

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 32, ISSUE 2/2005
(141–392)

Postępy
Biologii
Komórki

Advances
in Cell
Biology

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

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

Redaguje Kolegium – Editors:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

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

Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 8340 344, fax 8340470, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl.

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

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

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd.24,0. Ark. druk.16,0. Podpisano do druku w maju i druk ukończono w czerwcu 2005 r.

W tym Zeszytcie

Duża zmienność genetyczna pozwala bakteriom zasiedlać różnorodne nisze ekologiczne oraz umożliwia szybką adaptację do zmiennych warunków środowiska. Jednym z mechanizmów umożliwiającym bakteriom regulację ważnych funkcji życiowych jest wykryty w ostatnich latach układ komunikowania się bakterii w obrębie gatunku, jak i między gatunkami. Te niezwykle ważne wyniki doprowadziły do wykrycia chemicznych cząsteczek sygnałowych bakterii, jak również ich receptorów. Funkcje ligandów u bakterii Gram-ujemnych pełnią acylowane laktony homoseryny, zaś u bakterii Gram-dodatnich oligopeptydy. Więcej informacji na ten temat znajdzie Czytelnik na stronie 231.

Przeszczepianie unaczynionych narządów jest obecnie rutynowym postępowaniem terapeutycznym ratującym życie wielu chorym. Jednym z ważnych celów immunologii transplantacyjnej jest poszukiwanie skutecznych sposobów indukcji tolerancji wobec antygenów dawcy. W badaniach na modelach zwierzęcych stwierdzono, że cel ten można osiągnąć poprzez chimeryzm układu krwiotwórczego. Przez transfuzję komórek krwiotwórczych szpiku kostnego od dawcy narządu można uzyskać tolerancję immunologiczną dla alloprzeszczepu tego narządu. Osiągnięcia w tej dziedzinie w badaniach gryzoni oraz wynikające z nich potencjalne implikacje terapeutyczne u ludzi omówiono na stronie 215.

Peptyd ghrelina jest endogennym ligandem receptora hormonu wzrostu. Peptyd jest syntetyzowany głównie w komórkach X/A żołądka, a w mniejszych ilościach także w podwzgórzu, przysadce mózgowej, jelitach, korze nadnerczy, łożysku, kardiomiocytach, limfocytach T oraz monocytach. Ghrelina jest obwodowym hormonem pobudzającym apetyt i pobieranie pokarmu poprzez stymulację komórek wydzielających neuropeptyd Y i AgRP w jądrze łukowatym podwzgórza oraz hamowanie anoreksygennego działania melanokortyny. Więcej o ghrelinie jest na stronie 257.

Szpiczak mnogi (*myeloma multiplex*) jest nowotworem charakteryzującym się niekontrolowanym rozrostem plazmacytów. Szpiczak jest leczony standardową chemioterapią, jednak nie można tym sposobem osiągnąć całkowitego wyleczenia chorego. Wprowadzenie lepszych technik oceny choroby resztkowej (MRD – *minimal residual disease*) umożliwi wczesne rozpoznanie i leczenie nawrotu choroby. Zalety oraz wady różnych sposobów badania MRD u chorych na szpiczaka oraz ich zastosowania kliniczne omówiono na stronie 273 i 281.

Klasyczny model budowy błony komórkowej został ostatnio zmodyfikowany. Przekonano się, że cząsteczki lipidów w błonie nie mają rozmieszczenia przypadkowego, ale tworzą mikrodomeny wzbogacone w cholesterol, sfingolipidy i gangliozydy. Te mikrodomeny obserwowano również w żywych komórkach, a ich rolę w homeostazie komórki oraz patogenizie chorób przedstawiono na str.293.

Apoptoza komórek jest powszechnym zjawiskiem, również obserwowanym w erytrocytach. Więcej na ten temat Czytelnik znajdzie na stronie 359.

Prof. dr hab. M.Olszewska prosi o nie nadsyłanie prac w okresie maj-październik 2005 (remont Zakładu).

FAGOWE BIBLIOTEKI PEPTYDOWE PRZYKŁAD ZASTOSOWANIA W BADANIACH NAD RAKIEM

PHAGE-DISPLAYED PEPTIDE LIBRARIES
AN APPLICATION IN CANCER RESEARCH

Dominik CZAPLICKI

Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii, Wydział Biotechnologii UJ, Kraków

Streszczenie: Zagadnienie interakcji cząsteczek zależnej od ich przestrzennej struktury jest kluczowe dla wielu dziedzin biologii. Metody tworzenia bibliotek zawierających ogromną pulę różnych cząsteczek pozwalają na nowe podejście do poszukiwania i badania ligandów. Jedną z takich metod jest technologia *phage display* oparta na bibliotece sekwencji peptydów prezentowanych na powierzchni bakteriofagów nitkowatych. Spośród wielu zastosowań tej techniki na uwagę zasługuje procedura uzyskiwania epitopów peptydowych (mimeotopów) identycznych strukturalnie z wybranym epitopem. Strategia zastosowania mimeotopów zamiast antygenów glikolipidowych otwiera nowe możliwości czynnej immunoterapii nowotworów. Przykładem takiego podejścia badawczego jest poszukiwanie sekwencji peptydów imitujących strukturalnie gangliozyd G_{D2} obecny na komórkach nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma).

Słowa kluczowe: biblioteki peptydowe, phage display, mimeotopy, immunoterapia nowotworów.

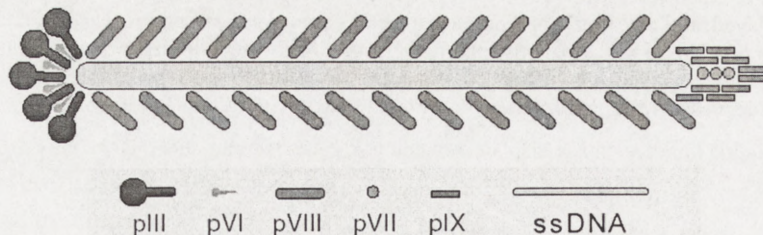
Summary: The problem of molecules interaction based on the spatial structure is central to many fields of biology. Methods of building libraries that contain vast numbers of different molecules offer new approach in ligand-oriented research. One of these methods is phage display technology using libraries of peptides displayed on filamentous phage particles. Among many applications of the technique, structural peptide mimicry seems to be particularly important, since it opens a possibility for cancer immunotherapy to utilise peptide epitopes instead of glycolipid ones. The search for peptide sequences that mimic G_{D2} ganglioside present on neuroblastoma cancer cells comes as an example of this strategy.

Keywords: peptide libraries, phage display, mimeotopes, cancer immunotherapy.

*Praca była finansowana przez grant 3P05A 00124 Ministerstwa Nauki i Informatyzacji.

Oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami oparte na ich przestrzennym dopasowaniu jest podstawą zjawisk biologicznych na poziomie molekularnym. Wiązanie substratu przez enzym, łączenie się hormonu z jego receptorem, adhezja komórek czy reakcja antygen - przeciwciało, choć stanowią jedynie skromny wybór takich oddziaływań, świadczą o ich powszechności i ogromnym znaczeniu, a także możliwości praktycznych zastosowań. Badanie takich procesów stanowi niewątpliwie kluczowe zagadnienie szeroko pojętej biologii molekularnej, a podczas ostatnich kilkunastu lat opracowane zostały metody umożliwiające bezprecedensowy postęp w tej dziedzinie. Metody te pozwalają na poszukiwanie ligandów dla rozmaitych celów biologicznych przy wykorzystaniu bibliotek, to jest ogromnych zbiorów cząsteczek o cechach potencjalnych ligandów. Biblioteki takie mogą zostać utworzone metodami chemii kombinatorycznej, co ma swoje zastosowanie w poszukiwaniu substancji o określonym działaniu farmakologicznym (ang. *drug discovery*). Istnieją również biblioteki, które budowane są dzięki technikom rekombinacji DNA i mogą się składać z oligonukleotydów RNA lub DNA (aptamerów), a nawet kompletnych wirionów zawierających na swej powierzchni potencjalne ligandy. W pierwszym przypadku mamy do czynienia z technologią SELEX (ang. *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) [7,8], natomiast w drugim – z metodą przeszukiwania bibliotek fagowych (ang. *phage display*). Znamienneą cechą obu jest zastosowanie strategii ewolucji powinowactwa, która opiera się na wyławianiu z biblioteki wielu ligandów o wysokim powinowactwie, a następnie stopniowym wzbogacaniu ich puli w ligandy najlepiej wiążące cząsteczkę docelową. Charakterystyczny dla technik wykorzystujących przeszukiwanie bibliotek jest fakt, iż selekcja ligandów nie wymaga żadnej wiedzy o strukturze cząsteczki docelowej, co powoduje wszechstronność zastosowań wspomnianych metod. Technologie SELEX oraz *phage display* są w dużym stopniu komplementarne, a dalsza część artykułu traktowała będzie o podstawach i zastosowaniach drugiej z nich.

Fundamentem metody przeszukiwania bibliotek fagowych jest wykorzystanie bakteriofagów nitkowatych należących do rodzaju *Inoviridae*. Stanowią one grupę wirusów o charakterystycznej budowie (ryc. 1) infekujących bakterie *Escherichia coli* za pośrednictwem pili F. Infekcja nie powoduje lizy komórek bakteryjnych, a jedynie około dwukrotne spowolnienie ich wzrostu. Do rodzaju *Inoviridae* należy kilka gatunków bakteriofagów (fl, fd, M13), lecz ich sekwencje DNA są identyczne w ponad 98%.



RYCINA 1. Schemat budowy fagów nitkowatych na przykładzie M13

Genomem fagów nitkowatych jest jednoniciowa cząsteczka DNA (ssDNA) o długości około 6500 zasad zawierająca 11 genów – około połowa z nich koduje białka kapsydu. Główne znaczenie strukturalne ma białko VIII (g8p) występujące na powierzchni wirionu w około 2700 kopiach, natomiast najważniejsze dla infekcyjności faga jest białko III (g3p) obecne w 5 kopiach.

Kluczowy dla idei *phage display* jest fakt, iż niektóre białka bakteriofagów typu M13 można modyfikować bez znaczącego wpływu na pełnioną przez nie funkcję. Zmiany te mogą między innymi polegać na fuzji z obcym białkiem lub peptydem, co prowadzi do powstania zrekombinowanego białka fagowego. Jeśli rekombinacja dotyczy składnika kapsydu, to takie obce białka lub peptydy mogą być eksponowane (ang. *displayed*) na powierzchni bakteriofaga. Mogą one tym samym oddziaływać ze znajdującym się w otoczeniu przeciwciałem lub innym ligandem. Co niezmiernie istotne, sekwencja nukleotydowa prezentowanych w ten sposób cząsteczek znajduje się w genomie faga – manipulując genotypem można więc znaleźć odpowiedni fenotyp.

Zastosowane w metodzie *phage display* podejście polega najczęściej na stworzeniu biblioteki złożonej z milionów lub miliardów rozmaitych sekwencji prezentowanych na powierzchni bakteriofagów nitkowatych. W skrócie – używane w tym celu są rekombinacyjne techniki DNA pozwalające na wygenerowanie ogromnej różnorodności sekwencji włączanych następnie w wybrane miejsce wirusowego genu kodującego białko kapsydu, najczęściej g3p lub g8p. Następnie tworzone są kłony bakteriofagów, z których każdy ma inną wersję zrekombinowanego genu, a zatem prezentuje odmienną sekwencję aminokwasową. Tym sposobem otrzymuje się fagową bibliotekę peptydową o złożoności określonej liczbą występujących w niej sekwencji.

Zbiór sekwencji zawartych w bibliotece fagowej stanowi podstawę dla procedury selekcyjnej określanej jako *panning*. Ogólnie polega ona na przeprowadzaniu kolejnych cykli wiązania fagów z ligandem oraz namnażania tak wybranych klonów. Jako ligand do selekcji służyć może zarówno przeciwciało, jak i enzym, receptor lub niemal dowolna inna cząsteczka. Każdy cykl (runda) powoduje znaczne wzbogacenie puli fagów w te, które przenoszą sekwencje o wysokim powinowactwie do ligandu. Wykorzystując zatem zróżnicowane powinowactwo peptydów w bibliotece można w ten sposób przeprowadzić wydajną selekcję fenotypów. Przez fenotyp rozumiana jest tutaj sekwencja występująca na danym klonie fagów, natomiast genotyp to kodujący ją fragment DNA. Co charakterystyczne, dopiero analiza genomu otrzymanych klonów pozwala na ujawnienie sekwencji aminokwasowych wyselekcjonowanych przez *panning*.

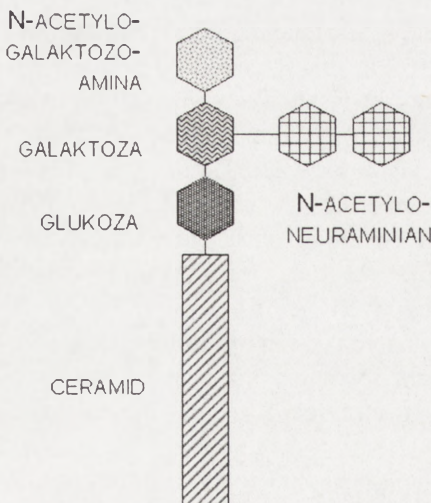
Przedstawiona tu pokrótce technologia otwiera pole dla nowych, niezwykle ciekawych zastosowań. O skali możliwości oferowanych przez metodę *phage display* świadczyć może krótka lista przykładowych badań prowadzonych z jej użyciem:

- identyfikacja nowych substratów enzymatycznych oraz inhibitorów [13],
- poszukiwanie antagonistów i agonistów rozmaitych receptorów [5],
- badanie oddziaływań białko-białko zachodzących dzięki domenom rozpoznającym specyficzne sekwencje [10],
- odkrywanie nieznanych bakteryjnych białek błonowych i pozakomórkowych [20],
- identyfikacja sekwencji aminokwasowych o potencjalnych właściwościach alergicznych [18],

- mapowanie epitopów rozpoznawanych przez specyficzne przeciwciała zarówno monoklonalne, jak i poliklonalne [15],
- inżynieria przeciwciał i tworzenie nowych fragmentów wiążących antygen [12],
- poszukiwanie sekwencji peptydów wiążących się specyficznie do komórek nowotworowych [11, 17].

Kolejnym zastosowaniem przeszukiwania fagowych bibliotek peptydowych, które daje nowe praktyczne możliwości w medycynie, jest **mimikra peptydów** (ang. *peptide mimics*). Podstawą tej strategii jest założenie, że reakcje odpornościowe polegające na rozpoznaniu antygeny opierają się w istocie na rozpoznaniu struktury przestrzennej jego fragmentu – epitopu. Kluczowe jest przy tym przestrzenne dopasowanie epitopu do struktury odpowiedniego receptora. Wynika z tego, iż dwa epitopy zbliżone pod względem strukturalnym będą immunologicznie równocenne, bez względu na ich naturę chemiczną. Dzięki metodzie *phage display* możliwe staje się zastępowanie antygenów cukrowych i glikolipidowych odpowiednimi peptydami [6]. Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych (skierowanych przeciw epitopowi antygeny glikolipidowego) do przeszukiwania fagowej biblioteki peptydowej pozwala na odnalezienie szeregu sekwencji imitujących w różnym stopniu ten epitop. Odnalezione w ten sposób peptydy są określane jako mimotopy lub mimeotopy.

Skuteczna immunoterapia wymaga istnienia specyficznego i immunogenego antygeny. Mimikra peptydów staje się niezwykle ważnym narzędziem w przypadkach, gdy taka terapia jest utrudniona ze względu na charakter chemiczny antygeny. Przykładem jest gangliozyd G_{D2} (disialogangliozyd) – glikolipidowy antygen powierzchniowy stanowiący składnik błony komórkowej, pochodna cerebrozydu zawierająca dwie reszty kwasu sjałowego (ryc. 2). Jest to antygen właściwy komórkom pochodzenia neuroektodermalnego, ale jego zawartość jest szczególnie duża na komórkach nowotworowych nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma). Nowotwór ten

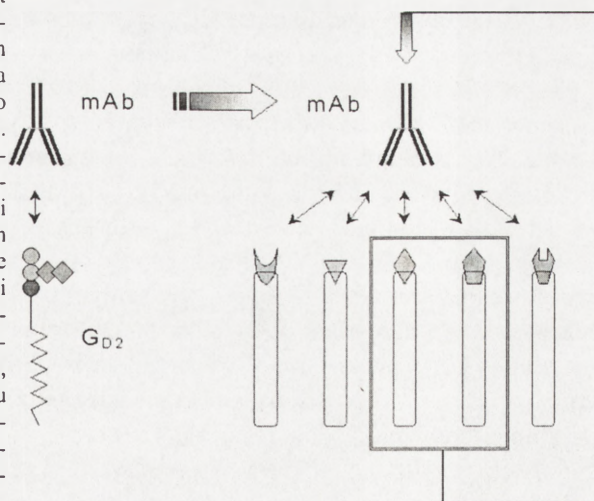


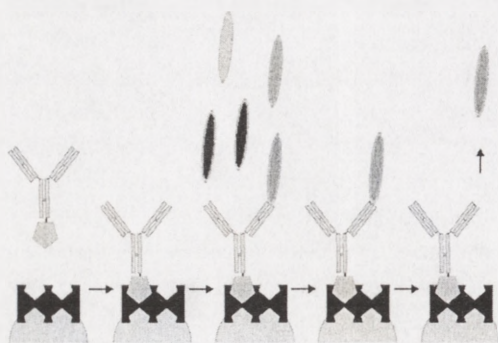
RYCINA 2. Schemat struktury gangliozydu G_{D2}

jest trzecim pod względem częstości występowania nowotworem dziecięcym, a stosowane metody jego terapii są często niewystarczające. Jedną z proponowanych w związku z tym strategii terapeutycznych jest immunoterapia skierowana przeciw gangliozydowi G_{D2} . Dotychczasowe wykorzystanie gangliozydu G_{D2} jako celu immunoterapii opierało się na podawaniu gotowych przeciwciał. Metoda ta ma swoje zalety, ale ma również szereg wad, w tym niską penetrację guza przez przeciwciała oraz stosunkowo krótki czas ich półtrwania w organizmie. Ponadto bierna immunoterapia jest z definicji ograniczona w czasie i nie prowadzi do powstania żadnej długotrwałej odporności. Wad tych pozbawiona jest immunoterapia czynna, a więc taka, która polega na wprowadzeniu do organizmu antygeny i wywołania naturalnej odpowiedzi na ten antygen. Skuteczna immunizacja antygenem wymaga jednak, aby miał on określone cechy biochemiczne warunkujące odpowiednio wysoką immunogenność. Do skutecznych immunogenów należą białka – gangliozydy są jednak antygenami glikolipidowymi o niskiej immunogenności, a nawet o cechach immunosupresyjnych. Charakter biochemiczny glikolipidów determinuje ich własności antygenowe i powoduje, że wiele z nich należy do grupy antygenów grasiczniezależnych, wywołujących odpowiedź humoralną bez pomocy limfocytów Th [14]. W efekcie glikolipidy indukują produkcję krótkotrwałych przeciwciał IgM i nie są w stanie wywołać wtórnej odpowiedzi ani pamięci immunologicznej. Ponadto problemy sprawia już samo oczyszczanie i synteza glikolipidów.

Z pomocą przychodzi tu technika *phage display* – dzięki zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych przeciw gangliozydowi G_{D2} [16] możliwa staje się selekcja mimeotopów peptydowych imitujących strukturę przestrzenną epitopu gangliozydu (ryc. 3). Otrzymane sekwencje peptydów można następnie wykorzystać w immunoterapii spodziewając się, że wywołana odpowiedź obejmie również pierwotny antygen [21]. Immunizacja mimeotopami ma liczne zalety. Mimeotopy peptydowe są antygenami grasiczozależnymi i indukują pełną, a więc humoralną i komórkową, odpowiedź organizmu.

RYCINA 3. Uproszczony schemat poszukiwania mimeotopów peptydowych metodą *phage display*. Pierwszym etapem jest wytworzenie przeciwciała monoklonalnego (mAb) specyficznego względem pierwotnego antygeny (G_{D2}). Następnie przeciwciało to jest wykorzystywane do przeszukiwania fagowych bibliotek peptydowych, czyli ogromnej puli peptydów o różnych sekwencjach (oznaczonych jako kolejne figury) występujących na powierzchni fagów nitkowatych. Następnie fagi niezwiązane są odpłukiwane (ang. *panning*), a pozostałe, po namnożeniu, przeznaczane są do kolejnego cyklu wiązania / odpłukiwania. Po kilku cyklach uzyskuje się pulę fagów o największym powinowactwie do przeciwciała monoklonalnego



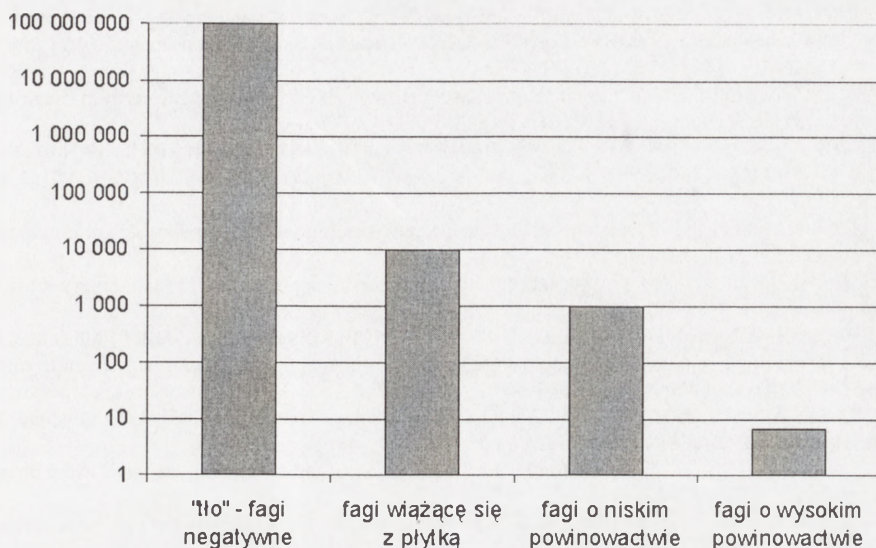


RYCINA 4. *Phage display* – schemat selekcji ligandów. Używane do selekcji przeciwciała 14G2a przeciw G_{D2} są immobilizowane na płytkach 96-studzienkowych. Następuje inkubacja biblioteki, po czym wolne bakteriofagi są starannie odplukiwane. Fagi związane na przeciwciałach wymywa się i infekuje *E. coli* szczepu K91. Namnożone fagi stanowią bibliotekę pośrednią używaną w kolejnych rundach selekcji

Ponadto są w stanie wywołać produkcję przeciwciał o wysokim powinowactwie do antygeny oraz wytworzyć pamięć immunologiczną. Peptydy są łatwe do otrzymania syntetycznie, również ich oczyszczanie można przeprowadzić w stosunkowo prosty sposób. Ich aminokwasowa struktura pozwala na skonstruowanie skutecznej szczepionki DNA zawierającej minigeny kodujące mimeotopy [9]. Dzięki tym cechom oraz łatwej modulacji odpowiedzi przez ingerencję w sekwencję amino kwasową immunizacja mimeotopami okazuje się skuteczna w przypadku infekcji wirusowych [19] oraz pasożytniczych [1]. Mimeotopy białek związanych z nowotworami również mogą znaleźć zastosowanie terapeutyczne [2].

W celu uzyskania mimeotopów peptydowych użytecznych w immunoterapii neuroblastoma nasz zespół posłużył się fagową biblioteką peptydową LX-8/f88-4 opartą na zrekombinowanym białku VIII (g8p) [4]. Prezentowane w niej peptydy składają się z 8 aminokwasów oflankowanych resztami cysteiny, dzięki czemu tworzy się zamknięta mostkiem dwusiarczkowym pętla. Złożoność biblioteki LX-8 wynosi $1,5 \times 10^9$ sekwencji. Szczegółowy opis zastosowanych procedur i metodyki oraz obszerne wprowadzenie w technologię *phage display* znajduje się w pracy Barbasa i in. [3]. Schematyczny przebieg przykładowej rundy selekcji przedstawiono na rycinie 4. Gospodarzem bakteriofagów, wykorzystywanym do ich namnażania, był szczep *Escherichia coli* K91. Dla wydajnej selekcji peptydów wymagane jest jak najpełniejsze usunięcie bakteriofagów wiążących się niespecyficznie do elementów układu, czyli do streptawidyny, polistyrenu i przeciwciał poza miejscem wiążącym antygen. Wynika to z proporcji klonów bakteriofagów wchodzących w skład biblioteki (ryc. 5). Po przeprowadzeniu sześciu kolejnych rund selekcji pojedyncze klony pozytywne były izolowane z puli fagów. Po otrzymaniu i namnożeniu ich jednoniciowe DNA było sekwencjonowane w obrębie zrekombinowanego rejonu białka VIII. Jest to sposób na poznanie genotypu reprezentowanego przez wyselekcjonowany fenotyp i tym samym ustalenie sekwencji aminokwasów w prezentowanym peptydzie. W wyniku procedury przeszukiwania fagowej biblioteki peptydowej LX-8 przy pomocy przeciwciała 14G2a odnalezione zostało 5 sekwencji peptydów. Dalszym etapem badań będzie ich analiza *in vitro* oraz ocena przydatności do immunoterapii na modelu mysim BALB/c.

Podsumowując, technologia *phage display* jest uniwersalnym sposobem poszukiwania ligandów dającym ogromne możliwości i wielość zastosowań. Jest przy tym



RYCINA 5. Pule fagów w bibliotece złożonej z 10^8 klonów. Przeważająca większość sekwencji obecnych na powierzchni bakteriofagów nie wykazuje powinowactwa do cząsteczki selekcyjnej. O kilka rzędów wielkości mniej jest tych, które wiążą się niespecyficycznie do elementów układu („wiążące się z płytką”). Klony stanowiące ostateczny cel selekcji powinowactwa są zatem prawdziwą „igłą w stogu siana”

metodą stosunkowo tanią, niewymagającą specjalnego wyposażenia czy zestawu kosztownych odczynników. *Panning* można przeprowadzać dla wielu ligandów selekcyjnych jednocześnie przy zastosowaniu mikroplatek polistyrenowych. Niestety, opisywana metoda nie jest pozbawiona wad: procedura selekcyjna opiera się na reprezentatywnej bibliotece początkowej, której skonstruowanie jest bardzo pracochłonne. Ponadto, biblioteki zawierają zwykle jedynie małą frakcję możliwych sekwencji, co wynika z astronomicznej liczby kombinacji występujących już dla peptydów o długości kilku czy kilkunastu aminokwasów. Kolejnym ograniczeniem jest wielkość cząsteczki prezentowanej na powierzchni kapsydu – zbyt duży ligand zmniejsza infekcyjność bakteriofagów, wpływa na ich namnażanie lub powoduje agregację. Pomimo tych wad wydaje się, że przeszukiwanie fagowych bibliotek peptydowych należy do najlepszych istniejących strategii poszukiwania ligandów dla cząsteczek biologicznych i jest szczególnie przydatne w badaniach zorientowanych na immunoterapię.

LITERATURA

- [1] ARNON R, TARRAB-HAZDAI R, STEWARD M. A mimotope peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni*: synthesis and characterization. *Immunology* 2000; **101**(4): 555–562.
- [2] ASHOK BT, DAVID L, CHEN YG, GARIKAPATY VP, CHANDER B, KANDUC D, MITTELMAN A, TIWARI RK. Peptide mimotopes of oncoproteins as therapeutic agents in breast cancer. *Int J Mol Med* 2003 Apr; **11**(4): 465–471.
- [3] BARBAS CF, BURTON DR, SCOTT JK, SILVERMAN GJ. Phage display – a laboratory manual. New York: Cold Springs Harbor Laboratory Press 2001.

- [4] BONNYCASTLE LL, MEHROKE JS, RASHED M, GONG X, SCOTT JK. Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. *J Mol Biol* 1996 May 24; **258**(5): 747–762.
- [5] CAIN SA, HIGGINBOTTOM A, MONK PN. Characterisation of C5a receptor agonists from phage display libraries. *Biochem Pharmacol* 2003; **66**(9): 1833–1840.
- [6] CUNTO-AMESTY G, DAM TK, LUO P, MONZAVI-KARBASSI B, BREWER CF, VAN COTT TC, KIEBER-EMMONS T. Directing the immune response to carbohydrate antigens. *J Biol Chem* 2001; **276**(32): 30490–30498.
- [7] FAMULOK M, MAYER G. Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; **243**: 123–136.
- [8] JAMES W. Nucleic acid and polypeptide aptamers: a powerful approach to ligand discovery. *Curr Opin Pharmacol* 2001; **1**(5): 540–546.
- [9] KIEBER-EMMONS T, MONZAVI-KARBASSI B, WANG B, LUO P, WEINER DB. Cutting edge: DNA immunization with minigenes of carbohydrate mimotopes induce functional anti-carbohydrate antibody response. *J Immunol* 2000; **165**(2): 623–627.
- [10] KURAKIN A, WU S, BREDESEN DE. Target-assisted iterative screening of phage surface display cDNA libraries. *Methods Mol Biol* 2004; **278**: 47–60.
- [11] LANDON LA, DEUTSCHER SL. Combinatorial discovery of tumor targeting peptides using phage display. *J Cell Biochem* 2003; **90**(3): 509–517.
- [12] LEE CV, SIDHU SS, FUH G. Bivalent antibody phage display mimics natural immunoglobulin. *J Immunol Methods* 2004; **284**(1–2): 119–132.
- [13] MELO FR, MELLO MO, FRANCO OL, RIGDEN DJ, MELLO LV, GENU AM, SILVA-FILHO MC, GLED-DIE S, GROSSI-DE-SA MF. Use of phage display to select novel cystatins specific for *Acanthoscelides obtectus* cysteine proteinases. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1651**(1–2): 146–152.
- [14] MOND JJ, VOS Q, LEES A, SNAPPER CM. T cell independent antigens. *Curr Opin Immunol* 1995; **7**(3): 349–354.
- [15] MUHLE C, SCHULZ-DROST S, KHRENOV AV, SAENKO EL, KLINGE J, SCHNEIDER H. Epitope mapping of polyclonal clotting factor VIII-inhibitory antibodies using phage display. *Thromb Haemost* 2004; **91**(3): 619–625.
- [16] MUJOO K, KIPPS TJ, YANG HM, CHERESH DA, WARGALLA U, SANDER DJ, REISFELD RA. Functional properties and effect on growth suppression of human neuroblastoma tumors by isotype switch variants of monoclonal antiganglioside GD2 antibody 14.18. *Cancer Res* 1989 Jun 1; **49**(11): 2857–2861.
- [17] OYAMA T, SYKES KF, SAMLI KN, MINNA JD, JOHNSTON SA, BROWN KC. Isolation of lung tumor specific peptides from a random peptide library: generation of diagnostic and cell-targeting reagents. *Cancer Lett* 2003; **202**(2): 219–230.
- [18] RHYNER C, WEICHEL M, FLUCKIGER S, HEMMANN S, KLEBER-JANKE T, CRAMERI R. Cloning allergens via phage display. *Methods* 2004; **32**(3): 212–218.
- [19] ROCCASECCA R, FOLGORI A, ERCOLE BB, PUNTORIERO G, LAHM A, ZUCCHELLI S, TAFI R, PEZZANERA M, GALFRE G, TRAMONTANO A, MONDELLI MU, PESSI A, NICOSIA A, CORTESE R, MEOLA A. Induction of cross-reactive humoral immune response by immunization with mimotopes of the hypervariable region 1 of the hepatitis C virus. *Int Rev Immunol* 2001; **20**(2): 289–300.
- [20] WALL T, ROOS S, JACOBSSON K, ROSANDER A, JONSSON H. Phage display reveals 52 novel extracellular and transmembrane proteins from *Lactobacillus reuteri* DSM 20016(T). *Microbiology* 2003; **149**: 3493–3505.
- [21] YIP YL, WARD RL. Application of phage display technology to cancer research. *Curr Pharm Biotechnol* 2002; **3**(1): 29–43.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 06.11.2004 r.

Przyjęto: 22.12.2004 r.

ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków

email: dominik@mol.uj.edu.pl

TOLERANCJA MÓZGU NA NIEDOKRWIENIE

BRAIN TOLERANCE TO ISCHEMIA

Joanna PERA

Klinika Neurologii Collegium Medicum UJ, Kraków

Streszczenie: Możliwość wyindukowania w mózgu tolerancji na niedokrwienie pod wpływem różnych bodźców przyciąga uwagę wielu badaczy. Perspektywa uczynienia mózgu, nawet przejściowo, bardziej opornym na zmniejszony przepływ krwi wydaje się być atrakcyjną z uwagi na jej potencjalne zastosowanie kliniczne. Mechanizmy molekularne hartowania zostały, jak dotąd, poznane jedynie fragmentarycznie. Praca niniejsza jest przeglądem dotychczasowej wiedzy o czynnikach zaangażowanych w indukcję tolerancji na niedokrwienie.

Słowa kluczowe: mózg, hartowanie, tolerancja.

Summary: The possibility to induce tolerance to brain ischemia by different stimuli draws attention of many researchers. The perspective to make the brain, even transiently, more resistant to reduced blood flow seems to be very attractive considering its potentially clinical application. Molecular mechanisms of preconditioning are known only fragmentary, so far. The present work summarizes the current knowledge about factors involved in the induction of brain ischemic tolerance.

Key words: brain, preconditioning, tolerance.

Działając na mózg czynnikami potencjalnie szkodliwymi, ale o niewielkim, nieszkodzącym natężeniu, można wyindukować stan tolerancji na znacznie silniejsze bodźce, w tym również na niedokrwienie. Ta możliwość hartowania (ang. *preconditioning*) dotyczy nie tylko układu nerwowego. Jej obecność została potwierdzona w wielu różnych tkankach, m.in. w mięśniu sercowym [25, 77], mięśniach szkieletowych [113], układzie pokarmowym [58, 72], nerkach [131], siatkówce [131].

W układzie nerwowym indukcja tolerancji na niedokrwienie została po raz pierwszy opisana w 1990 r. W modelu niedokrwienia przodomózgowia u myszokoczków stwierdzono, że uszkodzenie, mierzone liczbą martwych komórek piramidowych w polu CA1 hipokampa, było znacznie mniejsze (nawet o 90%), jeśli 5-minutowe zamknięcie tętnic szyjnych wspólnych poprzedzono na 24 godziny dwoma 2-minutowymi epizodami niedokrwienia. Oznaczało to, że pod wpływem krótkotrwałego niedokrwienia doszło do rozwoju tolerancji mózgu na kolejne, znacznie dłuższe [54]. W następnych badaniach

stwierdzono, że tego rodzaju oporność na niedokrwienie można wyindukować także w innych obszarach mózgu (korze, wzgórzu, jądrach podstawy) [53], rdzeniu kręgowym [111] i u różnych gatunków zwierząt [54, 111, 116, 120]. Zjawisko to można ponadto obserwować w różnych modelach eksperymentalnych zarówno *in vitro* [13, 99], jak i *in vivo* [116, 120]. W przypadku hartowania przez niedokrwienie stwierdzono też, że epizod hartujący nie musi być wykonany w ten sam sposób, co kolejny epizod długotrwałego niedokrwienia. To znaczy, że jeśli do hartowania wykorzystano niedokrwienie globalne mózgu, to efekt ochronny jest widoczny zarówno wtedy, gdy kolejny epizod niedokrwienia jest wywołany tą samą metodą [54], jak i wtedy, gdy zastosuje się model niedokrwienia ogniskowego [69]. Analogicznie, wywołując wstępnie niedokrwienie ogniskowe mózgu, neuroprotekcję obserwuje się i po późniejszym niedokrwieniu ogniskowym [5, 16], i po globalnym [31]. Istotne jest jednak, że tolerancja rozwija się tylko w obszarze poddanym działaniu bodźca hartującego, gdyż przejściowe niedokrwienie w zakresie jednej z tętnic środkowych mózgu nie chroni półkuli kontralateralnej [5, 66].

Z klinicznego punktu widzenia interesujące jest istnienie tolerancji krzyżowej (ang. *cross-tolerance*), czyli możliwość wywołania tolerancji na inny czynnik niż bodziec hartujący. Pozwala to mieć nadzieję na terapeutyczne zastosowanie hartowania, na przykład u osób o wysokim ryzyku zachorowania na udar mózgu, przed zabiegami neurochirurgicznymi, czy kardiochirurgicznymi. Szczególnie, że były już pierwsze próby kliniczne praktycznego wykorzystania hartowania serca [25] i wątroby [58].

Szereg czynników fizycznych i chemicznych może wywołać tolerancję mózgu na niedokrwienie. Udowodniono to w odniesieniu do m.in. hipoksji/anoksji (prawdopodobnie przez obniżenie ciśnienia parcjalnego tlenu w tkance) [6, 29, 101], hipertermii [17, 55], hipotermii [86, 87], urazu mechanicznego [95], *spreading depression* [57, 70], napadów drgawkowych wywołanych podaniem kwasu kainowego [7, 8] bądź bikukuliny [112], kwasu 3-nitropropionowego (3-NP, nieodwracalnego inhibitora dehydrogenazy bursztynianowej, enzymu łańcucha oddechowego) [80, 107, 123, 142], glutaminianu [83, 114], 2-deoksyglukozy (niemetabolizowalnego analogu glukozy) [149], lipopolisacharydu (LPS) [126] lub jego pochodnej (DPL, ang. *diphosphoryl lipid A* [129]), wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [8, 9], niektórych antybiotyków (erytromycyny, kanamycyny, ampicyliny) [38], czy wreszcie wziewnych środków znieczulających, jak na przykład izofluran [43, 153].

CZAS TRWANIA HARTOWANIA

Wiadomo, że obecność tolerancji jest zjawiskiem przejściowym, rozwijającym się po upływie pewnego czasu. Zarówno okres jej trwania, jak i długość latencji mogą być różne w różnych modelach doświadczalnych. Zasadniczo wyróżnia się dwie formy hartowania: wczesną (klasyczną) i opóźnioną.

Okno czasowe dla hartowania wczesnego zaczyna się kilka minut od zadziałania czynnika hartującego i trwa do kilku (2–6) godzin [80, 95, 96]. Ta forma najpraw-

dopodobniej nie zależy od syntezy białek, a raczej od ich modyfikacji posttranslacyjnych [52, 138]. Znaczącą rolę wydaje się odgrywać adenozyzna i jej receptor A1 oraz kanały potasowe zależne od ATP [21]. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań *in vivo*, dotyczące tej metody indukcji tolerancji, nie są jednoznaczne. Niedokrwienie przodomózgowia u szczura, wywołane 30 minut po hartowaniu, powodowało wprawdzie mniejszy ubytek liczby neuronów w polu CA1 hipokampa oceniany po 3 dniach, w porównaniu ze zwierzętami niehartowanymi, ale po upływie 7 dni ten efekt neuroprotekcynny niemal całkowicie zanikał [96]. Z kolei, w modelu ogniskowego niedokrwienia mózgu u myszy, wykonanie hartowania w podobnym odstępnie czasowym powodowało, że wielkość zawału oceniana po 24 godzinach była mniejsza u zwierząt hartowanych, ale brak jest danych, czy to ochronne działanie utrzymywało się również w późniejszym czasie [120]. Natomiast 30-minutowe zamknięcie t. środkowej mózgu u szczura na godzinę przed jej ponownym, 3-godzinnym zamknięciem, skutkowało zmniejszeniem zawału, również po 7 dniach od niedokrwienia [79].

Znacznie lepiej udokumentowane jest korzystne działanie hartowania opóźnionego w układzie nerwowym. Zostało ono potwierdzone w licznych modelach *in vitro* i *in vivo* [52, 138]. Pojawia się w 12–72 godziny od zadziałania czynnika hartującego i trwa do kilku- czy kilkunastu dni [5, 18, 47, 83]. Ta forma indukcji tolerancji zależy od syntezy białek – podanie cykloheksimidu (inhibitora translacji) znosi ochronne działanie tej postaci hartowania [5, 11, 142].

MECHANIZMY INDUKCJI TOLERANCJI NA NIEDOKRWIENIE

Molekularne mechanizmy leżące u podstaw tolerancji na niedokrwienie nie zostały jeszcze zbyt dobrze poznane. Czynnikiem odgrywającym rolę w indukcji tolerancji na niedokrwienie wymienianych jest wiele. Dla łatwiejszego opisu zjawiska Weih i wsp. zaproponowali wyróżnienie 3 faz hartowania: indukcji, transdukcji i tolerancji, analogicznie do sposobu opisywania przekazywania komórkowego [138]. Pamiętać jednak należy, że granice podziału są płynne i te same cząsteczki, czy też mechanizmy, mogą pojawiać się na różnych etapach rozwoju tolerancji [21, 25]. Poniżej prezentowane są te czynniki, których udział w hartowaniu wydaje się – przy obecnym stanie wiedzy – pewny.

Glutaminian i jego receptory

Antagoniści receptora NMDA zarówno kompetytywni (LY202157), jak i niekompetytywni (MK-801) znoszą ochronne działanie hartowania [10, 26, 48]. W jednym tylko badaniu podanie niekompetytywnego antagonisty – memantyny – wzmacniało nawet, choć w niewielkim stopniu, hartujące działanie 3-NP [26]. Na temat receptora AMPA dane są bardziej niejednoznaczne. Zarówno wzrost ekspresji podjednostki GluR2 [3, 56], jak i jej spadek [119] był obserwowany w neuronach hipokampa poddanych hartowaniu. W hodowli neuronów korowych stwierdzono ponadto, że w stanie tolerancji

stężenie zewnątrzkomórkowego glutaminianu było niższe niż przy braku hartowania i jednocześnie indukowana była ekspresja jego transporterów EAAT2 oraz EAAT3 [108]. Natomiast po *spreading depression* obserwowano spadek ekspresji transporterów EAAT1 i EAAT2 [23].

Jony wapniowe

Mimo napływu jonów do komórki, związanego z aktywacją receptorów NMDA, stężenie wewnątrzkomórkowe Ca^{2+} jest niższe po hartowaniu przez niedokrwienie [117]. Wiązane jest to m.in. z szybszym mitochondrialnym obrotem tymi jonami i większą aktywnością Ca^{2+} -ATPazy [116].

Jony cynkowe

Stężenie wewnątrzkomórkowe jonów Zn^{2+} , którym przypisywane jest działanie neurotoksyczne [61], było niższe po deprywacji glukozy i tlenu, jeżeli wcześniej została wyindukowana tolerancja w skrawkach hipokampa [74].

Adenozyna i jej receptory

Antagoniści receptora A1 blokują neuroprotektoryjny efekt hartowania w różnych modelach niedokrwienia [36, 79, 94], natomiast agoniści tego receptora wywierają działanie ochronne [36, 94]. Ponadto po epizodzie hartowania przez niedokrwienie w modelu globalnego niedokrwienia mózgu oraz po podaniu 3-NP, odnotowano wzrost ekspresji oraz powinowactwa receptorów A1 [132, 154, 155]. Proponowane mechanizmy neuroprotektoryjnego działania przez A1 to, m.in.: zmniejszanie syntezy cAMP, zmniejszanie napływu do komórek Ca^{2+} przez kanały typu N, hamowanie uwalniania glutaminianu i asparaginianu, aktywacja K_{ATP} i zwiększanie napływu K^{+} [155]. Znaczenie receptorów A2 w procesie indukcji tolerancji jest mniej pewne. Po krótkotrwałym niedokrwieniu stwierdzono wzrost ekspresji receptorów A2b na komórkach astrogleju [155].

Receptory opioidowe

W doświadczeniach na skrawkach mózdzku podanie morfiny chroniło przed późniejszą deprywacją glukozy i tlenu. Ten neuroprotektoryjny efekt zanikał przy podawaniu nieselektywnych antagonistów opioidowych, nieselektywnych antagonistów receptorów δ oraz selektywnych antagonistów receptorów $\delta 1$. Użycie selektywnych antagonistów receptorów $\delta 2$ nie wpływało na rozwój tolerancji [63].

Kanały potasowe zależne od ATP (K_{ATP})

Farmakologiczne otwarcie K_{ATP} ma działanie ochronne [35, 64, 104], natomiast inhibitory tych kanałów (w tym glibenklamid stosowany w leczeniu cukrzycy typu 2) znoszą ten efekt [37].

Wolne rodniki tlenowe

Podanie antyutleniaczy (witamina E, Cu/Zn SOD, dimetylomocznik) zapobiega wystąpieniu tolerancji [76, 103, 152]. Ponadto, po hartowaniu niedokrwinnym odnotowywano wzrost aktywności dysmutazy nadtlenkowej [46, 128], choć po wywołaniu fali depolaryzacji poziom ekspresji mRNA kodującego Mn SOD oraz Cu/Zn SOD nie zmieniał się [143].

Tlenek azotu (NO)

Wyższy poziom NO był obserwowany po *spreading depression* [143]. Zahamowanie syntazy tlenu azotu ogranicza, a podanie donorów NO naśladuje efekt neuroprotekcyny [15, 32, 33]. U myszy transgenicznym pozbawionych genu dla neuronalnej albo śródbłonkowej izoformy syntazy tlenu azotu (nNOS, eNOS) nie udało się wyindukować tolerancji na niedokrwienie mózgu [4]. Natomiast ekspresja NOS po hartowaniu może zależeć od rodzaju zastosowanego bodźca: po krótkotrwałym niedokrwieniu odnotowano wzrost białka eNOS [33], zaś po podaniu 3-NP poziom mRNA eNOS, nNOS oraz iNOS nie ulegał zmianie [133].

Kinazy białkowe

Opisywano zmiany aktywności kinaz białek: CaMKII (ang. *calcium/calmoduline kinase II*) [115], ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*) [32, 40, 116], PKC α , δ , ϵ (ang. *protein kinase C*) [59, 102], Akt/PKB (ang. *protein kinase B*) [141, 147], p38 [85] po indukcji tolerancji. W doświadczeniach prowadzonych na hodowli neuronów stwierdzono m.in., że aktywacja Ras jest warunkiem koniecznym i wystarczającym do rozwoju tolerancji na deprywację glukozy i tlenu [32].

Czynniki transkrypcyjne

Po hartowaniu obserwowano wzrost ekspresji genów: *c-fos*, *c-jun*, *zif268*, *junB* i *junD* oraz kodowanych przez nie białek [2, 5, 35, 57, 140]. Opisano także wzrost aktywności po epizodzie hartującym: AP-1 (ang. *activator protein-1*) [42, 148], NF- κ B (ang. *nuclear factor- κ B*) [8], CREB (ang. *cyclic AMP responsive element binding protein*) [78], HIF-1 (ang. *hypoxia inducible factor-1*) [6, 41, 109]. W przypadku tego ostatniego stwierdzono także podwyższoną ekspresję (mRNA i białko) niektórych genów kontrolowanych przez HIF-1: transportera glukozy GLUT-1, aldolazy, fosfofruktokinazy i dehydrogenazy mleczanowej [41].

Czynniki związane z translacją

Po niedokrwieniu globalnym, jako epizodzie hartującym, obserwowano zarówno zmniejszenie fosforylacji podjednostki α eIF2 oraz PERK (ang. *protein kinase-like ER eIF2 α kinase*) przy jednoczesnym wzroście ekspresji białka opiekuńczego GRP78 [34], jak i brak zmian w stopniu ufosforylowania eIF2 α , ale za to zwiększoną fosforylację innego czynnika inicjującego: eIF4E oraz białka wiążącego ten czynnik (eIF4E-BP) [27].

Przesunięcie równowagi w kierunku czynników antyapoptotycznych

Stwierdzano wzrost ekspresji *bcl-2* na poziomie mRNA i białka po zadziałaniu czynnikiem hartującym zwykle z towarzyszącym spadkiem ekspresji *bax* [82, 118, 134]. Z kolei podanie oligodezoksynukleotydów antysensowych dla *bcl-2* blokowało tolerancję [118]. Na temat roli kaspaz, wyniki dotychczasowych badań są niejednoznaczne. Aktywacja kaspazy 3 wydaje się być warunkiem koniecznym dla rozwoju tolerancji po hartowaniu niedokrwiennym bądź chemicznym [28, 73]. Jednocześnie w modelu niedokrwienia globalnego nie stwierdzono różnicy w poziomie ekspresji białek kaspazy 3 i 9, przy czym po hartowaniu szybciej malała aktywność kaspazy 3 oraz zahamowana była indukcja CAD (ang. *caspase-activated DNase*, jeden z efektorów kaspazy 3) w jądrach neuronów i fragmentacja DNA [125]. Inni badacze odnotowali po hartującym niedokrwieniu mniejszą aktywację kaspazy 3 [100]. Indukcja tolerancji na niedokrwienie wydaje się uszczelniać błonę mitochondrialną – po hartowaniu obserwowano znaczne obniżenie cytozolowego poziomu cytochromu c oraz Smac/DIABLO (ang. *second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor-of-apoptosis protein (IAP)-binding protein with low pH*) [125, 150]. Nie stwierdzono natomiast, by rozwój tolerancji zmieniał poziom białek XIAP i cIAP (ang. *X chromosome-linked & cellular inhibitor-of-apoptosis protein*) [125]. Po niedokrwieniu wywołanym w stanie tolerancji obserwowano ponadto spadek ekspresji mRNA kodującego p53 [127].

Aktywacja mechanizmów naprawczych

Po hartowaniu przez niedokrwienie przedomózgowia u szczura stwierdzono wyraźny wzrost poziomu białka Ku 70 uczestniczącego w naprawie pęknięć podwójnej nici DNA, podczas gdy w modelu ogniskowym, po samym tylko długotrwałym niedokrwieniu obserwowano spadek jego poziomu poprzedzający fragmentację DNA [122].

Białka szoku cieplnego

Wielu badaczy podkreśla ścisły związek czasowy i przestrzenny pomiędzy zwiększoną ekspresją białek szoku cieplnego (głównie HSP70, HSP27, HSP110/105), a nabywaniem tolerancji przez mózg [16, 18, 55, 73, 130, 144]. Dodatkowo, podanie przeciwciał skierowanych przeciw HSP70 znosiło efekt hartowania [81]. Jednocześnie jednak, w wielu pracach nie wykazano, by rozwój tolerancji korelował z aktywacją tej grupy białek [1, 18, 34, 57, 125], co może sugerować, że ich ekspresja jest raczej wskaźnikiem stresu, na który zostały narażone komórki [99].

Erytropoetyna

Podanie egzogennej substancji działało *in vitro* neuroprotekcyjnie, natomiast jej zablokowanie swoistymi przeciwciałami lub rozpuszczalną formą jej receptora znosiło efekt hartowania [19, 98, 110]. Stwierdzono także wzrost ekspresji mRNA erytropoetyny po hartowaniu *in vitro* (przez deprivację tlenu i glukozy) [110] oraz *in vivo* (przez hipoksję) [98]. W obu tych modelach czynnikiem indukującym ekspresję erytropoetyny był HIF-1.

Cytokiny

IL-1 β (interleukina 1- β)

Po krótkotrwałym niedokrwieniu globalnym u myszokoczek [89] i ogniskowym u szczurów [135] oraz po *spreading depression* [39] obserwowano wyraźny wzrost mRNA i białka IL-1 β , choć niższy niż po długotrwałym zamknięciu t. środkowej mózgu. Także po niedokrwieniu ogniskowym poprzedzonym bodźcem hartującym w postaci krótkotrwałego niedokrwienia lub 3-NP wzrost mRNA IL-1 β był niższy niż u zwierząt niehartowanych [92]. Natomiast podanie IL-1Ra (antagonisty receptora IL-1 β) zapobiegało rozwojowi tolerancji [89].

TNF- α (czynnik martwicy nowotworów, ang. tumor necrosis factor- α)

Podobnie jak w przypadku IL-1 β , zwiększoną ekspresję na poziomie mRNA i białka odnotowano po hartowaniu niedokrwieniowym [14, 136] i po *spreading depression* [39]. Poziom mRNA TNF- α był wyższy także po niedokrwieniu ogniskowym poprzedzonym hartowaniem przez niedokrwienie lub podanie 3-NP [92]. Zablockowanie TNF- α za pomocą przeciwciał monoklonalnych lub zahamowanie aktywności TACE (ang. *TNF- α converting enzyme* – enzymu przekształcającego prekursorowy TNF- α w cząsteczkę aktywną) hamowało indukcję tolerancji [14]. Z kolei podanie egzogenego TNF- α działało jak czynnik hartujący *in vitro* [12, 30, 65] i *in vivo* [84].

Czynniki troficzne

Po 2-minutowym niedokrwieniu przedomózgowia u szczura obserwowano wzrost poziomu mRNA NGF (czynnik wzrostu nerwów, ang. *nerve growth factor*) i BDNF (mózgowo-pochodny czynnik neurotroficzny, ang. *brain-derived neurotrophic factor*) po upływie 0,5 do 6 godzin od operacji [130]. Także po fali depolaryzacji wywołanej nadtwardówkowym podaniem KCl stwierdzano trwającą do 12 godzin indukcję mRNA dla NGF, BDNF, FGF-2 (czynnik wzrostu fibroblastów, ang. *fibroblast growth factor*) [44, 50, 71] oraz wzrost poziomu białka BDNF utrzymujący się do 12 dni [50, 146], zaś po podaniu 3-NP poziom NGF w skrawkach hipokampa [107]. Z kolei po niedokrwieniu globalnym poprzedzonym bodźcem hartującym w postaci: krótkotrwałego niedokrwienia albo farmakologicznego otwarcia K_{ATP}, albo podania agonisty receptora adenozynowego A1, poziom ekspresji mRNA NGF i BDNF był znacznie niższy niż u zwierząt niehartowanych [35]. Natomiast w modelu niedokrwienia ogniskowego, po 12 godzinach poziom mRNA BDNF i CNTF (rzęskowy czynnik neurotroficzny, ang. *ciliary neurotrophic factor*) w grupach hartowanych przez niedokrwienie i 3-NP był podobny do grupy niehartowanej i wyższy niż w grupie kontrolnej, zaś po 24 godzinach poziom mRNA NGF (ale nie CNTF i BDNF) u zwierząt hartowanych przez niedokrwienie był niższy niż u zwierząt niehartowanych [93].

EFEKTY INDUKCJI TOLERANCJI

Zmiany w ekspresji genów po długotrwałym niedokrwieniu

W porównaniu z obszernym piśmiennictwem dotyczącym zmian w ekspresji genów po niedokrwieniu mózgu, czy też z rosnącą liczbą danych o wpływie samego hartowania na translację/transkrypcję genów [20, 51, 94, 105], stosunkowo niewiele wiadomo o tym, jak stan tolerancji wpływa na ekspresję genów po późniejszym długotrwałym niedokrwieniu. Stenzel-Poore i wsp.[121] porównując przy użyciu mikromacierzy, zmiany poziomu mRNA u myszy:

- i) tylko hartowanych przez niedokrwienie,
 - ii) tylko poddanych ogniskowemu niedokrwieniu mózgu oraz
 - iii) poddanych ogniskowemu niedokrwieniu mózgu po uprzednim hartowaniu,
- stwierdzili, że bodziec hartujący przeprogramowuje, przynajmniej na poziomie transkrypcji, odpowiedź komórkową na późniejsze niedokrwienie. O ile po samym bodźcu hartującym rosła ekspresja genów zaangażowanych w metabolizm i regulację cyklu komórkowego, a w drugiej grupie – genów koordynujących reakcje immunologiczne, o tyle po niedokrwieniu wywołanym po wcześniejszym hartowaniu dominowała supresja genów uczestniczących w regulacji metabolizmu, transportu i cyklu komórkowego.

Zmniejszenie uszkodzenia spowodowanego przez niedokrwienie – obraz histologiczny

Z definicji, po niedokrwieniu mózgu poddanego uprzednio hartowaniu, obserwowane uszkodzenie tkanki jest znacznie mniejsze niż w mózgu niehartowanym. W zależności od zastosowanego modelu doświadczalnego stwierdzano zmniejszenie wielkości zawału albo mniejsze uszkodzenie hipokampa – odpowiednio po niedokrwieniu: ogniskowym (przejściowym bądź trwałym) albo globalnym wywołanym zamknięciem 2 lub 4 tętnic domózgowych [przeł. 138]. Również obrzęk mózgu, oceniany 24 godziny po trwałym zamknięciu t. środkowej mózgu u szczura, był znacznie mniejszy u zwierząt hartowanych 15-minutowym niedokrwieniem. Podobnie, po hartowaniu, bariera krew-mózg była lepiej zachowana [66] oraz stwierdzano mniejsze uszkodzenie naczyń mikrokrążenia mózgowego [67].

Większy nawet efekt ochronny, w obrazie histologicznym, odnotowano u zwierząt starszych niż u młodych [22, 24]. Obserwacja ta wydaje się o tyle istotna, że zapadalność na udar mózgu u ludzi wzrasta z wiekiem [124].

Zmiana aktywności komórek glejowych

Aktywacja astrocytów towarzyszy uszkodzeniom mózgu spowodowanym różnymi czynnikami uszkadzającymi: mechanicznymi, neurotoksycznymi czy niedokrwieniem [przeł. 62, 106]. Jest widoczna także po hartowaniu [18, 45, 71, 92, 140]. Jak się przypuszcza, może działać neuroproteekcyjnie poprzez: ochronę bariery krew-mózg; poprawę równowagi wodno-jonowej; zwiększenie zdolności do inaktywacji ekscyto-

toksycznego działania kwasu glutaminowego dzięki m.in. większej zdolności wychwytywania glutaminianu i wzrostowi aktywności syntetazy glutaminowej (tworzy nieto-ksyczną glutaminę z kwasu glutaminowego); zwiększenie ekspresji ochronnych i naprawczych czynników neurotroficznych, które zwiększają przeżywalność neuronów, ułatwiają synaptogenezę, aktywują neurogenezę; wzrost aktywności antyoksydacyjnej [18, 62].

Indukcja rozrostu i przerostu astrogleju może wiązać się też z plastycznością mózgu i przebudową (ang. *remodeling*) obecnymi po udarze [5].

W krótkim czasie po niedokrwieniu mózgu dochodzi również do aktywacji mikrogleju, który odgrywa kluczową rolę w rozwijającej się reakcji zapalnej [przeł. 49]. Po hartowaniu, w modelu globalnego niedokrwienia, obserwowano zmniejszenie aktywacji komórek mikrogleju [24, 41], a w modelu ogniskowego niedokrwienia gęstość mikrogleju była podobna u zwierząt hartowanych i niepoddanych hartowaniu [92]. Sugeruje to zahamowanie, przynajmniej częściowe, jego cytotoksycznego działania.

Wpływ na mózgowy przepływ krwi

Nie stwierdzono, by hartowanie przez niedokrwienie, czy przez podanie 3-NP zmieniało w sposób znaczący mózgowy przepływ krwi. W szczególności nie odnotowano zwiększenia regionalnego przepływu krwi [5, 16, 66, 69, 80, 146]. Również po *spreading depression*, w większości prac nie obserwowano zmiany przepływu krwi ani globalnego, ani regionalnego [70, 145]. Tylko w jednym badaniu opisano wyraźne obniżenie (o ok. 70%) podstawowego mózgowego przepływu krwi [91].

Aktywność i migracja leukocytów wielojądrzastych

Rozwój zapalenia wywołanego niedokrwieniem mózgu prowadzi m.in. do aktywacji leukocytów krwi obwodowej i ich akumulacji w obszarze uszkodzenia. Pierwsze neutrofile pojawiają się już po kilku godzinach. W wielu pracach udowodniono, że naciekające komórki wielojądrzaste nasilają uszkodzenie spowodowane niedokrwieniem [68, 97].

W nielicznych pracach dotyczących hartowania mózgu, w których oceniano zachowanie się leukocytów, odnotowano mniejszą niż w niedokrwieniu niepoprzedzonym hartowaniem migrację tych komórek [5] oraz mniejszy ich napływ do mózgu [5, 129]. Również odpowiedź zapalna związana z naciekiem komórek wielojądrzastych była słabiej wyrażona [129].

Sprawność zwierząt

W modelach ogniskowego niedokrwienia u szczura stwierdzano nawet całkowity brak niedowładu łapy tylnej i znacznie mniejszy niedowład przedniej, jeśli wcześniej zastosowano hartowanie [5]. Poprawę sprawności motorycznej odnotowano także w globalnym niedokrwieniu poprzedzonym indukcją tolerancji [60].

Na temat wpływu hartowania na zachowanie i uczenie się zwierząt, dotychczasowe wyniki badań są rozbieżne. Na przykład Ohno i Watanabe [88] stwierdzili, że zdolność uczenia się zwierząt nie ulega zmianie w porównaniu z grupą niepoddaną niedokrwieniu w ogóle [88]. Inna grupa badaczy obserwowała w początkowym okresie pogorszenie, a następnie poprawę „czynności wyższych” myszokoczków [22]. Natomiast niektórzy

autorzy podkreślają istnienie rozbieżności pomiędzy obrazem histologicznym a zachowaniem się zwierząt – w teście otwartego pola (*open-field test*) wyniki uzyskane przez myszokoczki, po samym tylko hartowaniu, były gorsze niż w grupie kontrolnej mimo braku nieprawidłowości w obrazie histologicznym [24]. Przyczyną tak różnych obserwacji mogą być trudności w doborze technik pozwalających na ocenę funkcji poznawczych badanych zwierząt.

Nie wiadomo, czy kiedykolwiek indukcja tolerancji na niedokrwienie będzie miała zastosowanie kliniczne. Z dotychczasowych badań nad chorymi na udar niedokrwienno mózgu wynika, że ci, u których przejściowy atak niedokrwienno (objawy ubytkowe trwają mniej niż 24 godziny) poprzedzał wystąpienie zawału mózgu, mieli znacząco lepsze rokowanie i mniejsze deficyty neurologiczne w porównaniu z osobami, które nie przebyły wcześniej tego krótkotrwałego epizodu [75, 137, 139]. Jest to powszechnie przyjmowane za dowód na możliwość wywołania tolerancji na niedokrwienie w mózgu człowieka. Być może więc poznanie mechanizmów hartowania pozwoli na jego wprowadzenie do kliniki.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABE H, NOWAK TS Jr. Induced hippocampal neuron protection in an optimized gerbil ischemia model: insult thresholds for tolerance induction and altered gene expression defined by ischemic depolarization. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; **24**: 84–97.
- [2] ABE H, NOWAK TS Jr. Postischemic temperature as a modulator of the stress response in brain: dissociation of heat shock protein 72 induction from ischemic tolerance after bilateral carotid artery occlusion in the gerbil. *Neurosci Lett* 2000; **295**: 54–58.
- [3] ALSBO CW, WRANG M, MOLLER F, DIEMER NH. Is the AMPA receptor subunit GluR2 mRNA an early indicator of cell fate after ischemia? A quantitative single cell RT-PCR study. *Brain Res* 2001; **894**: 101–108.
- [4] ATOCHIN DN, CLARK J, DEMCHENKO IT, MOSKOWITZ MA, HUANG PL. Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases. *Stroke* 2003; **34**: 1299–1303.
- [5] BARONE FC, WHITE R, SPERA PA, ELLISON J, CURRIE RW, WANG X, FEUERSTEIN GZ. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke* 1998; **29**: 1937–1950.
- [6] BERNAUDIN M, NEDELEC AS, DIVOUX D, MACKENZIE ET, PETIT E, SCHUMANN-BARD P. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; **22**: 393–403.
- [7] BLONDEAU N, PLAMONDON H, RICHELME C, HEURTEAUX C, LAZDUNSKI M. K(ATP) channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. *Neuroscience* 2000; **100**: 465–474.
- [8] BLONDEAU N, WIDMANN C, LAZDUNSKI M, HEURTEAUX C. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. *J Neurosci Res* 2001; **21**: 4668–4677.
- [9] BLONDEAU N, WIDMANN C, LAZDUNSKI M, HEURTEAUX C. Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. *Neuroscience* 2002; **109**: 231–241.
- [10] BOND A, LODGE D, HICKS CA, WARD MA, O'NEILL MJ. NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus. *Eur J Pharmacol* 1999; **380**: 91–99.
- [11] BORDET R, DEPLANQUE D, MABOUDOU P, PUISIEUX F, PU Q, ROBIN E, MARTIN A, BASTIDE M, LEYS D, LHERMITTE M, DUPUIS B. Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; **20**: 1190–1196.

- [12] BRUCE-KELLER AJ, GEDDES JW, KNAPP PE, MCFALL RW, KELLER JN, HOLTSBERG FW, PARTHASARATHY S, STEINER SM, MATTSON MP. Anti-death properties of TNF against metabolic poisoning: mitochondrial stabilization by MnSOD. *J Neuroimmunol* 1999; **93**: 53–71.
- [13] BRUER U, WEIH MK, ISAEV NK, MEISEL A, RUSCHER K, BERGK A, TRENDELENBURG G, WIEGAND F, VICTOROV IV, DIRNAGL U. Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Lett* 1997; **414**: 117–121.
- [14] CARDENAS A, MORO MA, LEZA JC, O'SHEA E, DAVALOS A, CASTILLO J, LORENZO P, LIZASOAIN I. Upregulation of TACE/ADAM17 after ischemic preconditioning is involved in brain tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; **22**: 1297–1302.
- [15] CENTENO JM, ORTI M, SALOM JB, SICK TJ, PEREZ-PINZON MA. Nitric oxide is involved in anoxic preconditioning neuroprotection in rat hippocampal slices. *Brain Res* 1999; **836**: 62–69.
- [16] CHEN J, GRAHAM SH, ZHU RL, SIMON RP. Stress proteins and tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; **16**: 566–577.
- [17] CHOPP M, CHEN H, HO KL, DERESKI MO, BROWN E, HETZEL FW, WELCH KM. Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat. *Neurology* 1989; **39**: 1396–1298.
- [18] CURRIE RW, ELLISON JA, WHITE RF, FEUERSTEIN GZ, WANG X, BARONE FC. Benign focal ischemic preconditioning induces neuronal Hsp70 and prolonged astrogliosis with expression of Hsp27. *Brain Res* 2000; **863**: 169–181.
- [19] DAWSON TM. Preconditioning-mediated neuroprotection through erythropoietin? *Lancet* 2002; **359**: 96–97.
- [20] DHODDAVK, SAILOR KA, BOWEN KK, VEMUGANTI R. Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis. *J Neurochem* 2004; **89**: 73–89.
- [21] DIRNAGL U, SIMON RP, HALLENBECK JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 2003; **26**: 248–254.
- [22] DOOLEY P, CORBETT D. Competing processes of cell death and recovery of function following ischemic preconditioning. *Brain Res* 1998; **794**: 119–126.
- [23] DOUEN AG, AKIYAMA K, HOGAN MJ, WANG F, DONG L, CHOW AK, HAKIM A. Preconditioning with cortical spreading depression decreases intraschemic cerebral glutamate levels and down-regulates excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 from rat cerebral cortex plasma membranes. *J Neurochem* 2000; **75**: 812–818.
- [24] DOWDEN J, CORBETT D. Ischemic preconditioning in 18- to 20-month-old gerbils: long-term survival with functional outcome measures. *Stroke* 1999; **30**: 1240–1246.
- [25] EISENA, FISMAN EZ, RUBENFIRE M, FREIMARK D, McKECHNIE R, TENENBAUM A, MOTRO M, ADLER Y. Ischemic preconditioning: nearly two decades of research. A comprehensive review. *Atherosclerosis* 2004; **172**: 201–210.
- [26] FRANKIEWICZ T, PARSONS CG. Chronic memantine does not block 3-nitropropionic acid-delayed ischaemic tolerance in rat hippocampal slices *ex vivo*. *Neurotox Res* 2004; **5**: 617–622.
- [27] GARCIA L, BURDA J, HREHOROVSKA M, BURDA R, MARTIN ME, SALINAS M. Ischaemic preconditioning in the rat brain: effect on the activity of several initiation factors, Akt and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation, and GRP78 and GADD34 expression. *J Neurochem* 2004; **88**: 136–147.
- [28] GARNIER P, YING W, SWANSON RA. Ischemic preconditioning by caspase cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Neurosci* 2003; **23**: 7967–7973.
- [29] GIDDAY JM, FITZGIBBONS JC, SHAH AR, PARK TS. Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat. *Neurosci Lett* 1994; **168**: 221–224.
- [30] GINIS I, JAISWAL R, KLIMANIS D, LIU J, GREENSPON J, HALLENBECK JM. TNF-alpha-induced tolerance to ischemic injury involves differential control of NF-kappaB transactivation: the role of NF-kappaB association with p300 adaptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; **22**: 142–152.
- [31] GLAZIER SS, O'ROURKE DM, GRAHAM DI, WELSH FA. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; **14**: 545–553.
- [32] GONZALEZ-ZULUETA M, FELDMAN AB, KLESSE LJ, KALB RG, DILLMAN JF, PARADA LF, DAWSON TM, DAWSON VL. Requirement for nitric oxide activation of p21(ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 436–441.

- [33] HASHIGUCHI A, YANO S, MORIOKA M, HAMADA J, USHIO Y, TAKEUCHI Y, FUKUNAGA K. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase via phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; **24**: 271–279.
- [34] HAYASHI T, SAITO A, OKUNO S, FERRAND-DRAKE M, CHAN PH. Induction of GRP78 by ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and prevents delayed neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; **23**: 949–961.
- [35] HEURTEAUX C, LAURITZEN I, WIDMANN C, LAZDUNSKI M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4666–4670.
- [36] HIRAIDE T, KATSURA K, MURAMATSU H, ASANO G, KATAYAMA Y. Adenosine receptor antagonists cancelled the ischemic tolerance phenomenon in gerbil. *Brain Res* 2001; **910**: 94–98.
- [37] HORIGUCHI T, KIS B, RAJAPAKSE N, SHIMIZU K, BUSIJA DW. Opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels is a trigger of 3-nitropropionic acid-induced tolerance to transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2003; **34**: 1015–1020.
- [38] HUBER R, KASISCHKE K, LUDOLPH AC, RIEPE MW. Increase of cellular hypoxic tolerance by erythromycin and other antibiotics. *Neuroreport* 1999; **10**: 1543–1546.
- [39] JANDER S, SCHROETER M, PETERS O, WITTE OW, STOLL G. Cortical spreading depression induces proinflammatory cytokine gene expression in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 218–225.
- [40] JONES NM, BERGERON M. Hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain involves enhanced ERK1/2 signaling. *J Neurochem* 2004; **89**: 157–167.
- [41] JONES NM, BERGERON M. Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 1105–1114.
- [42] KAPINYA K, PENZEL R, SOMMER C, KIESSLING M. Temporary changes of the AP-1 transcription factor binding activity in the gerbil hippocampus after transient global ischemia, and ischemic tolerance induction. *Brain Res* 2000; **872**: 282–293.
- [43] KAPINYA K, LOWL D, FUTTERER C, MAURER M, WASCHKE KF, ISAEV NK, DIRNAGL U. Tolerance against ischemic neuronal injury can be reduced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent. *Stroke* 2002; **33**: 1889–1898.
- [44] KARIKO K, HARRIS VA, RANGEL Y, DUVAL ME, WELSH FA. Effect of cortical spreading depression on the levels of mRNA coding for putative neuroprotective proteins in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; **18**: 1308–1315.
- [45] KATO H, KOGURE K, ARAKI T, ITOYAMA Y. Astroglial and microglial reactions in the gerbil hippocampus with induced ischemic tolerance. *Brain Res* 1994; **664**: 69–76.
- [46] KATO H, KOGURE K, ARAKI T, LIU XH, KATO K, ITOYAMA Y. Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the hippocampus following ischemia in a gerbil model of ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; **15**: 60–70.
- [47] KATO H, KOGURE K, NAKATA N, ARAKI T, ITOYAMA Y. Facilitated recovery from postischemic suppression of protein synthesis in the gerbil brain with ischemic tolerance. *Brain Res Bull* 1995; **36**: 205–208.
- [48] KATO H, LIU Y, ARAKI T, KOGURE K. MK-801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. *Neurosci Lett* 1992; **139**: 118–121.
- [49] KATO H, WALZ W. The initiation of the microglial response. *Brain Pathol* 2000; **10**: 137–143.
- [50] KAWAHARA N, CROLL SD, WIEGAND SJ, KLATZO I. Cortical spreading depression induces long-term alterations of BDNF levels in cortex and hippocampus distinct from lesion effects: implications for ischemic tolerance. *Neurosci Res* 1997; **29**: 37–47.
- [51] KAWAHARA N, WANG Y, MUKASA A, FURUYA K, SHIMIZU T, HAMAKUBO T, ABURATANI H, KODAMA T, KIRINO T. Genome-wide gene expression analysis for induced ischemic tolerance and delayed neuronal death following transient global ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; **24**: 212–223.
- [52] KIRINO T. Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; **22**: 1283–1296.
- [53] KITAGAWA K, MATSUMOTO M, KUWABARA K, TAGAYA M, OHTSUKI T, HATA R, UEDA H, HANDA N, KIMURA K, KAMADA T. «Ischemic tolerance» phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res* 1991; **561**: 203–211.
- [54] KITAGAWA K, MATSUMOTO M, TAGAYA M, HATA R, UEDA H, NIINOBE M, HANDA N, FUKUNAGA R, KIMURA K, MIKOSHIBA K, KAMADA T. «Ischemic tolerance» phenomenon found in the brain. *Brain Res* 1990; **528**: 21–24.

- [55] KITAGAWA K, MATSUMOTO M, TAGAYA M, KUWABARA K, HATA R, HANDA N, FUKUNAGA R, KIMURA K, KAMADA T. Hyperthermia-induced neuronal protection against ischemic injury in gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; **11**: 449–452.
- [56] KJOLLER C, DIEMER N. GluR2 protein synthesis and metabolism in rat hippocampus following transient ischemia and ischemic tolerance induction. *Neurochem Int* 2000; **37**: 7–15.
- [57] KOBAYASHI S, HARRIS VA, WELSH FA. Spreading depression induces tolerance of cortical neurons to ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; **15**: 721–727.
- [58] KOTI RS, SEIFALIAN AM, DAVIDSON BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: A review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* 2003; **20**: 383–396.
- [59] KURKINEN K, BUSTO R, GOLDSTEINS G, KOISTINAHO J, PEREZ-PINZON MA. Isoform-specific membrane translocation of protein kinase C after ischemic preconditioning. *Neurochem Res* 2001; **26**: 1139–1144.
- [60] KUROIWA T, YAMADA I, ENDO S, HAKAMATA Y, ITO U. 3-Nitropropionic acid preconditioning ameliorates delayed neurological deterioration and infarction after transient focal cerebral ischemia in gerbils. *Neurosci Lett* 2000; **283**: 145–148.
- [61] LEE JM, ZIPFEL GJ, CHOI DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 1999; **399** (suppl):A7–A14.
- [62] LIBERTO CM, ALBRECHT PJ, HERX LM, YONG VW, LEVISON SW. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 2004; **89**: 1092–1100.
- [63] LIM YJ, ZHENG S, ZUO Z. Morphine preconditions Purkinje cells against cell death under *in vitro* simulated ischemia-reperfusion conditions. *Anesthesiology* 2004; **100**: 562–568.
- [64] LIU D, LU C, WAN R, AUYEUNG WW, MATTSOON MP. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; **22**: 431–443.
- [65] LIU J, GINIS I, SPATZ M, HALLENBECK JM. Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF-alpha and ceramide. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; **278**: C144–C153.
- [66] MASADA T, HUA Y, XI G, ENNIS SR, KEEP RF. Attenuation of ischemic brain edema and cerebrovascular injury after ischemic preconditioning in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 22–33.
- [67] MASADA T, HUA Y, XI G, ENNIS SR, KEEP RF. Effect of ischemic preconditioning on edema formation and cerebrovascular injury following focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl* 2002; **81**: 265–268.
- [68] MATSUO Y, ONODERA H, SHIGA Y, NAKAMURA M, NINOMIYA M, KIHARA T, KOGURE K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke* 1994; **25**: 1469–1475.
- [69] MATSUSHIMA K, HAKIM AM. Transient forebrain ischemia protects against subsequent focal cerebral ischemia without changing cerebral perfusion. *Stroke* 1995; **26**: 1047–1052.
- [70] MATSUSHIMA K, HOGAN MJ, HAKIM AM. Cortical spreading depression protects against subsequent focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; **16**: 221–226.
- [71] MATSUSHIMA K, SCHMIDT-KASTNER R, HOGAN MJ, HAKIM AM. Cortical spreading depression activates trophic factor expression in neurons and astrocytes and protects against subsequent focal brain ischemia. *Brain Res* 1998; **807**: 47–60.
- [72] McCALLION K, WATTANASIRICHAIGOON S, GARDINER KR, FINK MP. Ischemic preconditioning ameliorates ischemia- and reperfusion-induced intestinal epithelial hyperpermeability in rats. *Shock* 2000; **14**: 429–434.
- [73] McLAUGHLIN B, HARTNETT KA, ERHARDT JA, LEGOS JJ, WHITE RF, BARONE FC, AIZENMAN E. Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 715–720.
- [74] MIYAWAKI T, YOKOTA H, OGURO K, KATO K, SHIMAZAKI K. Ischemic preconditioning decreases intracellular zinc accumulation induced by oxygen-glucose deprivation in gerbil hippocampal CA1 neurons. *Neurosci Lett* 2004; **362**: 216–219.
- [75] MONCAYO J, de FREITAS GR, BOGOUSLAVSKY J, ALTIERI M, van MELLE G. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology* 2000; **54**: 2089–2094.
- [76] MORI T, MURAMATSU H, MATSUI T, MCKEE A, ASANO T. Possible role of the superoxide anion in the development of neuronal tolerance following ischaemic preconditioning in rats. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2000; **26**: 31–40.
- [77] MURRY CE, JENNINGS RB, REIMER KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; **74**: 1124–1136.

- [78] NAKAJIMA T, IWABUCHI S, MIYAZAKI H, OKUMA Y, INANAMI O, KUWABARA M, NOMURA Y, KAWAHARA K. Relationship between the activation of cyclic AMP responsive element binding protein and ischemic tolerance in the penumbra region of rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 2002; **331**: 13–16.
- [79] NAKAMURA Y. Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull* 2002; **25**: 945–953.
- [80] NAKASE H, HEIMANN A, URANISHI R, RIEPE MW, KEMPSKI O. Early-onset tolerance in rat global cerebral ischemia induced by a mitochondrial inhibitor. *Neurosci Lett* 2000; **290**: 105–108.
- [81] NAKATA N, KATO H, KOGURE K. Inhibition of ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus by quercetin and anti-heat shock protein-70 antibody. *Neuroreport* 1993; **4**: 695–698.
- [82] NAKATSUKA H, OHTA S, TANAKA J, TOKU K, KUMON Y, MAEDA N, SAKANAKA M, SAKAKI S. Cytochrome c release from mitochondria to the cytosol was suppressed in the ischemia-tolerance-induced hippocampal CA1 region after 5-min forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci Lett* 2000; **278**: 53–56.
- [83] NANDAGOPAL K, DAWSON TM, DAWSON VL. Critical role for nitric oxide signaling in cardiac and neuronal ischemic preconditioning and tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **297**: 474–478.
- [84] NAWASHIRO H, TASAKI K, RUETZLER CA, HALLENBECK JM. TNF-alpha pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; **17**: 483–490.
- [85] NISHIMURA M, SUGINO T, NOZAKI K, TAKAGI Y, HATTORI I, HAYASHI J, HASHIMOTO N, MORIGUCHI T, NISHIDA E. Activation of p38 kinase in the gerbil hippocampus showing ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; **23**: 1052–1059.
- [86] NISHIO S, CHEN ZF, YUNOKI M, TOYODA T, ANZIVINO M, LEE KS. Hypothermia-induced ischemic tolerance. *Ann NY Acad Sci* 1999; **890**: 26–41.
- [87] NISHIO S, YUNOKI M, CHEN ZF, ANZIVINO MJ, LEE KS. Ischemic tolerance in the rat neocortex following hypothermic preconditioning. *J Neurosurg* 2000; **93**: 845–851.
- [88] OHNO M, WATANABE S. Ischemic tolerance to memory impairment associated with hippocampal neuronal damage after transient cerebral ischemia in rats. *Brain Res Bull* 1996; **40**: 229–236.
- [89] OHTSUKI T, RUETZLER CA, TASAKI K, HALLENBECK JM. Interleukin-1 mediates induction of tolerance to global ischemia in gerbil hippocampal CA1 neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; **16**: 1137–1142.
- [90] OMATA N, MURATA T, TAKAMATSU S, MARUOKA N, WADA Y, YONEKURA Y, FUJIBAYASHI Y. Hypoxic tolerance induction in rat brain slices following hypoxic preconditioning due to expression of neuroprotective proteins as revealed by dynamic changes in glucose metabolism. *Neurosci Lett* 2002; **329**: 205–208.
- [91] OTORI T, GREENBERG JH, WELSH FA. Cortical spreading depression causes a long-lasting decrease in cerebral blood flow and induces tolerance to permanent focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; **23**: 43–50.
- [92] PERA J, ZAWADZKA M, KAMIŃSKA B, SZCZUDLIK A. Influence of chemical and ischemic preconditioning on cytokine expression after focal brain ischemia. *J Neurosci Res* 2004; **78**: 132–140.
- [93] PERA J, ZAWADZKA M, KAMIŃSKA B, SZCZUDLIK A. Neurotrophic factors expression after focal brain ischemia preceded by different preconditioning strategies. *Cerebrovasc Dis* 2005, w druku.
- [94] PEREZ-PINZON MA, MUMFORD PL, ROSENTHAL M, SICK TJ. Anoxic preconditioning in hippocampal slices: role of adenosine. *Neuroscience* 1996; **75**: 687–694.
- [95] PEREZ-PINZON MA, VITRO TM, DIETRICH WD, SICK TJ. The effect of rapid preconditioning on the microglial, astrocytic and neuronal consequences of global cerebral ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999; **97**: 495–501.
- [96] PEREZ-PINZON MA, XU GP, DIETRICH WD, ROSENTHAL M, SICK TJ. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; **17**: 175–182.
- [97] PHILLIPS JB, WILLIAMS AJ, ADAMS J, ELLIOTT PJ, TORTELLA FC. Proteasome inhibitor PS519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 2000; **31**: 1686–1693.
- [98] PRASS K, SCHARFF A, RUSCHER K, LOWL D, MUSELMANN C, VICTOROV I, KAPINYA K, DIRNAGL U, MEISEL A. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke* 2003; **34**: 1981–1986.
- [99] PRINGLE AK, THOMAS SJ, SIGNORELLI F, IANNOTTI F. Ischaemic pre-conditioning in organotypic hippocampal slice cultures is inversely correlated to the induction of the 72 kDa heat shock protein (HSP72). *Brain Res* 1999; **845**: 152–164.

- [100] QI S, ZHAN RZ, WU C, FUJIHARA H, YAKAMURA T, BABA H, TAGA K, SHIMOJI K. Sublethal cerebral ischemia inhibits caspase-3 activation induced by subsequent prolonged ischemia in the C57Black/Crj6 strain mouse. *Neurosci Lett* 2001; **315**: 133–136.
- [101] RAUCA C, ZERBE R, JANTZE H, KRUG M. The importance of free hydroxyl radicals to hypoxia preconditioning. *Brain Res* 2000; **868**: 147–149.
- [102] RAVAL AP, DAVE KR, MOCHLY-ROSEN D, SICK TJ, PEREZ-PINZON MA. Epsilon PKC is required for the induction of tolerance by ischemic and NMDA-mediated preconditioning in the organotypic hippocampal slice. *J Neurosci* 2003; **23**: 384–391.
- [103] RAVATI A, AHLENMEYER B, BECKER A, KLUMPP S, KRIEGLSTEIN J. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *J Neurochem* 2001; **78**: 909–919.
- [104] RESHEF A, SPERLING O, ZOREF-SHANI E. Opening of K(ATP) channels is mandatory for acquisition of ischemic tolerance by adenosine. *Neuroreport* 2000; **11**: 463–465.
- [105] RAGHAVENDRA RAO VL, BOWEN KK, DHODDA VK, SONG G, FRANKLIN JL, GAVVA NR, DEMPSEY RJ. Gene expression analysis of spontaneously hypertensive rat cerebral cortex following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 2002; **83**: 1072–1086.
- [106] RIDET JL, MALHOTRA SK, PRIVAT A, GAGE FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 1997; **20**: 570–577.
- [107] RIEPE MW, KASISCHKE K, GERICKE CA, LOWE A, HELLWEG R. Increase of hypoxic tolerance in rat hippocampal slices following 3-nitropropionic acid is not mediated by endogenous nerve growth factor. *Neurosci Lett* 1996; **211**: 9–12.
- [108] ROMERA C, HURTADO O, BOTELLA SH, LIZASOAIN I, CARDENAS A, FERNANDEZ-TOME P, LEZA JC, LORENZO P, MORO MA. *In vitro* ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor-alpha pathway. *J Neurosci* 2004; **24**: 1350–1357.
- [109] RUSCHER K, ISAEV N, TRENDELENBURG G, WEIH M, IURATO L, MEISEL A, DIRNAGL U. Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett* 1998; **254**: 117–120.
- [110] RUSCHER K, FREYER D, KARSCH M, ISAEV N, MEGOW D, SAWITZKI B, PRILLER J, DIRNAGL U, MEISEL A. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an *in vitro* model. *J Neurosci* 2002; **22**: 10291–10301.
- [111] SAKURAI M, HAYASHI T, ABE K, AOKI M, SADAHIRO M, TABAYASHI K. Enhancement of heat shock protein expression after transient ischemia in the preconditioned spinal cord of rabbits. *J Vasc Surg* 1998; **27**: 720–725.
- [112] SASAHIRA M, LOWRY T, SIMON RP, GREENBERG DA. Epileptic tolerance: prior seizures protect against seizure-induced neuronal injury. *Neurosci Lett* 1995; **185**: 95–98.
- [113] SCHROEDER CA Jr, LEE HT, SHSH PM, BABU S.C., THOMPSON CI, BELLONI FL. Preconditioning with ischemia or adenosine protects skeletal muscles from ischemic tissue reperfusion injury. *J Surg Res* 1996; **63**: 29–34.
- [114] SCHURR A, PAYNE RS, TSENG MT, GOZAL E, GOZAL D. Excitotoxic preconditioning elicited by both glutamate and hypoxia and abolished by lactate transport inhibition in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 2001; **307**: 151–154.
- [115] SHAMLOO M, KAMME F, WIELOCH T. Subcellular distribution and autophosphorylation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-alpha in rat hippocampus in a model of ischemic tolerance. *Neuroscience* 2000; **96**: 665–674.
- [116] SHAMLOO M, RYTTER A, WIELOCH T. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in the hippocampal CA1 region in a rat model of global cerebral ischemic preconditioning. *Neuroscience* 1999; **93**: 81–88.
- [117] SHIMAZAKI K, NAKAMURA T, NAKAMURA K, OGURO K, MASUZAWA T, KUDO Y, KAWAI N. Reduced calcium elevation in hippocampal CA1 neurons of ischemia-tolerant gerbils. *Neuroreport* 1998; **9**: 1875–1878.
- [118] SHIMIZU S, NAGAYAMA T, JIN KL, ZHU L, LOEFFERT JE, WATKINS SC, GRAHAM SH, SIMON RP. bcl-2 Antisense treatment prevents induction of tolerance to focal ischemia in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 233–243.
- [119] SOMMER C, KIESSLING M. Ischemia and ischemic tolerance induction differentially regulate protein expression of GluR1, GluR2, and AMPA receptor binding protein in the gerbil hippocampus: GluR2 (GluR-B) reduction does not predict neuronal death. *Stroke* 2002; **33**: 1093–1100.

- [120] STAGLIANO NE, PEREZ-PINZON MA, MOSKOWITZ MA, HUANG PL. Focal ischemic preconditioning induces rapid tolerance to middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; **19**: 757–761.
- [121] STENZEL-POORE MP, STEVENS SL, XIONG Z, LESSOV NS, HARRINGTON CA, MORI M, MELLER R, ROSENZWEIG HL, TOBAR E, SHAW TE, CHU X, SIMON RP. Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states. *Lancet* 2003; **362**: 1028–1037.
- [122] SUGAWARA T, NOSHITA N, LEWEN A, KIM GW, CHAN PH. Neuronal expression of the DNA repair protein Ku 70 after ischemic preconditioning corresponds to tolerance to global cerebral ischemia. *Stroke* 2001; **32**: 2388–2393.
- [123] SUGINO T, NOZAKI K, TAKAGI Y, HASHIMOTO N. 3-Nitropropionic acid induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus *in vivo*. *Neurosci Lett* 1999; **259**: 9–12.
- [124] SZCZUDLIK A. Patofizjologia udaru niedokrwiennego. W: Prusiński A, Domżał TM, Kozubski W, Szczudlik A. Niedokrwiennie udary mózgu. Bielsko-Biala: α -medica press 1999: 60–87.
- [125] TANAKA H, YOKOTA H, JOVER T, CAPPUCCIO I, CALDERONE A, SIMIONESCU M, BENNETT MVL, ZUKIN RS. Ischemic preconditioning: neuronal survival in the face of caspase-3 activation. *J Neurosci* 2004; **24**: 2750–2759.
- [126] TASAKI K, RUETZLER CA, OHTSUKI T, MARTIN D, NAWASHIRO H, HALLENBECK JM. Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1997; **748**: 267–270.
- [127] TOMASEVIC G, SHAMLOO M, ISRAELI D, WIELOCH T. Activation of p53 and its target genes p21(WAF1/Cip1) and PAG608/Wig-1 in ischemic preconditioning. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; **70**: 304–313.
- [128] TOYODA T, KASSELL NF, LEE KS. Induction of ischemic tolerance and antioxidant activity by brief focal ischemia. *Neuroreport* 1997; **8**: 847–851.
- [129] TOYODA T, KASSELL NF, LEE KS. Induction of tolerance against ischemia/reperfusion injury in the rat brain by preconditioning with the endotoxin analog diphosphoryl lipid A. *J Neurosurg* 2000; **92**: 435–441.
- [130] TRUETTNER J, BUSTO R, ZHAO W, GINSBERG MD, PEREZ-PINZON MA. Effect of ischemic preconditioning on the expression of putative neuroprotective genes in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; **103**: 106–115.
- [131] TURMAN MA, BATES CM. Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. *Ren Fail* 1997; **19**: 47–60.
- [132] von ARNIM CA, TIMMLER M, LUDOLPH AC, RIEPE MW. Adenosine receptor up-regulation: initiated upon preconditioning but not upheld. *Neuroreport* 2000; **27**: 1223–1226.
- [133] von ARNIM CAF, TIMMLER M, LUDOLPH AC, RIEPE MW. Chemical preconditioning is not mediated by upregulation of nitric oxide synthase isoforms. *Neurosci Lett* 2001; **299**: 130–134.
- [134] WADA K, MIYAZAWA T, NOMURA N, TSUZUKI N, NAWASHIRO H, SHIMA K. Preferential conditions for and possible mechanisms of induction of ischemic tolerance by repeated hyperbaric oxygenation in gerbil hippocampus. *Neurosurgery* 2001; **49**: 160–166.
- [135] WANG X, LI X, CURRIE RW, WILLETTE RN, BARONE FC, FEUERSTEIN GZ. Application of real-time polymerase chain reaction to quantitate induced expression of interleukin-1beta mRNA in ischemic brain tolerance. *J Neurosci Res* 2000; **59**: 238–246.
- [136] WANG X, LI X, ERHARDT JA, BARONE FC, FEUERSTEIN GZ. Detection of tumor necrosis factor-alpha mRNA induction in ischemic brain tolerance by means of real-time polymerase chain reaction. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; **20**: 15–20.
- [137] WEGENER S, GOTTSCHALK B, JOVANOVIĆ V, KNAB R, FIEBACH JB, SCHELLINGER PD, KUCINSKI T, JUNGEHÜLSING GJ, BRUNECKER P, MÜLLER B, BANASIK A, AMBERGER N, WERNECKE KD, SIEBLER M, RÖTHER J, VILLRINGER A, WEIH M, for the MRI in Acute Stroke Study Group of the German Competence Network Stroke. Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter Magnetic Resonance Imaging Study. *Stroke* 2004; **35**: 616–621.
- [138] WEIH M, PRASS K, RUSCHER K, TRENDELENBURG G, DIRNAGL U, RIEPE MW, MEISEL A. Ischämietoleranz. Modell für die Forschung, Hoffnung für die Klinik? *Nervenarzt* 2001; **72**: 255–260.
- [139] WEIH M, KALLENBERG K, BERGK A, DIRNAGL U, HARMS L, WERNECKE KD, EINHÄUPL KM. Attenuated stroke severity after prodromal TIA. A role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke* 1999; **30**: 1851–1854.
- [140] WHITFIELD PC, WILLIAMS R, PICKARD JD. Delayed induction of JunB precedes CA1 neuronal death after global ischemia in the gerbil. *Brain Res* 1999; **818**: 450–458.

- [141] WICK A, WICK W, WALTENBERGER J, WELLER M, DICHGANS J, SCHULZ JB. Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *J Neurosci* 2002; **22**: 6401–6407.
- [142] WIEGAND F, LIAO W, BUSCH C, CASTELL S, KNAPP F, LINDAUER U, MEGOW D, MEISEL A, REDETZKY A, RUSCHER K, TRENDELENBURG G, VICTOROV I, RIEPE M, DIENER HC, DIRNAGL U. Respiratory chain inhibition induces tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; **19**: 1229–1237.
- [143] WIGGINS AK, SHEN PJ, GUNDLACH AL. Neuronal-NOS adaptor protein expression after spreading depression: implications for NO production and ischemic tolerance. *J Neurochem* 2003; **87**: 1368–1380.
- [144] YAGITA Y, KITAGAWA K, OHTSUKI T, TANAKA S, HORI M, MATSUMOTO M. Induction of the HSP110/105 family in the rat hippocampus in cerebral ischemia and ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 811–819.
- [145] YANAMOTO H, HASHIMOTO N, NAGATA I, KIKUCHI H. Infarct tolerance against temporary focal ischemia following spreading depression in rat brain. *Brain Res* 1998; **784**: 239–249.
- [146] YANAMOTO H, MIZUTA I, NAGATA I, XUE J, ZHANG Z, KIKUCHI H. Infarct tolerance accompanied enhanced BDNF-like immunoreactivity in neuronal nuclei. *Brain Res* 2000; **877**: 331–344.
- [147] YANO S, MORIOKA M, FUKUNAGA K, KAWANO T, HARA T, KAI Y, HAMADA J, MIYAMOTO E, USHIO Y. Activation of Akt/protein kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 351–360.
- [148] YONEDA Y, KURAMOTO N, AZUMA Y, OGITA K, MITANI A, ZHANG L, YANASE H, MASUDA S, KATAOKA K. Possible involvement of activator protein-1 DNA binding in mechanisms underlying ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *Neuroscience* 1998; **86**: 79–97.
- [149] YU ZF, MATTSON MP. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration reduce focal ischemic brain damage and improve behavioral outcome: evidence for a preconditioning mechanism. *J Neurosci Res* 1999; **57**: 830–839.
- [150] ZHAN RZ, FUJIIHARA H, BABA H, YAKAMURA T, SHIMOJI K. Ischemic preconditioning is capable of inducing mitochondrial tolerance in the rat brain. *Anesthesiology* 2002; **97**: 896–901.
- [151] ZHANG C, ROSENBAUM DM, SHAIKH AR, LI Q, ROSENBAUM PS, PELHAM DJ, ROTH S. Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; **43**: 3059–3066.
- [152] ZHANG X, XIONG L, HU W, ZHENG Y, ZHU Z, LIU Y, CHEN S, WANG X. Preconditioning with prolonged oxygen exposure induces ischemic tolerance in the rat brain via oxygen free radical formation. *Can J Anaesth* 2004; **51**: 258–263.
- [153] ZHENG S, ZUO Z. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol* 2004; **65**: 1172–1180.
- [154] ZHOU AM, LI QJ, CHEN XL, LI WB. Increase in amount and affinity of adenosine receptor in rat hippocampal cellular membranes induced by cerebral ischemic preconditioning and its protective effects on the neurons. *Acta Physiol Sin* 2001; **53**: 265–269.
- [155] ZHOU AM, LI WB, LI QJ, LIU HQ, FENG RF, ZHAO HG. A short cerebral ischemic preconditioning up-regulates adenosine receptors in the hippocampal CA1 region of rats. *Neurosci Res* 2004; **48**: 397–404.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 12.11.2004 r.

Przyjęto: 06.01.2005 r.

ul. Botaniczna 3, 31-503 Kraków

e-mail: pera@neuro.cm-uj.krakow.pl

POBIERANIE ŻELAZA PRZEZ PASOŻYTNICZE PIERWOTNIAKI: RECEPTORY DLA BIAŁEK WIĄŻĄCYCH ŻELAZO*

AN IRON UPTAKE BY PARASITIC PROTOZOA: RECEPTORS FOR IRON-
BINDING PROTEINS

Henryka DŁUGOŃSKA, Bożena DZIADEK, Katarzyna DZITKO

Zakład Immunoparazytologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej,
Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Efektywne pobieranie żelaza przez pasożytnicze pierwotniaki jest warunkiem ich przeżycia w organizmie żywiciela. Rodzaj dostępnego źródła żelaza, o które pasożyt musi konkurować z makroorganizmem, zależy od niszy, jaką zasiedla i trybu życia (wewnątrz- lub/i zewnątrzkomórkowy). W pracy opisano różne sposoby pozyskiwania żelaza ze związków chelatowych (transferyna, laktoferyna) u wybranych gatunków *Protozoa*. Szczególną uwagę poświęcono wiciowcom *Trypanosoma brucei*. W uwagach końcowych wskazano na problemy związane z badaniami nad metabolizmem żelaza u wewnątrzkomórkowych pasożytniczych pierwotniaków oraz znaczne zróżnicowanie receptorów zaangażowanych w pobieranie żelaza, zależnie od gatunku i postaci pasożyta.

Słowa kluczowe: białka wiążące żelazo, receptory, pasożytnicze pierwotniaki.

Summary: An effective iron uptake by parasitic protozoa is a determining factor for their survival in host. The available iron source, for which the parasite must compete with the macroorganism, depends on the niche where it resides and its life mode (intracellular or/and extracellular). In the paper an iron acquisition from chelate compounds (transferrin, lactoferrin) in selected protozoan species has been presented. A particular interest has been focused on flagellated protozoan, *Trypanosoma brucei*. In concluding remarks any particular problems associated with the studies on iron metabolism in intracellular parasitic protozoa and a significant variety of protozoan receptors involved in iron delivery, depending on a parasite species and form, have been pointed out.

Key words: iron-binding proteins, receptors, parasitic protozoa.

*Praca została dofinansowana przez KBN: projekt badawczy 2 P04C 014 26.

Żelazo jest nieodzownym do życia pierwiastkiem zarówno dla makroorganizmów, jak i drobnoustrojów. Uczestniczy ono w wielu kluczowych procesach metabolicznych, m.in. w transporcie tlenu, syntezie RNA i DNA, transporcie elektronów, wiązaniu azotu i detoksykacji utleniaczy. Może jednak także katalizować proces wytwarzania wysoko reaktywnego rodnika hydroksylogowego (reakcja Fentona: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$), który indukuje szereg reakcji szkodliwych dla komórek, w tym peroksydację lipidów i uszkodzenie DNA oraz powstawanie innych toksycznych metabolitów, np. N-chloramin, czynnych w procesie wewnątrzkomórkowego zabijania drobnoustrojów. Wydaje się, że ze względu na powszechność i obfitość żelaza w biosferze życie jest rodzajem ciągłego hazardu, ponieważ zarówno brak żelaza, jak i jego nadmiar są zdecydowanie szkodliwe [20].

Patogenne drobnoustroje wykształciły bogaty wachlarz mechanizmów zaopatrywania się w żelazo z zasobów organizmu gospodarza. Ponieważ w fizjologicznym pH i w obecności tlenu żelazo tworzy nierozpuszczalne wodorotlenki, jedynym dostępnym jego źródłem są różne związki chelatowe, zwykle o charakterze białkowym. Należą do nich białka rodziny transferyn, obejmujące u ssaków transferynę surowiczą, laktoferynę i melanotransferynę, a u ptaków owotransferynę oraz wewnątrzkomórkowe białka na czele z hemoglobina i ferrytyna, która magazynuje żelazo i bierze udział w procesach detoksykacji [4,28].

BIAŁKA METABOLIZMU ŻELAZA: TRANSFERYNA SUROWICZA I LAKTOFERYNA

Transferyna surowicza ssaków i ptaków (owotransferyna) odpowiadają za transport żelaza Fe^{3+} z płynów ustrojowych do cytosolu, natomiast laktoferyna jest raczej uważana za „zmiatacz” żelaza. Te trzy białka charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa topologii i identycznymi miejscami wiązania żelaza. Częsteczkę transferyn stanowi pojedynczy glikozylowany polipeptyd o masie cząsteczkowej względnej, M_r prawie 80 kDa (ok. 700 aminokwasów), uorganizowany w dwa płaty (N i C), spięte wewnętrznym łańcuchem zbudowanym z 10–12 reszt aminokwasowych. Każdy płat, podzielony na dwie domeny, ma jedno miejsce wiążące jon żelazowy, które leży między wewnętrznymi powierzchniami głębokiej, hydrofilnej szczeliny na styku domen i jest utworzone przez 4 aminokwasy: asparaginę, dwie tyrozyny i histydynę. Brak przyłączonego żelaza (apotransferyna) sprawia, że płat przybiera konformację „otwartej szczęki”. Przyłączenie żelaza (holotransferyna) podwyższa stopień upakowania cząsteczki, zamykając żelazo wewnątrz i chroniąc je przed przypadkowym uwolnieniem. To sprawia, że wiązanie żelaza przez transferyny jest mocne, lecz odwracalne. Jedna cząsteczka transferyny uczestniczy w 100–200 cyklach transportu i uwalniania żelaza. Mimo iż prawie całe żelazo niehemowe w krążeniu jest związane właśnie z transferyną, to jej miejsca wiążące żelazo są wysyczone tylko w ok. 30% [4,28].

Laktoferyna występuje zewnątrzkomórkowo (błony śluzowe, płyny biologiczne: siara, mleko, nasienie, ślina) i wewnątrzkomórkowo (ziarnistości wtórne neutrofilii). Zdolność wiązania żelaza przez laktoferynę jest bardzo duża i aż ponad 300-krotnie wyższa niż transferyny surowiczej. Prócz wiązania żelaza, laktoferyna, a nawet tylko jej proteolityczny fragment powstały po trawieniu pepsyną i obejmujący N-końcowy region cząsteczki (laktoferycyna) wykazują działanie bakteriobójcze, oparte na obecności silnie zasadowych aminokwasów, które sprawiają, że punkt izoelektryczny laktoferyny (pI) znajduje się w przedziale 8,4–9,0, podczas gdy innych przedstawicieli rodziny transferyn – 5,4–5,9. Silnie elektrododatnia laktoferyna chciwie wiąże ujemnie naładowane komponenty komórkowe, np. bakteryjny LPS czy DNA [12,17]. Transferyny, chociaż bardzo podobne pod wieloma względami, różnią się mechanizmem uwalniania żelaza w różnych warunkach środowiska, m.in. różnica dotyczy pH – w przypadku holotransferyny żelazo jest uwalniane w pH ok. 5,5, a w przypadku hololaktoferyny – w $\text{pH} \leq 3,5$ [1].

Transferyny (holotransferyny) są głównym źródłem żelaza dla komórek. Prócz tego, biorą one udział w wielu ważnych procesach fizjologicznych: reakcji zapalnej, proliferacji, różnicowaniu i nowotworzeniu komórek, a także w odporności przeciwzakaźnej [12,17,39]. Nie tylko laktoferyna i jej pochodne [12], ale również transferyna surowicza i owotransferyna mają działanie przeciwbakteryjne, spowodowane zwiększeniem przepuszczalności błony zewnętrznej bakterii [2].

Większość komórek pobiera żelazo drogą endocytozy swoistych receptorów wiążących związki chelatujące żelazo, rzadziej bez udziału tych receptorów. Ten pierwszy sposób charakteryzuje się dużym powinowactwem, ale ograniczoną wydajnością, ten drugi natomiast – niskim powinowactwem, ale dużą wydajnością. Po oddaniu żelaza następuje recykling transferyny, który jest cechą obu procesów, z tym że jest on bardziej efektywny w przypadku drogi zależnej od receptorów [15].

POZYSKIWANIE ŻELAZA PRZEZ PIERWOTNIAKI

Wiedza na temat mechanizmów zaopatrywania się pasożytniczych pierwotniaków w żelazo pochodzące z organizmu żywiciela jest dość uboga. Najwięcej informacji z tego zakresu dotyczy zewnątrzkomórkowych pasożytów, szczególnie wiciowców z rodzaju *Trypanosoma*, które bytując w osoczu krwi ssaków mogą wykorzystywać związki chelatujące żelazo (głównie surowiczą transferynę) w sposób bezpośredni.

Trypanosoma brucei (świdrowiec afrykański)

Świdrowiec afrykański, pasożyt ssaków, jest czynnikiem etiologicznym śpiączki afrykańskiej u ludzi, przenoszonej przez muchy tse-tse. U form trypomastigota, wyizolowanych ze krwi, wykazano obecność receptorów dla transferyny, kodowanych przez geny *ESAG6* i *ESAG7* (*expression site associated gene*). Produkty tych genów tworzą swoisty receptor (TfR) złożony z glikoprotein: pESAG6 (Mr 50–60 kDa) i

pESAG7 (Mr 40-42 kDa). Ten heterodimer jest wbudowany w błonę za pomocą GPI (glikozylofosfatydyloinozytolu), który przyłącza się do pESAG6 w siateczce śródplazmatycznej [31]. Brak GPI upośledza utworzenie dimeru ESAG6-ESAG7 i jego zakotwiczenie w błonie komórkowej [7]. U *T. brucei* stwierdzono aż 1000 genów *VSG* (*variant surface glycoprotein*), kodujących hiperzmienną powierzchniową glikoproteinę o Mr ok. 50 kDa, odpowiedzialną za tworzenie bardzo licznych wariantów antygenowych pasożyta i kolejne fale (nawet ponad 100) parazytemii u jednego żywiciela. Część tych genów zlokalizowana jest w około 20 telomerycznych jednostkach transkrypcyjnych, z których każda zawiera promotor, osiem lub więcej genów *ESAG* (w większości o nieznanym celu), w tym geny *ESAG6* i *ESAG7* oraz gen *VSG*. W danym momencie aktywna jest tylko jedna jednostka transkrypcyjna, co prowadzi do ekspresji tylko 1 formy *VSG* i jednej formy receptora ESAG6/ESAG7, chociaż jak niedawno wykazano ok. 20% mRNA dla ESAG6 pochodzi z wyciszonych (*silent*) jednostek transkrypcyjnych [5,8]. Receptory kodowane przez poszczególne jednostki transkrypcyjnie różnią się znacznie powinowactwem w stosunku do transferyny różnych gatunków, np. TfR kodowane przez jednostkę 221 wiążą silnie transferynę bydlęcą, średnio intensywnie transferynę ludzką, a prawie wcale nie wiążą transferyny psa; wartości K_d wahają się od 0,002 do > 1 mM. U wariantu *T. brucei* z aktywną jednostką 221, hodowanego w obecności transferyny psa, następuje przełączenie na jednostkę VO2, kodującą TfR o wysokim powinowactwie w stosunku do transferyny tego gatunku. Zmienność sekwencji aminokwasów w części receptorów wiążącej ligand (obszar obejmujący aminokwasy 205–215 i 223–238 w N-terminalnej części ESAG6) umożliwia wykorzystywanie transferyny różnych gatunków ssaków, a także możliwość przystosowania się do obecności przeciwciał antyreceptorowych, powstających w przewlekłym zarażeniu i konkurujących z transferyną o wiązanie z TfR [13,32]. Wykazano, że pokrewny gatunek, *Trypanosoma equiperdum* cechuje znacznie mniejsze zróżnicowanie genów *ESAG6*, co koreluje ze znacznie mniejszym wachlarzem potencjalnych żywicieli tego pasożyta (tylko konie, osły i muły) [16].

Tanaka i wsp. [34] stwierdzili ostatnio, że *Trypanosoma brucei* wiąże transferyny: bydlęcą i ludzką laktoferynę, bydlęcą transferynę i owotransferynę przy użyciu dwóch tych samych białek receptorowych o Mr 40 i 43 kDa. Białko 40 kDa zostało zidentyfikowane jako dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPHD). Warto nadmienić, że enzym ten, zlokalizowany u *Staphylococcus aureus* w ścianie komórkowej, wiąże ludzką transferynę. Drugie z opisanych białek, o Mr 43 kDa, jest być może analogiem ESAG7.

Potraktowanie form bytujących we krwi *T. brucei* związkiem chelatującym żelazo, deferoksaminą, hamuje ich proliferację. Są one 10-krotnie bardziej wrażliwe na brak żelaza niż komórki ssaków, co otwiera potencjalne możliwości terapeutyczne, oparte na zaburzaniu metabolizmu żelaza tych pasożytów [9].

Jest interesujące, że postaci trypomastigota spokrewnionego gatunku *Trypanosoma cruzi*, czynnika etiologicznego trypanosomozy amerykańskiej (choroby Chagasa) nie wiążą i nie pochłaniają transferyny, być może dlatego, że są to formy krótko żyjące i nieproliferyjące. Natomiast formy epimastigotyczne, pasożytujące u pluskwiaków,

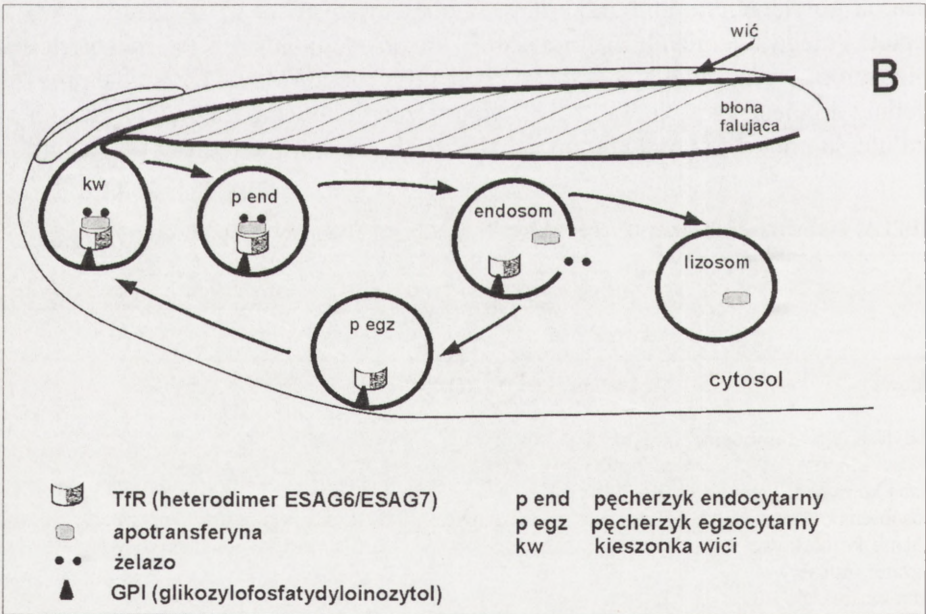
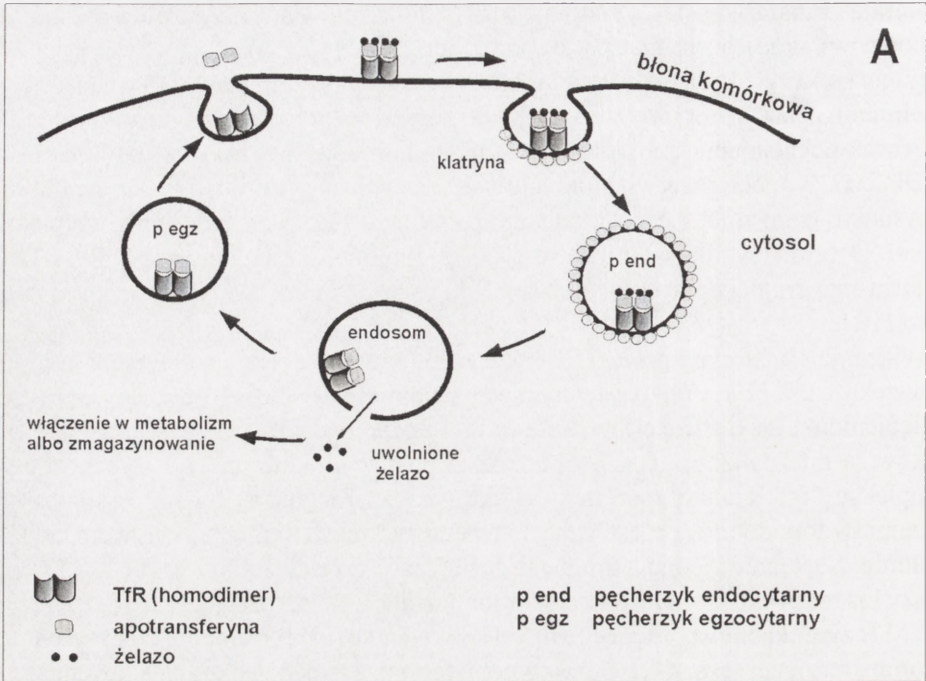
pobierają transferynę do cytostomu (otwór pokarmowy u orzęsków i niektórych wiciowców), skąd jest ona transportowana do rezerwosomów, znajdujących się na tylnym biegunie komórki i będących prawdopodobnie ekwiwalentem lizosomów. Stamtąd, po uwolnieniu żelaza receptory transferynowe powracają na powierzchnię komórki [24].

Proces pochłaniania transferyny (Tf) przez komórki *T. brucei* i ssaków różni się zasadniczo. W tabeli przedstawiono główne cechy receptorów dla transferyny (TfR), a na rysunku – sam proces jej pochłaniania i recyklingu TfR u człowieka i pierwotniaka *T. brucei*. U człowieka opisano dwa rodzaje receptorów dla transferyny: TfR1 i TfR2. Funkcja tego drugiego jest słabo określona [36], stąd podane w tabeli informacje dotyczą tylko TfR1.

Wiązanie transferyny przez TfR może się odbywać na całej powierzchni komórek człowieka, a u *T. brucei* tylko w jednym wydzielonym miejscu – kieszonce wici, będącej zagłębieniem błony, gdzie odbywa się endo- i egzocytoza [3,24]. Kompleksy Tf-TfR u ssaków są internalizowane w pęcherzykach pokrytych klatryną, a u trypanosomy – kompleksy Tf-TfR (zakotwiczone w pelliculi przez GPI, glikozylofosfatydyloinozytol) są najprawdopodobniej przesuwane do wnętrza komórki wraz z przepływem ładunku w błonie. Następnie i jedno, i drugie są dostarczane do endosomów (pH ok. 5,5), a ich dalszy los różni się. W endosomach komórek ssaków żelazo odłącza się i przy udziale DMT1 (czynnika transportującego metale diwalentne) przedostaje się do cytosolu, zaś holotransferyna przekształca się w apotransferynę, a ta nadal skompleksowana z TfR wraca na powierzchnię komórki i tam, w obojętnym pH (7,4), oddysocjowuje od receptora i ulega uwolnieniu. Natomiast u *T. brucei*, apotransferyna jest transportowana do lizosomów, gdzie ulega degradacji proteolitycznej. Wolne TfR wracają prawdopodobnie do kieszonki wici [3,28,31]. Mocno zdegradowane fragmenty transferyny, która uległa endocytozie w komórkach *T. brucei*, można jednak znaleźć w podłożu

TABELA. Porównanie właściwości receptorów dla transferyny (TfR) człowieka i *T. brucei*

Cecha	TfR	
	człowiek	<i>T. brucei</i>
Budowa	Homodimer (2 x 90 kDa)	Heterodimer ESAG6/ESAG7; ESAG6 50-60 kDa + ESAG7 40-42 kDa
Modyfikacje potranslacyjne	Glikozylacja, fosforylacja, acylacja	Glikozylacja
Liczba kopii na komórkę	20–700 x 10 ³	3 x 10 ³
Sposób umocowania w błonie komórkowej	2 domeny przezbłonowe	GPI (glikozylofosfatydyloinozytol) na C-terminalnym końcu ESAG6
Wiązanie transferyny		
liczba cząsteczek/TfR	2	1
liczba cząsteczek/TfR/h	18 (erytoblasty)	4,5
Powinowactwo do apotransferyny w pH 7	niskie	wysokie
pH 5	wysokie	niskie
Recykling – powrót TfR na powierzchnię komórki po dostarczeniu żelaza	powraca kompleks TfR-apotransferyna	powraca sam TfR



RYCINA. Pochłanianie transferyny w drodze endocytozy mediowanej przez receptory TfR: A – komórka ssaka, B – *Trypanosoma brucei*

hodowlanym, co wskazuje na możliwość jej częściowego recyklingu, który przebiega z udziałem markerów endocytarnych Rab5 i Rab11 [27].

Trichomonas vaginalis (rzęsistek pochwoy)

T. vaginalis zasiedla z dużą częstością nabłonek układu moczopłciowego u ludzi, przyczepiając się do komórek żywiciela za pomocą cytoadhezyn (AP65, AP51, AP33 i AP23), których ekspresja jest większa w obecności żelaza [30,37]. Środowisko życia otwiera możliwość wykorzystania przez tego pasożyta, poza prostymi związkami żelaza, także laktoferyny i hemoglobiny (z krwi menstruacyjnej). Intensywność ekspresji i powinowactwo białka wiążącego laktoferynę (136 kDa) do ligandu jest zależna od stężenia żelaza w środowisku wzrostu [37].

Blisko spokrewniony pasożyt bydła *Trichomonas foetus*, przenoszony drogą płciową, może wiązać zarówno transferynę, jak i laktoferynę, ale co charakterystyczne, z większą intensywnością przyłącza laktoferynę, w tym silniej laktoferynę bydłą niż ludzką. Na podstawie testu hamowania kompetycyjnego wykazano, że wiązanie laktoferyny tylko w niewielkim stopniu ma charakter nieswoisty, tj. oparte jest na siłach elektrostatycznych. Aktywność wiązania laktoferyny znaleziono we frakcjach powierzchniowych białek pasożyta o Mr: 22, 49, 55, 72 i 155 kDa. Nie wiadomo, czy są to różne białka czy multimery jednego białka [14]. Tachezy [33] zwraca uwagę, że *Trichomonas vaginalis* i *Trichomonas foetus* mają beztlenowy metabolizm, ze znaczącym udziałem białek typu FeS (np. ferredoksyna), zlokalizowanych w hydrogenosomach. Te dwufunkcyjne białka, oprócz udziału w metabolizmie energe-tycznym, mogą mieć także udział w cytoadhezji pasożyta. Nie ulega wątpliwości, że żelazo jest bardzo istotnym regulatorem zjadliwości *T. foetus*. Szczepcy o mniejszej wirulencji słabiej przyswajają żelazo z transferyny i niskocząsteczkowych kompleksów żelazowych [18]. Inkubowanie *T. foetus* w podłożu pozbawionym żelaza zwiększa jego zdolność adhezji do komórek nabłonkowych w hodowli *in vitro*, ale obniża aktywność proteaz cysteinowych pasożyta i jego cytotoksyczność [22]. Obserwacje dotyczące związku: żelazo - zdolność cytoadhezji u *T. foetus* i *T. vaginalis* są więc sprzeczne i być może wskazują, że te dwa bliskie filogenetycznie gatunki rodzaju *Trichomonas* różnią się pod względem metabolizmu.

Entamoeba histolytica (pełzak czerwonki)

Ten kosmopolityczny pasożyt, czynnik etiologiczny pełzakowicy jelitowej, wykorzystuje jako źródło żelaza w hodowli *in vitro*, oprócz soli tego pierwiastka, hemoglobinę różnych gatunków (człowieka, świni i bydła), degradując ją przy użyciu obojętnych proteaz cysteinowych. Swoje wymagania odżywcze względem żelaza może także zaspokoić wiążąc, a następnie internalizując ludzką holotransferynę przy użyciu dwóch białek receptorowych (Mr 140 i 70 kDa), z których jedno jest zlokalizowane w błonie komórkowej, a drugie w cytosolu [29]. Te obserwacje nie pokrywają się z nieco wcześniejszymi, otrzymanymi przez inną grupę badaczy, która śledząc szlaki endocytozy różnych białek u *E. histolytica* stwierdziła, że pasożyt ten nie pochłania transferyny,

mimo że ma zdolność internalizowania innych białek: laktoferyny, albuminy i peroksydazy chrzanowej [6].

Leishmania spp. (leiszmania)

Wiciowce rodzaju *Leishmania* powodują u ludzi leiszmaniozę narządową, skórą i błon śluzowych. Leiszmania występuje w dwóch głównych formach: zewnątrzkomórkowej – promastigota, pasożytującej w jelicie owadów – przenosicieli i wewnątrzkomórkowej – amastigota, pasożytującej w makrofagach ssaków, w tym u człowieka. Ten dualizm powoduje, że pasożyt musi się dopasować do różnych środowisk życia. W badaniach *in vitro* wykazano, że postaci promastigota *L. chagasi* mogą wykorzystywać jako źródło żelaza: heminę, holotransferynę i hololaktoferynę, ale nie ferrytynę [37].

Wewnątrzkomórkowe formy *Leishmania spp.* zasiedlają niezwykle niszę wewnątrz makrofagów ssaków – wakuolę pasożytniczą, której wewnątrz jest silnie kwaśne i hydrolityczne. Zarażenie makrofagów nie prowadzi do zmiany intensywności pobierania przez nie transferyny, zmianie ulega natomiast ich system endocytarny. Endosomy zawierające TfR i transferynę zlewają się z wakuolą pasożytniczą. Uwolniona tam transferyna jest pobierana przez pasożyty, a następnie kierowana do lizosomo-podobnego przedziału ich komórki [10,24].

Wilson i wsp. [38] kontynuując badania nad mechanizmem przyswajania żelaza przez formy promastigotyczne *L. chagasi* stwierdzili, że pobierają one preferencyjnie żelazo w formie zredukowanej, co wiąże się z ekspresją zależnej od NADPH reduktazy żelazowej. Redukcja Fe^{3+} do Fe^{2+} w transferynie lub laktoferynie sprzyja ich internalizacji z udziałem monomerycznej cząsteczki o Mr 70 kDa, która wiąże jednak nie tylko transferynę i laktoferynę, ale również albuminę, a więc w przeciwieństwie do *Trypanosoma spp.* proces przyłączania białek wiążących żelazo u *Leishmania spp.* jest nieswoisty. Ta nieswoistość może być istotnym biologicznie walorem, który umożliwia wykorzystywanie różnych związków żelaza u różnych żywicieli.

Toxoplasma gondii (toksoplazma)

Pasożytuje wewnątrzkomórkowo u licznych gatunków ptaków i ssaków, w tym człowieka. Zarażenie przebiega z reguły bezobjawowo, z wyjątkiem osobników z osłabioną odpornością (chorzy na AIDS, biorcy przeszczepów itp.), u których inwazja *T. gondii* może mieć burzliwy przebieg i poważne następstwa.

Tanaka i wsp. [35] wykazali u toksoplazmy obecność białka o Mr 42 kDa przyłączającego zarówno bydlęcą transferynę, jak i bydlęcą laktoferynę oraz owotransferynę. Jaka jest biologiczna rola wiązania laktoferyny, nie wiadomo, tym bardziej że intensywność jej przyłączania wydaje się być niezależna od zawartości żelaza. Warto też w tym miejscu nadmienić, iż rok później Tanaka i wsp. [34] opisali wiązanie tych samych białek chelatujących żelazo u świdrowca *Trypanosoma brucei* (informacja podana we wcześniejszym fragmencie pracy) z tą różnicą, że u toksoplazmy wykryli tylko jedno białko wiążące, a u trypanosomy dwa – o Mr 40 i 43 kDa.

W błonie wakuoli pasożytniczej, wydzielonego i bezpiecznego przedziału komórkowego, w którym bytuje i namnaża się *T. gondii*, nie stwierdzono obecności TfR; już podczas penetracji typowe, wczesne markery endosomalne, m.in. TfR, są usuwane, uniemożliwiając zlanie się wakuoli z lizosomami i wewnątrzkomórkowe zabicie *T. gondii* [23]. Pozostaje więc otwartą kwestią, co jest źródłem i jaki jest mechanizm zaopatrzenia toksoplazmy w żelazo, skoro błona wakuoli pozwala tylko na swobodne przemieszczanie się cząsteczek o maksymalnej Mr 1300 Da. Z badań własnych *in vitro* wynika, że zarażenie *T. gondii* powoduje po 18 h obniżenie ekspresji TfR na makrofagach myszy (w sposób zależny od dawki), ale nie na fibroblastach, powszechnie używanych w laboratoriach do namnażania toksoplazmy [11]. Zmiany w ekspresji TfR na zarażonych komórkach są więc zależne od ich rodzaju.

Laktoferycyna, 25-aminokwasowy peptyd otrzymywany przez trawienie laktoferyny pepsyną, obniża infekcyjność sporozoitów *T. gondii*, mierzoną przez ich zdolność do penetracji komórek w hodowli *in vitro*, jak i podwyższenie dawki oraz przedłużenie czasu przeżycia zarażonych zwierząt doświadczalnych [26]. Chociaż laktoferycyna może być generowana *in vivo* w warunkach naturalnych z laktoferyny śluzu przewodu pokarmowego pod wpływem pepsyny żołądka, to nie jest pewne, czy mogą być osiągnięte aż tak wysokie stężenia, jak te określone w pracy jako słabo i silnie inhibicyjne (100 i 1000 µg/ml). Z kolei, aby wykorzystać żelazo związane z laktoferyną, pasożyty muszą być oporne na jej bezpośrednią cytotoksyczną aktywność. Brak dotychczas informacji o mechanizmach unikania tego pasożytojącego działania, zarówno w odniesieniu do *T. gondii*, jak i innych pasożytniczych pierwotniaków, zaś samo pobieranie laktoferyny wysyczonej żelazem ma niewątpliwie działanie propasożytnicze [12].

UWAGI KOŃCOWE

Problem pozyskiwania i przyswajania niezbędnego do życia żelaza u pasożytniczych pierwotniaków jest bardziej złożony niż u innych organizmów, m.in. ze względu na skomplikowane cykle rozwojowe pasożytów i złożone interakcje żywiciel-pasożyt, będące skutkiem długotrwałych ewolucyjnie kontaktów. Różne postaci rozwojowe pasożytniczych pierwotniaków mogą żyć u różnych gatunków żywicieli, nie tylko w różnych tkankach, ale również wewnątrz lub na zewnątrz komórek, co sprawia, że najprawdopodobniej wykorzystują różne mechanizmy zdobywania żelaza, niezbędnego do przeżycia i replikacji. W przeciwieństwie do bakterii, u pierwotniaków nie opisano dotychczas wydzielania sideroforów, które z dużym powinowactwem wiążą żelazo, a potem są internalizowane z udziałem swoistych receptorów ściany bakterii. Wyjątkowo wdzięcznym modelem do badań nad sposobami zaopatrzenia w żelazo okazały się wiciowce rodzaju *Trypanosoma*, ale tylko formy zewnątrzkomórkowe (trypomastigotyczne), bytujące w osoczu krwi. Bardzo skąpe informacje dotyczą bezwzględnych wewnątrzkomórkowych pasożytów, np. *Toxoplasma gondii* czy *Plasmodium spp.* (zarodziec). Mimo wieloletnich intensywnych badań, źródło i sposób zaopatrzenia

zarodźców malarii w żelazo pozostają nadal bardzo enigmatyczne [21,37]. Opisane dotychczas receptory dla transferyny surowiczej, głównego białka transportującego żelazo i dostarczającego go komórkom pierwotniaków, wyraźnie się różnią nie tylko u różnych gatunków, ale także stadiów rozwojowych jednego gatunku. To zróżnicowanie TfR dotyczy m.in. ich lokalizacji w komórkach pierwotniaków. Na przykład u *Leishmania spp.*, postać amastigota, rezydująca wewnątrzkomórkowo, cechuje się równomiernym rozmieszczeniem TfR na całej powierzchni komórki, podczas gdy postać zewnątrzkomórkowa – wybiórczym ich zgrupowaniem w kieszonce wici. Różne miejsca ekspresji TfR i ich endocytozy odzwierciedlają różne środowiska, w których dane pasożyty muszą przeżyć i stąd zapewne u postaci zewnątrzkomórkowych konieczność ukrycia TfR w kieszonce wici, co ogranicza dostęp komórek efektorowych systemu immunologicznego. Badanie metabolizmu żelaza u wewnątrzkomórkowych pasożytniczych pierwotniaków utrudnia fakt, że mogą one czerpać żelazo także z cytosolowych zasobów komórek żywicielskich, w sposób elastyczny wykorzystując egzogenne i endogenne źródła tego elementu, co wykazano u bakterii *Mycobacterium tuberculosis*, rezydujących w fagosomach makrofagów [25]. Warto też nadmienić, że surowicza transferyna o dużej zdolności wiązania nie tylko żelaza, ale i innych metali i w warunkach fizjologicznych tylko częściowo wysycona przez żelazo, może być wykorzystana do terapii, dostarczając do komórek, drogą zależną i niezależną od TfR, różne leki, w tym terapeutyczne kationy Ga^{3+} i Ru^{3+} o właściwościach przeciw-nowotworowych, szczególnie że komórki nowotworowe wykazują wysoką ekspresję TfR [19]. Znajomość procesów pobierania żelaza przez pasożytnicze pierwotniaki może więc mieć znaczenie nie tylko czysto poznawcze, ale i aplikacyjne.

LITERATURA

- [1] ABDALLAH FB, EL HAGE CHACHINE JM. Transferrins: iron release from lactoferrin. *J Mol Biol* 2000; **303**: 255–266.
- [2] AGUILERA O, QUIROS LM, FIERRO JF. Transferrins selectively cause ion efflux through bacterial and artificial membranes. *FEBS Lett* 2003; **548**: 5–10.
- [3] AISEN P. Transferrin receptor 1. *Int J Bioch Cell Biol* 2004; **36**: 2137–2143.
- [4] AISEN P, ENNS C, WESLING-RESNICK M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Bioch Cell Biol* 2001; **33**: 940–959.
- [5] ANSORGE I, STEVERDING D, MELVILLE S, HARTMANN C, CLAYTON C. Transcription of 'inactive' expression sites in African trypanosomes leads to expression of multiple transferrin receptors RNAs in bloodstream forms. *Mol Bioch Parasitol* 1999; **101**: 81–94.
- [6] BATISTA EJ, de MENEZES FEITOSA LF, de SOUZA W. The endocytic pathway in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 2000; **86**: 881–890.
- [7] BIEBINGER S, HELFERT S, STEVERDING D, ANSORGE I, CLAYTON C. Impaired dimerization and trafficking of ESAG6 lacking a glycosyl-phosphatidylinositol anchor. *Mol Bioch Parasitol* 2003; **132**: 93–96.
- [8] BORST P, ULBERT S. Control of VSG gene expression sites. *Mol Bioch Parasitol* 2001; **25**: 17–27.
- [9] BREIDBACH T, SCORY S, KRAUTH-SIEGEL RL, STEVERDING D. Growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* by the iron chelator deferoxamine. *Int J Parasitol* 2002; **32**: 473–479.

- [10] BURCHMORE RJS, BARRETT MP. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int J Parasitol* 2001; **31**: 1311–1320.
- [11] DZIADEK B, DYTNEŃSKA K, DŁUGOŃSKA H. The modulation of transferrin receptors level on mouse macrophages and fibroblasts by *Toxoplasma gondii*. *Pol J Microbiol* 2004; **53**, suppl.: 75–80.
- [12] FARNAUD S, EVANS RW. Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol* 2003; **40**: 395–405.
- [13] GERRITS H, MUSSMANN R, BITTER W., KIEFT R, BORST P. The physiological significance of transferrin receptor variations in *Trypanosoma brucei*. *Mol Bioch Parasitol* 2002; **119**: 237–247.
- [14] GRAB DJ, LONSDALE-ECCLES JD, OLI MW, CORBEIL LB. Lactoferrin-binding proteins of *Tritrichomonas foetus*. *J Parasitol* 2001; **87**: 106–1070.
- [15] IKUTA K, ZAK O, AISEN P. Recycling, degradation and sensitivity to the synergistic anion of transferrin in the receptor-independent route of iron uptake by human hepatoma (HuH-7) cells. *Int J Bioch Cell Biol* 2004; **36**: 340–352.
- [16] ISOBE T, HOLMES EC, RUDENKO G. The transferrin receptor genes of *Trypanosoma equiperdum* are less diverse in their transferrin binding site than those of broad-host range. *J Mol Evol* 2003; **56**: 377–386.
- [17] KRUZEL ML. Rola laktoferyny w rozwoju ostrych stanów zapalnych. *Post Hig Med Dośw* 2003; **57**: 377–404.
- [18] KULDA J, POISLOVÁ M, SUCHAN P, TACHEZY J. Iron enhancement of experimental infection of mice by *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res* 1999; **85**: 692–699.
- [19] LI H, SUN H, MING QUIAN Z. The role of the transferrin-transferrin receptor system in drug delivery and targeting. *Trends Pharm Sci* 2002; **23**: 206–209.
- [20] LIEU PT, HEISKALA M, PETERSON PA, YANG Y. The roles of iron in health and disease. *Mol Aspects Med* 2001; **22**: 1–87.
- [21] MABEZA GF, LOYEVSKY M, GORDEUK VR, WEISS G. Iron chelation therapy for malaria: a review. *Pharmacol Ther* 1999; **81**: 53–75.
- [22] MELO-BRAGA MB, da ROCHA-AZEVEDO B, SILVA-FILHO FC. *Tritrichomonas foetus*: the role played by iron during parasite interaction with epithelial cells. *Exp Parasitol* 2003; **105**: 111–120.
- [23] MORDUE DG, HÅKANSSON S, NIESMAN I, SIBLEY LD. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp Parasitol* 1999; **92**: 87–99.
- [24] MORGAN GW, HALL BS, DENNY PW, CARRINGTON M, FIELD MC. The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences. *Trends Parasitol* 2002; **18**: 491–496.
- [25] OLAKANMI O, SCHLESINGER LS, AHMED A, BRITIGAN BE. Intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis* acquires iron from both extracellular transferrin and intracellular iron pools. Impact of interferon-gamma and hemochromatosis. *J Biol Chem* 2002; **277**: 49727–49734.
- [26] OMATA Y, SATAKE M, MAEDA R, SAITO A, SHIMAZAKI K, YAMAUCHI K, UZUKA Y, TANABE S, SARASHINA T, MIKAMI T. Reduction of the infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Eimeria stiedaei* sporozoites by treatment with bovine lactoferricin. *J Vet Med Sci* 2001; **63**: 187–190.
- [27] PAL A, HALL BS, JEFFRIES TR, FIELD MC. Rab5 and Rab11 mediate transferrin and anti-variant surface glycoprotein antibody recycling in *Trypanosoma brucei*. *Biochem J* 2003; **374**: 443–451.
- [28] PONKA P, LOK CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Bioch Cell Biol* 1999; **31**: 1111–1137.
- [29] REYES-LÓPEZ M, SERRANO-LUNA JJ, NEGRETE-ABASCAL E, LEÓN-SICAIROS N, GUERRERO-BARRERA AL, de la GARZA M. *Entamoeba histolytica*: transferrin binding proteins. *Exp Parasitol* 2001; **99**: 132–140.
- [30] RYU JS, CHOI HK, MINDYHA SE, AHN MH. Effect of iron on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol* 2001; **87**: 457–460.
- [31] STEVERDING D. The transferrin receptor of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Int* 2000; **48**: 191–198.
- [32] STEVERDING D. The significance of transferrin receptor variation in *Trypanosoma brucei*. *Trends Parasitol* 2003; **19**: 125–127.
- [33] TACHEZY J. More on iron acquisition by parasitic protozoa. *Parasitol Today* 1999; **15**: 207.
- [34] TANAKA T, ABE Y, INOUE N, KIM WS, KUMURA H, NAGASAWA H, IGARASHI I, SHIMAZAKI K. The detection of bovine lactoferrin binding protein on *Trypanosoma brucei*. *J Vet Med Sci* 2004; **66**: 619–625.

- [35] TANAKA T, ABE Y, KIM WS, XUAN X, NAGASAWA H, IGARASHI I, KUMURA H, SHIMAZAKI K. The detection of bovine lactoferrin binding protein on *Toxoplasma gondii*. *J Vet Med Sci* 2003; **65**: 1377–1380.
- [36] TRINDER D, BAKER E. Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism *Int J Bioch Cell Biol* 2003; **35**: 292–296.
- [37] WILSON ME, BRITIGAN BE. Iron acquisition by parasitic protozoa. *Parasitol Today* 1998; **14**: 348–353.
- [38] WILSON ME, LEWIS TS, MILLER MA, McCORMICK ML, BRITIGAN BE. *Leishmania chagasi*: uptake of iron bound to lactoferrin requires an iron reductase. *Exp Parasitol* 2002; **100**: 196–207.
- [39] XIE H, HUFF GR, HUFF WE, BALOG JM, RATH NC. Effects of ovotransferrin on chicken macrophages and heterophil-macrophages. *Dev Comp Immunol* 2002; **26**: 805–815.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 12.12.2004 r.

Przyjęto: 10.01.2005 r.

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

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

METABOLIZM TREHALOZY U ROŚLIN

TREHALOSE METABOLISM IN PLANTS

Barbara WOLSKA-MITASZKO, Eliza MOLESTAK

Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, UMCS,
Lublin

Streszczenie. Niedawno wyodrębniono i scharakteryzowano roślinne geny kodujące procesy syntezy oraz rozkładu trehalozy. Obecnie coraz więcej danych wskazuje na udział trehalozy i trehalazy w procesach sygnalizacji cukrowej, kontroli alokacji fotoasymilatów oraz w regulacji przemian węglowodanów. Pomimo to funkcja metabolizmu trehalozy u roślin nie jest całkowicie wyjaśniona.

Słowa kluczowe: metabolizm trehalozy, geny *TPS* i *TPP*, trehalaza, *TPS1*, *Tre-6P*

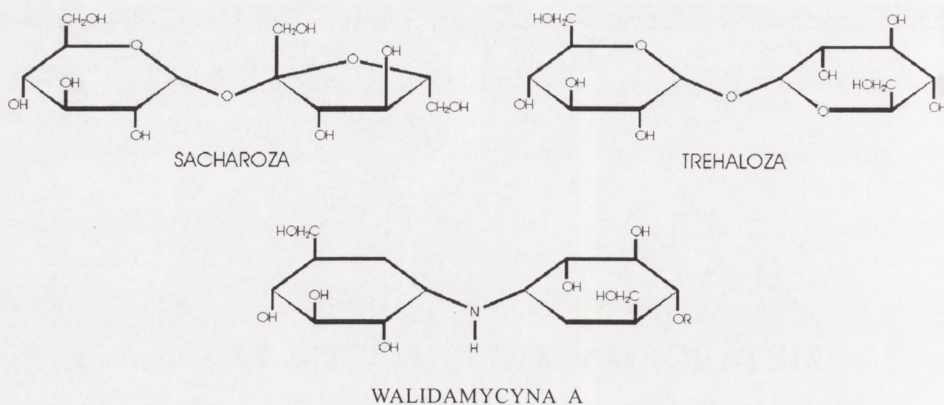
Summary. Plant genes encoding metabolism of trehalose were discovered not so long ago. There are more and more of dates indicating on regulatory function of trehalose and trehalase in sugar sensing and signaling as well as in the control of assimilate allocation. Nevertheless the function of trehalose metabolism in plants is still not clear.

Key words: trehalose metabolism, *TPS* and *TPP* genes, trehalase, *TPS1*, *Tre-6P*

Wykaz stosowanych skrótów: **Tre-6P** – trehalozo-6-fosforan, **TPS** – syntaza *Tre-6P*, **TPP** – fosfataza *Tre-6P*, **TPS** – gen kodujący syntazę *Tre-6P*, **TPP** – gen kodujący fosfatazę *Tre-6P*, **TPH** – hydrolaza *Tre-6P*, **THA** – trehalaza, **UDP-Glc** – urydynodifosfoglukoza, **Val A** – walidamycyna A.

1. WSTĘP

Disacharyd trehaloza występujący w świecie mikroorganizmów i zwierząt, identyfikowany wcześniej jako tzw. cukier grzybowy – mykoza, zbudowany jest z dwóch cząsteczek glukozy połączonych glikozydowym wiązaniem $\alpha, \alpha-1, 1$. To nietypowe wiązanie łączy anomeryczne węgle w strukturze obu cząsteczek i eliminuje wystąpienie właściwości redukujących. Chemiczna struktura trehalozy jest bardzo zbliżona do struktury sacharozy (ryc. 1), ale trehaloza w przeciwieństwie do sacharozy jest tylko nieznacznie słodka, natomiast jest bardziej stabilna i nie ulega tak łatwo jak sacharoza nieenzymatycznej hydrolizie w niskim pH oraz w podwyższonej tempera-



RYCINA 1. Struktura sacharozy, trehalozy i walidamycyny A

turze. Brak właściwości redukujących jest szczególnie istotny, gdyż podobnie jak sacharoza, nie wykazuje reakcji Maillarda z białkami i nie naraża komórek czy tkanek na drastyczne reakcje oksydacyjno-redukcyjne. Znaczna chemiczna inertność, stabilność oraz całkowity brak toksyczności [19,29] sprawia, że trehaloza jest niemal idealnym czynnikiem ochronnym dla zachowania struktury wielu enzymów, białek szkieletowych i błon [2,4,12,65]. Podobnie jak inne polyole, zabezpiecza i stabilizuje integralność błon przez utrzymywanie lipidów w stanie płynnym [12,18]. Zapobiega to ich niszczeniu przez separację faz, degradację czy fuzję [2,12]. Co więcej, trehaloza nie tylko stabilizuje struktury termowrażliwych białek, ale także zmniejsza stopień ich agregacji [2,19,54], co wiąże się z zastosowaniem trehalozy w stabilizacji i konserwacji leków, kosmetyków, suszonej czy mrożonej żywności oraz z krioprotekcją komórek, tkanek czy nawet narządów [19,29]. Potencjalne wykorzystanie trehalozy w przyszłości to możliwość wspomagania leczenia schorzeń neurodegeneracyjnych związanych z występowaniem nadmiernej agregacji białek bądź amyloidów [2,18,54,67].

Akumulacja trehalozy jest głównym mechanizmem zabezpieczającym komórki grzybów, bakterii oraz bezkręgowców (nicieni, skorupiaków i owadów) przed szkodliwymi warunkami środowiska. Dzięki temu wyspecjalizowane, anhydrobiotyczne formy rozwojowe tych organizmów mogą przetrwać szczególnie niekorzystne działanie wielu czynników [4,5,6,12,15,18,20]. Na uwagę zasługuje znaczne zróżnicowanie roli trehalozy u mikroorganizmów, od magazynowania źródła węgla do funkcji protekcyjnej i sygnałowej. Szczegółowe dane zgromadzone w wielu pracach przeglądowych i doświadczalnych dotyczą organizmów zarówno pro-, jak i eukariotycznych [4,12,18,20,23,26,35,54,65,67].

U roślin wyższych trehaloza jest spotykana sporadycznie, a jej rolę pełni „młodsza siostra”, sacharoza [26,65]. Wyjątek stanowią tzw. rośliny wskrzeszone, które dzięki akumulacji trehalozy mogą przetrwać stan niemal całkowitego odwodnienia, zachowując jedynie około 1% wody [26]. Należy do nich widliczka – *Selaginella lepidophylla* („róża Jerycha”), *Myrothamnus flabellifolia* i trawa *Sporobolus staphianus*. Poziom

trehalozy jest u tych roślin wysoki i osiąga 10–20% suchej masy [26,35]. U innych gatunków roślin obecność trehalozy stwierdzana jest bardzo rzadko, np. w owocach czy kwiatach niektórych przedstawicieli *Apiaceae* [35]. Sądzono więc, że rośliny nie syntetyzują i nie akumulują trehalozy, podobnie jak ssaki [31,39]. Dopiero niedawno zidentyfikowano geny kodujące enzymy biosyntezy trehalozy [7,33,62,63,73]. Spowodowało to gwałtowny wzrost zainteresowania metabolizmem trehalozy w nadziei na uzyskanie nowych odmian roślin wykazujących wzmoczoną tolerancję na suszę i zasolenie [24,71] oraz ze względu na poszukiwanie źródeł taniego i łatwo dostępnego disacharydu. Poza tym wprowadzanie inhibitora trehalazy, walidamycyny A, do rzodkiewnika *Arabidopsis thaliana* potwierdziło możliwość endogennej syntezy i akumulacji trehalozy [27,35,36], jak również obecność u roślin genów syntezy trehalozy homologicznych do genów *TPS* i *TPP* z drożdży i bakterii [65].

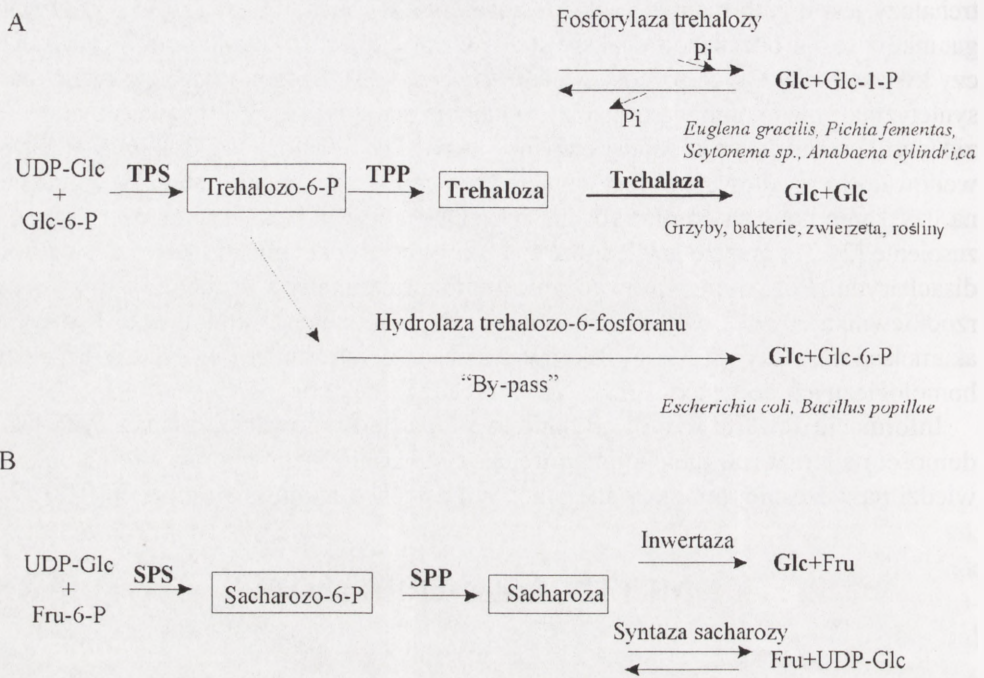
Informacje zawarte w tym artykule są próbą podsumowania zasadniczych wiadomości na temat roli metabolizmu trehalozy u roślin. Stanowią także rodzaj odpowiedzi na wcześniej publikowane prace w Postępkach Biologii Komórki [10,30,57].

2. METABOLIZM TREHALOZY

2.1. Biosynteza trehalozy

Biosynteza trehalozy u większości organizmów [4,18,23,50,54] zbliżona jest do syntezy sacharozy. Jest to dwuetapowy proces transferu glukozy zachodzący w cytoplazmie, gdzie donorem glukozy jest UDP-glukoza, a akceptorem glukozo-6P. W pierwszym etapie, przy udziale syntazy trehalozo-6-P, *TPS* (EC 2.4.1.15) powstaje ufosforylowany intermediat i UDP (ryc. 2). Drugi etap syntezy polega na defosforylacji wytworzonego prekursora, Tre-6P, pod wpływem fosfatazy trehalozo-6P, *TPP* (EC 3.1.3.12) i prowadzi do wytworzenia zdefosforylowanego disacharydu, tj. trehalozy oraz recykliczacji wolnego fosforanu nieorganicznego (Pi).

Podczas sekwencjonowania genomu *Arabidopsis* ujawniono geny kodujące endogenną aktywność syntazy *TPS*. Ekspresja tych genów w drożdżowych mutantach $\Delta tps1$ pozwoliła u *Arabidopsis* zidentyfikować gen *AtTPS1*, a u *Sellaginella lepidophylla* gen *SITPS1* [7,33,63,73]. Obecnie wiadomo, że u *Arabidopsis* występuje aż 11 genów homologicznych do drożdżowego genu *TPS1*, zgrupowanych w dwóch podrodzinach/klasach [33]. W klasie I wyodrębniono 4 zbliżone geny (*AtTPS1-4*) o 63–80% identyczności sekwencji, z których tylko gen *AtTPS1* koduje funkcjonalną aktywność *TPS* wyrażaną w drożdżowych mutantach $\Delta tps1$. Gen ten zawiera unikalne, N-terminalne wydłużenie niespotykane w innych roślinnych homologach *TPS*, jak również w drożdżowym genie *TPS1* (ryc. 3) [33,62]. Geny *AtTPS5-11* klasy II (54–83% identyczności sekwencji) zawierają w swej części C-terminalnej regiony kodujące aktywność fosfatazową. Analogicznie jak u drożdży określono je jako tzw. geny dwuczęściowe, kodujące N-terminalną domenę o aktywności syntazy i C-terminalną domenę o aktywności fosfatazy [33,62,63].

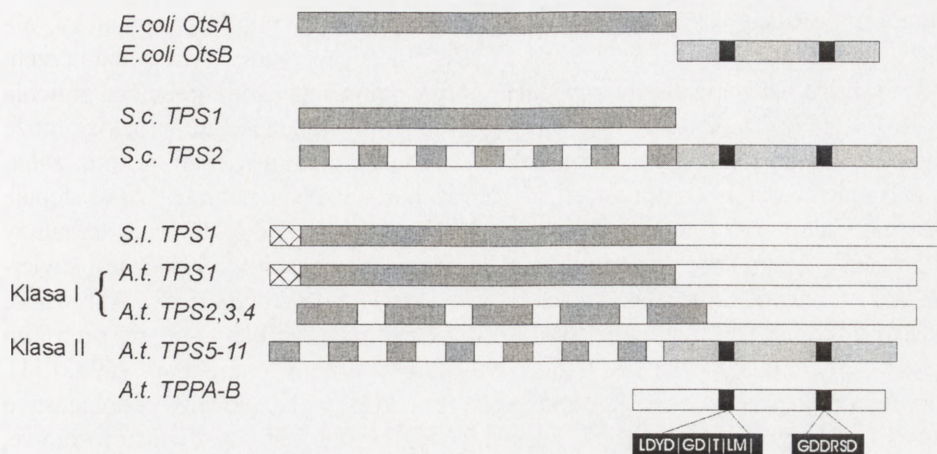


RYCINA 2. Porównanie biosyntezy i degradacji trehalozy (A) oraz sacharozy (B) (wg [26, 35], zmodyfikowane i uzupełnione)

Przy użyciu komplementacji termowrażliwych drożdżowych mutantów $\Delta tps2$ scharakteryzowano u *Arabidopsis* dwa geny kodujące fosfatazę trehalozo-6P, TPP: *AtTPPA* i *AtTPPB* [62]. Geny te zawierają konserwatywne fragmenty charakterystyczne dla sekwencji fosfatazowych (ryc. 3) [33]. Poza tymi obszarami podobieństwo do innych genów fosfatazowych nie jest duże. Geny *AtTPPA* i *AtTPPB* wyrażane są w kwiatach i innych młodych, rozwijających się tkankach roślinnych [36,49]. Przy użyciu RT-PCR wykazano tkankowo specyficzną ekspresję tych genów, regulowaną być może zależnie od stadium rozwoju rośliny [26,33]. Ilość genów, homologów *TPP*, może nadal wzrastać. Z dużym prawdopodobieństwem prognozowany jest udział kolejnych homologów *TPP* (*AtTPPC* - *AtTPPJ*), co zwiększałoby do 21 liczbę genów metabolizmu trehalozy u *Arabidopsis* [52].

2.2. Rozkład trehalozy

Trehaloza hydrolizowana jest nieodwracalnie do dwóch cząsteczek glukozy przez trehalazę, specyficzną α, α -glukohydrolazę (EC 3.2.1.28). Alternatywnie trehaloza może być metabolizowana przy udziale fosforylazy trehalozy (EC 2.4.1.64) (ryc. 2). U mikroorganizmów trehaloza wykorzystywana jest jako endo- i egzogenne źródło węgla, co wiąże się z występowaniem np. u grzybów dwóch typów odmiennych trehalaz [4,14,23,50,54]. Intrygujące jest, że u roślin i zwierząt trehalaza jest równie szeroko rozpowszechniona, pomimo braku endogennego substratu [31,39]. Egzogenna trehaloza



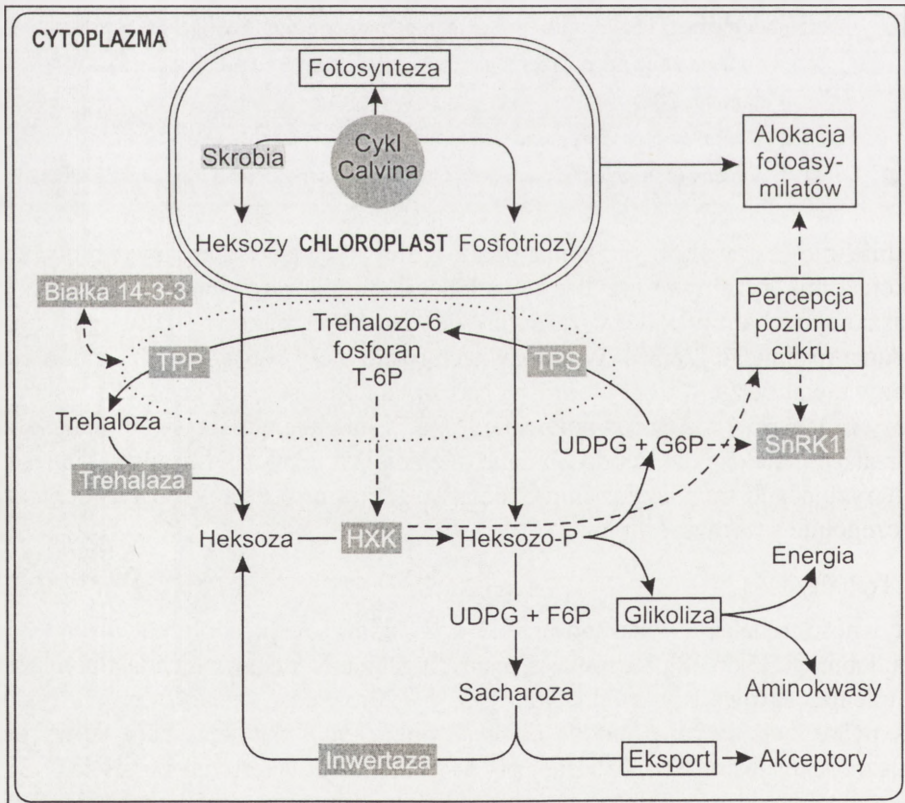
RYCINA 3. Struktura genów kodujących biosyntezę trehalozy u mikroorganizmów i roślin (wg [33], zmienione; *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*), *Selaginella lepidophylla* (*S.l.*), *Arabidopsis thaliana* (*A.t.*)).

generalnie nie jest wykorzystywana przez rośliny. Wyjątkiem są symbiotyczne interakcje z mikoryzalnymi grzybami czy bakteriami wiążącymi azot, gdzie poziom wytwarzanej trehalozy zależy zarówno od genotypu bakterii, jak i genotypu gospodarza roślinnego [28,35]. W brodawkach roślin motylkowatych obniżeniu ilości trehalozy towarzyszy wzrost ilości sacharozy, natomiast podczas stresu poziom trehalozy i sacharozy rośnie równocześnie [26,35]. Interakcje roślina – drobnoustroje wytwarzające trehalozę nie są odosobnione, niemniej na tle niezbyt licznych doniesień charakteryzujących trehalozę roślinne niełatwo jest wnioskować, jaki typ trehalazy jest szczególnie rozpowszechniony.

2.2.1. Trehalaza

Aktywność trehalazy wykazano przede wszystkim u roślin motylkowatych (soja, lucerna, łubin) [1,35,66,68], ale również u innych gatunków roślin, takich jak: pomidory, tytoń, trzcina cukrowa czy rzodkiewnik [35,36]. Aktywność trehalazy u tych roślin, jak i w pyłku kwiatowym *Camellia japonica* oraz *Lilium* charakteryzuje się wysoką specyficznością substratową, optimum pH 4–7 oraz znaczną termostabilnością [1,35]. Tak jak u drożdży, roślinna trehalaza jest specyficznie hamowana przez walidamycynę A, antybiotyk pochodzący ze *Streptomyces hygroscopicus* [26,27,36]. Zahamowanie

aktywności trehalazy u *Arabidopsis* powoduje nie tylko akumulację trehalozy, ale równoczesną redukcję zawartości sacharozy i skrobi, zahamowanie wydłużenia korzeni siewek oraz gromadzenie skrobi w pędach; przy czym gromadzona trehaloza zmienia aktywność syntazy sacharozy i inwertazy [35,49]. Niewykluczone, że trehaloza może być toksyczna dla roślin powodując zakłócenia metabolizmu sacharozy oraz zahamowanie syntezy ściany komórkowej [35]. U roślin motylkowatych trehalaza występuje przede wszystkim w brodawkach korzeniowych, ograniczając lokalizację trehalozy wytwarzanej przez mikroorganizmy [26,28,35]. Poza brodawkami trehalaza jest stwierdzana także w innych organach i tkankach roślin motylkowatych [26,35,68]. Aktywność trehalazy z brodawek korzeniowych soi (*Glycine max*) charakteryzuje się szerokim zakresem optymalnego pH (3,5–7) oraz wysokim optimum temperatury (59°C) [1]. Enzym ten (glikoproteina o masie cząsteczkowej 66 kDa) wykazuje duże podobieństwo do kwaśnych trehalaz grzybowych i jest niewrażliwy na kationy dwuwartościowe, związki chelatowe i sulfhydrylowe [1]. Obecność trehalazy wykazano w sterylnych hodowlach tkanek korzenia soi, co sugeruje, że w brodawkach korzeniowych enzym ten jest pochodzenia roślinnego [28,35]. Aktywność trehalazy lokalizowana nie tylko w zainfekowanej strefie brodawek, lecz także w ich rdzeniu, świadczy o potencjalnym



RYCINA 4. Powiązanie metabolizmu trehalozy z przemianami sacharozy i fotosyntezą (wg [41] zmienione)

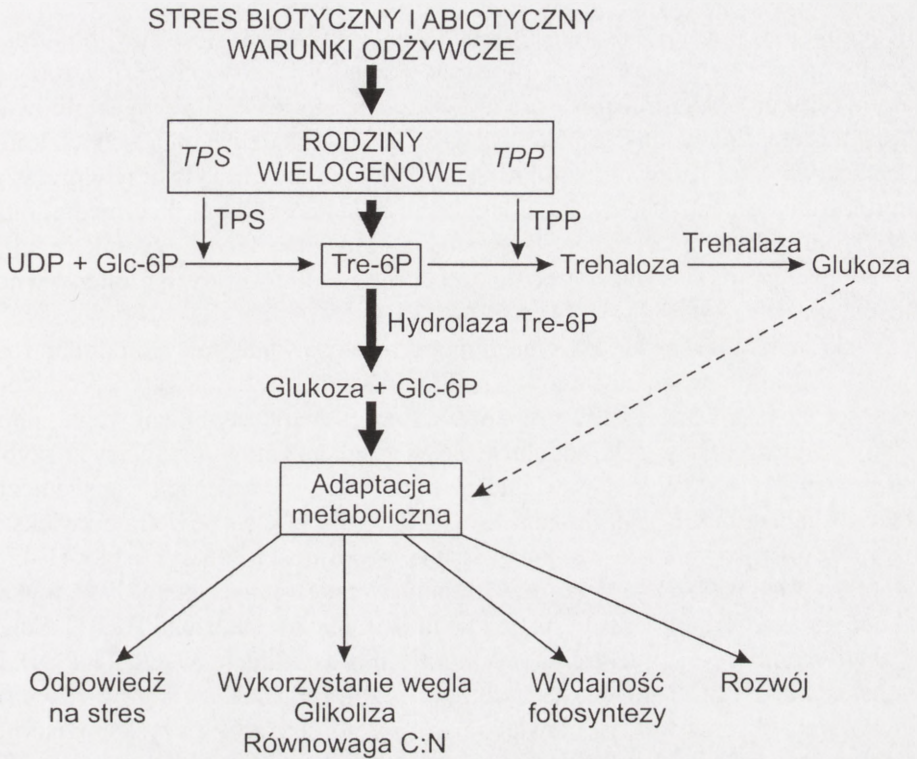
zabezpieczeniu roślin przed obecnością tego disacharydu [1,35]. Gen *GMTRE1*, kodujący trehalazę w komórkach soi, ulega ekspresji we wszystkich organach, na niskim, lecz stałym poziomie [1]. Podczas sekwencjonowania genomu *Arabidopsis* zidentyfikowano izolog T19F06.1 wykazujący wysoką homologię do genu *GMTRE1*, chociaż homologia na poziomie sekwencji aminokwasów wynosi tylko 59% [36]. Przypuszcza się, że pojedynczy gen koduje trehalazę nie tylko u *Glycine max* i *Arabidopsis*, ale najprawdopodobniej także u innych gatunków roślin [1,26,36].

Ekspresja genu kodującego trehalazę i aktywność tego enzymu mogą być indukowane podczas infekcji *Arabidopsis* przez produkujący trehalozę fitopatogen *Plasmodiophora brassicae* [8]. Indukcja trehalazy zachodzi również przy infekcji ryżu przez grzyb *Magnaporthe grisea*, który dla swego rozwoju wymaga rozkładu trehalozy w tkankach rośliny [22,58]. Związane jest to z post-translacyjną aktywacją trehalazy zlokalizowanej w grzybowej ścianie komórkowej [58]. Co więcej, infekcyjność patogenicznych dla człowieka szczepów *Candida* oraz innych patogenów grzybowych dotyczy także zmian metabolizmu trehalozy [3,60,69,70,72].

3. REGULACYJNE WŁAŚCIWOŚCI SYNTAZY TPS I TREHALOZO-6 FOSFORANU

Możliwość heterologicznej ekspresji roślinnych genów TPS w komórkach mikroorganizmów i *vice versa* ujawniła szereg niespodziewanych obserwacji [26,27,33,44,73]. Okazało się, że funkcja genu *AtTPS1* prowadzi do wytworzenia letalnego fenotypu w rozwoju zarodkowym *Arabidopsis*, gdyż zatrzymywany jest etap inicjacji odkładania materiałów zapasowych podczas dojrzewania nasion [16]. *In vitro* przy niskim poziomie sacharozę zablokowanie rozwoju zarodków mutantów *tps1* wskazuje, że funkcja *AtTPS1* związana z metabolizmem cukrów niezbędna jest dla prawidłowego wzrostu i rozwoju tej rośliny. Poza tym mutanty *tps1*, letalne w embriogenezie zarodków, wykazują zredukowany poziom Tre-6P, co powoduje niemożność wykorzystywania dostępnych cukrów i w konsekwencji zmniejsza efektywność fotosyntezy [16,17]. N-terminalne skrócenie genów *AtTPS1* i *SITPS1* wzmacnia aktywność ekspresyjnego białka TPS w komórkach drożdży, prowadząc do wzrostu poziomu trehalozy przewyższającego jej endogenne stężenie w komórkach tych mikroorganizmów [59]. Mutacje Arg¹⁷ i Leu²⁷ zmieniają niską aktywność enzymów TPS o pełnej sekwencji aminokwasowej, tak więc domeny N-końca roślinnych TPS mogą stanowić region aktywacji enzymu, w którym Arg i Leu działają jako potencjalne miejsca interakcji z białkami regulatorowymi, np. z białkami 14-3-3 [34,59]. Uszkodzone syntazy zarówno z widliczki, jak i z rzodkiewnika wykazują wysoką, ale zróżnicowaną aktywność. TPS z *Selaginella* może wykazywać nawet 5-krotnie wyższą aktywność w porównaniu z analogicznie skróconą syntazą TPS z *A. thaliana*, co wyjaśnia wysoką akumulację trehalozy u *Selaginella* i praktyczny jej brak u *Arabidopsis* [59]. Różnica w akumulacji trehalozy może

wynikać z odmiennej regulacji na poziomie białka TPS, jak i z różnicy w aktywności trehalazy z obu roślin [59]. Potencjalnie wysoka aktywność TPS wskazuje na funkcję sygnałową, tym bardziej że może wzrastać okazjonalnie, np. podczas transdukcji sygnału, podobnie jak aktywność cykazy adenylanowej w komórkach drożdży [37]. Ilość trehalozy, którą można zidentyfikować w komórkach roślinnych, jest znikoma (0,15 mg/g suchej masy lub mniej [41,47]), niewykluczone więc, że roślinne białka TPS mają genetycznie uwarunkowaną niższą aktywność katalityczną w porównaniu z syntazami TPS z drożdży [59]. Ekspresja genów metabolizmu trehalozy z *E. coli*, kodujących fosfatazę TPP i hydrolazę TPH w mutantach *A. thaliana* [52] potwierdziła niezbędność AtTPS1 dla procesów prawidłowej embriogenezy u tej rośliny [16]. Trehaloza (100 μ M) dostarczana do hodowli zarodków mutantów *tps1* niwelowała efekt tej mutacji, a ekspresja trehalazy z *E. coli* zabezpieczała siewki przed toksycznym oddziaływaniem wysokiego stężenia tego cukru w podłożu [52]. Wynika stąd, że komórki roślinne mogą pobierać zewnątrzkomórkową trehalozę, a fenotyp letalnego mutantu *Attps1* może być wyeliminowany przez ekspresję *TPS1* z *E. coli* [52]. Poza tym komplementacja mutantów *Attps1* przez TPS z *E. coli*, wykazuje dodatkowo, że nie trehaloza, lecz Tre-6P niezbędny jest dla prawidłowego wykorzystania węglowodanów, wzrostu i rozwoju tej rośliny [41,42,51]. *In vitro*, Tre-6P nie jest inhibitorem aktywności HXK z *Arabidopsis* i liści szpinaku [16,17] i być może u roślin w regulacji metabolizmu cukrów funkcjonuje „molekularny przełącznik” inny niż HXK [38,43]. Poza tym, przez tzw. karmienie cukrowe wykazano, że proces glikolizy także u roślin jest regulowany zależnie od poziomu Tre-6P, a niewykluczone, że ten związek może również pośredniczyć w kontroli oddychania i szlaku pentozowego [52,64]. Regulacyjne oddziaływanie Tre-6P, którego brak jest letalny w rozwoju zarodków *Arabidopsis* [16], udokumentowane w pracach zespołu Smeekensa [52,61] wykazało, że akumulacja Tre-6P powoduje gwałtowne zahamowanie wzrostu siewek rosnących na trehalozie, wynikające z niedostatecznej defosforylacji Tre-6P, spowodowanej wysokim poziomem trehalozy [52]. Przez analizę ekspresji 35 genów związanych z metabolizmem Tre-6P, z których połowę stanowią geny uczestniczące w odpowiedzi roślin na stres, wykazano, że poziom Tre-6P skorelowany jest z ekspresją części z tych genów, w tym *AtPK19*, genu kinazy rybosomalnego białka S6 oraz genu *AtKIN11*, kinazy związanej z wykorzystaniem cukrów u *Arabidopsis* [52]. Postulowana obecnie centralna rola Tre-6P w metabolizmie trehalozy zwraca szczególną uwagę na funkcję TPS1 w generalnej regulacji metabolizmu węglowodanów, powiązanej z oddziaływaniem czynników stresowych, hormonów, statusem związków azotowych i efektywnością fotosyntezy (ryc. 5) [11,21,42,44,51,52], tym bardziej że, jak wykazano ostatnio, syntaza TPS1 niezbędna jest nie tylko do wegetatywnego wzrostu, ale również do procesów kwitnienia [61].



RYCINA 5. Centralne umiejscowienie T-6P w procesach adaptacji metabolicznej u roślin (wg [42, 52]; opracowane i zmienione)

UWAGI KOŃCOWE

Obecność endogennej trehalozy przez długi czas była przypisywana jedynie tzw. roślinom wskrzeszonym [26,35]. U innych roślin stosunkowo niedawno stwierdzono obecność funkcjonalnych genów syntezy tego disacharydu [7,33,63,73]. Pomimo że metabolizm trehalozy i sacharozy u roślin wykazuje wyraźną analogię (ryc. 2) [18,26,35], nie jest jasne, jak dokładnie trehaloza wpływa na ekspresję genów, aktywność enzymów i efektywność fotosyntezy. Oprócz roślin jedynie cyjanobakterie zdolne są do syntezy sacharozy zachodzącej w plastydach pochodzących od cyjanobakteryjnych przodków [13,40,45]. Młodsza ewolucyjnie sacharoza ma przewagę nad „starszą siostrą” – trehalozą, wykazując większą rozpuszczalność w niskich temperaturach i lepsze parametry transportu floemowego przy wysokich, zbliżonych do 1 M [55] stężeniach tego cukru [26,65]. Poza tym hydroliza sacharozy zachodzi przy udziale dwóch enzymów: invertazy, ale również syntazy sacharozy, co ma znaczenie regulacyjne [32,48,56,57]. Zredukowana dostępność sacharozy podczas interakcji rośliny – drobnoustroje może być korzystna dla roślin, gdyż tylko niektóre z fito-

patogenów czy symbiontów mają zdolność wykorzystania sacharozy, podczas gdy inne, np. grzyby ektomikoryzalne są często pozbawione aktywności inwertazy [35]. Natomiast akumulacja trehalozy nie jest korzystna, to też rośliny wyewoluowały w kierunku gromadzenia innych niż trehaloza związków zabezpieczających ich komórki przed szkodliwymi wpływami środowiska [33,65]. Poza tym wytworzyły precyzyjnie kontrolowany system syntezy, jak i degradacji trehalozy [41,42]. Intermediat biosyntezy, Tre-6P aktualnie zaczyna być rozpatrywany jako nowy czynnik regulujący procesy percepcji i sygnalizacji poziomu cukrów, skorelowanych z intensywnością fotosyntezy (ryc. 5) [17,41,42,44,51,52].

Zwiększenie wydajności fotosyntezy pomimo stosowania nowych odmian roślin i różnego rodzaju nawożenia stanowi ciągle wyzwanie dla fizjologów i producentów żywności. Poszukiwane są nowe możliwości zwiększenia asymilacji węgla, poprzez zmiany ekspresji genów czy modulację aktywności enzymów regulujących szybkość fotosyntezy [41,42]. Wzrost wydajności fotosyntezy w roślinach transgenicznych można osiągnąć przez insercję genu *ostA* z *E. coli* [41], co powoduje zwiększenie ilości Tre-6P prowadzące do zwiększenia wydajności fotosyntezy [41,42,44]. Natomiast rośliny rzodkiewnika czy tytoniu z nadekspresją genu *TPP* wykazują znikomy poziom Tre-6P i ekspresja genów fotosyntezy jest obniżona [17,41]. Sugeruje to, że poziom Tre-6P, nie trehalozy, kontroluje asymilację węgla (ryc. 4) [41]. Zastosowanie HPLC i użycie specyficznych izoform HXK z *Yarrowia lypolytica* [47] pozwala obecnie wykryć niewielkie zmiany ilości Tre-6P i uzyskać wiarygodne wyniki potwierdzające informację, że wysoka ekspresja *TPS* może zwiększyć wydajność fotosyntezy nawet 5-krotnie [41].

Zdolność percepcji sygnałów węglowych i azotowych aktywuje geny regulujące zarówno wydajność fotosyntezy, jak i asymilację azotu (ryc. 5) [11,21,46]. W wielokomórkowym organizmie roślinnym jest to dodatkowo skomplikowane, gdyż w optymalizacji całościowego przepływu metabolitów zaangażowane są zintegrowane sieci sygnałów cukrowo-azotowych [11,21], krzyżujące się z drogami sygnałów hormonalnych i stresowych [11,30,46], transmitowanych przez procesy fosforylacji/defosforylacji, ubikwitynacji czy farnesylicacji [53,64]. Połączenie tych różnorodnych mechanizmów wymaga komunikacji między szlakami (*cross-talk*), jak i między odpowiednimi kompartmentami subkomórkowymi [21,30,53,64]. Niedawno wykazano, że mutanty *tps1* owadów są również letalne [9]. Powstaje mnóstwo pytań, na które brak dziś odpowiedzi, np. czy istnieją konserwatywne, wspólne miejsca interakcji Tre-6P u drożdży, roślin i owadów, organizmów zróżnicowanych genetycznie i fizjologicznie; czy anonsowana możliwość genetycznych manipulacji poziomem Tre-6P [41,44] doprowadzi do znaczącej regulacji efektywności fotosyntezy; jak regulowana jest aktywność białka TPS1 – czy na poziomie aktywacji preprokursora, przez wiązanie białek 14-3-3, czy przez zmiany konformacyjne kompleksu donor-TPS-akceptor [25]. Pomimo że obecnie pojawiają się ciągle nowe informacje dotyczące zaangażowania TPS1 i Tre-6P w procesach kontroli fotosyntezy, asymilacji N₂, wzrostu i rozwoju roślin, dalsze badania są nadal niezbędne dla pełnego wyjaśnienia ich funkcji [17,41,42,44,46,52].

LITERATURA

- [1] AESCHBACHER RA, MÜLLER J, BOLLER T, WIEMKEN A. Purification of the trehalase *GMTRE1* from soybean nodules and cloning of its cDNA. *GMTRE1* is expressed at a low level in multiple tissues. *Plant Physiol* 1999; **119**: 489–495.
- [2] ALLISON SD, CHANG B, RANDOLPH T, CARPENTER JF. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Arch Biochem Biophys* 1999; **365**: 289–298.
- [3] ALVAREZ-PERAL FJ, ARGUELLES JC. Changes in external trehalase activity during human serum-induced dimorphic transition in *Candida albicans*. *Res Microbiol* 2000; **151(10)**: 837–843.
- [4] ARGUELLES JC. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeast: a comparative analysis. *Arch Microbiol* 2000; **174**: 217–224.
- [5] BEHM CA. The role of trehalose in the physiology of nematodes. *Int J Parasitol* 1997; **27**: 215–229.
- [6] BELTRAN FF, CASTILLO R, VICENTE-SOLER J, CANSADO J, GACTO M. Role for trehalase during germination of spores in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol Lett* 2000; **193(1)**: 117–121.
- [7] BLAZQUEZ MA. Isolation and molecular characterization of *Arabidopsis TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J* 1998; **13**: 685–689.
- [8] BRODMAN A, SCHULLER A, LUDWIG-MÜLLER J, AESCHBACHER RA, WIEMKEN A, BOLLER T, WINGLER A. Induction of trehalase in *Arabidopsis* plants infected with trehalose-producing pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Mol Plant Microb Int* 2002; **7**: 693–700.
- [9] CHEN Q, MA E, BEHAR KL, XU T, HADDAD GG. Role of trehalose phosphate synthase in anoxia tolerance and development in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 2002; **277**: 3274–3279.
- [10] CIERESZKO I. Regulacyjna rola cukrów, percepcja cukrów i przekazywanie sygnału w komórkach roślinnych. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 269–289.
- [11] CORUZZI MG, ZHOU L. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging matrix effects. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 247–253.
- [12] CROWE JH, CARPENTER JF, CROWE LM. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 1998; **60**: 73–103.
- [13] CURATTI L, PORCHIA AC, HERRERA-ESTRELLA L, SALERNO GL. A procaryotic sucrose synthase gene (*sus A*) isolated from a filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium encodes a protein similar to those of plants. *Planta* 2000; **211**: 729–735.
- [14] D'ENFERT C, BONINI BM, ZAPPELLA PDA, FONTAINE T, da SILVA AM, TERENCE HF. Neutral trehalases catalyze intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* 1999; **32**: 471–483.
- [15] DMITRYJUK M, ŻÓŁTOWSKA K. Purification and characterization of acid trehalase from muscle of *Ascaris suum* (Nematoda). *Comp Biochem and Physiol* 2003; **136**: 61–69.
- [16] EASTMOND PJ, van DIJKEN AJ, SPIELMAN M, KERR A, TISSIER AF, DICKINSON HG, JONES JD, SMEEKENS SC, GRAHAM IA. Trehalose-6-phosphate synthase I, which catalyses the first step in trehalose synthesis is essential for *Arabidopsis* embryos maturation. *Plant J* 2002; **29**: 225–235.
- [17] EASTMOND PJ, LI Y, GRAHAM A. Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants. *J Exp Bot* 2003; **54**: 533–537.
- [18] ELBEIN AD, PAN YT, PASTUSZAK I, CARROLL D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 2003; **13**: 17R–27R.
- [19] EROGLU A, RUSO MJ, BIEGANSKI R, FOWLER A, CHALEY S, BAYLEY H, TONER M. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature Biotechnol* 2000; **18**: 163–167.
- [20] FILLINGER S, CHAVEROCHE MK, van DIJCK P, de VRIES R, RUIJTER G, THEVELEIN J, d'ENFERT C. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 2001; **147**: 1851–1862.
- [21] FOYER CH, PARRY M, NOCTOR G. Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *J Exp Bot* 2003; **54**: 585–593.
- [22] FOSTER AJ, JENKINSON JM, TALBOT NJ. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *Eur Mol Biol Org* 2003; **22**: 225–235.
- [23] FRANÇOIS J, PARROU JL. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 2001; **25**: 125–145.

- [24] GARG AK, KIM JK, OWENS TG, RANWALA AP, CHOI YD, KOCHIAN LV, WU RJ. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 15898–15903.
- [25] GIBSON RP, TARLING CA, ROBERTS S, WITHERS SG, DAVUES GJ. The donor subsite of trehalose-6-phosphate synthase. *J Biol Chem* 2004; **279**: 1950–1955.
- [26] GODDIJN OJM, van DUN K. Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 315–319.
- [27] GODDIJN OJM, VERWOERD TC, VOOGE E, KRUTWAGEN RWHH, de GRAAF PTHM, POELS J, van DUN K, PONSTEIN AS, DAMM B, PEN J. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol* 1997; **113**: 181–190.
- [28] GORDON AJ, LEA PJ, ROSENBERG C, TRINCHANT JC. Nodule formation and function in legumes. W: LEA PJ and J-F Morot-Gaudry, „Plant Nitrogen”. Springer-Verlag/INRA-Editions, Versailles, FR ISBN; 2001: 101–146.
- [29] GUON, PUHLEV I, BROWN DR, MANSBRIDGE J, LEVINE F. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotechnol* 2000; **18**: 168–171.
- [30] HETMANN A, KOWALCZYK S. Mono- i disacharydy – drożdżowymi, roślinnymi i zwierzęcymi cząsteczkami sygnałowymi regulującymi ekspresję genów. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 87–112.
- [31] ISHIHARA R, TAKETAMI S, SASAI-TAKEDATSU M, KINO M, TOKUNAGA R, KOBAYASHI Y. Molecular cloning, sequencing and expression of cDNA encoding human trehalase. *Gene* 1997; **202**: 69–74.
- [32] KOCH K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 235–246.
- [33] LEYMAN B, van DIJCK P, THEVELEIN JM. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 510–513.
- [34] MOORHEAD G. Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *Plant J* 1999; **18**: 1–12.
- [35] MÜLLER J, WIEMKEN A, AESCHBACHER RA. Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. *Plant Sci* 1999; **147**: 37–47.
- [36] MÜLLER J, AESCHBACHER RA, WINGLER A, BOLLER T, WIEMKEN A. Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1086–1093.
- [37] NOWAK JZ. Cykliczny AMP: synteza, inaktywacja i mechanizmy działania w komórce. W: Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. PWN 2004: 37–63.
- [38] OESTERHELT C, GROSS W. Different sugar kinases are involved in the sugar sensing of *Galdieria sulphuraria*. *Plant Physiol* 2002; **128**: 291–299.
- [39] OESTERREICHER TJ, MARKESICH DC, HENNING SJ. Cloning, characterization and mapping of the mouse trehalase (Treh) gene. *Gene* 2001; **270**: 211–220.
- [40] PAGE-SHARP M, BEHM CA, SMITH GD. Involvement of the compatible solutes trehalose and sucrose in the response to salt stress of a cyanobacterial *Scytonema species* isolated from desert soils. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1472**: 519–528.
- [41] PAUL M, PELLNY T, GODDIJN O. Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 197–200.
- [42] PAUL M, PELLNY T. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J Exp Bot* 2003; **54**: 539–547.
- [43] PEGO JV, SMEEKENS SCM. Plant fructokinases: a sweet family get-together. *Trends Plant Sci* 2000; **5**: 531–536.
- [44] PELLNY TK, GHANNOUM O, CONROY JP, SCHLUEPMANN H, SMEEKENS S, ANDRALOJC J, KRAUSE KP, GODDIJN O, PAUL MJ. Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnol* 2004; **2**: 71–82.
- [45] PORCHIA AC, SALERNO GL. Sucrose biosynthesis in a procaryotic organism: sucrose synthase from *Anabaena sp.* strain PCC 7119 is remarkably different from the plant enzymes with respect to substrate affinity and amino-terminal sequence. *Planta* 1999; **210**: 34–40.
- [46] POURTAU N, MARES M, PURDY S, QUENTIN N, RUEL A, WINGLER A. Interactions of abscisic acid and sugar signalling in the regulation of leaf senescence. *Planta* 2004; **219**: 765–772.
- [47] ROESSNER U, WAGNER C, KOPKA J, TRETHEWEY RN, WILLMITZER L. Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J* 2000; **23**: 131–142.
- [48] ROITCH T, BALIBREA ME, HOFMANN M, PROELS R, SINHA AK. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J Exp Bot* 2003; **54**: 513–524.

- [49] ROLLAND F, MOORE B, SHEEN J. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 2002; **14**: 185–205.
- [50] ROLLAND F, WINDERICKX J, THEVELEIN JM. Glucose-sensing and signaling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research* 2002; **2**: 183–201.
- [51] SCHLUEPMANN H, PELLNY T, VAN DIJKEN A, SMEEKENS S, PAUL M. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 6849–6854.
- [52] SCHLUEPMANN H, van DIJKEN A, AGHDASI M, WOBBS B, PAUL M SMEEKENS S. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol* 2004; **135**: 879–890.
- [53] SHINOZAKI K, DENNIS E. Cell signalling and gene regulation. Global analyses of signal transduction and gene expression profiles. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**: 405–409.
- [54] SINGER MA, LINDQUIST S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotech* 1998; **16**: 460–469.
- [55] SOWIŃSKI P. Rurki sitowe – fenomen funkcjonalności. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 619–634.
- [56] STURM A, TANG GQ. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 401–406.
- [57] SZADEL A, LORENC-PLUCIŃSKA G. Metabolizm sacharozu u roślin oraz jego regulacja w warunkach stresów środowiskowych. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 47–59.
- [58] TALBOT NJ, FOSTER AJ. Genetics and genomics of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: developing an experimental model for understanding fungal diseases of cereal. *Adv Bot Res* 2001; **34**: 263–287.
- [59] van DIJCK P, MASCORRO-GALLARDO JO, de BUS M, ROYACKERS K, ITURRIAGA G, THEVELEIN JM. Truncation of *Arabidopsis thaliana* and *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase unlocks high catalytic activity and supports high trehalose levels on expression in yeast. *Biochem J* 2002; **366**: 63–71.
- [60] van DIJCK P, De ROP L, SLUFCEK K, van AEL E, THEVELEIN JM. Disruption of the *Candida albicans* TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase decreases infectivity without affecting hypha formation. *Infect Immun* 2002; **70**: 1772–1782.
- [61] van Dijken AJH, SCHLEUPMANN H, SMEEKENS SCM. *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiol* 2004; **135**: 969–977.
- [62] VOGEL G, FIEHN O, JEAN-RICHARD-dit-BRESSEL L, BOLLER T, WIEMKEN A, AESCHBACHER RA, WINGLER A. Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: occurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues. *J Exp Bot* 2001; **52**: 1817–1826.
- [63] VOGEL G, AESCHBACHER RA, MÜLLER J, BOLLER T, WIEMKEN A. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation on the yeast *tps2* mutant. *Plant J* 1998; **13**: 673–683.
- [64] WANG R, OKAMOTO M, XING X, CRAWFORD N. Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol* 2003; **132**: 556–567.
- [65] WINGLER A. The function of trehalose biosynthesis in plant. *Phytochemistry* 2002; **60**: 437–440.
- [66] WOLSKA-MITASZKO B, MAŁEK W. Trehalase from *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) and *Lupinus polyphyllus*. *J Basic Microbiol* 1999; **39**: 43–50.
- [67] WOLSKA-MITASZKO B. Trehaloza – substancja przedziwna. Właściwości, występowanie, zastosowania. *Biotechnologia* 2001; **2**: 36–53.
- [68] WOLSKA-MITASZKO B, MOLESTAK E. Properties of trehalase from different organs of alfalfa, *Medicago sativa*. *Acta Physiol Plant* 2004; in press.
- [69] XIA Y, CLARKSON J, CHARNLEY AK. Trehalose-hydrolysing enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Inverteb Pathol* 2002; **80**: 139–147.
- [70] XIA Y, GAO M, CLARKSON JM, CHARNLEY AK. Molecular cloning, characterisation, and expression of a neutral trehalase from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Inverteb Pathol* 2002; **80**: 127–137.
- [71] YEO ET, KWON HB, HAN SE, LEE JT, RYU JC & BYUN MO. Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (TPS1) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 2000; **10**: 263–268.

- [72] ZARAGOZA O, de VIRGILIO C, PONTON J, GANCEDO C. Disruption in *Candida albicans* of the *TPS2* gene encoding trehalose-6-phosphate affects cell integrity and decreases infectivity. *Microbiology* 2002; **148**: 1281–1290.
- [73] ZENTELLA R, MASCORRO-GALLARDO JO, van DIJCK P, FOLCH-MALLOL J, BONINI B, VAN VAEC C, GAXIOLA R, COVARRUBIAS AA, NIETO-SOTELO J, THEVELEIN JM, ITURRIAGA G. *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast *tps* mutant. *Plant Physiol* 1999; **119**: 1473–1482.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano 17.08. 2004 r.

Przyjęto: 21.01.2005 r.

ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

BIAŁKA REGULUJĄCE PROCES ADHEZJI KOMÓRKOWEJ W NOWOTWORACH TARCZYCY*

PROTEINS REGULATING THE CELL ADHESION MECHANISM IN THYROID NEOPLASMS

Zuzanna GAJ, Anna LIPIŃSKA

Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Obecnie wiadomo, że nieprawidłowa adhezja komórkowa jest jednym z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za progresję nowotworową. W większości raków tarczycy obserwuje się powstawanie przerzutów co może świadczyć o zaburzeniach tego procesu. W artykule opisano białka zaangażowane w regulację adhezji komórkowej w nowotworach tarczycy.

Słowa kluczowe: nowotwory tarczycy, kadheryny, kateniny, integryny, glikoproteina CD44, dysadheryna.

Summary: Now, it is known that aberrant cell adhesion is one of the main mechanism involved in tumor progression. Formation of metastases in majority of thyroid carcinomas evidenced the disturbance in this process. In this review, the proteins playing role in regulation of cell adhesion in thyroid neoplasms are described.

Key words: thyroid tumors, cadherins, catenins, integrins, glycoprotein CD44, dysadherin.

Wykaz stosowanych skrótów: **APC** (*adenomatous polyposis coli*) – produkt genu brodawczakowatości jelita grubego; **CAM** (*cell adhesion molecule*) – cząsteczka odpowiedzialna za adhezję komórek (=kadheryna); **CD44** (*cluster of differentiation*) – antygenowy kompleks różnicowania; **cdc42** (*cell division control/cycle*) – białko kontroli cyklu podziału komórkowego; **CDH** (*cadherin*) – kadheryna; **CK1** (*casein kinase I*) – kinaza kazeinowa 1; **c-myc** (*myelocytomatosis*) – białko kodowane przez protoonkogen *myc* będący homologiem wirusowego onkogeny zidentyfikowanego w wirusie białaczki ptaków; **CpG** – odcinki DNA zawierające cytydynę i guanozynę; **CSF-1** (*colony stimulating factor 1*) – czynnik stymulujący wzrost kolonii; **EGF** (*epidermal growth factor*) – czynnik wzrostu naskórka; **ErbB2** (*erythroblastosis*) – protoonkogen *erbB* będący homologiem wirusowego onkogeny zidentyfikowanego w wirusie erytroblastozy ptaków; **FAK** (*focal adhesion kinase*) – kinaza FAK; **Grb-2** (*growth factor receptor bound protein 2*) – białko uczestniczące w transdukcji sygnału ze zaktywowanego receptora błonowego; **HGF** (*hepatocyte growth factor*) – czynnik wzrostu hepatocytów; **GSK-3β** (*glycogen synthase kinase*) – kinaza syntazy glikogenu; **HNF-4** (*hepatocyte nuclear factor 4*) – białko jądrowe

* Praca wykonana w ramach grantu 505/446/u Uniwersytetu Łódzkiego.

hepatocytów; **MAPK** (*mitogen-activated protein kinase*) – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny; **MAPKK** (*mitogen-activated protein kinase kinase*) – kinaza kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny; **MDR1** (*multi-drug resistance gene 1*) – gen oporności wielolekowej; **MMP** (*matrix metalloproteinases*) – macierzowe metaloproteiny; **PDGF** (*platelet derived growth factor*) – płytkowy czynnik wzrostu; **PI3K** (*phosphatidylinositol-3-kinase*) – kinaza fosfoatydyloinozytolu; **PKC** (*protein kinase C*) – kinaza białkowa C; **Raf** – kinaza serynowo-treoninowa należąca do MAPKKK/MKKK; **Ras** (*rat sarcoma*) – małe białko G kodowane przez protoonkogen *ras* będący homologiem wirusowego onkogenu zidentyfikowanego w wirusie mięsaka myszy; **Rb** (*retinoblastoma*) – gen supresorowy warunkujący powstawanie siatkówczaka; **RTKs** (*receptor tyrosine kinases*) – receptorowe kinazy tyrozynowe; **SOS** (*son of sevenless protein*) – białko wymiany nukleotydów guaninowych GDP → GTP; **Src** (*sarcoma*) – protoonkogen *src* będący homologiem wirusowego onkogenu wirusa mięsaka Rousa; **Src** (*Src tyrosine kinase*) – niereceptorowa kinaza tyrozynowa Src; **TBP** (*TATA box binding protein*) – białko wiążące się z sekwencją TATA; **TGF α** (*transforming growth factor α*) – transformujący czynnik wzrostu α .

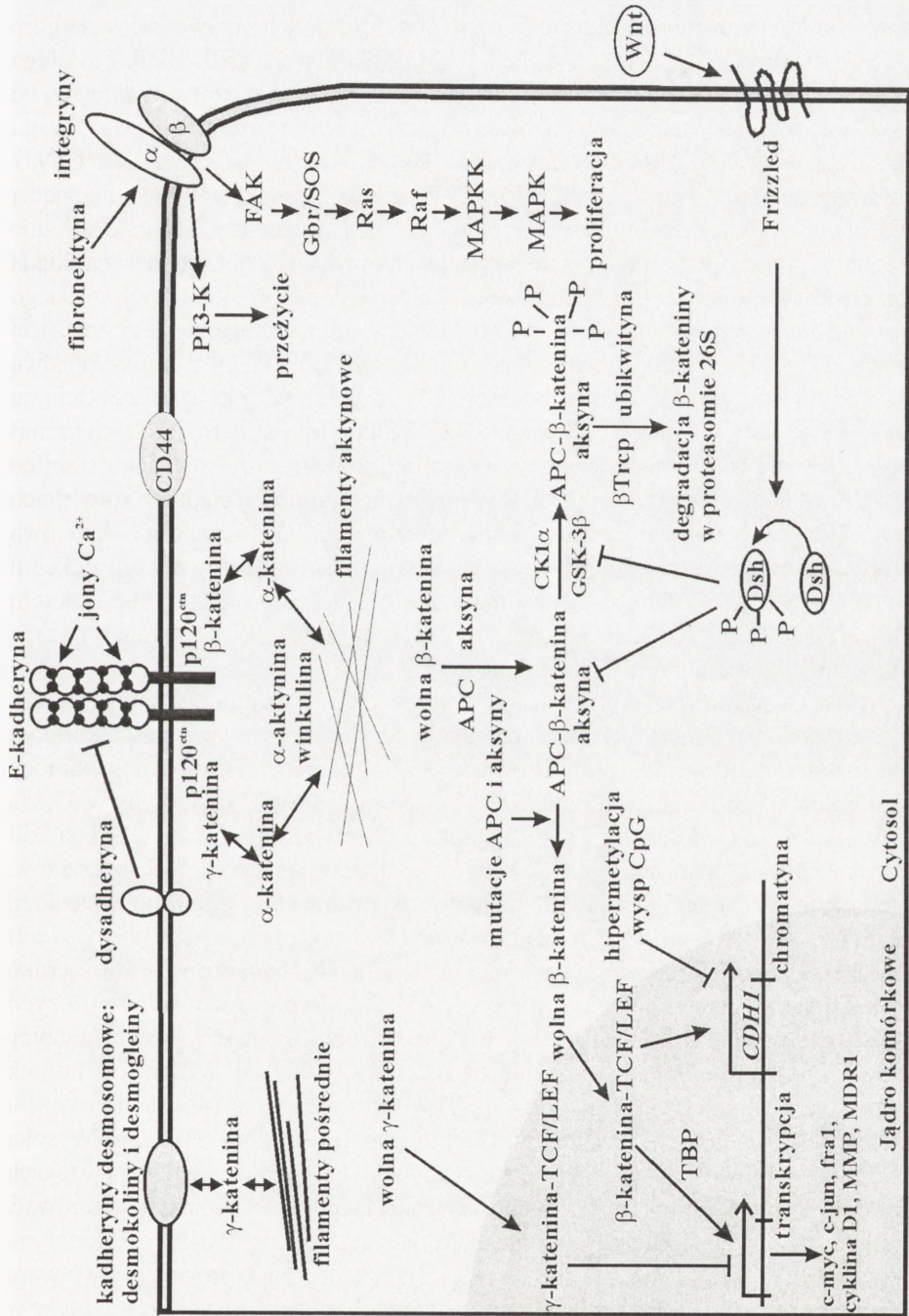
1. WSTĘP

Obecnie powszechnie wiadomo, że większość nowotworów człowieka (80–90%) pochodzi z tkanki nabłonkowej [30]. W prawidłowej tkance epitelialnej komórki są ciasno upakowane i dzięki procesowi adhezji są one połączone silnymi oddziaływaniami międzykomórkowymi. Pierwszym etapem progresji nowotworowej jest uzyskanie przez komórki nowotworowe zdolności do migracji z pierwotnego ogniska, co może nastąpić tylko wtedy, gdy proces adhezji ulegnie zaburzeniu. Przyczynia się to do zwiększonej proliferacji i migracji komórek nowotworowych, prowadząc do inwazji na otaczające tkanki i powstania przerzutów w węzłach chłonnych i innych narządach. W procesie transformacji nowotworowej zaangażowanych jest m.in. wiele białek regulujących proces adhezji. Podczas przejścia od prawidłowego do zmienionego nowotworowo tyreocytu ekspresja niektórych z tych białek jest hamowana, podczas gdy innych znacznie podwyższona [18].

W artykule omówiono główne białka regulujące proces adhezji, tj. kadheryny tworzące kompleks z rodziną cytoplazmatycznych białek zwanych kateninami, integryny, białka CD44 oraz niedawno odkryte białko – dysadherynę w nowotworach tarczycy na tle badań tych białek w innych nowotworach (ryc. 1).

2. KADHERYNY

Zidentyfikowane ponad 20 lat temu kadheryny są uniwersalnymi glikoproteinami transbłonowymi. Niemniej poszczególne białka tej rodziny charakteryzują się wysoką specyficznością tkankową. Podzielono je na pięć grup, tj. kadheryny klasyczne typu I (E-, P-, M-, N-, i R-kadheryny) i II (m.in. VE-, K- i OB-kadheryny), kadheryny desmosomalne (desmogleiny i desmokoliny) oraz słabo poznane protokadheryny i tzw. kadheryny pozostałe [59, 61].



RYCINA. 1. Schemat przedstawiający główne białka zaangażowane w regulowanie procesu adhezji oraz ich udział w transdukcji sygnału, proliferacji i przeżywalności tyrcocytów (na podstawie [6, 41, 47, 56, 59] zmodyfikowany) – opis w tekście

2.1. E-kadheryna

E-kadheryna jest najlepiej poznanym przedstawicielem klasycznych kadheryn. Jest ona znana jako uwomorulina (ponieważ w rozwoju zarodkowym pojawia się w stadium moruli), jak również: CDH1, L-CAM, cell-CAM120/80, Arc-1 [59]. Białko to ulega ekspresji we wszystkich komórkach epitelialnych i oprócz uczestniczenia w zależnej od jonów Ca^{2+} adhezji, bierze udział w indukowaniu i utrzymywaniu polaryzacji i właściwego fenotypu tych komórek. E-kadheryna człowieka jest kodowana przez gen *CDH1* zlokalizowany na chromosomie 16q22.1 [6, 61]. Po obróbce potranslacyjnej polegającej na odcięciu peptydu sygnałowego i propeptydu z 135 kDa prekursora powstaje dojrzałe białko (m. cz. 120 kDa), które podlega fosforylacji i glikozylacji [59]. E-kadheryna składa się z konserwatywnej dla wszystkich klasycznych kadheryn domeny C-końcowej, krótkiego odcinka trans-błonowego i zewnątrzkomórkowej domeny aminoterminalnej, uczestniczącej w zależnej od jonów Ca^{2+} homofilowej adhezji międzykomórkowej. Domenę N-końcową stanowi pięć tandemowo ułożonych subdomen (C1–C5), pomiędzy którymi znajdują się miejsca wiążące jony wapnia. Subdomena C1 E-kadheryny (najbardziej zewnętrzna) zawiera sekwencję HAV (histrydyna-alanina-walina), dzięki której powstają stabilne dimery, które wchodząc w interakcje z analogicznymi dimerami na sąsiednich komórkach tworzą strukturę przy-pominającą zamek błyskawiczny [6, 33, 37]. Domena C-końcowa odpowiada za wiązanie się E-kadheryny z wewnątrzkomórkowym kompleksem zawierającym α -, β -, i γ -kateniny, co umożliwia jej łączenie się z cytoszkieletem komórkowym [6, 22, 59]. Czwarta katenina – p120^{cas} wiąże się tylko z E-kadheryną i nie wchodzi w interakcje z pozostałymi kateninami [6].

Często obserwowana w wielu typach nowotworów człowieka utrata ekspresji E-kadheryny jest skorelowana z utratą epitelialnego fenotypu, wzrostem inwazyjności komórek nowotworowych i pogorszeniem prognozowania [56, 61]. Cerrato i wsp. [14] przy pomocy technik immunohistochemicznych wykazali obniżenie ekspresji E-kadheryny w 53,3% przypadków raka brodawkowego i w 71,4% raka pęcherzykowego tarczycy. Stwierdzili także, że obniżenie ekspresji tego białka koreluje z występowaniem odległych przerzutów. Obniżenie ekspresji i przemieszczenie E-kadheryny do cytoplazmy wykazano w rzadkiej, wysoce inwazyjnej odmianie raka brodawkowego DSV (ang. *diffuse sclerosing variant*) [62]. Redukcja ekspresji E-kadheryny może być także odpowiedzialna za progresję szeroko inwazyjnego raka pęcherzykowego tarczycy [45]. Zaobserwowany w powyższych badaniach spadek ekspresji E-kadheryny w dobrze zróżnicowanych rakach tarczycy pozostaje w zgodzie z wynikami wcześniejszych analiz [9, 65, 80]. W liniach komórek raka anaplastycznego tarczycy (HTh7, C643 i HTh74) Husmark i wsp. [40] zaobserwowali brak syntezy E-kadheryny, z wyjątkiem słabej jej ekspresji w linii SW1736. Wysoka ekspresja E-kadheryny w gruczolakach pęcherzykowych i jej stopniowa redukcja w rakach zróżnicowanych aż do całkowitej nieobecności w raku anaplastycznym może sugerować, że obniżenie syntezy E-kadheryny prowadzi do nabycia bardziej złośliwego fenotypu raka tarczycy [9]. Uważa się więc, że między ekspresją E-kadheryny a progresją nowotworu tarczycy i procesem przerzutowania istnieje odwrotna korelacja, co wykazano także w szeregu innych nowotworów człowieka, m.in. w raku płuc [17], wątroby [60], prostaty [84] i jajników [27].

W ciągu ostatnich lat poznano wiele mechanizmów, które mogą być przyczyną zaburzenia ekspresji E-kadheryny. Należą do nich mutacje genu *CDH1*, hipermetylacja wysp CpG w obrębie promotora *CDH1*, zaburzenia w działaniu czynników transkrypcyjnych, nieprawidłowa fosforylacja składników kompleksu E-kadheryna-kateniny, a także ich lokalizacja w komórce [6, 11, 22, 71]. Mutacje w genie *CDH1* E-kadheryny to raczej wyjątek niż reguła. Obserwowane są one głównie w rozlanym raku żołądka, zrazikowym raku piersi oraz w raku jajników i endometrium; są to najczęściej mutacje punktowe, delecje i przesunięcia ramki odczytu [6, 33]. W rakach tarczycy obserwuje się je bardzo rzadko, zwykle w rakach niezróżnicowanych [62]. W prawidłowych komórkach wyspy CpG nie podlegają metylacji. Natomiast jest ona obserwowana w komórkach wielu nowotworów [16, 30, 71]. Metylacja wysp CpG zmienia strukturę chromatyny czyniąc ją niedostępną dla polimerazy RNA klasy II i czynników transkrypcyjnych, co w konsekwencji prowadzi do zablokowania ekspresji genów [22]. Graff i wsp. [30] zaobserwowali, że w 4 z 5 linii komórkowych raków tarczycy, w których nie stwierdzono ekspresji E-kadheryny, wyspy CpG w regionie promotora były silnie zmetylowane. Natomiast w 8 liniach z potwierdzoną ekspresją E-kadheryny nie ulegały one metylacji. Autorzy stwierdzili także brak metylacji wysp CpG w prawidłowej tkance tarczycy i w 80% gruczolaków, natomiast ujawnili ją w 11% przypadków raków pęcherzykowych, 40% – raków z komórek Hürthla, 83% – raków brodawkowatych i w 21% – raków słabo zróżnicowanych i niezróżnicowanych. Husmark i wsp. [40] zaobserwowali, że zastosowanie czynnika demetylującego AzaC (5-aza-2-deoksy-cytydyny) powoduje zwiększenie ekspresji E-kadheryny w linii SW1736 komórek raka anaplastycznego. Wpływ metylacji regionu promotora w genie *CDH1* na obniżenie ekspresji E-kadheryny stwierdzono także w innych nowotworach, m.in. raku skóry [16] i przetyku [69]. Ostatnie badania dowodzą, że stopień metylacji wysp CpG i w konsekwencji poziom ekspresji E-kadheryny może znacząco się zmieniać w zależności od mikrośrodowiska nowotworu. Sugeruje się, że zwiększona metylacja jest wymagana w początkowym stadium inwazji, kiedy komórki odrywają się od pierwotnego guza. Natomiast później komórki nowotworowe częściowo cofają metylację wysp CpG w promotorze genu *CDH1* i przywracają ekspresję E-kadheryny, aby umożliwić sobie przeżycie w nowym ognisku nowotworowym [31].

Innym mechanizmem prowadzącym do obniżenia poziomu E-kadheryny jest aktywacja ekspresji represorów transkrypcji, takich jak Snail lub Slug, które mogą wchodzić w interakcję z sekwencjami E-box w proksymalnym regionie promotora jej genu. Transfekcja cDNA Snail do melanocytów, w których nie stwierdzono jego ekspresji, wywoływała znaczące obniżenie syntezy E-kadheryny. Transfekcja plazmidu zawierającego antysensową sekwencję Snail do linii komórkowych czerniaka powodowała reekspresję E-kadheryny na poziomie mRNA, jak i białka [58]. Stwierdzono, że Slug powoduje zablokowanie ekspresji E-kadheryny w liniach komórek raka jelita grubego [20]. Do innych czynników transkrypcyjnych mogących regulować syntezę E-kadheryny należą: Rb, c-myc, HNF-4, PAX 2, E12/E47 czy SIP1 [19, 56].

Proces adhezji mogą regulować również zmiany w stopniu ufosforylowania składników kompleksu E-kadheryna-kateniny przeprowadzane przez białkowe kinazy tyrozynowe i serynowo-treoninowe oraz fosfatazy A i C. Obniżenie adhezji komórkowej

indukowane przez czynniki wzrostu, takie jak: EGF, TGF α , HGF, PDGF, CSF-1, jest najprawdopodobniej spowodowane fosforylacją reszt tyrozyny kompleksu E-kadheryny-kateniny i jego rozpadem [56]. Uważa się, że onkogeny, takie jak *Src* i *ErbB2*, także odgrywają rolę w rozpadzie kompleksu, ponieważ zwiększają wrażliwość komórek na działanie czynników wzrostu [6]. Na stabilność kompleksu mają także wpływ małe białka Rho o właściwościach GTPaz, które są m.in. zaangażowane w regulację cytoszkieletu komórkowego. Białka tej rodziny: Rac i Cdc42 aktywowane przez PI3K stabilizują kompleks białek adhezyjnych poprzez wiązanie czynnika IQGAP1. Białko to ma zdolność przyłączania się do β -kateniny i E-kadheryny, co powoduje oddysocjowanie α -kateniny od kompleksu i jego rozpad [6, 18].

E-kadheryna pełni istotną rolę w utrzymaniu tkankowej integralności. Może być ona uznana za białko supresorowe, ponieważ wiążąc β -kateninę w rejonie błony komórkowej uniemożliwia jej translokację do jądra i promowanie proliferacji komórek [3, 47, 70]. Regulacja ekspresji E-kadheryny jest procesem bardzo złożonym, którego zaburzenie w połączeniu z rozregulowaniem innych mechanizmów komórkowych prowadzi do nieuchronnej progresji nowotworowej. Dokładne poznanie roli E-kadheryny i szlaków regulujących jej ekspresję może przyczynić się do powstania nowych, skutecznych terapii antynowotworowych.

2.2. N-kadheryna

N-kadheryna (m.cz. 135 kDa) znana jako białko CDH2, A-CAM oraz N-Cal-Cam jest kodowana przez gen *CDH2* zlokalizowany na chromosomie 18q12.1 [40, 59, 61]. Ulega ona ekspresji w tkankach pochodzenia neuroektodermalnego i mezodermalnego [57]. Jej ekspresja jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju mięśnia sercowego [61]. Chociaż większość badań wskazuje, że N-kadheryna nie występuje w komórkach epitelialnych, wysoki jej poziom wykryto w liniach komórkowych nowotworów tarczycy [40], pęcherza [61] oraz prostaty [76]. Husmark i wsp. [40], stwierdzili ekspresję N-kadheryny w czterech liniach ludzkich komórek raka anaplastycznego tarczycy nie wykazujących obecności E-kadheryny. Podczas immunoprecypitacji strącała się ona łącznie z β -kateniną, co świadczyło o tworzeniu przez te białka funkcjonalnego kompleksu. W prawidłowej embrionalnej, jak i w dojrzałej tkance gruczołu tarczowego stwierdzono brak ekspresji N-kadheryny [25, 40, 62]. Nabycie przez komórki zdolności do ekspresji N-kadheryny prowadzi do przybrania fenotypu o zwiększonej ruchliwości i zdolności do inwazji, co potwierdzono badając słabo inwazyjne linie komórek MCF-7 raka piersi [35]. Ponadto wykazano, że transfekcja cDNA N-kadheryny do prawidłowych komórek nabłonka rogowaciejącego powodowała obniżenie ekspresji E- i P-kadheryny, a także nabywanie przez te komórki fenotypu zbliżonego do fibroblastów. Natomiast wprowadzenie cDNA w orientacji antysensowej przywracało komórkom prawidłowy fenotyp epitelialny i zwiększało ekspresję E- i P-kadheryny [44]. W komórkach linii HA-376 raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, w których stwierdzono wysoką ekspresję N-kadheryny oraz silną metylację promotora genu E-kadheryny zaobserwowano, że po zastosowaniu czynnika demetylującego AzaC poziom ekspresji E-kadheryny zaczął rosnąć, natomiast N-kadheryny spadać [15]. N-kadheryna pozwala

nie tylko na odłączenie komórek nowotworowych od masy guza pierwotnego, ale także nadaje im zdolność do adhezji z innymi komórkami zawierającymi N-kadherynę, np. miofibroblastami lub komórkami endotelium. Takie interakcje mogą chronić komórki nowotworowe podczas procesu inwazji [35, 77]. Ponieważ N-kadheryna ma zdolność do nasilania migracji komórek i przerzutowania, a jej zwiększony poziom jest skorelowany z rosnącą inwazyjnością, może być uważana za jeden z czynników promujących progresję nowotworu ze zmiany łagodnej do formy inwazyjnej [12].

3. KATENINY

Obecnie, do katenin zalicza się cztery białka, tj. α -, β -, γ -kateninę oraz białko p120^{cas}. Kateniny biorą udział w adhezji poprzez tworzenie kompleksów z kadherynami; wchodzi także w skład desmosomu [6, 56, 59, 77].

3.1. α -katena

α -katena to jedno z cytoplazmatycznych białek bezpośrednio odpowiedzialnych za adhezję międzykomórkową. Dotychczas zidentyfikowano trzy homologiczne ludzkie α -kateny: α -E-katena o m.c. 102 kDa występującą w tkance nabłonkowej (kodowaną przez gen *CTNNA1* znajdujący się na chromosomie 5q31), α -N-katena o m.c. 104 kDa zlokalizowaną tylko w komórkach nerwowych (kodowaną przez gen *2p11.1-p12*) oraz α -T-katena występującą jedynie w komórkach mięśnia sercowego [6, 56, 59, 77, 78]. α -katena wiąże się z E-kadheryną poprzez β - lub γ -katena i tworzy albo bezpośrednio stabilne połączenie z filamentami aktynowymi albo poprzez α -aktynę lub winkulinę, warunkując prawidłową adhezję [7, 13, 59, 61, 78].

Przeprowadzone przez Böhma i wsp. [8] badania immunohistochemiczne ekspresji α -kateny wykazały obniżenie poziomu tego białka w ok. 40% przypadków raka brodawkowatego i w 52% – raka pęcherzykowego tarczycy. Stwierdzili oni także, korelację między obniżeniem ekspresji α -kateny a zaawansowaniem wieku pacjentów, występowaniem przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych i ryzykiem wystąpienia nawrotów nowotworu. Obniżenie ekspresji α -kateny ujawniono także w niektórych przypadkach rzadkiej odmiany raka brodawkowatego DSV [62]. Brak ekspresji α -kateny w obszarze połączeń międzykomórkowych stwierdzono w linii TK6 komórek raka tarczycy szczura [13]. Obniżoną ekspresję α -kateny wykryto również w raku płuc, przelyku, prostaty i piersi [61].

Mechanizm obniżenia ekspresji α -kateny w rakach tarczycy nie został na razie wyjaśniony. W komórkach syngenetowych raka żołądka stwierdzono delecję w genie α -kateny (*CTNNA1*) w regionie odpowiadającym za wiązanie się z β -katena. Kompleks złożony z E-kadheryny i β -kateny, ale bez α -kateny nie jest w stanie utworzyć stabilnego połączenia z filamentami aktynowymi oraz połączeń międzykomórkowych [19]. Takie słabo połączone między sobą komórki mogą łatwo odrywać się od pierwotnego ogniska nowotworu i tworzyć przerzuty. O tym jak ważna w procesie

adhezji jest rola α -kateniny, świadczy fakt, że komórki pozbawione tego białka nie są zdolne do utworzenia stabilnych połączeń międzykomórkowych mimo wysokiej ekspresji E-kadheryny i β -kateniny [72].

3.2. β -katenina

β -katenina – 781-aminokwasowe białko o m.c. ok. 92 kDa jest kodowane przez gen *CTNNB1* znajdujący się na chromosomie 3p21. W cząsteczce β -kateniny zwraca uwagę obecność 12- lub 13-krotnie powtórnego 42-aminokwasowego motywu (ang. *arm repeat*) w domenie centralnej. Jest ona odpowiedzialna za wiązanie E-kadheryny, białka APC (ang. *adenomatous polyposis coli*), konduktyny, TCF/LEF (ang. *T cell factor/lymphoid enhancer factor*) i receptora dla czynnika wzrostu EGF. Podobną domenę mają inne białka rodziny Armadillo (γ -katenina i p120^{cas}). W domenie N-terminalnej znajduje się 32-aminokwasowy region odpowiedzialny za wiązanie α -kateniny [6, 28, 59, 61, 77]. β -katenina pełni w komórce podwójną rolę. Białko to nie tylko uczestniczy w procesie adhezji komórkowej, jak początkowo sądzono, ale działa także jako czynnik transkrypcyjny będąc koaktywatorem czynnika TCF/LEF wchodzącego w skład szlaku transdukcji sygnału Wnt (ang. *wingless type*). Pozwala jej to pełnić aktywną rolę w kontroli ekspresji genów, a pośrednio wpływać na proliferację komórek i progresję nowotworową [19].

Immunohistochemiczne badania ekspresji β -kateniny w obszarze połączeń międzykomórkowych wykazały jej obniżenie w raku brodawkowatym i pęcherzykowym tarczycy, a brak – w raku anaplastycznym [14]. Stwierdzono także istnienie korelacji między redukcją ekspresji β -kateniny a występowaniem odległych przerzutów i progresywną utratą stopnia zróżnicowania nowotworu [8, 14]. Garcia-Rostan i wsp. [28] zaobserwowali brak ekspresji β -kateniny w 41,6% przypadków raka anaplastycznego, a w kolejnych 41,6% – jej nieprawidłową jądrową lokalizację. Wykazali także obecność mutacji w eksonie 3. genu *CTNNB1* (co może być markerem raków anaplastycznych tarczycy) [29]. Ishigaki i wsp. [43] stosując technikę immunocytochemiczną stwierdzili zmienioną lokalizację β -kateniny we wszystkich badanych liniach komórkowych raków tarczycy. W liniach NPA (raka brodawkowatego), ARO, FRO (raka anaplastycznego) i WRO (raka pęcherzykowego) ujawnili jej lokalizację w cytoplazmie, natomiast w linii TPC-1 (raka brodawkowatego) – w jądrze komórkowym. Wysoki poziom β -kateniny w liniach NPA i TPC1 korelował z nadekspresją w tych liniach komórkowych cykliny D1 i białka c-myc. Analizując 132 preparaty nowotworów tarczycy Ishigaki i wsp. [43] ujawnili cytoplazmatyczną lokalizację β -kateniny w 9% przypadków gruczolaków, 25% raków pęcherzykowych oraz w 67% raków brodawkowatych, w których stwierdzono także nadekspresję cykliny D1. Należy nadmienić, że wysoką ekspresję cykliny D1, głównego regulatora komórkowej proliferacji, ujawniono także w raku anaplastycznym tarczycy [55, 81, 82]. Ze względu na jej brak w tkance prawidłowej, cyklina D1 może uchodzić za negatywny czynnik prognostyczny nowotworów tarczycy [50].

Sugeruje się, że β -katenina jest nie tylko uczestnikiem procesu adhezyjnego, ale także odgrywa główną rolę w szlaku transdukcji sygnału Wnt, który jest odpowiedzialny

za zwiększoną proliferację komórek i prawdopodobnie bierze udział w promocji nowotworowej. Aktywacja szlaku Wnt rozpoczyna się przyłączeniem białka Wnt do transbłonowego receptora Frizzled, co umożliwia fosforylację cytosolowego białka Disheveled (Dsh). Aktywne białko Dsh inaktywuje działanie serynowo/treoninowej kinazy syntazy glikogenu GSK-3 β (ang. *glycogen synthase kinase*). Prawdopodobnie Dsh wchodzi także w interakcję z aksyną, co prowadzi do rozpadu kompleksu APC, GSK-3 β , aksyny, β -kateniny, a następnie degradacji aksyny i akumulacji β -kateniny w cytoplazmie [85]. W rezultacie stężenie wolnej β -kateniny w cytoplazmie rośnie i ulega ona translokacji do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z czynnikami transkrypcyjnymi TCF/LEF. Jądrowa β -katenina połączona z TCF/LEF poprzez pontynę 52 łączy się z białkami TBP (ang. *TATA box binding protein*), co aktywuje transkrypcję m.in. *c-myc*, *c-jun*, *fra-1* oraz innych genów kodujących białka uczestniczące w progresji nowotworowej: cyklinę D1, macierzowe metaloproteinazy MMP (m.in. matrylizyna), białko oporności wielolekowej produkt genu *MDR 1* (ang. *multi-drug resistance gene 1*) [19, 56, 77]. Kompleks β -katenina-TCF/LEF może także wiązać się z promotorem E-kadheryny, co wskazuje, że pełni rolę w regulowaniu jej transkrypcji [7, 39]. W liniach komórkowych ARO (raka anaplastycznego) i WRO (raka pęcherzykowego) tarczycy człowieka stwierdzono ekspresję genów kodujących białka z rodziny Wnt, Frizzled oraz Dishelved, co świadczy że elementy szlaku Wnt ulegają ekspresji w tych komórkach i że może on być w nich funkcjonalnie aktywny [36]. Gdy szlak Wnt jest nieaktywny, uwolniona z kompleksu adhezyjnego β -katenina jest wiązana przez wielobiałkowy kompleks tworzony przez: białko APC, GSK-3 β , serynowo/treoninową fosfatazę 2A i białko adaptorowe aksynę lub konduktynę. Kompleks ten umożliwia fosforylację β -kateniny przez GSK-3 β na resztach seryny i treoniny. Proces inicjuje kinaza kazeinowa CK1 α fosforylując Ser 45., co umożliwia dalszą fosforylację Ser 33. i 37. oraz Thr 41. przez GSK-3 β . Ufosforylowana β -katenina jest rozpoznawana przez białko β Trcp (komponent kompleksu ligazy), która powoduje jej ubiquitynację i wyznacza do degradacji w proteasomie 26S [10, 19, 47, 56]. Punktowe mutacje polegające na zamianie reszt seryny i treoniny na inne nieulegające fosforylacji powodują, że β -katenina staje się stabilna, nie ulega degradacji i akumuluje się w cytoplazmie i jądrze komórkowym [23, 49, 85]. Stwierdzono to m.in. w raku anaplastycznym tarczycy [28]. Mutacje genu *APC* także mogą zwiększać ilość β -kateniny w cytoplazmie. Stwierdzono je m.in. w linii ARO komórek raka anaplastycznego [43], natomiast brak takich mutacji zaobserwowano w gruczolakach i dobrze zróżnicowanych rakach tarczycy [53].

Badania immunohistochemiczne wykazały zmiany w ekspresji β -kateniny, ale także jej nieprawidłową lokalizację w cytoplazmie i jądrze komórkowym w wielu innych typach nowotworów m.in. raku wątroby [60], płuc [17], szyjki macicy [68], jajników [27], żołądka [54] oraz w czerniaku [48], a także w innych rakach skóry [24]. β -katenina jest przykładem białka w którym mutacje lub nieprawidłowa akumulacja może prowadzić do nieoczekiwanych konsekwencji niezwiązanych z jego fizjologiczną funkcją [52].

3.3. γ -katenina

γ -katenina (m.cz. 83 kDa) jest kodowana przez gen znajdujący się na długim ramieniu chromosomu 17 (17q21). Początkowo zidentyfikowano ją jako składnik płytki desmosomu, stąd synonim plakoglobina (ang. *plakoglobin*) [6, 59, 61]. γ -katenina wchodzi w skład kompleksu z E-kadheryną i α -kateniną, ale także tworzy płytkę desmosomu, stabilizując połączenia między desmosomalnymi kadherynami (desmogleiną i desmokoliną) a filamentami pośrednimi [14, 59, 85]. γ -katenina pełni istotną rolę w rozwoju, ponieważ myszy pozbawione genu γ -kateniny giną w stadium embrionalnym, przypuszczalnie na skutek zakłócenia prawidłowej struktury mięśnia sercowego [85]. Funkcja γ -kateniny nadal nie jest dokładnie wyjaśniona, ale najprawdopodobniej działa ona antagonistycznie do β -kateniny. Badając rolę γ -kateniny w keratynocytach stwierdzono, że w wyniku fosforylacji reszt tyrozynowych może ona odłączać się od kompleksu białek adhezyjnych. Wolna γ -katenina znajdująca się w cytoplazmie może podobnie jak β -katenina ulegać translokacji do jądra i tworzyć kompleks z TCF/LEF. Utworzony kompleks jest transkrypcyjnie nieaktywny i nie może aktywować docelowych genów związanych z proliferacją komórki [38]. Być może konkurencja w wiązaniu TCF/LEF między β -kateniną i plakoglobiną jest jednym z mechanizmów wykorzystywanych przez komórkę do powstrzymania proliferacji komórek, które z jakiegoś powodu utraciły zdolność do adhezji. W ten sposób γ -katenina może działać jako białko supresorowe, blokujące proliferację komórek nowotworowych.

Cerrato i wsp. [14] badając immunohistochemicznie zmiany ekspresji γ -kateniny zaobserwowali jej redukcję w 86,6% przypadków raka brodawkowatego i w 85,7% raka pęcherzykowego. Natomiast Böhm i wsp. [8] stwierdzili redukcję poziomu γ -kateniny w 54% przypadków raka brodawkowatego i 68% – raka pęcherzykowego oraz zaobserwowali, że była ona skorelowana z wielkością guza i obecnością odległych przerzutów. Obniżenie ekspresji γ -kateniny stwierdzono również w rzadkich odmianach raka brodawkowatego: DSV [62] i MECT (ang. *mucoepidermoid carcinoma of the thyroid*) [63]. Sugeruje się, że obniżenie poziomu syntezy γ -kateniny w liniach komórek raka anaplastycznego SW1736 oraz C643 może być wywołane hipermetylacją rejonu promotorowego genu, ponieważ jej ekspresja wzrastała po zastosowaniu czynnika demetylującego DNA – AzaC [40]. Brak ekspresji γ -kateniny stwierdzono w liniach komórkowych pochodzących z pierwotnego raka tarczycy szczura (TK6) i jego przerzutów do płuc (MPTK6) [13]. Mutacje w genie γ -kateniny zaobserwowano dotychczas tylko w liniach komórek raka żołądka [85]. Transfekcja cDNA γ -kateniny do komórek raka anaplastycznego powoduje odwrócenie procesu nowotworowego niezależnie od ekspresji kadheryn [40]. Ostatnio pojawiły się dowody, że γ -katenina może także promować proces nowotworowy. Jej nadekspresja w ludzkim raku języka powoduje niekontrolowany wzrost tych komórek i zablokowanie procesu apoptozy, ponieważ plakoglobina ma zdolność indukowania antyapoptotycznego białka Bcl-2 [34].

3.4. Białko p120^{ctn}

Białko p120^{ctn} zaliczane do katenin (poprzednio nazywane p120^{cas}) jest cytosolowym białkiem o m.cz. 90–120 kDa (w zależności od izoformy), kodowanym przez gen

CTNND1 ulokowany na chromosomie 11q11 w bezpośrednim sąsiedztwie centromeru [6, 59, 61, 77]. Początkowo identyfikowano je jako substrat dla niereceptorowej kinazy tyrozynowej Src i receptorowych kinaz tyrozynowych dla czynników wzrostu (RTKs). Białko p120^{ctn} może się wiązać z E-, N-, P- i VE-kadheryną, natomiast nie wchodzi w interakcje z innymi kateninami [59, 61]. Rola p120^{ctn} nadal jest dyskusyjna; część badań wskazuje, że jego funkcja może zależeć od izoformy, w jakiej występuje, a także od potranskrypcyjnych lub potranslacyjnych modyfikacji [6]. Prawdopodobnie bierze udział w regulacji funkcji kompleksu E-kadheryna-kateniny [56].

Badanie ekspresji p120^{ctn} w liniach komórkowych raka anaplastycznego tarczycy (SW1736, C643, HTh7 i HTh74) wykazało jej obniżenie w porównaniu z kontrolą, zwłaszcza w linii HTh7, mającej także najniższy lub zerowy poziom γ -kateniny i cytokeratyn [40]. Białko p120^{ctn} prawidłowych tyreocytów ujawnia się na elektroferogramie jako pojedynczy prążek o m.cz. ok. 100 kDa. W przypadku linii komórek raka anaplastycznego tarczycy to pasmo znacznie maleje, a pojawia się dodatkowy prążek odpowiadający izoformie o m.cz. ok. 115 kDa. Ponieważ dwie izoformy tego białka zaobserwowano tylko w komórkach nowotworowych, pojawienie się izoformy o m.cz. 115 kDa może mieć wpływ na funkcjonowanie E-kadheryny, a przez to na proces adhezji [40]. Często obserwowanym zaburzeniem związanym z kateniną p120^{ctn} jest jej zwiększona obecność w cytoplazmie komórek nowotworowych, a obniżenie poziomu w strefie połączeń międzykomórkowych. Ujawniono, że białko p120^{ctn} także może być obecne w jądrze komórkowym podobnie jak inne białka rodziny Armadillo i nie ulega degradacji przez kompleks APC/GSK-3 β [77]. Uwolnione z kompleksu adhezyjnego białko p120^{ctn} może być fosforylowane i podobnie jak β -katenina brać udział w szlaku przekazywania sygnałów niezależnie od swojej roli w adhezji komórkowej [61]. Białko to po translokacji do jądra komórkowego wiąże się z czynnikiem transkrypcyjnym Kaiso; funkcjonalne znaczenie tej interakcji pozostaje na razie nieznanne [56].

4. INTEGRYNY

Adhezja komórek do matryks zewnątrzkomórkowej reguluje proliferację, migrację i przeżycie szeregu typów komórek. Receptorami adhezyjnymi błony komórkowej są integryny, które stanowią rodzinę transbłonowych glikoprotein. Strukturalnie, integryny są heterodimerami składającymi się z niekowalencyjnie połączonych podjednostek α i β (łańcuch α m.cz. 140–210 kDa, łańcuch β – 90–120 kDa) [11, 21, 46]. Każda z nich poza domeną transbłonową zawiera dużą domenę zewnątrzkomórkową i mniejszą cytoplazmatyczną. Wyjątek stanowi podjednostka $\beta 4$, której domena cytoplazmatyczna jest odmienna zarówno w wielkości (około 1000 aminokwasów), jak i strukturze w porównaniu z innymi podjednostkami integryn [51]. Miejsce wiązania ligandów stanowią sekwencje domen zewnętrznych obu podjednostek, natomiast domeny cytoplazmatyczne łączą się z cytoszkieletem. Wewnątrzkomórkowa domena podjednostki β może wchodzić

w interakcje z płytką adhezyjną (ang. *focal adhesion plaque*), która jest miejscem oddziaływania z filamentami aktynowymi i zawiera lub wchodzi w interakcję z szeregiem kinaz białkowych, takich jak FAK, Src i PKC [11].

Zidentyfikowano wiele rodzajów podjednostek α i β i stwierdzono, że mogą one występować w różnych połączeniach, w wyniku czego tworzą znaczną liczbę heterodimerów (dotychczas opisano 18 podjednostek α i 9 podjednostek β , które tworzą co najmniej 24 heterodimery) [11]. Integryny regulują szlaki sygnalizacyjne, które kontrolują wzrost i przeżycie komórek tarczycy. Badania proliferacji tyreocytów wykazały, że aktywacja integryn przez przyłączenie fibronektyny indukuje fosforylację adhezyjnej kinazy tyrozynowej FAK, co z kolei prowadzi do tworzenia kompleksu FAK/Grb-2/SOS. Szlak inicjowany przez FAK jest kontynuowany przez Ras, Raf-MAPKK i ostatecznie MAPK [41]. Hamowanie aktywności Ras i MAPK zatrzymuje wzrost komórek, ale nie indukuje apoptozy. Aktywacja integryn przez adhezję do fibronektyny także indukuje fosfatydyloinozytolo-3 kinazę – enzym, który odgrywa kluczową rolę w zależnym od integryn przeżyciu komórek tarczycy. Zahamowanie aktywności tego enzymu prowadzi komórki tarczycy na drogę apoptozy [41].

W prawidłowym gruczole tarczowym prawie we wszystkich komórkach pęcherzykowych, podobnie jak w innych komórkach epitelialnych, ekspresji ulega integryna $\alpha\beta 1$ [21, 79]. Vitale i wsp. [79] stwierdzili, że w wolu guzkowatym – łagodnej wieloogniskowej hiperplazji – koegzystują dwie morfologicznie odróżnialne subpopulacje komórek pęcherzykowych różniących się ekspresją integryn. W dominującej subpopulacji tyreocytów ekspresji ulega tylko podjednostka $\beta 1$ asocjująca z $\alpha 3$, podczas gdy w małej subpopulacji liczącej 10–60% tyreocytów ekspresji ulegają podjednostki $\beta 1$, $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ i $\alpha 6$. Podczas procesu transformacji nowotworowej często obserwuje się znaczące zmiany w ekspresji poszczególnych integryn na powierzchni komórek nowotworowych. Dahlman i wsp. [21] ujawnili w preparatach ze zmian łagodnych i złośliwych tarczycy ekspresję podjednostek $\alpha 6$ i $\beta 4$. Podjednostka $\beta 4$ asocjuje z podjednostką $\alpha 6$ tworząc heterodimer $\alpha 6\beta 4$ będący receptorem dla lamininy. Dowodem przemawiającym na korzyść hipotezy, że ekspresja integryny $\alpha 6\beta 4$ jest charakterystyczna dla raków i może być związana z ich agresywnością i przeżyciem pacjenta jest stwierdzenie jej ekspresji w raku piersi [1], pęcherza [32], płuc [26], żołądka [75]. Kitajiri i wsp. [46] stwierdzili podwyższoną ekspresję podjednostki $\beta 4$ integryny w rakach brodawkowatych tarczycy, w grupie pacjentów z dużymi przerzutami do węzłów chłonnych w porównaniu z grupą bez lub z małymi przerzutami. Wyniki te wskazują na korelację między ekspresją podjednostki integryny $\beta 4$ w rakach brodawkowatych a wielkością przerzutu, co sugeruje jej rolę w rozwoju metastaz. Badanie poziomu ekspresji integryny $\alpha 6\beta 4$ może więc być przydatnym wskaźnikiem pozwalającym ocenić potencjalną inwazyjność tego nowotworu. Ważnym osiągnięciem zespołu Westermarcka [21] było stwierdzenie ekspresji podjednostki $\alpha 2$ i nadekspresji integryny $\alpha 2\beta 1$ jedynie w raku anaplastycznym tarczycy. Dla uwiarygodnienia wyników w analizie immunohistochemicznej wykorzystano dwa różne przeciwciała monoklonalne przeciwko podjednostce $\alpha 2$ integryny.

W świetle przedstawionych danych rzeczową wydaje się sugestia, że zmiany ekspresji integryny i zaburzenie przekazu sygnału wiążą się z nabyciem przez zmienione nowotworowo tyreocyty właściwości do proliferacji i inwazji.

5. GLIKOPROTEINA CD44

Białka CD44 (ang. *cluster of differentiation*) tworzą polimorficzną rodzinę powierzchniowych glikoprotein, które grają rolę w regulacji szeregu procesów fizjologicznych i patofizjologicznych. Uczestniczą one w interakcji komórka – komórka, komórka – matryks zewnątrzkomórkowa, w migracji komórek, w aktywacji limfocytów, w reakcjach zapalnych, we wzroście i progresji nowotworów. Ludzkie białko CD44 jest kodowane przez gen ulokowany na chromosomie 11 (11p13). Gen *CD44* zawiera 10 eksonów standardowych (ang. *standard*; s) i 10 zmiennych (ang. *variable*; v). Eksony standardowe (1–5 i 16–20) po złożeniu i translacji dostarczają standardowej izoformy CD44s. Natomiast w wyniku alternatywnego składowania eksonów zmiennych powstaje szereg izoform tego białka (CD44v). Antygen CD44 jest powierzchniowym receptorem dla kwasu hialuronowego [2, 4, 5, 73].

W prawidłowych nieproliferujących tyreocytach fizjologicznej ekspresji ulega forma CD44s [2, 4, 5]. Ujawniono, że zmiennymi eksonami obecnymi w transkryptach CD44v w wielu nowotworach są eksony: 7 (v2), 8 (v3) i 11 (v6) [83]. Aogi i wsp. [2] stwierdzili obecność transkryptu CD44v2 (z eksonem 7) w 75% preparatów raka tarczycy, ale również w 29% preparatów zmian łagodnych. Transkrypt CD44v6 (z eksonem 11) był obecny w 83% przypadków raków, a także w 35% zmian łagodnych. Ekson 8 był obecny w transkryptach (CD44v3) otrzymanych z najwyższej liczby przypadków nowotworów złośliwych (92%), ale również z najwyższej liczby preparatów zmian łagodnych (59%). Badania Aogi i wsp. [2] wykazały, że całkowita ekspresja CD44v znacznie wzrastała w rakach tarczycy, bowiem 73% preparatów raków tarczycy (poza rdzeniastym) zawierało transkrypty ze wszystkimi 3 zmiennymi eksonami. Natomiast tylko w 24% preparatów zmian łagodnych stwierdzono występowanie transkryptów CD44v2, CD44v3 i CD44v6. Ujawniony przez Aogi i wsp. [2] wzrost ekspresji CD44v w rakach tarczycy pozostaje w zgodzie z wynikami wcześniejszych badań [74]. Bartolazzi i wsp. [5] techniką immunohistochemiczną z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych testowali ekspresję CD44v6 w 618 preparatach zmian patologicznych tarczycy. W 75 zanalizowanych preparatach tkanki prawidłowej tarczycy nie stwierdzono ekspresji CD44v6. Natomiast ekspresję tej izoformy ujawniono w przypadku 81,4% preparatów nowotworów złośliwych tarczycy o różnym typie histologicznym i stopniu zróżnicowania (poza rakami rdzeniastymi). Izofорма CD44v6 była wykrywana w około 50% raków niezróżnicowanych i w 43% preparatów gruczolaka pęcherzykowego [5].

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że żadna z izoform CD44 nie może być uznawana jako sugerowany marker raków tarczycy, lecz jedynie znacznik deregulacji proliferacji tyreocytów [5].

6. DYSADHERYNA

W 2002 r. w laboratorium Hirohashi zidentyfikowano i scharakteryzowano „anty-adhezyjną cząsteczkę” będącą transbłonową glikoproteiną i nazwano ją dysadheryną (ang. *dysadherin*) [42]. Wykryto ją w komórkach szeregu nowotworów, tj. raka piersi, płuc, żołądka, jelita grubego, pęcherza, mózgu i przelyku przy użyciu monoklonalnego przeciwciała NCC-3G10. Ekspresję dysadheryny stwierdzono natomiast w ograniczonej liczbie komórek prawidłowych – limfocytach, komórkach edotelialnych i komórkach warstwy podstawnej nabłonka rogowaciejącego [42]. Wydedukowana z cDNA 178-aminokwasowa sekwencja dysadheryny obejmuje dwa regiony hydrofobowe odpowiadające peptydowi sygnałowemu i domenie transbłonowej, domenę zewnątrzkomórkową bogatą w serynę, treoninę i prolinę, która jest miejscem O-glikozylacji oraz krótki region cytoplazmatyczny zawierający dodatnio naładowane reszty aminokwasów. Masa cząsteczkowa dysadheryny waha się w granicach 50–55 kDa (różnice wynikają z odmiennego poziomu O-glikozylacji): Transfekcja cDNA dysadheryny do linii komórek PLC/PRF5 raka wątroby spowodowała obniżenie adhezji komórka – komórka. Ponadto w transfekowanych komórkach stwierdzono znaczne obniżenie poziomu E-kadheryny, odwrotnie proporcjonalnie do ekspresji dysadheryny. Okazało się, że transfekcja cDNA dysadheryny indukowała obniżenie poziomu białka i osłabienie adhezyjnej funkcji E-kadheryny pozostając bez wpływu na ekspresję jej mRNA. Te dane sugerują, że dysadheryna odgrywa rolę w potranskrypcyjnej regulacji E-kadheryny. Obecnie mechanizm regulacyjny modyfikujący funkcję E-kadheryny nie jest poznany, ale przypuszcza się, że może w nim grać rolę znaczna glikozylacja dysadheryny i interakcja z aktyną [42]. W dalszych badaniach zespół Hirohashi stosując nowe przeciwciała monoklonalne przeciwko dysadherynie NCC-M53 stwierdził w przewodowym gruczolakoraku trzustki ścisłą korelację między wzrostem ekspresji dysadheryny a występowaniem przerzutów i wielkością guza [67]. Otrzymane wyniki pozwoliły autorom wnioskować, że ekspresja dysadheryny wydaje się odzwierciedlać agresywność raka i może być pozytywnym znacznikiem złej prognozy w tym typie nowotworu [67]. Do podobnych wniosków doszli Shimada i wsp. [66] po analizie ekspresji dysadheryny w raku żołądka. Ten sam zespół przeprowadził po raz pierwszy immunohistochemiczne badania ekspresji dysadheryny w rakach tarczycy [64]. Stwierdzili oni jej ekspresję w 76% preparatów raka brodawkowego oraz w 100% preparatów raka anaplastycznego. Natomiast nie ujawniono jej ekspresji w żadnym z preparatów raka pęcherzykowego oraz w prawidłowych tyreocytach. Ekspresja dysadheryny okazała się znacznie wyższa w raku anaplastycznym niż brodawkowym. Ponadto stwierdzono istnienie znacznej korelacji między ekspresją dysadheryny a wielkością nowotworu, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych i przerzutów odległych, a także śmiertelnością z powodu raka tarczycy. Tak jak we wcześniejszych badaniach, w rakach tarczycy zaobserwowano znaczną negatywną korelację między ekspresją dysadheryny i E-kadheryny [64].

Otrzymane wyniki zaprezentowanych badań upoważniają do stwierdzenia, że ekspresja dysadheryny może być uznana za biologiczny wskaźnik agresywności raków, dający złe prognozy w ich terapii [37].

7. PODSUMOWANIE

Adhezja komórkowa to bardzo złożony proces regulowany przez wiele grup białek, których rola w dużym stopniu wymaga jeszcze poznania. Ponieważ wiele z tych białek wchodzi w interakcje z różnymi czynnikami zewnątrzkomórkowymi i składnikami szlaków transdukcji sygnału, a także same biorą udział w procesie przekazywania sygnału, zaburzenia w ich ekspresji mogą być kluczowym elementem w procesie inwazji nowotworowej. Można mieć nadzieję, że prowadzone obecnie badania pozwolą w przyszłości na pełne poznanie roli białek regulujących adhezję komórkową, a to pozwoli na opracowanie bardziej skutecznych terapii antynowotworowych.

LITERATURA

- [1] ABDEL-GHANY M, CHENG HC, ELBLE RC, PAULI BU. The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis. *J Biol Chem* 2001; **276**: 25438–25446.
- [2] AOGI K, KITAHARA K, URQUIDI V, TARIN D, GOODISON S. Comparison of telomerase and CD44 expression as diagnostic tumor markers in lesions of the thyroid. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 2790–2797.
- [3] APLIN AE. Cell adhesion molecule regulation of nucleocytoplasmic trafficking. *FEBS Lett* 2003; **534**: 11–14.
- [4] BARTOLAZZI A. Improving accuracy of cytology for nodular thyroid lesions. *Lancet* 2000; **355**: 1661–1662.
- [5] BARTOLAZZI A, GASBARRI A, PAPOTTI M, BUSSOLATI G, LUCANTE T, KHAN A, INOHARA H, MARANDINO F, ORLANDI F, NARDI F, VECCHIONE A, TECCE R, LARSSON O; THYROID CANCER STUDY GROUP. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet* 2001; **357**: 1644–1650.
- [6] BEAVON IRG. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer* 2000; **36**: 1607–1620.
- [7] BEN-ZE'EV A. Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**: 99–108.
- [8] BÖHM J, NISKANEN L, KIRALY K, KELLOKOSKI J, ESKELINEN M, HOLLMEN S, ALHAVA E, KOSMA VM. Expression and prognostic value of alpha-, beta-, and gamma-catenins in differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 4806–4811.
- [9] BRABANT G, HOANG-VU C, CETIN Y, DRALLE H, SCHEUMANN G, MÖLNE J, HANSSON G, JANSSON S, ERICSON LE, NILSSON M. E-cadherin: a differentiation marker in thyroid malignancies. *Cancer Res* 1993; **53**: 4987–4993.
- [10] BREMNES RM, VEVE R, HIRSCH FR, FRANKLIN WA. The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung Cancer* 2002; **36**: 115–124.
- [11] CAIRNS RA, KHOKHA R, HILL RP. Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. *Curr Mol Med* 2003; **3**: 659–671.
- [12] CAVALLARO U, SCHAFFHAUSER B, CHRISTOFORI G. Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett* 2002; **176**: 123–128.
- [13] CELETTI A, GARBI C, CONSALES C, CERRATO A, GRECO D, MELE E, NITSCH L, GRIECO M. Analysis of cadherin/catenin complexes in transformed thyroid epithelial cells: modulation by beta 1 integrin subunit. *Eur J Cell Biol* 2000; **79**: 583–593.
- [14] CERRATO A, FULCINITI F, AVALLONE A, BENINCASA G, PALOMBINI L, GRIECO M. Beta- and gamma-catenin expression in thyroid carcinomas. *J Pathol* 1998; **185**: 267–272.
- [15] CHEN Q, LIPKINA G, SONG Q, KRAMER RH. Promoter methylation regulates cadherin switching in squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **315**: 850–856.

- [16] CHILES MC, AI L, ZUO C, FAN CY, SMOLLER BR. E-cadherin promoter hypermethylation in preneoplastic and neoplastic skin lesions. *Mod Pathol* 2003; **16**: 1014–1018.
- [17] CHOI YS, SHIM YM, KIM SH, SON DS, LEE HS, KIM GY, HAN J, KIM J. Prognostic significance of E-cadherin and beta-catenin in resected stage I non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003; **24**: 441–449.
- [18] CHRISTOFORI G, SEMB H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 1999; **24**: 73–76.
- [19] CONACCI-SORRELL M, ZHURINSKY J, BEN-ZE'EV A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 2002; **109**: 987–991.
- [20] CONACCI-SORRELL M, SIMCHA I, BEN-YEDIDIA T, BLECHMAN J, SAVAGNER P, BEN-ZE'EV A. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 2003; **163**: 847–857.
- [21] DAHLMAN T, GRIMELIUS L, WALLIN G, RUBIN K, WESTERMARK K. Integrins in thyroid tissue: upregulation of alpha2beta1 in anaplastic thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 1998; **138**: 104–112.
- [22] DI CROCE L, PELICCI PG. Tumour-associated hypermethylation: silencing E-cadherin expression enhances invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 2003; **39**: 413–414.
- [23] DIHLMANN S, KLEIN S, DOEBERITZ MVK. Reduction of beta-catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated beta-catenin. *Mol Cancer Ther* 2003; **2**: 509–516.
- [24] EL-BAHRAWY M, EL-MASRY N, ALISON M, POULSOM R, FALLOWFIELD M. Expression of beta-catenin in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2003; **148**: 964–970.
- [25] FAGMAN H, GRÄNDE M, EDSBAGGE J, SEMB H, NILSSON M. Expression of classical cadherins in thyroid development: maintenance of an epithelial phenotype throughout organogenesis. *Endocrinology* 2003; **144**: 3618–3624.
- [26] FALCIONI R, CIMINO L, GENTILESCHI MP, D'AGNANO I, ZUPI G, KENNEL SJ, SACCHI A. Expression of beta 1, beta 3, beta 4, and beta 5 integrins by human lung carcinoma cells of different histotypes. *Exp Cell Res* 1994; **210**: 113–122.
- [27] FALEIRO-RODRIGUES C, MACEDO-PINTO I, PEREIRA D, FERREIRA VM, LOPES CS. Association of E-cadherin and beta-catenin immunexpression with clinicopathologic features in primary ovarian carcinomas. *Hum Pathol* 2004; **35**: 663–669.
- [28] GARCIA-ROSTAN G, TALLINI G, HERRERO A, D'AQUILA TG, CARCANGIU ML, RIMM DL. Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1999; **59**: 1811–1815.
- [29] GARCIA-ROSTAN G, CAMP RL, HERRERO A, CARCANGIU ML, RIMM DL, TALLINI G. Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol* 2001; **158**: 987–996.
- [30] GRAFF JR, GREENBERG VE, HERMAN JG, WESTRA WH, BOGHAERT ER, AIN KB, SAJI M, ZEIGER MA, ZIMMER SG, BAYLIN SB. Distinct patterns of E-cadherin CpG island methylation in papillary, follicular, Hurthle's cell, and poorly differentiated human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1998; **58**: 2063–2066.
- [31] GRAFF JR, GABRIELSON E, FUJII H, BAYLIN SB, HERMAN JG. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem* 2000; **275**: 2727–2732.
- [32] GROSSMAN HB, LEE C, BROMBERG J, LIEBERT M. Expression of the alpha6beta4 integrin provides prognostic information in bladder cancer. *Oncol Rep* 2000; **7**: 13–16.
- [33] GUILFORD P. E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today* 1999; **5**: 172–177.
- [34] HAKIMELAHI S, PARKER HR, GILCHRIST AJ, BARRY M, LI Z, BLEACKLEY RC, PASDAR M. Plakoglobin regulates the expression of the anti-apoptotic protein BCL-2. *J Biol Chem* 2000; **275**: 10905–10911.
- [35] HAZAN RB, PHILLIPS GR, QIAO RF, NORTON L, AARONSON SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 2000; **148**: 779–790.
- [36] HELMBRECHT K, KISPERT A, VON WASIELEWSKI R, BRABANT G. Identification of a Wnt/beta-catenin signaling pathway in human thyroid cells. *Endocrinology* 2001; **142**: 5261–5266.
- [37] HIROHASHI S, KANAI Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 2003; **94**: 575–581.

- [38] HU P, BERKOWITZ P, O'KEEFE EJ, RUBENSTEIN DS. Keratinocyte adherens junctions initiate nuclear signaling by translocation of plakoglobin from the membrane to the nucleus. *J Invest Dermatol* 2003; **121**: 242–251.
- [39] HUBER O, BIERKAMP C, KEMLER R. Cadherins and catenins in development. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 685–691.
- [40] HUSMARK J, HELDIN NE, NILSSON M. N-cadherin-mediated adhesion and aberrant catenin expression in anaplastic thyroid-carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1999; **83**: 692–699.
- [41] ILLARIO M, AMIDEO V, CASAMASSIMA A, ANDREUCCI M, DI MATOLA T, MIELE C, ROSSI G, FENZI G, VITALE M. Integrin-dependent cell growth and survival are mediated by different signals in thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 260–269.
- [42] INO Y, GOTOH M, SAKAMOTO M, TSUKAGOSHI K, HIROHASHI S. Dysadherin, a cancer-associated cell membrane glycoprotein, down-regulates E-cadherin and promotes metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 365–370.
- [43] ISHIGAKI K, NAMBA H, NAKASHIMA M, NAKAYAMA T, MITSUTAKE N, HAYASHI T, MAEDA S, ICHINOSE M, KANEMATSU T, YAMASHITA S. Aberrant localization of beta-catenin correlates with overexpression of its target gene in human papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 3433–3440.
- [44] ISLAM S, CAREY TE, WOLF GT, WHEELLOCK MJ, JOHNSON KR. Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell–cell adhesion. *J Cell Biol* 1996; **135**: 1643–1654.
- [45] KATO N, TSUCHIYA T, TAMURA G, MOTOYAMA T. E-cadherin expression in follicular carcinoma of the thyroid. *Pathol Int* 2002; **52**: 13–18.
- [46] KITAJIRI S, HOSAKA N, HIRAUMI H, HIROSE T, IKEHARA S. Increased expression of integrin beta-4 in papillary thyroid carcinoma with gross lymph node metastasis. *Pathol Int* 2002; **52**: 438–441.
- [47] MACLEOD K. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 2000; **10**: 81–93.
- [48] MAELANDSMO GM, HOLM R, NESLAND JM, FODSTAD Ø, FLØRENES VA. Reduced beta-catenin expression in the cytoplasm of advanced-stage superficial spreading malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 3383–3388.
- [49] MARIN O, BUSTOS VH, CESARO L, MEGGIO F, PAGANO MA, ANTONELLI M, ALLENDE CC, PINNA LA, ALLENDE JE. A noncanonical sequence phosphorylated by casein kinase I in beta-catenin may play a role in casein kinase I targeting of important signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 10193–10200.
- [50] MEIRMANOV SK, NAKASHIMA M, TAKAMURA N, ITO M, PROUGLO YV, YAMASHITA S, SEKINE I. Involvement of Wnt pathway in thyroid cancer around Semipalatinsk Nuclear Test Site. *International Congress Series* 2003, **1258**: 177–183.
- [51] MERCURIO AM, RABINOVITZ I. Towards a mechanistic understanding of tumor invasion—lessons from the alpha6beta 4 integrin. *Semin Cancer Biol* 2001; **11**: 129–141.
- [52] MITTAL K. The 9 lives of beta-catenin. *Hum Pathol* 2004; **35**: 647–648.
- [53] MIYAKE N, MAETA H, HORIE S, KITAMURA Y, NANBA E, KOBAYASHI K, TERADA T. Absence of mutations in the beta-catenin and adenomatous polyposis coli genes in papillary and follicular thyroid carcinomas. *Pathol Int* 2001; **51**: 680–685.
- [54] MIYAZAWA K, IWAYA K, KURODA M, HARADA M, SERIZAWA H, KOYANAGI Y, SATO Y, MIZOKAMI Y, MATSUOKA T, MUKAI K. Nuclear accumulation of beta-catenin in intestinal-type gastric carcinoma: correlation with early tumor invasion. *Virchows Arch* 2000; **437**: 508–513.
- [55] MORETTI F, NANNI S, PONTECORVI A. Molecular pathogenesis of thyroid nodules and cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000; **14**: 517–539.
- [56] NOLLET F, BEX G, VAN ROY F. The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Mol Cell Biol Res Commun*. 1999; **2**: 77–85.
- [57] OKEGAWA T, PONG RC, LI Y, HSIEH JT. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim Pol* 2004; **51**: 445–457.
- [58] POSER I, DOMINGUEZ D, DE HERREROS AG, VARNAI A, BUETTNER R, BOSSERHOFF AK. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem* 2001; **276**: 24661–24666.
- [59] PÖTTER E, BERGWITZ C, BRABANT G. The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocr Rev* 1999; **20**: 207–239.

- [60] PRANGE W, BREUHAHN K, FISCHER F, ZILKENS C, PIETSCH T, PETMECKY K, EILERS R, DIENES HP, SCHIRMACHER P. Beta-catenin accumulation in the progression of human hepatocarcinogenesis correlates with loss of E-cadherin and accumulation of p53, but not with expression of conventional WNT-1 target genes. *J Pathol* 2003; **201**: 250–259.
- [61] RAMBURAN A, GOVENDER D. Cadherins and catenins in pathology. *Curr Diagnost Pathol* 2002; **8**: 305–317.
- [62] ROCHA AS, SOARES P, SERUCA R, MAXIMO V, MATIAS-GUIU X, CAMESELLE-TEIJEIRO J, SOBRINHO-SIMÕES M. Abnormalities of the E-cadherin/catenin adhesion complex in classical papillary thyroid carcinoma and in its diffuse sclerosing variant. *J Pathol* 2001; **194**: 358–366.
- [63] ROCHA AS, SOARES P, MACHADO JC, MAXIMO V, FONSECA E, FRANSSILA K, SOBRINHO-SIMÕES M. Mucoepidermoid carcinoma of the thyroid: a tumour histotype characterised by P-cadherin neoexpression and marked abnormalities of E-cadherin/catenins complex. *Virchows Arch* 2002; **440**: 498–504.
- [64] SATO H, INO Y, MIURA A, ABE Y, SAKAI H, ITO K, HIROHASHI S. Dysadherin: expression and clinical significance in thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 4407–4412.
- [65] SCHEUMMAN GFW, HOANG-VU C, CETIN Y, GIMM O, BEHRENDIS J, VON WASIELEWSKI R, GEORGII A, BIRCHMEIER W, VON ZUR MÜHLEN A, DRALLE H, BRABANT G. Clinical significance of E-cadherin as a prognostic marker in thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**: 2168–2172.
- [66] SHIMADA Y, YAMASAKI S, HASHIMOTO Y, ITO T, KAWAMURA J, SOMA T, INO Y, NAKANISHI Y, SAKAMOTO M, HIROHASHI S, IMAMURA M. Clinical significance of dysadherin expression in gastric cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 2818–2823.
- [67] SHIMAMURA T, SAKAMOTO M, INO Y, SATO Y, SHIMADA K, KOSUGE T, SEKIHARA H, HIROHASHI S. Dysadherin overexpression in pancreatic ductal adenocarcinoma reflects tumor aggressiveness: relationship to E-cadherin expression. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 659–667.
- [68] SHINOHARA A, YOKOYAMA Y, WAN X, TAKAHASHI Y, MORI Y, TAKAMI T, SHIMOKAWA K, TAMAYA T. Cytoplasmic/nuclear expression without mutation of exon 3 of the beta-catenin gene is frequent in the development of the neoplasm of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2001; **82**: 450–455.
- [69] SIHX, TSAO SW, LAM KY, SRIVASTAVA G, LIU Y, WONG YC, SHEN ZY, CHEUNG ALM. E-cadherin expression is commonly downregulated by CpG island hypermethylation in esophageal carcinoma cells. *Cancer Lett* 2001; **173**: 71–78.
- [70] STOCKINGER A, EGER A, WOLF J, BEUG H, FOISNER R. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J Cell Biol* 2001; **154**: 1185–1196.
- [71] STRATHDEE G. Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol* 2002; **12**: 373–379.
- [72] SUNDFELDT K. Cell–cell adhesion in the normal ovary and ovarian tumors of epithelial origin; an exception to the rule. *Mol Cell Endocrinol* 2003; **202**: 89–96.
- [73] SZYM CZYK P, KILIAŃSKA ZM. Antygen CD44: czy występowanie jego izoform może mieć znaczenie w diagnostyce nowotworów jelita grubego? *Post Biochem* 1999; **45**: 249–260.
- [74] TAKANO T, SUMIZAKI H, NAKANO K, MATSUZUKA F, KUMA K, AMINO N. Increased expression of CD44 variants in differentiated thyroid cancers. *Jpn J Cancer Res* 1996; **87**: 1245–1250.
- [75] TANI T, KARTTUNEN T, KIVILUOTO T, KIVILAAKSO E, BURGESSON RE, SIPPONEN P, VIRTANEN I. Alpha 6 beta 4 integrin and newly deposited laminin-1 and laminin-5 form the adhesion mechanism of gastric carcinoma. Continuous expression of laminins but not that of collagen VII is preserved in invasive parts of the carcinomas: implications for acquisition of the invading phenotype. *Am J Pathol* 1996; **149**: 781–793.
- [76] 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.
- [77] VAN AKEN E, DE WEVER O, CORREIA DA ROCHA AS, MAREEL M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch* 2001; **439**: 725–751.
- [78] VANPOUCKE G, NOLLET F, TEJPAR S, CASSIMAN JJ, VAN ROY F. The human alphaE-catenin gene *CTNNA1*: mutational analysis and rare occurrence of a truncated splice variant. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1574**: 262–268.
- [79] VITALE M, DE RIU S, FENZI GF, CASAMASSIMA A, SALZANO S, MÜELLER F, MARZANO LA, ROSSI G. Expression of integrins of the beta1 family in thyroid cells from patients with Graves' disease *in vivo* and *in vitro*. *Biochimie* 1999; **81**: 477–484.

- [80] VON WASIELEWSKI R, RHEIN A, WERNER M, SCHEUMANN GF, DRALLE H, PÖTTER E, BRABANT G, GEORGII A. Immunohistochemical detection of E-cadherin in differentiated thyroid carcinomas correlates with clinical outcome. *Cancer Res* 1997; **57**: 2501–2507.
- [81] WANG S, WUU J, SAVAS L, PATWARDHAN N, KHAN A. The role of cell cycle regulatory proteins, cyclin D1, cyclin E, and p27 in thyroid carcinogenesis. *Hum Pathol* 1998; **29**: 1304–1309.
- [82] WANG S, LLOYD RV, HUTZLER MJ, SAFRAN MS, PATWARDHAN NA, KHAN A. The role of cell cycle regulatory protein, cyclin D1, in the progression of thyroid cancer. *Mod Pathol* 2000; **13**: 882–887.
- [83] WOODMAN AC, SUGIYAMA M, YOSHIDA K, SUGINO T, BORGIA A, GOODISON S, MATSUMURA Y, TARIN D. Analysis of anomalous CD44 gene expression in human breast, bladder, and colon cancer and correlation of observed mRNA and protein isoforms. *Am J Pathol* 1996; **149**: 1519–1530.
- [84] WU TT, HSU YS, WANG JS, LEE YH, HUANG JK. The role of p53, bcl-2 and E-cadherin expression in predicting biochemical relapse for organ confined prostate cancer in Taiwan. *J Urol* 2003; **170**: 78–81.
- [85] ZHURINSKY J, SHTUTMAN M, BEN-ZE'EV A. Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci* 2000; **113**: 3127–3139.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 27.12.2004 r.

Przyjęto: 26.01.2005 r.

Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki,

S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

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

INDUKCJA TOLERANCJI IMMUNOLOGICZNEJ W TRANSPLANTACJI UNACZYNIONYCH NARZĄDÓW ALLOGENICZNYCH*

INDUCTION OF IMMUNOLOGICAL TOLERANCE IN
VASCULARIZED ORGAN TRANSPLANTATION

Małgorzata RICHTER, Bogusław MACHALIŃSKI

Zakład Patologii Ogólnej, Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie

Streszczenie: Przeszczepianie organów unaczynionych stało się rutynowym postępowaniem terapeutycznym ratującym życie wielu chorym ze schyłkową niewydolnością narządów. Jednym z głównych celów immunologii transplantacyjnej jest poszukiwanie skutecznych metod indukowania u biorcy specyficznej tolerancji wobec antygenów dawcy. W badaniach w modelach zwierzęcych wykazano, iż indukcja mieszanego chimeryzmu poprzez transfuzję komórek krwiotwórczych szpiku kostnego może stanowić efektywny sposób rozwoju specyficznej tolerancji immunologicznej dla alloprzeszczepu. W niniejszej pracy przedstawiono historię oraz współczesne osiągnięcia w badaniach nad mechanizmem oraz opracowaniem optymalnego protokołu indukcji mieszanego chimeryzmu u gryzoni i dużych zwierząt. Zawarto również aspekty kliniczne indukcji tolerancji immunologicznej u ludzi oraz potencjalne implikacje terapeutyczne.

Słowa kluczowe: alloprzeszczep, krwiotwórcze komórki macierzyste, mieszany chimeryzm, tolerancja immunologiczna, transplantacja narządów.

Summary: Achieving immunological tolerance is an important goal in the effort to reduce long-term morbidity and mortality in organ transplant recipients. The establishment of mixed chimerism through the transplantation of donor bone marrow cells is an experimental approach for tolerance induction with clinical potential. Permanent, robust donor-specific tolerance has been reliably achieved in various animals models of mixed chimerism. This article reviews the historical background and the progress achieved in recent years in developing mixed chimerism protocols in rodents, large animals and also regards the issue of clinical applications.

Key words: allograft, haematopoietic stem cells, mixed chimerism, immunological tolerance, organ transplantation.

* Praca finansowana z grantu UE nr QLK3-CT-2002-30307 w ramach Stem Cell Therapeutics Excellence Centre.

Wykaz skrótów stosowanych w pracy: **APC** (ang. *Antigen Presenting Cell*) – komórka prezentująca antygen, **BMT** (ang. *Bone Marrow Transplantation*) – przeszczepienie komórek szpiku kostnego, **DST** (ang. *Donor-Specific Transfusion*) – transfuzja specyficznych komórek dawcy, **GVHD** (ang. *Graft Versus Host Disease*) – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi, **KKM** – krwiotwórcze komórki macierzyste, **TBI** (ang. *Total Body Irradiation*) – napromieniowanie całego ciała, **PCR** (ang. *Polymerase Chain Reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy

WSTĘP

Transplantacja jest w wielu przypadkach jedyną skuteczną metodą leczenia schyłkowej niewydolności różnych narządów. W ostatnim dwudziestoleciu ogromnym sukcesem w transplantologii było udoskonalenie procedur immunosupresji, które znacznie poprawiły odległe przeżycie i prawidłowe funkcjonowanie przeszczepianych narządów allogenicznych. Z drugiej strony jednak pacjent, poddawany leczeniu immunosupresyjnemu, narażony jest na wiele działań ubocznych, wśród których są infekcje oportunistyczne, nowotwory, uszkodzenie nerek czy zaburzenia metaboliczne [9, 41, 58].

Przyjmuje się, iż kontrola reakcji ostrego odrzucania przeszczepu dzięki wprowadzeniu cyklosporyny A jest w chwili obecnej zadowalająca, nie można natomiast tego odnieść do procesu przewlekłego odrzucania przeszczepu. Po 10 latach, tylko 50% przeszczepów nerek nadal funkcjonuje, a 70% alloprzeszczepów płuc wykazuje pogorszenie już 5 lat od transplantacji [18]. W związku z tym problem przewlekłego odrzucania przeszczepu nadal pozostaje nierozwiązany [34, 36, 41]. Z tych powodów jednym z głównych celów współczesnej transplantologii immunologicznej jest poszukiwanie metod indukcji specyficznej tolerancji wobec antygenów dawcy, która mogłaby skutecznie uchronić pacjenta od późnego odrzucania przeszczepu oraz pozwoliłaby uniknąć przewlekłej terapii lekami immunosupresyjnymi [9, 10, 36].

Tolerancję immunologiczną można wytworzyć między innymi poprzez wszczepienie komórek allogenicznych gospodarzowi, poddanemu wcześniej immunosupresji za pomocą leków (np. cyklosporyna A, steroidy), naświetlań promieniami gamma czy przeciwciał antylimfocytarnych (globulina antylimfocytarna, przeciwciała anti-CD4). Aby podtrzymać stan tolerancji, należy uzyskać pewien stopień chimeryzmu, czyli współlistnienia komórek od genetycznie różnych osobników. Stan ten najłatwiej jest osiągnąć, jeżeli wszczepiane komórki są zdolne do samoodnowy jak krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM) [36].

W niniejszej pracy zostanie omówiona w skrócie historia wielu prób indukcji tolerancji immunologicznej poprzez wytworzenie mieszanego chimeryzmu oraz przedstawione zostaną najnowsze osiągnięcia dotyczące tej metody w badaniach w modelu zwierzęcym oraz u ludzi.

RODZAJE CHIMERYZMU I MECHANIZMY JEGO POWSTAWANIA

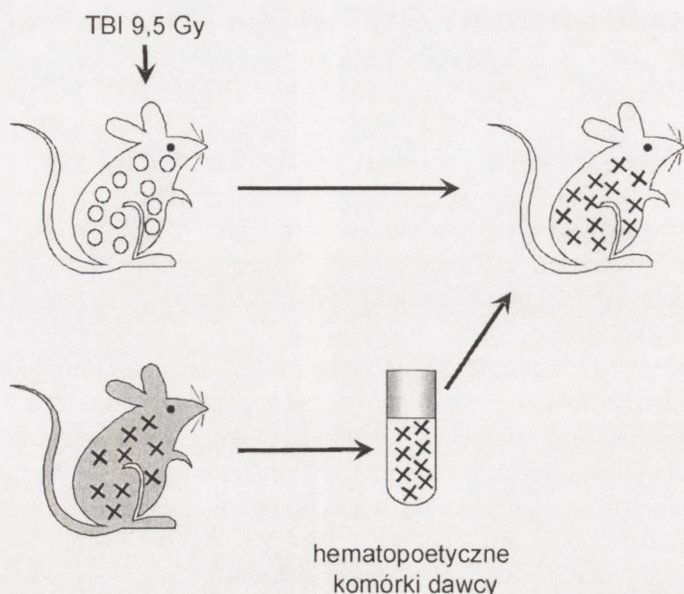
Zgodnie z mitologią grecką chimera była przedstawiana jako stworzenie składające się z głowy i szyi lwa, ciała kozy i ogona węża [18, 59]. Według innych starożytnych kultur podobne stworzenia istniały również w Indiach jako Koziorożec, czyli skrzyżowanie lwa, słonia i węża oraz w Chinach jako kombinacja kobiety i węża, zwana Fu-Hsi [18, 59]. Najślawniejszą polską chimera jest natomiast warszawska Syrena, czyli połączenie kobiety i ryby.

Z medycznego punktu widzenia chimeryzm określany jest jako stan współistnienia w jednym organizmie dwóch genetycznie różnych populacji komórek, które mają zdolność różnicowania i prawidłowego wzajemnego funkcjonowania. Chimeryzm może pojawić się spontanicznie lub jako konsekwencja interwencji medycznej [3, 54, 58]. Spontaniczny chimeryzm można zaobserwować u bliźniąt, kiedy w życiu płodowym występuje połączenie pomiędzy naczyniami dwóch łożysk. Natomiast sztucznie indukowany chimeryzm można osiągnąć w różny sposób w zależności od rodzaju, jaki chce się uzyskać (tab. 1) [54, 58].

W pełnym chimeryzmie układ krwiotwórczy gospodarza jest zastąpiony całkowicie przez układ krwiotwórczy dawcy wskutek zastosowania całkowitej mieloablacji u gospodarza (ryc. 1). W związku z tym obecność pełnego chimeryzmu jest związana z nieprawidłowym funkcjonowaniem pierwotnej odpowiedzi immunologicznej oraz dużym ryzykiem wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi GVHD (ang. *graft versus host disease*).

TABELA 1. Definicje i charakterystyka poszczególnych rodzajów chimeryzmu

Rodzaje chimeryzmu	Definicja	Komentarz
Chimeryzm	obecność obcych hematopoetycznych komórek u danego osobnika	
Mikrochimeryzm	obecność u biorcy hematopoetycznych komórek dawcy < 1%	może wystąpić spontanicznie po allogenicznym przeszczepieniu narządu unaczynionego.
Makrochimeryzm		
a) pełny chimeryzm	wszystkie hematopoetyczne komórki obecne u biorcy pochodzą od dawcy, 100%	powstaje w wyniku allogenicznego przeszczepienia szpiku po wcześniejszym przygotowaniu immunoablacyjnym
b) mieszany chimeryzm	współistnienie hematopoetycznych komórek pochodzących zarówno od dawcy, jak i od biorcy, 1 < komórki dawcy < 100%	powstaje po przeszczepieniu KKM po wcześniejszym immunosupresyjnym przygotowaniu biorcy

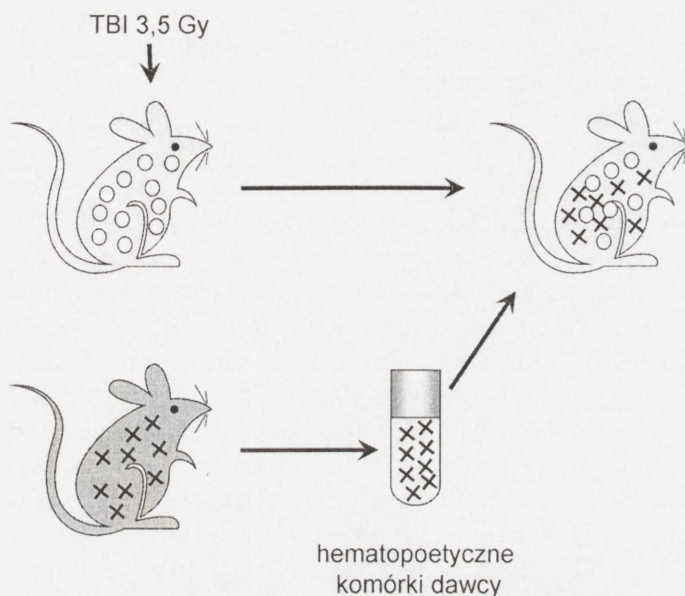


RYCINA 1. Mechanizm powstawania pełnego chimeryzmu u myszy. Przeszczerpienie komórek hematopoetycznych pochodzących od dawcy po wcześniejszym immunoablacyjnym przygotowaniu biorcy

Ponadto, śmiertelność 7–10% związana z przygotowaniem ablacyjnym biorcy wyklucza zastosowanie tej metody w allogenicznym przeszczepach narządów unaczynionych i jest w chwili obecnej zarezerwowana głównie dla chorób nowotworowych układu krwiotwórczego oraz poważnych zaburzeń odporności [18, 47, 58].

Z punktu widzenia immunologii transplantacyjnej indukcja stabilnego, mieszanego chimeryzmu poprzez infuzję KKM odgrywa istotną rolę w strategiach wytworzenia specyficznej tolerancji immunologicznej wobec antygenów dawcy. W mieszanym chimeryzmie układ krwiotwórczy dawcy współistnieje z układem krwiotwórczym biorcy (ryc. 2). Mieszany chimeryzm indukuje specyficzną tolerancję immunologiczną, jest ponadto związany z lepszą immunokompetencją organizmu gospodarza oraz ze stosunkowo większą odpornością na GVHD w porównaniu z pełnym chimeryzmem [18, 47, 54]. Może być osiągnięty za pomocą łagodniejszej immunosupresji pozwalającej na powszechne zastosowanie kliniczne, np. poprzez częściowe naświetlenia promieniami gamma, użycie przeciwciał antylimfocytarnych lub kostymulującej terapii blokującej. Powyższe metody poddawane są w ostatnich latach intensywnym badaniom przez różne ośrodki kliniczne i naukowo-badawcze na całym świecie [9, 36, 57].

Trzeci rodzaj chimeryzmu, mikrochimeryzm, pojawia się spontanicznie u biorców alloprzeszczepów jako rezultat pierwotnej obecności krwiotwórczych komórek dawcy (tzw. leukocytów pasażerskich) przenoszonych razem z przeszczepianym narządem [41, 43, 58]. Ten rodzaj chimeryzmu może być wykrywany za pomocą techniki PCR (ang. *polymerase chain reaction*). Nie potwierdzono jednak do tej pory znaczącej przydatności mikrochimeryzmu w indukcji tolerancji wobec antygenów alloprzeszczepu [3, 27, 59].



RYCINA 2. Mechanizm powstawania mieszanego chimeryzmu u myszy. Przeszczenie KKM pochodzących od dawcy po wcześniejszym częściowym immunosupresyjnym przygotowaniu biorcy

RYS HISTORYCZNY

Spontaniczne pojawienie się chimeryzmu i tolerancji jako pierwszy zaobserwował Owen ze współpracownikami, który udowodnił, że komórki posiadające antygeny „własne” i „obce” mogą powstać u tego samego osobnika. W 1945 r. Owen opisał „doświadczenie w naturze” u nieidentycznych bliźniaczych cieląt rasy „freemartin”. Wymieniały one KKM przez naczynia krwionośne wspólnego łożyska i w związku z tym każde ze zwierząt posiadało markery erytrocytarne obu cieląt. Przez całe życie wykazywały one tolerancję na bliźniacze komórki, co manifestowało się niezdolnością do wytworzenia przeciwciał przeciwko odpowiednim antygenom erytrocytarnym [27, 38]. Wkrótce Billingham i wsp. dowiedli, że większość badanych bliźniąt była rasy „freemartin” wykazuje pełną akceptację przeszczepów skórnych pochodzących od siebie wzajemnie, pomimo iż różnią się pod względem genetycznym [5].

Ekperymentalne potwierdzenie wcześniejszych obserwacji uzyskano w 1953 r., kiedy Billingham, Brent i Medvar wywołali tolerancję immunologiczną na skórne alloprzeszczy (przeszczy, które są genetycznie różne, ale pochodzą od tego samego gatunku) u myszy, którym podali dożylnie w życiu płodowym krwiotwórcze komórki allogeniczne od przyszłego dawcy skóry [4].

Na początku lat siedemdziesiątych Opelz i wsp. zaobserwowali, iż wielokrotne, niespecyficzne transfuzje krwi, jak również specyficzne pochodzące od dawców przeszczepianych narządów [33] prowadziły do znacznie lepszego przeżycia przesz-

czepianych narządów allogenicznych. Powyższe badania pozwoliły skonsolidować hipotezę dotyczącą użycia krwiotwórczych komórek w celu indukcji specyficznej tolerancji immunologicznej w transplantologii [32, 33].

Początkowo wielokrotnie próby wywołania tolerancji u dorosłych biorców często kończyły się niepowodzeniami, dopiero ustalenie roli, jaką odgrywa w całym procesie właściwe, wcześniejsze przygotowanie biorcy przyczyniło się do znaczącej poprawy osiąganych wyników [18]. Monaco i Wood jako pierwsi wykazali, iż indukcja specyficznej tolerancji na skórne przeszczepy może być osiągnięta u dorosłych myszy, które zostały pozbawione grasicy i potraktowane przeciwciałami antylimfocytarnymi, a następnie otrzymały frakcję limfoidalnych komórek pozyskanych wcześniej od mysz – mieszańców (hybryd). Późniejsze eksperymenty na dorosłych myszach, które otrzymały w terapii globulinę antylimfocytarną, wykazały, iż podane w infuzji dożylniej niskie dawki ($10\text{--}50 \times 10^6$) krwiotwórczych komórek szpiku także indukują lepsze przeżycie przeszczepu skórnoego bez cech GVHD [30]. Następne podobne doświadczenia na dorosłych psach i małpach ugruntowały przekonanie o dużej roli chimeryzmu w mechanizmie indukcji tolerancji immunologicznej na przeszczepy allogeniczne narządów unaczynionych [7, 50] i stały się punktem wyjścia do rozważań nad powszechnym zastosowaniem u ludzi.

POSTULOWANY MECHANIZM WYTWORZENIA TOLERANCJI IMMUNOLOGICZNEJ PRZEZ INDUKCJĘ STABILNEGO MIESZANEGO CHIMERYZMU

Tolerancja immunologiczna jest to stan braku osobniczej swoistej odpowiedzi immunologicznej, podczas gdy odpowiedź wobec antygenów nieswoistych jest zachowana i funkcjonuje prawidłowo. Stan ten jest bardzo pożądanym jako względnie fizjologiczny w transplantologii w porównaniu z nieswoistymi czynnikami immunosupresyjnymi, które blokując reakcję odrzucania przeszczepu zmniejszają równocześnie odporność na infekcje oraz wywołują całą gamę innych efektów niepożądanych [36].

Swoista tolerancja immunologiczna jest indukowana uprzednią ekspozycją na antygen. W przypadku mieszanego chimeryzmu indukcję specyficznej tolerancji u biorców alloprzeszczepu można uzyskać poprzez wszczepienie krwiotwórczych komórek szpiku kostnego wzbogaconych najlepiej we frakcję KKM, ale pozbawionych komórek adherentnych i limfocytów. Zdolność KKM do samoodnowy pozwala układowi immunologicznemu gospodarza na ciągły kontakt z obcym antygenem, a usunięcie komórek adherentnych i limfocytów zmniejsza ryzyko wystąpienia GVHD [58].

Wytworzenie i podtrzymywanie stanu tolerancji w mechanizmie mieszanego chimeryzmu odbywa się wewnątrzgrasiczo poprzez centralną klonalną delecję [53]. Jest to jeden z fizjologicznych mechanizmów w ludzkim organizmie, dzięki któremu wytwarzana jest tolerancja na własne antygeny. Komórki T, które wykazują antygenowo swoiste receptory o wysokim stopniu powinowactwa do wewnątrzgrasiczych antygenów

własnych, są eliminowane w drodze apoptozy. Natomiast autoreaktywne komórki T o niskim powinowactwie oraz komórki z receptorami swoistymi dla antygenów niewystępujących wewnątrzgrasiczo dojrzewają i dołączają do obwodowej puli komórek T [36, 37, 58].

Ogromną rolę w podtrzymywaniu stanu tolerancji przypisuje się komórkom dendrytycznym szpiku kostnego dawcy, których głównym zadaniem jest prezentacja antygenów w grasicy [51, 52].

Tolerancja w mieszanych chimerach zależy więc przede wszystkim od ciągłej obecności w grasicy komórek dendrytycznych pochodzących od dawcy, które pośredniczą w mechanizmie centralnej klonalnej delecji z udziałem komórek dawcy. Dzięki temu wewnątrzgrasiczo eliminowane są nie tylko autoreaktywne limfocyty T gospodarza, ale również populacja limfocytów T wykazująca antygenowo swoiste receptory o wysokim stopniu powinowactwa do antygenów przeszczepu. Tolerancja na antygeny przeszczepu trwa więc tak długo, dopóki w szpiku kostnym pula krwiotwórczych komórek pochodzących od dawcy będzie współistniała z komórkami gospodarza.

W ten sposób w mieszanych chimerach nowo powstałe dojrzałe limfocyty T, które przeszły selekcję wewnątrzgrasiczą, wykazują trwałą tolerancję wobec antygenów dawcy. Należy jednak pamiętać, że dojrzałe reaktywne limfocyty T gospodarza, które odgrywają kluczową rolę w odrzucaniu przeszczepu, powinny być usunięte lub inaktywowane przed transplantacją narządu oraz wszczępieniem KKM. Niestety powszechnie stosowana w tym celu nieswoista immunosupresja w postaci naświetlań promieniami gamma, leków immunosupresyjnych czy przeciwciał antylimfocytarnych pozostawia pacjenta w stanie znacznie obniżonej odporności immunologicznej i zwiększa ryzyko infekcji, dopóki nie powstanie w grasicy nowa pula komórek T [28, 40]. W związku z tym poszukiwania skutecznych metod swoistej immunosupresji są nadal przedmiotem intensywnych badań w dziedzinie immunologii transplantacyjnej.

Od niedawna specyficzna eliminacja dojrzałych limfocytów T uzyskiwana jest w drodze równoczesnego zablokowania kostymulacji limfocytów T (ang. *costimulatory blockade*) oraz wszczępienia komórek szpiku kostnego (BMT, ang. *Bone Marrow Transplantation*).

INDUKCJA TOLERANCJI W MECHANIZMIE BLOKOWANIA KOSTYMULACJI LIMFOCYTÓW T ORAZ RÓWNOCZESNEJ TRANSPLANTACJI KOMÓREK SZPIKU KOSTNEGO

Blokowanie kostymulacji, czyli dodatkowych sygnałów potrzebnych do aktywacji limfocytów T, pozwoliło po raz pierwszy na indukcję stabilnego mieszanego chimeryzmu unikając silnej nieswoistej immunosupresji [57]. W powyższym eksperymencie myszy potraktowano niską dawką TBI (3 Gy), a następnie otrzymały one standardową dawkę komórek szpiku kostnego dawcy oraz pojedynczą dawkę przeciwciała monoklonalnego anti-CD154 (anty-CD40L) i CTLA-4Ig. W rezultacie otrzymano stan stabilnego mieszanego chimeryzmu oraz silną tolerancję na alloprzeszczep.

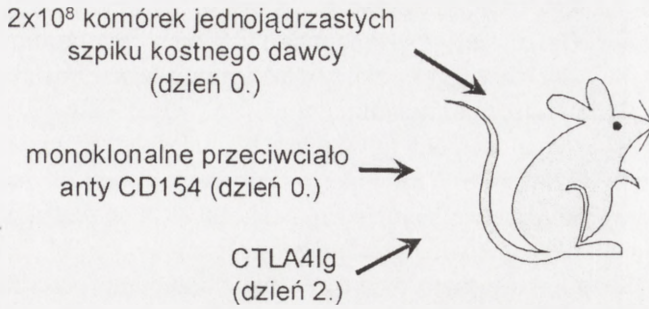
Zastosowanie tego protokołu miało na celu wyeliminowanie reaktywnych limfocytów T biorcy w drodze obwodowej klonalnej delecji przez blokowanie mechanizmów kostymulacji limfocytów T, które zależą głównie od cząsteczek CD40L, CD28 i CTLA-4 na powierzchni limfocytu T. Kostymulacja limfocytów T oznacza, że potrzebny jest drugi sygnał oprócz tego, który wywołał indukcję przez TCR po połączeniu się z antygenem MHC klasy II obecnym na powierzchni komórki prezentującej antygen APC (ang. *Antigen Presenting Cell*). Ten drugi sygnał nasila proliferację komórek T oraz funkcje efektorowe, takie jak produkcja limfokin i cytoliza.

Obecnie wiadomo, iż najsilniejszym sygnałem biorącym udział w kostymulacji limfocytów T jest połączenie się antygeny CD40 na powierzchni APC z jego ligandem na powierzchni limfocytów T zwanym CD40L (CD154). Wiązanie ligandu CD40L na powierzchni limfocytu T przez przeciwciało anti-CD154 prowadzi więc do zablokowania najsilniejszego sygnału aktywacji limfocytów T przez APC.

W kostymulacji może brać udział wiele innych cząsteczek powierzchniowych komórek T, ale szczególnie duże znaczenie spośród nich odgrywa szereg B7-CD28/CTLA-4. CD28 ulega stałej ekspresji na powierzchni komórki T, natomiast CTLA-4 obecne jest na powierzchni dopiero po jej aktywacji. Antygeny B-7 obecne na powierzchni APC łączą się z CD28 powodując stabilizację sygnałów aktywacji limfocytów T. Stymulacja CD28 prowadzi do produkcji IL-2, ekspresji receptora dla IL-2 i progresji w cyklu życiowym pobudzonych komórek T. Natomiast CTLA-4, będąca alternatywnym receptorem dla B7, jest białkiem regulacyjnym ograniczającym aktywację limfocytów T. Cząsteczka CD28 początkowo łączy się z B7, co prowadzi do aktywacji limfocytów T, lecz pojawiająca się następnie zwiększona ekspresja CTLA-4 doprowadza do interakcji CTLA-4/B7, co w konsekwencji ogranicza poziom aktywacji. Wiązanie zatem CTLA-4 przez przeciwciało CTLA-4Ig na powierzchni komórki blokuje odpowiedzi zależne od CD28 i powoduje zahamowanie syntezy IL-2. Usunięcie IL-2 prowadzi natomiast do nieuchronnej śmierci komórki [36, 56].

Mechanizm blokowania kostymulacji w podobnych protokołach został użyty także w innych eksperymentach, gdzie również uzyskano zadowalające wyniki badań [1, 12, 56, 57]. Niemniej jednak, jak wykazano w późniejszych pracach, próby zastosowania tej metody osobno (tj. bez jednoczesnego przeszczepienia KKM) nie dały pozytywnych rezultatów w indukcji pierwotnej tolerancji na przeszczep skóry u myszy ani tolerancji wobec przeszczepu nerek u małp [58]. Wobec powyższego, mechanizm blokowania kostymulacji wydaje się być użyteczny w indukowaniu mieszanego chimeryzmu, jedynie w skojarzeniu z BMT.

Jednym z najnowszych osiągnięć w tej dziedzinie była indukcja długotrwałego mieszanego chimeryzmu i tolerancji na przeszczep skóry w mechanizmie blokowania kostymulacji limfocytów T bez użycia jakiegokolwiek poprzedzającej cytoredukcyjnej terapii biorcy (np. TBI lub leków immunosupresyjnych). Jedynym warunkiem było zastosowanie dużych dawek jednojądrzastych komórek szpiku kostnego. Zgodnie z tym protokołem myszy otrzymały 2×10^8 komórek szpiku kostnego oraz pojedyncze dawki przeciwciał anti-CD154 oraz CTLA-4Ig (ryc. 3) [55, 58].



RYCINA 3. Indukcja mieszanego chimeryzmu oraz tolerancji immunologicznej u myszy w mechanizmie blokowania kostymulacji limfocytów T oraz równoczesnej transplantacji komórek szpiku kostnego (CTLA4Ig – przeciwciała przeciwko cząsteczce powierzchniowej CTLA4)

W ostatnich miesiącach opisano strategię indukcji tolerancji u myszy w mechanizmie blokowania kostymulacji jedynie z użyciem pojedynczych dawek przeciwciał anty-CD40L (CD154) i anty-CD8 oraz BMT uzyskując długotrwałe przyjęcie przeszczepu skórno dawcy (powyżej 100 dni) [22]. Pozwoliło to na wytworzenie szybkiej i stabilnej tolerancji zarówno limfocytów CD8, jak i CD4 wobec antygenów dawcy. W kolejnej modyfikacji przeciwciała anty-CD8 zostały zastąpione użyciem DST (ang. *Donor-Specific Transfusion*) oraz TBI w dawce 3 Gy uzyskując podobny efekt [46]. W powyższych doświadczeniach stwierdzono, iż tolerancja wobec antygenów dawcy występuje niemal natychmiast po dokonaniu BMT. Dowodem tego był fakt prawidłowego przyjęcia alloprzeszczepu płata skórno dawcy przeszczepionego w drugim dniu od zabiegu infuzji komórek krwiotwórczych oraz odrzucenie podobnego przeszczepu pochodzącego od trzeciego, niespokrewnionego szczepu wsobnego myszy [23].

Ostatnie doniesienia wskazują na udział dodatkowych jeszcze mechanizmów odgrywających rolę w indukowaniu szybkiej tolerancji wobec antygenów dawcy. Jeden z nich może być związany z początkową anergią reaktywnych limfocytów CD4 biorcy wywoływana przez komórki hematopoetyczne dawcy i ich następczą delecją w obecności przeciwciał anty-CD40L. Ponadto, kluczową rolę przypisuje się od niedawna regulatorowym limfocytom T, które również biorą udział w powstawaniu obwodowej tolerancji na alloantygeny przeszczepów unaczynionych [23, 24].

W chwili obecnej trwają intensywne badania mające na celu dokładne wyjaśnienie wszystkich powyższych mechanizmów indukcji tolerancji. Możliwe, iż niektóre elementy z opisanych strategii znajdą się wkrótce w standardowych protokołach transplantologicznych u ludzi.

MECHANIZMY INDUKCJI TOLERANCJI U GRYZONI

Postęp w dziedzinie indukcji tolerancji immunologicznej w mechanizmie stabilnego mieszanego chimeryzmu był rezultatem wielu badań przeprowadzonych w modelu zwierzęcym zarówno u gryzoni, jak i u dużych zwierząt.

W jednym z przykładowych eksperymentów myszy-biorcy otrzymywały monoklonalne przeciwciała (mAb) anty-CD4 i anty CD8 w celu wyeliminowania populacji cytotoksycznych limfocytów T gospodarza. Następnie, okolice grasicy myszy-biorców zostały naświetlone promieniami gamma w dawce 7 Gy, a całe ciało TBI 3 Gy. Tak przygotowanym zwierzętom podano dożylnie standardową dawkę komórek szpiku kostnego od dawcy niespokrewnionego ($\sim 15 \times 10^6$ komórek/mysz). W opisanym protokole myszy wykazywały tolerancję wobec skórnych przeszczepów allogenicznych oraz obecność stabilnego mieszanego chimeryzmu, a mimo to nadal pozostały immunokompetentne. Zostało to potwierdzone reakcją odrzucenia przeszczepu skórniego pochodzącego od trzeciego szczepu wsobnego [39].

W kolejnych doświadczeniach wykazano, iż napromienianie grasicy może być zastąpione dodatkową dawką monoklonalnych przeciwciał antylimfocytarnych [1, 50] lub kostymulacyjną terapią blokującą (CTLA4Ig i przeciwciała monoklonalne anty-CD154), co znacznie zmniejszyło toksyczność przygotowania biorcy [49, 57].

W innym przypadku TBI myszy biorcy zostało zastąpione pojedynczą, skojarzoną dawką chemioterapeutyków (dimetylan myleranu i cyklofosamid). Tutaj również osiągnięto stan mieszanego chimeryzmu oraz specyficzną tolerancję na przeszczep skórny [11].

Choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi jest jednym z głównych klinicznych problemów allogenicznych przeszczepów szpiku, mimo to w powyższych doświadczeniach nie była obserwowana [47]. Można to wytłumaczyć poprzez uprzednie dokładne oczyszczenie wszczepianego szpiku kostnego z dojrzałych komórek T lub zastosowanie kostymulującej terapii blokującej w momencie BMT [52, 53, 54, 57].

Pomimo wielokrotnie podejmowanych nieablacyjnych metod przygotowania gryzoni do przeszczepienia, nie zdołano odstąpić od początkowych dawek mielosupresji czy nieswoistej eliminacji limfocytów T [9, 10, 11, 28, 31, 44]. Jeden z pomysłów dotyczył zastosowania infuzji bardzo dużych dawek allogenicznych, krwiotwórczych komórek szpiku kostnego w celu uniknięcia TBI. W eksperymencie tym myszy biorcy zostały poddane terapii antylimfocytarnymi przeciwciałami monoklonalnymi oraz selektywnemu napromienianiu grasicy. Następnie otrzymały dużą liczbę ($174 \times 10^6/\text{kg m.c.}$) krwiotwórczych komórek szpiku kostnego dawcy w infuzji dożylniej. U 80% badanych myszy zaobserwowano wysoki poziom chimeryzmu oraz indukcję specyficjnej tolerancji na alloprzeszczep [48].

Naukowcy byli jednak zgodni, iż barierą w zastosowaniu powyższej metody u ludzi byłoby niewątpliwie pozyskiwanie tak dużej liczby komórek hematopoetycznych szpiku kostnego od potencjalnych dawców narządów. Zwłaszcza, że większość narządów allogenicznych jest rutynowo pobierana od zmarłych dawców. Opracowanie w ostatnim czasie nowej metody pozyskiwania komórek krwiotwórczych od heparynizowanych dawców narządów pozwala jednak mieć nadzieję na pokonanie w przyszłości tej przeszkody [25, 35].

Próby uniknięcia napromieniania organizmu gospodarza czy użycia leków cytotoksycznych w powyższych eksperymentach dowiodły jednoznacznie, iż prawidłowe wszczepienie krwiotwórczych komórek dawcy wymaga odpowiedniego przygotowania organizmu biorcy. Potwierdziły się zatem przypuszczenia, iż niskie dawki terapii

mielosupresyjnej są niezbędne do indukcji długotrwałego stabilnego chimeryzmu w modelu mysim [30, 39, 53].

INDUKCJA TOLERANCJI U DUŻYCH ZWIERZĄT

Skomplikowane nieablacyjne metody indukcji tolerancji poprzez ustanowienie mieszanego chimeryzmu do niedawna nie były stosowane u dużych zwierząt [58]. Wątpliwości te zostały wyeliminowane jednak przez Fuchimoto i wsp., którzy jako pierwsi zastosowali kostymulującą terapię blokującą w celu usunięcia limfocytów T u świń. W tym modelu stabilny mieszany chimeryzm oraz specyficzna tolerancja na antygeny dawcy w przeszczepie skórny została uzyskana po eliminacji limfocytów T immunotoksyną skoniugowaną z przeciwciałem anti-CD3, frakcjonowanym TBI (3 Gy) oraz napromienianiem grasicy (7 Gy) [17]. W kolejnym eksperymencie ci sami naukowcy spróbowali zastosować podobną metodę indukcji mieszanego chimeryzmu, z pominięciem TBI. Okazało się, iż nie ma przeszkód w stosowaniu nieablacyjnych metod w celu indukcji tolerancji u dużych zwierząt [14].

Podobne doświadczenia u psów były wielokrotnie przeprowadzane przez Storba i wsp. Początkowo, w celu przygotowania biorcy, zastosowano TBI w dawce 2 Gy oraz skojarzoną terapię cyklosporyną A i mykofenolanem mofetylu przez pierwszy tydzień począwszy od BMT. Po zmodyfikowaniu tego protokołu, włączyli do indukcji terapię CTLA4-Ig, zmniejszając TBI do 1 Gy. W obu przypadkach zaobserwowano stabilny mieszany chimeryzm i długotrwałą tolerancję na przeszczep skóry [45, 46].

Próby indukcji mieszanego chimeryzmu zostały podjęte również u małp *Cynomolgus* z gatunku makak (*Macacca fascicularis*). Według opisanego protokołu małpy były przygotowywane do przeszczepienia przy użyciu globuliny antylimfocytarnej, TBI (3 Gy), napromieniania grasicy (7 Gy) oraz splenektomii bezpośrednio przed transplantacją szpiku i nerek od tego samego dawcy. Dodatkowo przez następne 4 tygodnie otrzymywały cyklosporynę A. Chimeryzm identyfikowano we krwi biorców do 68 dnia po BMT, a średnie przeżycie przeszczepu wyniosło ponad 6 lat. W dalszym etapie modyfikacja tego protokołu, zawierająca krótką terapię przeciwciałem monoklonalnym anti-CD154, pozwoliła uniknąć splenektomii i równocześnie zwiększyła poziom chimeryzmu [19, 20, 21].

Powyższe badania wykazały, iż stan stabilnego mieszanego chimeryzmu może być skutecznie i bezpiecznie indukowany również w badaniach modelowych na dużych zwierzętach.

ASPEKTY KLINICZNE INDUKCJI TOLERANCJI IMMUNOLOGICZNEJ U LUDZI

Pierwszą kliniczną próbę zastosowania krwiotwórczych komórek szpiku kostnego dawcy razem z przeszczepem narządów unaczynionych u ludzi podjął Monaco w 1976 r. w Bostonie. Równoczesny przeszczep nerki i komórek szpiku kostnego dawcy został

poprzedzony w tym przypadku terapią z użyciem poliklonalnej globuliny antylimfocytarnej. W rezultacie zaobserwowano stosunkowo dłuższe przeżycia przeszczepów u pacjentów z grupy badanej w porównaniu z grupą kontrolną [30].

Następnie Barber i wsp. opisali swoje zachęcające wyniki badań u biorców przeszczepów nerek, którzy otrzymali równocześnie komórki szpiku kostnego od zmarłych dawców. Pacjenci ci zostali poddani poprzedzającej terapii lekami immunosupresyjnymi (cyklosporyna A, azatiopryna, prednison) oraz otrzymali krótki cykl z użyciem poliklonalnej globuliny antylimfocytarnej. Również tym razem uzyskano znaczną poprawę w przeżyciu przeszczepów (od 3 do 32 miesięcy, ze średnią 16 miesięcy) z kilkoma epizodami odrzucenia [2, 29].

Podobne wyniki uzyskał Fontes i jego współpracownicy z Pittsburgha, którzy podjęli kliniczną próbę indukcji chimeryzmu u biorców przeszczepów allogenicznych różnych organów unaczynionych (nerka, wątroba, serce, wyspy trzustkowe). W okresie okołoperacyjnym biorcy otrzymywali w infuzji dożylniej niespreparowany szpik kostny dawców ($3 \times 10^8/\text{kg}$ m. c.) i byli poddawani konwencjonalnej immunosupresji (takrolimus i prednison) [13, 34].

Dużym sukcesem klinicznym może się pochwalić Spitzer, który wraz ze współpracownikami dokonał allotransplantacji nerki i szpiku kostnego u 56-letniej kobiety w końcowym stadium niewydolności nerek z rozpoznaniem szpiczaka mnogiego. Przygotowanie pacjentki do przeszczepienia zawierało cykl immunosupresji w postaci napromieniania grasicy, podania antytymocytarnej globuliny oraz cyklofosfamidu. Chimeryzm nie trwał dłużej niż 105 dni od transplantacji, lecz mimo to u pacjentki nie zaobserwowano ostrego lub przewlekłego odrzucenia przeszczepu [42].

Do chwili obecnej najwięcej sukcesów w dziedzinie indukcji tolerancji na alloprzeszczepy narządów unaczynionych osiągnął zespół Ronaldo Garcii-Morales z Uniwersytetu w Miami, gdzie od 1994 r. realizowany jest z powodzeniem program równoczesnego przeszczepiania narządów (wątroby, nerek, trzustki, jelita) oraz krwiotwórczych komórek szpiku kostnego. Biorcy przeszczepów poddawani są wcześniejszemu przygotowaniu w postaci 10-dniowej terapii indukcyjnej monoklonalnym przeciwciałem OKT3 oraz terapii lekami immunosupresyjnymi (takrolimus, metyloprednizolon, mykofenolan mofetylu). Infuzja komórek szpiku kostnego dawcy następuje dwa razy: w okresie okołoperacyjnym oraz pomiędzy 10 a 14 dniem od operacji. Następnie poziom mieszanego chimeryzmu jest oceniany przy użyciu metody reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). W wynikach tych badań zaobserwowano między innymi znamienne korelację pomiędzy długotrwałe utrzymującym się wysokim poziomem chimeryzmu i odległym przeżyciem przeszczepionych narządów [6, 8, 15, 16, 26].

PODSUMOWANIE

Kluczowe odkrycia ostatnich lat potwierdziły znaczącą rolę mieszanego chimeryzmu w rozwoju specyficznej tolerancji immunologicznej u biorców przeszczepionych narządów nie tylko w modelu mysim i u dużych zwierząt, ale również u ludzi. W ostatnim czasie znaczne ulepszenie protokołów przeszczepiania krwiotwórczych

komórek szpiku kostnego w konstelacji z przeszczepianymi narządami allogenicznymi bardzo zredukowało ryzyko potencjalnej toksyczności w porównaniu z wcześniejszymi metodami [18, 54]. W związku z nadzieją na powszechne zastosowanie u ludzi pewne aspekty indukcji tolerancji w mechanizmie mieszanego chimeryzmu czekają nadal na udoskonalenie ze strony naukowców. Należą tu przede wszystkim badania mechanizmów BMT pod osłoną blokowania kostymulacji limfocytów T biorcy, oraz izolacja możliwie największej i najczystszej frakcji KKM ze szpiku kostnego od zmarłych potencjalnych dawców przeszczepów allogenicznych.

Ustalenie protokołu indukcji mieszanego chimeryzmu poprzez BMT z następowym blokowaniem kostymulacji limfocytów T było niewątpliwie jednym z największych osiągnięć w tej dziedzinie w ostatnich latach i najbardziej zbliżyło nas do celu, jakim jest bezpieczna indukcja i długotrwały stan tolerancji immunologicznej w transplantacji allogenicznych narządów unaczynionych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADAMS AB, DURHAM MM, KEAN L. Costimulation blockade, busulfan, and bone marrow promote titratable macrochimerism, induce transplantation tolerance, and correct genetic hemoglobinopathies with minimal myelosuppression. *J Immunol* 2001; **167**: 1103–1111.
- [2] BARBER WH, MANKIND JA, LASKOW DA, DEIRHOI MH, JULIAN BA, CURTIS JJ, DIETHELM AG. Long-term results of controlled prospective study with transfusion of donor-specific bone marrow in 57 cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation* 1991; **51**: 70–75.
- [3] BARTA A, BATAI A, KELMEN E, LENGYEL L, REMENYI P, SIPOS A, TORBAGYI E, AVALOS M, FEKETE E, FOLDI J, PALDI-HARIS P, TAMASKA J, GYODI E, RAJCHY K, HOFFER I, JAKAB J, PETRANYI GG, PALOCZI K. Immunological importance of chimerism in transplantation: new conditioning protocol in BMT and development of chimeric state. *Hum Immunol* 2000; **61**: 101–110.
- [4] BILLINGHAM RE, BRENT L, MEDAWAR PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; **172**: 603–606.
- [5] BILLINGHAM RE, LAMPKIN HG, MEDAWAR PB, WILLIAMS HL. Tolerance of homografts, twin diagnosis and freemartin conditions in cattle. *Heredity* 1952; **6**: 201.
- [6] BURKE GW, RICORDI C, KARATZAS T, CARRENO M, CIANCIO G, COKER D, QUIAN T, SELVAGGI G, ALEJANDRO R, SKYLER JS, TZAKIS A, ROTH D, NERY J, MILLER J. Donor bone marrow infusion in simultaneous pancreas/kidney transplant recipients: a preliminary study. *Transplant Proc* 1995; **27**: 3121–3122.
- [7] CARIDIS DT, LIEGEOIS A, BARRET I, MONACO AP. Enhanced survival of canine renal allografts of ALS-treated dogs given bone marrow. *Transplant Proc* 1973; **5**: 671–674.
- [8] CIANCIO G, MILLER J, GARCIA-MORALES R, CARRENO M, BURKE III GW, ROTH D, KUPIN W, TZAKIS AG, RICORDI C, ROSEN A, FULLER L, ESQUENAZI V. Six-year clinical effect of donor bone marrow infusions in renal transplant patients. *Transplantation* 2001; **71**: 827–835.
- [9] DE VARIES-VAN DER ZWAN A, BESSELING AC, DE WAAL LP, BOOG CJP. Specific tolerance induction and transplantation: A single day protocol. *Blood* 1997; **89**: 2596–2601.
- [10] DE VARIES-VAN DER ZWAN A, VAN DER POL MA, BESSELING AC, DE WAAL LP, BOOG CJP. Hematopoietic stem cells can induce specific skin graft acceptance across a full MHC barrier. *Bone Marrow Transplant* 1998; **22**: 91–98.
- [11] DE VARIES-VAN DER ZWAN A, VAN DER POL MA, DE WALL LP, BOOG CJP. An alternative conditioning regimen for induction of specific skin graft tolerance across full major histocompatibility complex barriers. *Transplant Immunol* 1998; **6**: 147–151.

- [12] DURHAM MM, BINGAMAN AW, ADAMS AB. Administration of anti-CD40 ligand and donor bone marrow leads to hematopoietic chimerism and donor-specific tolerance without cytoablative conditioning. *J Immunol* 2000; **165**: 1–4.
- [13] FONTES P, RAO A, DEMETRIS J, ZEEVI A, TRUCCO M, CARROL P, RYBKA W, RUDERT WA, RICORDI C, DODSON F, TZAKIS A, TODO S, ABU-ELMAGD K, JORDAN M, FUNG JJ, STARZL TE. Bone marrow augmentation of donor-cell chimerism in kidney, liver, heart and pancreas islet transplantation. *Lancet* 1994; **344**: 151–155.
- [14] FUCHIMOTO Y, HUANG CA, SHIMIZU A. Mixed chimerism without whole body irradiation in large animal model. *J Clin Invest* 2001; **05**: 1779–1789.
- [15] GARCIA-MORALES R, CARRENO M, MATHEW J, CIROCCO R, ZUCKER K, CIANCIO G, BURKE G, ROTH D, TEMPLE D, FULLER L, ESQUENAZI V, ESKIND L, KENYON NS, RICORDI C, TZAKIS A, MILLER J. Continuing observations on the regulatory effects of donor-specific bone marrow cell infusions and chimerism in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1998; **65**: 956–965.
- [16] GARCIA-MORALES R, ESQUENAZI V, ZUCKER K, GOMEZ CI, FULLER L, CARRENO R, ALAMO A, KARATZAS T, BURKE III GW, CIANCIO G, TEMPLE D, FERNANDEZ H, RICORDI C, TZAKIS A, MILLER J. An assessment of the effects of cadaver donor bone marrow on kidney allograft recipient blood cell chimerism by a novel technique combining PCR and flow cytometry. *Transplantation* 1996; **62**: 1149–1160.
- [17] HUANG C, FUCHIMOTO Y, SCHEIER-DOLBERG R, MURPHY MC, NEVILLE DM, SACHS DH AND JR. Stable mixed chimerism and tolerance using nonmyeloablative preparative regimen in large-animal model. *J Clin Invest* 2000; **105**: 173–181.
- [18] JACQUET EG, SCHANIE CL, FUGIER- VIVIER I, WILLER SS, ILDSTAD ST. Facilitating cells as a venue to establish mixed chimerism and tolerance. *Pediatr Transplant* 2003; **7**: 348–357.
- [19] KAWAI T, COSIMI B, COLVIN RB, POWELSON J, EASON J, KOZŁOWSKI T, SYKES M, TANAKA M, SACHS D. Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 1995; **59**: 256–262.
- [20] KAWAI T, ABRAHAMIAN G, SOGAWA H, WEE S, BOSKOVIC S, NADAZDIN O, MANIYYEDI S, WEYMOUTH D, KO D, COLVIN R, SACHS D, COSIMI A. Costimulatory blockade for induction of mixed chimerism and renal allograft tolerance in non-human primates. *Transplantation* 2000; **69**: 370–376.
- [21] KIMIKAWA M, SACHS D, COLVIN R, BARTHOLOMEW A, KAWAI T, COSIMI B. Modifications of the conditioning regimen for achieving mixed chimerism and donor-specific tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 1997; **64**: 709–716.
- [22] KURTZ J, ITO H, SHAFFER J, SYKES M. Mechanisms involved in establishment of tolerance through costimulatory blockade and BMT: lack of requirement for CD40L-mediated signaling for tolerance or deletion of donor-reactive CD4 cells. *Am J Transplantation* 2001; **1**: 339–349.
- [23] KURTZ J, SHAFFER J, LIE A, ANOSOVA N, BENICHOU G, SYKES M. Mechanisms of early peripheral CD4 T-cell tolerance induction by anti-CD154 monoclonal antibody and allogeneic bone marrow transplantation: evidence for anergy and deletion but not regulatory cells. *Blood* 2004; **103**: 4336–4343.
- [24] KURTZ J, WEKERLE T, SYKES M. Tolerance in mixed chimerism – a role for regulatory cells? *Trends Immunol* 2004; **25**: 518–523.
- [25] MACHALINSKI B, KIJOWSKI J., MARLICZ W., GONTAREWICZ A., MARKIEWSKI M., PACZKOWSKI M., KOPKOWSKI A., MAJKA M., OSTROWSKI M., RATAJCZAK M.Z. Heparinized cadaveric organ donors (HCOD) - a potential source of hematopoietic cells for transplantation and gene therapy. *Transplantation* 2001; **71**: 1003–1007.
- [26] MATHEW J, GARCIA-MORALES R, FULLER L, ROSEN A, CIANCIO G, BURKE GW, CARRENO M, TEMPLE D, TZAKIS AG, RICORDI C, MILLER J, ESQUENAZI V. Donor bone marrow-derived chimeric cells present in renal transplant recipients infused with donor marrow. *Transplantation* 2000; **70**: 1675–1682.
- [27] MATHEW M, MILLER J. Immunoregulatory role of chimerism in clinical organ transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; **28**: 115–119.
- [28] MAYUMI H, GOOD RA. Long-lasting skin allograft tolerance in adult mice induced across fully allogeneic (multimajor H-2 plus multiminor histocompatibility) antigen barriers by a tolerance-inducing method using cyclophosphamide. *J Exp Med* 1989; **169**: 213–238.

- [29] MCDANIEL DO, NAFTILAN J, HULVEY K, SHANEYFELT S, LEMONS JA, LAGOO-DEENADAY-ALAN S, HUDSON S, DIETHELM AG, BARBER WH. Peripheral blood chimerism in renal allograft recipients transfused with donor bone marrow *Transplantation* 1994; **57**: 852–856.
- [30] MONACO AP, WOOD ML. Studies on heterologous antilymphocyte serum in mice: VII. Optimal cellular antigen for induction of immunologic tolerance with ALS. *Transplant Proc* 1970; **2**: 489–496.
- [31] MURASE N, DEMETRIS AJ, FUJISAKI S, TANABE M, QUING Y, TODO S, STARZL TE. Bone marrow augmentation for heart, liver, and small bowel transplantation: prolongation of graft survival and incidence of graft-versus-host disease. *Transplant Proc* 1995; **27**: 174–175.
- [32] OPELZ GMD, SENGAR DPS, MICKY MR, TERASAKI PI. Effect of blood transfusion on subsequent kidney transplant. *Transplant Proc* 1973; **5**: 253–259.
- [33] OPELZ GMD, TERASAKI PHD. Improvement of kidney-graft survival with increased numbers of blood transfusions. *New Engl J Med* 1978; **229**: 799–803.
- [34] RAO AS, FONTES P, ZEEVI, TRUCCO M, DODSON FS, RYBKA WB, SHAPIRO R, JORDAN M, PHAM SM, RILO HL, SESKEY T, TODO S, SCANTLEBURY V, VIVAS C, DEMETRIS AJ, FUNG JJ, STARZL TE. Augmentation of chimerism in whole organ recipients by simultaneous infusion of bone marrow cells. *Transplant Proc* 1995; **27**: 210–212.
- [35] RICORDI C, KARATZAS T, NERY J, WEBB M, SELVAGGI G, FERNANDEZ L, KHAN FA, RUIZ P, SCHIFF E, OLSON L, FERNANDEZ H, BEAN J, ESQUENAZI V, MILLER J, TZAKIS AG. High-dose donor bone marrow infusions to enhance allograft survival. *Transplantation* 1997; **63**: 7–11.
- [36] ROITT I, BROSTOFF J, MALE D. Immunologia. Wydaw. Lekarskie PZWL 2000, rozdział 14, 27.
- [37] SACHS DH. Mixed chimerism as an approach to transplantation tolerance. *Clin Immunol* 2000; **95**: 63–68.
- [38] SALVATIERRA OJR, VINCENZI F, AMEND W, POTTER D, IWAKI Y, OPELZ G, TERASAKI P, DUCAR, COCHRUM K, HANES D, STONEY RJ, FEDUSKA NJ. Deliberate donor-specific blood transfusions prior to living related renal transplantations. *Ann Surg* 1980; **192**: 543–552.
- [39] SHARABI Y, ABRAHAM VS, SYKES M, SACHS DH. Mixed allogeneic chimeras prepared by a non-myeloablative regimen: requirement for chimerism to maintain tolerance. *Bone Marrow Transplant* 1992; **9**: 191–197.
- [40] SHARABI Y, SACHS D. Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen. *J Exp Med* 1989; **169**: 493–502.
- [41] SPITZER TR. Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplant strategies and role of mixed chimerism. *The Oncologist* 2000; **5**: 215–223.
- [42] SPITZER TR, DELMONICO F, TOLKOFF-RUBIN N, MCAFEE S, SACKSTEIN R, SAIDMAN S, COLBY C, SYKES M, SACHS DH, COSMI AB. Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. *Transplantation* 1999; **68**: 480–484.
- [43] STARZL TE, DEMETRIUS MT, TURRUCO M, MURASE N, RICORDI C, ILDSTAD S, RAMOS H, TODO S, TZAKIS A, FUNG JJ, NALESNIK M, ZEEVI A, RUDERT WA, KOCOVA M. Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology* 1992; **17**: 1127–1139.
- [44] STEWARD FM, ZHONG S, WUU J. Lymphohematopoietic engraftment in minimally myeloablated hosts. *Blood* 1998; **91**: 3681–3687.
- [45] STORB R, YU C, WAGNER J. Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. *Blood* 1997; **89**: 3048–3054.
- [46] STORB R, YU C, ZAUCHA JM. Stable mixed chimerism in dogs given donor antigen, CTLA4Ig, and 100 cGy total body irradiation before and pharmacologic immunosuppression after marrow transplant. *Blood* 1999; **94**: 2523–2529.
- [47] SYKES M. Mixed chimerism and transplant tolerance. *Immunity* 2001; **14**: 417–424.
- [48] SYKES M, SZOT G, SWENSON K, PEARSON D. Induction of high levels of allogeneic hematopoietic reconstitution and donor-specific tolerance without myelosuppressive conditioning. *Nature Med* 1997; **3**: 783–787.
- [49] TAKEUCHI Y, ITO H, KURTZ J, WERKELE T, HO L, SYKES M. Earlier low-dose TBI or DST overcomes CD8 T-cell mediated alloresistance to allogeneic marrow in recipients of anti-CD40L. *Am J Transplant* 2004; **4**: 31–40

- [50] THOMAS JM, CARVER FM, FOIL MB. Renal allograft tolerance induced with ATG and donor bone marrow in out-bred rhesus monkeys. *Transplantation* 1983; **36**: 104–106.
- [51] TOMITA Y, KHAN A, SYKES M. Mechanism by which additional monoclonal antibody injections overcome the requirement for thymic irradiations to achieve mixed chimerisms in mice receiving bone marrow transplantation after conditioning with anti-T cell mAbs and 3 Gy whole body irradiation. *Transplantation* 1996; **61**:477–485.
- [52] TOMITA Y, KHAN A, SYKES M. Role of intrathymic clonal deletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a non-myeloablative regimen. *J Immunol* 1994; **153**: 1087–1098.
- [53] TOMITA Y, SACHS DH, SYKES M. Myelosuppressive conditioning is required to achieve engraftment of pluripotent stem cells contained in moderate doses of syngeneic bone marrow. *Blood* 1994; **83**: 939–948.
- [54] WEKERLE T, BLAHA P, ASARI R, SCHMID M, KISS CH, ROTH E, MIIHLBACHER F. Tolerance induction through mixed chimerism. *Eur Surg* 2002; **34**: 131–136.
- [55] WEKERLE T, KURTZ J, ITO H. Allogeneic bone marrow transplantation with co-stimulatory blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment. *Nat Med* 2000; **6**: 464–469.
- [56] WEKERLE T, SAYEGH M, CHANRAKER A, SWENSONKG, ZHAO Y, SYKES M. Role of peripheral clonal deletion in tolerance induction with bone marrow transplantation and costimulatory blockade. *Transplant Proc* 2000; **31**: 680.
- [57] WEKERLE T, SAYEGH M, HILL J, ZHAO Y, CHANDRAKER A, SWENSONKG, ZHAO G, SYKES M. Extrathymic T cell deletion and allogeneic stem cell engraftment induced with costimulatory blockade is followed by central T cell tolerance. *J Exp Med* 1998; **187**: 2037–2044.
- [58] WEKERLE T, SYKES M. Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Annu Rev Med* 2001; **52**: 352–370.
- [59] WOOD K, SACHS DH. Chimerism and transplantation tolerance: cause and effect. *Immunol Today* 1996; **15**: 584–588.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 22.07.2004 r.

Przyjęto: 10.01.2005 r.

Zakład Patologii Ogólnej Pomorskiej Akademii Medycznej

Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

QUORUM SENSING – KOMUNIKOWANIE SIĘ KOMÓREK W POPULACJACH BAKTERII PRZY UDZIALE CHEMICZNYCH CZĄSTECZEK SYGNAŁOWYCH

QUORUM SENSING – BACTERIAL CELL - TO - CELL
COMMUNICATION USING CHEMICAL SIGNAL MOLECULES

Adam JAWORSKI, Liliana SERWECIŃSKA, Paweł STĄCZEK

Zakład Genetyki Drobnoustrojów Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie: Ogromna zmienność genetyczna i fizjologiczna pozwala bakteriom zasiedlać różnorodne nisze ekologiczne oraz umożliwia szybką adaptację do zmiennych warunków środowiska. Jednym z ważnych mechanizmów umożliwiającym komórkom bakterii regulację ważnych funkcji życiowych i aktywności fizjologicznych w sposób globalny i wysoce zsynchronizowany jest bakteryjny system *quorum sensing* (QS). Niezwykle ważne wyniki uzyskane w ostatnich latach w badaniach tego systemu, definiowanego jako sposób wewnątrz- i międzygatunkowego komunikowania się komórek bakterii przy udziale chemicznych sygnałów wskazują, że większość gatunków bakterii, o ile nie wszystkie, wykształciło do tych celów wyspecjalizowane szlaki syntezy dyfuzyjnych cząsteczek sygnałowych oraz białka receptorowe jako specyficzne sensory tych sygnałów chemicznych, a także systemy ich transmisji na białka efektorowe i docelowe geny. Globalna regulacja przy udziale systemu QS obejmuje wiele podstawowych procesów życiowych i aktywności bakterii, takich jak: symbioza, wirulencja, kompetencja, koniugacja, produkcja antybiotyków, sporulacja, tworzenie biofilmów, wzrost rozpełzliwy. Funkcję chemicznych cząsteczek sygnałowych, specyficznych autoinduktorów (AI) u bakterii Gram-ujemnych pełnią acylowane laktony homoseryny, zaś u bakterii Gram-dodatnich oligopeptydy. Przyjmuje się, że system QS u współcześnie żyjących bakterii jest pewnym odzwierciedleniem wczesnego etapu w ewolucji organizmów wielokomórkowych.

Słowa kluczowe: *quorum sensing*, cząsteczki sygnałowe, ekspresja genów.

Summary: Due to the great genetic and physiological variability bacteria are able to colonize different ecological niches and rapidly adapt to the changing environmental conditions. Bacterial *quorum sensing* system (QS) represents one of the important mechanisms allowing bacterial cells to regulate physiological activities on the global, highly synchronized level. This system is defined as a method of intra- and interspecies communication of bacterial cells. Significant advances in the analyses of quorum sensing components show that most if not all bacterial species have developed specialized pathways for synthesis of diffusible signal molecules and receptor proteins serving as

specific receptors for such signals, as well as systems for transmission of the signals onto effector proteins and, ultimately, target genes. Global regulation using QS system regulates many basic activities of bacteria such: symbiosis, virulence, competence, conjugation, antibiotics production, sporulation, biofilms formation, swarming. In Gram-negative bacteria, acyl homoserine lactones act as signal molecules, whereas in Gram-positive bacteria this role is played by oligopeptides. There are hypotheses that QS system in presently living bacteria represents early stages of multicellular organisms evolution.

Key words: quorum sensing, signal molecules, gene expression.

1. WPROWADZENIE

Wyniki opisywane w rosnącej liczbie prac doświadczalnych oraz w innych artykułach i opracowaniach publikowanych w ostatnich latach dowodzą, że bakterie w drodze ewolucyjnego rozwoju wykształciły wyspecjalizowane systemy sygnałów chemicznych oraz molekularne mechanizmy komunikowania się komórek i koordynowania ważnych procesów życiowych w populacjach żyjących w różnych niszach środowiskowych. Angielski termin *quorum sensing* (QS) opisuje się w literaturze przedmiotu najogólniej jako mechanizm regulacji ekspresji genów w populacjach bakterii, w odpowiedzi na zmiany liczby komórek (gęstości populacji) żyjących w określonej niszy. Molekularny mechanizm tej regulacji obejmuje wytwarzanie przez komórki bakterii cząsteczek sygnałowych i ich akumulację w środowisku wzrostu, rozpoznawanie tych sygnałów przez wyspecjalizowane białka receptorowe będące bakteryjnymi sensorami, a w końcowym efekcie globalną, skoordynowaną odpowiedź komórek populacji w postaci zmiany ekspresji różnorodnych genów kontrolujących ważne szlaki metaboliczne i procesy życiowe. Komórki wielu gatunków bakterii zarówno Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich mają zdolność syntezy dyfuzyjnych cząsteczek sygnałowych, zwanych autoinduktorami (AI), których stężenie w środowisku wzrostu rośnie w miarę rozwoju hodowli i wzrostu gęstości komórek w danej populacji. Bakterie rozpoznając precyzyjnie zarówno naturę chemicznych sygnałów, jak i ich progowe stężenia w środowisku wzrostu są w stanie monitorować liczbę komórek w danej niszy oraz kontrolować aktywność fizjologiczną całej populacji. Dowiedziono, że ten wyspecjalizowany sposób komunikowania się komórek bakterii w populacjach, w celu koordynacji określonych szlaków metabolicznych, odgrywa bardzo istotną rolę w tak ważnych procesach życiowych, jak: bioluminescencja, wirulencja, kompetencja, koniugacja, sporulacja, synteza antybiotyków, ruchliwość, tworzenie biofilmu, wzrost rozpełzliwy.

Okazało się, że bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie wykształciły zarówno odmienne systemy autoinduktorów, jak i odmienne mechanizmy regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na takie sygnały. Funkcję cząsteczek sygnałowych u bakterii Gram-ujemnych spełniają acylowane laktony homoseryny (ang. *acyl-HSL*, *acyl-homoserine lactones*), zaś bakterie Gram-dodatnie porozumiewają się zwykle za pomocą sygnałów oligopeptydowych. Co więcej, te specyficzne autoinduktory wykorzystywane są do komunikowania się komórek w populacjach określonych szczepów czy gatunków, a zupełnie inna cząsteczka sygnałowa (AI-2) jest wykorzystywana do komunikowania

się komórek w mieszanych, międzygatunkowych populacjach bakterii. Podnosi się, że ten sposób globalnej, skoordynowanej regulacji ważnych procesów życiowych w całej populacji komórek pozwolił bakteriom osiągnąć niektóre właściwości organizmów wielokomórkowych, stąd autoinduktory określa się niekiedy jako *hormone like molecules*. Nie brak w literaturze przedmiotu także głosów, że bakteryjny system QS można traktować jako odzwierciedlenie wczesnych etapów filogenezy organizmów wielokomórkowych.

Nie ulega dzisiaj wątpliwości, że komórki bakterii potrafią w populacjach synchronizować ważne procesy i aktywności, wykorzystując do tego celu zarówno system uniwersalnych autoinduktorów do komunikacji międzygatunkowej, jak również wysoce specyficznych do komunikacji wewnątrzgatunkowej. Z drugiej strony, szereg organizmów prokariotycznych i eukariotycznych wykształciło mechanizmy hamowania bakteryjnego systemu QS. Jednym ze sposobów przeciwdziałania tak zmobilizowanym populacjom bakterii jest synteza i sekrecja enzymów degradujących bakteryjne autoinduktory, drugim zaś synteza antagonistycznych związków chemicznych. Na podstawie gromadzonej wiedzy o bakteryjnych autoinduktorach i właściwościach enzymów zdolnych do ich degradacji oraz o naturze chemicznej związków antagonistycznych, podjęto bardzo intensywne i obiecujące badania, których celem jest opracowanie zupełnie nowej, antibakteryjnej terapii, która polegałaby na skutecznym hamowaniu bakteryjnego systemu QS.

2. RYS HISTORYCZNY BADAŃ BAKTERYJNEGO SYSTEMU *QUORUM SENSING*

Pierwsze doniesienia o możliwości komunikowania się komórek bakterii w populacjach pojawiły się w literaturze światowej 25 lat temu, kiedy to Neelson i Hastings opisali po raz pierwszy wyniki na ten temat uzyskane w badaniach morskich bakterii *Vibrio fischeri* zdolnych do luminescencji [26]. Okazało się, że komórki tych bakterii mają zdolność emitowania światła wówczas, gdy jako symbionty rozwijają się w wyspecjalizowanych organach zwierząt morskich – kałamarnicy *Euprymna scolopes* i ryby *Monocentris japonicus*. Tracą natomiast zdolność luminescencji jako komórki wolnożyjące w wodzie morskiej. Zauważono, że u podstaw tego zjawiska leżą dwa zasadnicze uwarunkowania. Po pierwsze, dostępność bogatych źródeł węgla i energii w wyspecjalizowanych tkankach gospodarza umożliwia bakteriom szybki wzrost i rozwój w ściśle określonej niszy, gdzie populacja komórek może osiągnąć dużą gęstość. Po drugie, syntetyzowane przez komórki i wydzielane do środowiska cząsteczki sygnałowe mogą osiągnąć wysokie stężenie jedynie w skolonizowanym organie zwierzęcia. Ograniczona dostępność składników pokarmowych w wodzie morskiej uniemożliwia bowiem zarówno szybki wzrost i rozwój populacji wolnożyjących bakterii, jak również akumulację dyfuzyjnych cząsteczek sygnałowych. Nieco później dowiedziono, że zdolność do luminescencji *Vibrio fischeri* jest związana z aktywnością

kompleksu enzymatycznego lucyferazy, syntetyzowanego w komórkach pod kontrolą operonu luxCDABE. Emisja światła ma miejsce wówczas, gdy populacja bakterii w skolo-nizowanym organie gospodarza osiągnie odpowiednio dużą gęstość, a tym samym stężenie akumulowanych cząsteczek sygnałowych osiągnie wartość progową, zapewniającą indukcję syntezy kompleksu lucyferazy [17]. Dowiedziono, że za regulację procesu bioluminescencji u symbiotycznych bakterii *V. fischeri* odpowiedzialne są dwa białka regulatorowe LuxI oraz LuxR, z których pierwsze kontroluje syntezę autoinduktora, drugie zaś odpowiedzialne jest za przyłączenie autoinduktora do operonu lucyferazy i indukcję transkrypcji strukturalnego genu lucyferazy. W miarę wzrostu liczby komórek bakterii w tkankach gospodarza i rozwoju populacji rośnie również stężenie syntetyzowanego dyfuzyjnego autoinduktora. Gdy stężenie to osiągnie wartość 1–10 mikrogramów na 1 ml, autoinduktor tworzy kompleks z białkiem LuxR, które w tej postaci przyłącza się do promotora genu lucyferazy, inicjując proces transkrypcji i syntezy białka lucyferazy w komórkach całej populacji. Zatem w omawianym układzie symbiotycznym emisja światła jest w istocie bardzo precyzyjnie regulowana gęstością komórek bakterii w populacji, rozwijającej się w ściśle określonej niszy.

Pomimo tych odkryć dość powszechnie sądzono, że komunikowanie się komórek i organizmów przy udziale syntetyzowanych i wydzielanych do środowiska cząsteczek sygnałowych jest cechą organizmów eukariotycznych. Stąd, system autoregulacji bioluminescencji LuxI/LuxR *V. fischeri* był przez wiele lat uznawany, co prawda, za interesujący sposób komunikowania się komórek bakterii, ale ograniczony do bakterii morskich z rodzaju *Vibrio*. Inne, niezbyt liczne do niedawna i mniej znane przykłady komunikowania się bakterii opisywano dla populacji komórek promieniowca *Streptomyces* spp. syntetyzującego antybiotyki, koniugujących komórek *Enterococcus faecalis* oraz dla *Myxococcus xanthus* tworzących ciała owocowe [15, 16].

Pojęcie *quorum sensing* (QS) upowszechniło się w literaturze po 1994 roku, kiedy to Fuqua i współpracownicy po raz pierwszy użyli tego terminu dla określenia sposobu komunikowania się komórek bakterii w populacjach [18]. Ogromny postęp w tej dziedzinie, dokonany szczególnie w ostatnich 10 latach, dowodzi, że większość gatunków bakterii, o ile nie wszystkie, syntetyzuje i wydziela do środowiska wzrostu specyficzne cząsteczki sygnałowe, przy udziale których zachodzi międzykomórkowa komunikacja, umożliwiająca skoordynowaną odpowiedź komórek populacji na zmiany warunków w środowisku wzrostu.

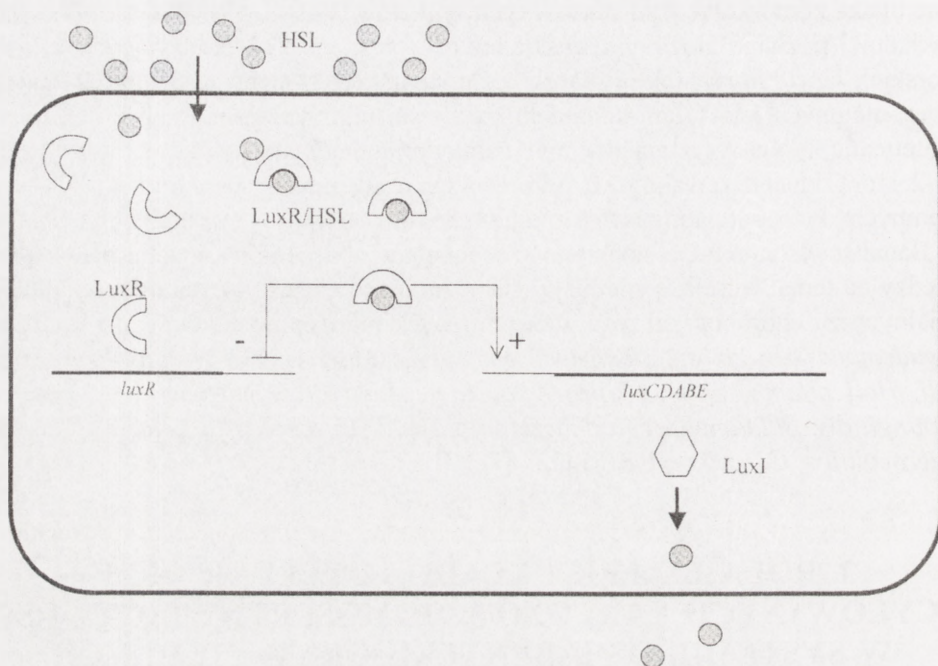
Obecnie w literaturze przedmiotu opisano co najmniej 30 gatunków bakterii, dla których bez żadnych wątpliwości zidentyfikowano system QS, określane jako typ LuxI/LuxR. Do najlepiej scharakteryzowanych pod tym względem gatunków należy zaliczyć: *Vibrio fischeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens* i *Erwinia carotovora* [1, 2, 11, 51, 58, 71, 97]. W latach 1995–2004 ukazało się wiele prac dowodzących, że komórki licznych gatunków bakterii Gram-dodatnich, w tym *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, mają zdolność syntetyzowania i rozpoznawania w środowisku wzrostu dyfuzyjnych cząsteczek sygnałowych, umożliwiających międzykomórkową komunikację również w populacjach tej grupy bakterii. Bakterie Gram-dodatnie wykształciły jednakże inne systemy QS i wykorzystują odmienne związki chemiczne jako autoinduktory (oligopeptydy), a także

inne białka komórkowe jako sensory tych sygnałów [40, 42, 55]. W ostatnich latach dokładniej poznano złożony, dwuskładnikowy system QS wolnożyjących bakterii morskich *Vibrio harveyi*, który łączy cechy charakterystyczne zarówno dla bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich. Co więcej, okazało się, że komórki *V. harveyi*, syntetyzują i wykorzystują dla tego celu odmienną cząsteczkę sygnałową, zwaną AI-2, którą zidentyfikowano także w komórkach wielu innych gatunków bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich [5, 51, 82, 84, 85, 86].

Badania systemów QS nabierają szczególnego znaczenia w świetle narastającej wiedzy na temat roli, jaką spełniają one w regulacji ekspresji czynników odpowiedzialnych za chorobotwórczość wielu groźnych patogenów człowieka, takich jak: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella enterica* serotyp *Typhi*, *Burkholderia cepacia*, *Yersinia enterocolitica*, *Candida albicans* [13, 81, 97].

3. ROLA BIAŁEK UKŁADU LUXI/LUXR ORAZ ACYLOWANYCH LAKTONÓW HOMOSERYNY (ACYL-HSL) W SYSTEMIE QS U BAKTERII GRAM-UJEMNYCH

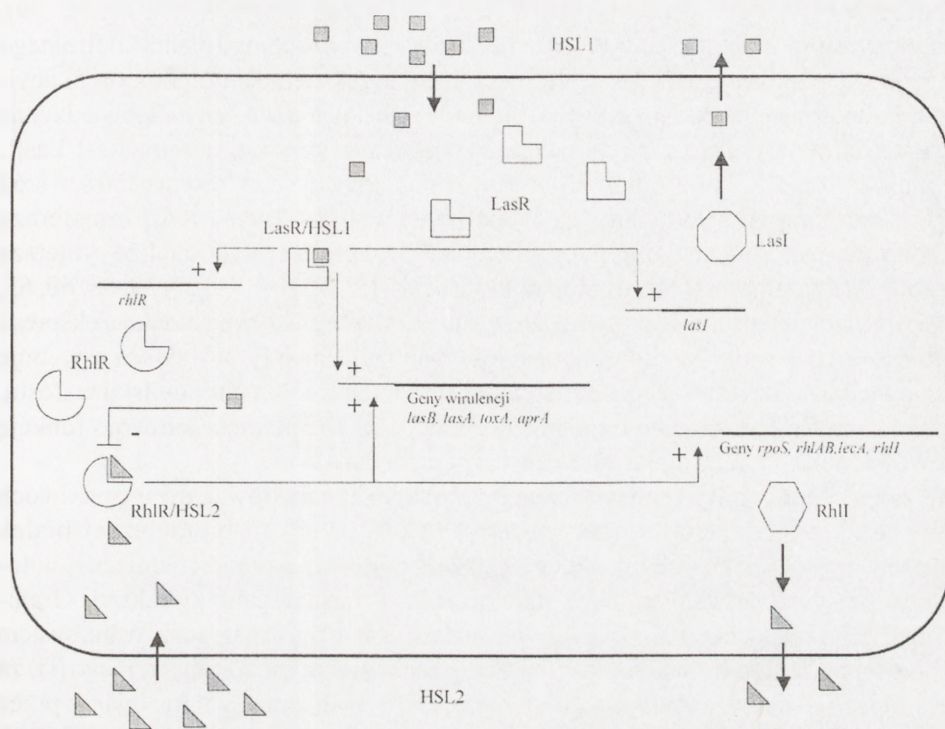
Na rycinie 1 przedstawiono schemat systemu QS bakterii Gram-ujemnych na przykładzie symbiotycznych bakterii *Vibrio fischeri* zdolnych do bioluminescencji. Jak wspomniano wcześniej, emisja światła w omawianym systemie jest ściśle skorelowana z gęstością populacji bakterii, których liczba w skolonizowanym organie zwierzęcia może osiągnąć wartość $10^{11}/1$ ml. Komórki *Vibrio fischeri* syntetyzują i wydzielają do środowiska wzrostu cząsteczki laktonu N-3-okso-heksanoilo- homoseryny, spełniającego w hodowli tego gatunku funkcję autoinduktora, którego stężenie rośnie w miarę wzrostu liczby komórek w populacji i może osiągnąć wartość końcową nawet do $10 \mu\text{g}/1$ ml. Acylowane laktony homoseryny łatwo dyfundują przez osłony komórkowe, stąd ich stężenie w komórkach bakterii oraz w środowisku wzrostu jest praktycznie jednakowe [37]. Komórki bakterii emitują światło w wyniku indukcji syntezy białek kompleksu enzymatycznego lucyferazy, kodowanych przez pięć genów strukturalnych luxCDABE, które są częścią operonu luxICDABE [17, 19, 50]. Gen kodujący syntezę białka regulatorowego LuxR jest transkrybowany w odwrotnym kierunku niż przylegające do niego geny operonu luxICDABE. Ekspresja białek kompleksu lucyferazy jest kontrolowana przez dwa białka regulatorowe LuxI i LuxR. Pierwsze z nich jest syntetazą odpowiedzialną za syntezę autoinduktora acyl-HSL, drugie zaś rozpoznaje autoinduktor i wiąże się z nim, gdy jego stężenie w środowisku wzrostu bakterii osiągnie wartość $1-10 \mu\text{g}/1$ ml. Interakcja białka LuxR i autoinduktora, coraz silniejsza w miarę wzrostu stężenia HSL, zmienia konformację przestrzenną białka LuxR, odsłaniając jego domenę wiążącą. Tak zmienione białko regulatorowe może rozpoznać i połączyć się z promotorem operonu luxICDABE, indukując w ten sposób transkrypcję wszystkich



RYCINA 1. Schemat systemu regulacji quorum sensing *Vibrio fischeri*. Operon *luxCDABE* zbudowany z 5 genów strukturalnych kodujących ekspresję lucyferazy i odpowiedzialnych za bioluminescencję. LuxI i LuxR białka regulatorowe systemu, gdzie białko LuxI (⬡) jest odpowiedzialne za syntezę autoinduktora HSL (⊙), a białko LuxR (☾) za wiązanie autoinduktora i wytworzenie kompleksu LuxR/HSL, który aktywuje (+) transkrypcję operonu *luxCDABE* i równocześnie hamuje (-) transkrypcję operonu *luxR*

genów operonu. Następuje więc indukcja syntezy nie tylko białek kompleksu lucyferazy (LuxCDABE) odpowiedzialnych za świecenie, ale także białka syntetazy LuxI odpowiedzialnej za syntezę autoinduktora. Kompleks LuxR/HSL ma także zdolność rozpoznawania i łączenia się z promotorem genu *luxR*, ale w tym przypadku dochodzi do represji syntezy białka regulatorowego LuxR. Jest to zatem system kontroli negatywnej, który w warunkach silnej indukcji może hamować nadmierną produkcję białek z operonu *luxCDABE* [24].

Podobny, aczkolwiek nieco bardziej złożony mechanizm międzykomórkowej komunikacji, wykształciły oportunistyczne bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Bakterie te syntetyzują dwie pary białek regulatorowych LasI/LasR oraz RhI/RhIR, które są homologami wyżej opisanych białek *Vibrio fischeri* LuxI i LuxR [4, 59]. Oba białka, LasI i RhI są syntetazami, odpowiedzialnymi za syntezę dwóch autoinduktorów, odpowiednio, N-3-okso-dekanolowego laktonu homoseryny i N-butyrylowego laktonu homoseryny [60]. Zatem dwa układy białek regulatorowych i dwa różne autoinduktory (nazwane w tym artykule dla wygody acyl-HSL1 i acyl-HSL2) kontrolują w populacjach



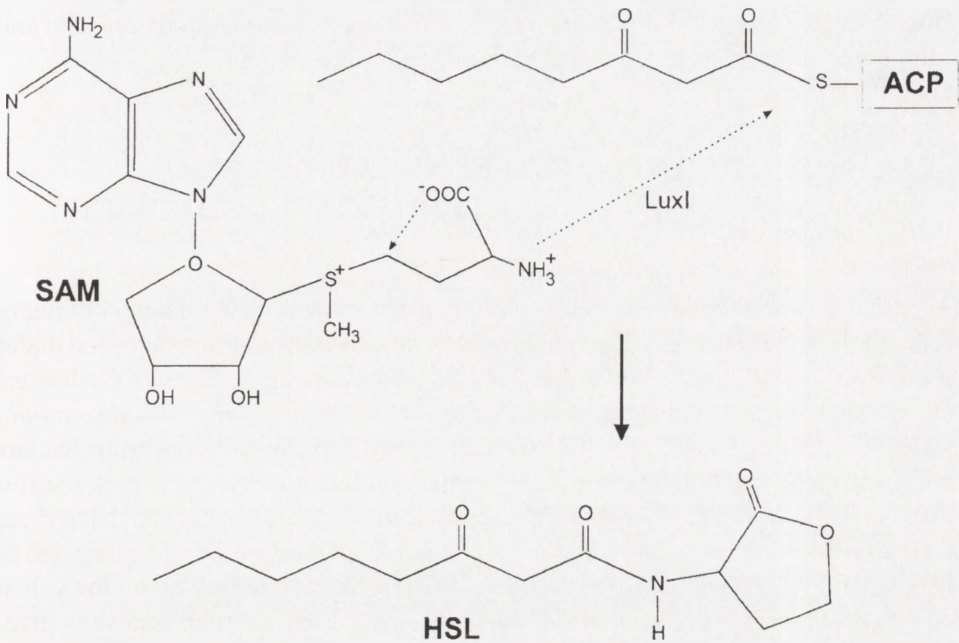
RYCINA 2. Dwuskładnikowy system regulacji quorum sensing *Pseudomonans aeruginosa*. Białko LasI (○) syntetyzuje autoinduktor HSL1 (■), zaś białko RhII (⬡) autoinduktor HSL2 (▲). Białko receptorowe LasR (⌞) wiąże autoinduktor HSL1, a wytworzony kompleks LasR/HSL1 indukuje (+) zarówno ekspresję genów wirulencji *lasB*, *lasA*, *toxA*, *aprA*, jak również syntezę drugiego białka receptorowego RhIR (⌚), które tworząc kompleks z autoinduktorem HSL2 wzmacnia ekspresję wyżej wymienionych genów wirulencji zależnych od LasR, a także aktywuje ekspresję szeregu innych genów *rpoS*, *rhlAB*, *lecA*, *rhlI* (szczegółowe wyjaśnienie mechanizmu w tekście)

P. aeruginosa ekspresję szeregu czynników chorobotwórczości. Mechanizm tej regulacji, przedstawiony schematycznie na rycinie 2, jest podobny do wcześniej opisanej regulacji emisji światła w komórkach w populacjach *V. fischeri*. I tak, w warunkach, gdy populacja komórek *P. aeruginosa* osiągnie wysoką gęstość w tkankach gospodarza, a stężenie syntetyzowanych autoinduktorów acyl-HSL1 i acyl-HSL2 przekroczy w tym środowisku określoną wartość, cytoplazmatyczne białko receptorowe LasR rozpoznaje i łączy się z właściwym dla siebie autoinduktorem acyl-HSL1. Wytworzony kompleks LasR/acyl-HSL1 przyłącza się do promotorów kontrolujących ekspresję wielu genów odpowiedzialnych za syntezę szeregu sekrecyjnych białek *P. aeruginosa*. Białka te wydzielane do środowiska uszkadzają tkanki gospodarza, rozszerzając w ten sposób obszar bakteryjnej infekcji. Do tych białek, będących czynnikami chorobotwórczości, których synteza w tworzonym biofilmie jest indukowana kompleksem LasR/acyl-HSL1 należy zaliczyć: elastazę kodowaną przez gen *lasB*, proteazę kodowaną przez gen

lasA, egzotoksynę (gen *toxA*) oraz alkaliczną fosfatazę (gen *aprA*) [9, 11, 35, 59]. Omawiany kompleks LasR/acyl-HSL1 indukuje ekspresję drugiego białka kontrolnego RhIR, które rozpoznaje i wiąże się ze specyficznym dla siebie autoinduktorem acyl-HSL2. Powstały kompleks RhIR/acyl-HSL2 indukuje dodatkowo geny odpowiedzialne za syntezę elastazy oraz fosfatazy alkalicznej, będące pod kontrolą systemu LasI/LasR. Niezależnie, kompleks indukcyjny RhIR/acyl-HSL2 aktywuje inny zespół genów, wśród których znajdują się: podjednostka σ^5 polimerazy RNA (gen *rpoS*), transferaza ramnozowa, toksyczna lektyna (geny, odpowiednio, *rhIAB* i *lecA*), a także syntetaza RhII odpowiedzialna za syntezę autoinduktora acyl-HSL2 [4, 11, 19, 25, 39, 58, 60, 63, 92, 93, 94]. Uogólniając, należy stwierdzić, że ta niezwykle efektywna indukcja ekspresji wielu ważnych czynników chorobotwórczości w populacjach *P. aeruginosa* następuje w odpowiedzi na wzrost stężenia dyfuzyjnych autoinduktorów w środowisku wzrostu, rozpoznawanych przez białka regulatorowe LasR i RhIR, pełniące zarówno funkcję sensorów sygnałów, jak i efektorów transkrypcji genów.

W zakończeniu niniejszego rozdziału pragniemy skoncentrować uwagę na dwóch ogólnych zagadnieniach *quorum sensing* u bakterii: funkcji biologicznej białek regulatorowych zaliczanych do rodziny LuxI i LuxR oraz naturze chemicznej autoinduktorów syntetyzowanych przez inne niż wyżej opisane gatunki bakterii Gram-ujemnych. W populacjach komórek *Agrobacterium tumefaciens*, patogena roślin, system QS kontroluje proces koniugacyjnego przenoszenia plazmidu koniugacyjnego Ti, za który odpowiedzialne są białka regulatorowe TraI i TraR oraz syntetyzowany przez białko TraI N-oktanolowy lakton homoseryny działający jako autoinduktor [31, 98]. Podobnie, w populacjach *Erwinia carotovora*, bakterii patogennych dla wielu gatunków różnych roślin, układ białek regulatorowych ExpI/ExpR, analogów systemu LuxI/LuxR, kontroluje syntezę i sekrecję wielu egzoenzymów, w tym celulaz i pektynaz odpowiedzialnych za macerację tkanek i rozszerzanie się infekcji bakteryjnej.

Na podstawie obecnej wiedzy na temat funkcji biologicznej białek zaliczanych do rodziny LuxI/LuxR (*LuxI-like*, and *LuxR-like*) u różnych gatunków bakterii Gram-ujemnych można stwierdzić, że jedno z białek tego systemu jest syntetazą odpowiedzialną za syntezę dyfuzyjnego autoinduktora, drugie zaś wypełnia funkcję sensora tego sygnału w środowisku wzrostu oraz aktywatora transkrypcji określonych genów. Substratami dla syntezy autoinduktorów u bakterii Gram-ujemnych są S-adenozylometionina (SAM) oraz acylowane, nośnikowe białko Acyl-ACP (ang. *acyl-acyl carrier protein*), które jest pośrednim produktem w syntezie kwasów tłuszczowych. Jak przedstawiono na rycinie 3, funkcja enzymatycznego białka LuxI *V. fischeri* i jego analogów u innych gatunków bakterii Gram-ujemnych sprowadza się do połączenia wiązaniem amidowym SAM ze specyficznym dla danego gatunku Acyl-ACP [52, 90]. Okazało się, że acylowane laktony homoseryny, wypełniające funkcję autoinduktorów u różnych gatunków bakterii Gram-ujemnych, różnią się między sobą wyłącznie długością acylowego łańcucha przyłączonego do SAM. Wysunięto wniosek, że syntetaza danego gatunku bakterii Gram-ujemnych (ang. *LuxI-like protein*) ma zdolność przyłączenia do SAM ściśle określonego Acyl-ACP, o zdefiniowanej długości łańcucha, syntetyzuje więc autoinduktor jednego rodzaju. Dokładna analiza sekwencji aminokwasowej oraz struktury przestrzennej białek należących do rodziny białek LuxR dowiodły, że są one



RYCINA. 3. Szlak biosyntezy laktonów homoseryny, autoinduktorów bakteryjnego systemu *quorum sensing*. Rodzina enzymatycznych białek typu LuxI tworzy wiązanie amidowe pomiędzy cząsteczkami S-adenozylometioniny (SAM) i acyl - ACP. Wytworzony produkt pośredni ulega laktonizacji, z odłączeniem metylioadenozyny i wytworzeniem końcowego produktu, którym jest określony acylowany lakton homoseryny (HSL)

zbudowane z dwóch domen, z których jedna, aminoterminalna, jest odpowiedzialna za wiązanie właściwego autoinduktora, druga zaś, karboksyterminalna, za multimeryzację cząsteczki i aktywację transkrypcji docelowych genów [6, 72, 74, 79, 80, 92, 100]. Karboksyterminalna domena białek (ang. *LuxR-like*) zawiera bardzo konserwatywny motyw helisa-skręt-helisa (ang. *helix-turn-helix*), odpowiedzialny za rozpoznanie i połączenie się z promotorami wielu docelowych genów w regionie ich palindromowej sekwencji (ang. *lux-box*), położonej około 40 par zasad powyżej kodonu start [18].

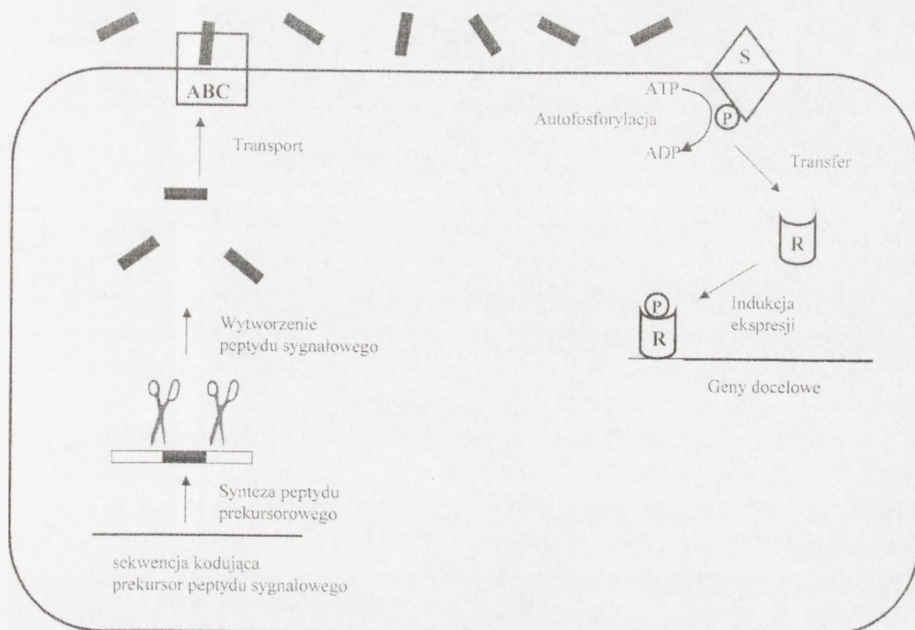
Jak wspomniano wcześniej, białka rodziny LuxR, jako sensory sygnałów, rozpoznają w środowisku wyłącznie specyficzne dla danego gatunku autoinduktory, ale zawierając konserwatywny motyw helisa-skręt-helisa mogą aktywować w komórkach danej populacji bakterii transkrypcję wielu różnych genów, zawierających w regionie ich promotorów docelową sekwencję typu *lux-box* [21, 69, 99]. Ponadto, białka rodziny LuxR są niezwykle wrażliwe na wszelkie zmiany długości acylowego łańcucha acyl-HSL, a stąd tylko właściwe dla danego gatunku acylowane laktony homoseryny mają zdolność pełnej aktywacji transkrypcji docelowych genów. Z drugiej strony okazało się, że związki chemiczne o bardzo podobnej budowie chemicznej do acylowanych laktonów homoseryny mogą hamować wiązanie się białek akceptorowych rodziny LuxR z właściwymi dla nich autoinduktorami. Odkrycie to stworzyło szansę dla podjęcia badań nad wykorzystaniem

takich analogów w hamowaniu systemu QS, jako możliwej strategii dla opracowania skutecznej, alternatywnej terapii zakażeń bakteryjnych [21, 69, 99].

4. ORGANIZACJA I FUNKCJA SYSTEMU *QUORUM SENSING* U BAKTERII GRAM-DODATNICH

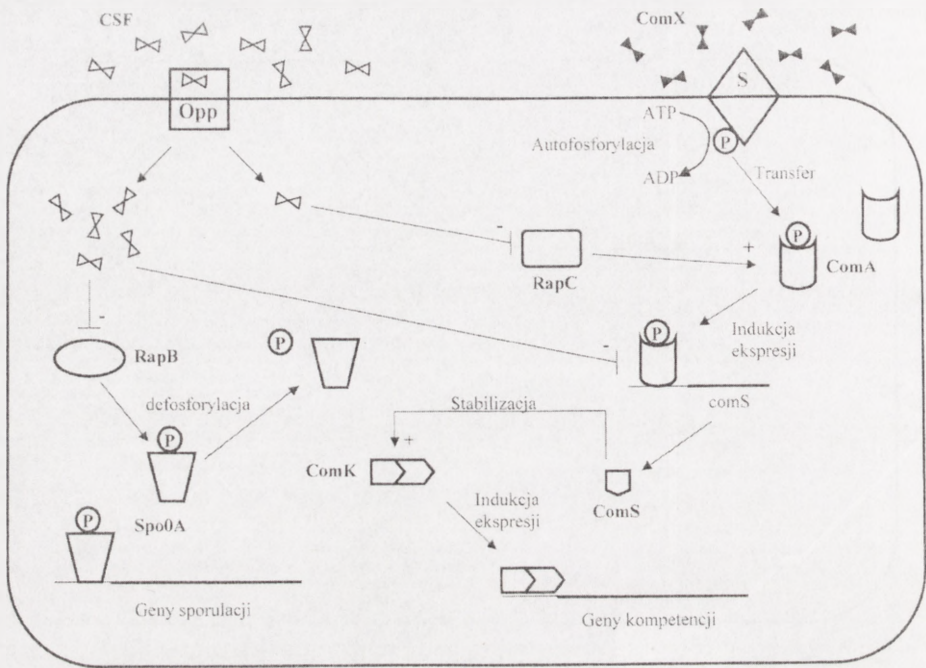
Bakterie Gram-dodatnie w czasie ewolucyjnego rozwoju wykształciły odmienne mechanizmy syntezy cząsteczek sygnałowych i sposoby transmisji sygnałów od białek sensorowych komórki do efektorów. Mechanizmy i białka zaangażowane w QS u bakterii Gram-dodatnich zostały najlepiej poznane u *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* [23, 68]. Funkcję cząsteczek sygnałowych u tej grupy bakterii pełnią oligopeptydy, które powstają w wyniku trawienia większych prekursorów białkowych. Takie cząsteczki sygnałowe, specyficzne dla każdego gatunku bakterii, są transportowane na zewnątrz komórki przy udziale białka transportowego zależnego od ATP (ABC, ang. *ATP-binding cassette*). Gdy stężenie cząsteczek sygnałowych w środowisku wzrostu osiągnie wartość krytyczną, sygnał ten jest rozpoznawany przez kinazę histydynową pełniącą funkcję białka receptorowego. Interakcja cząsteczki sygnałowej z kinazą histydynową i autofosforylacja reszty histydynowej tego białka inicjuje kaskadę reakcji fosforylacji i defosforylacji kolejnych białek komórkowych, z wytworzeniem w końcowym etapie białka regulatorowego specyficznego dla określonego gatunku bakterii Gram-dodatnich. Białka regulatorowe z ufosforylowaną resztą asparaginy rozpoznają promotory docelowych genów, aktywując w ten sposób ich ekspresję [38, 51, 70]. Indukcja ekspresji określonych genów jest więc ostatnim etapem transdukcji sygnałów u bakterii Gram-dodatnich w zsynchronizowanej odpowiedzi komórek populacji na określone, progowe stężenie autoinduktora w ich środowisku wzrostu (ryc. 4).

Dobrze poznanymi przykładami roli biologicznej QS u bakterii Gram-dodatnich jest nabywanie stanu kompetencji przez komórki *Streptococcus pneumoniae* i *Bacillus subtilis*. Nabycie stanu kompetencji, to jest zdolności pobierania obcego DNA, jest związane z szeregiem złożonych przemian fizjologicznych, z których znaczna część jest pod kontrolą omawianego systemu [28]. W przypadku *S. pneumoniae* funkcję cząsteczki sygnałowej spełnia oligopeptyd CSP (ang. *competence stimulating peptide*) zbudowany z 17 aminokwasów, powstający w wyniku proteolizy prekursorowego peptydu ComC, zbudowanego z 41 aminokwasów [27, 66]. CSP jest wydzielany do środowiska wzrostu przy udziale białek transportowych (ang. *Com ABC transporter*). Akceptorem sygnału jest białko kinazy ComD, które przy odpowiednio wysokim stężeniu CSP ulega autofosforylacji, uruchamiając w ten sposób wieloetapowy proces fosforylacji i defosforylacji białek pośrednich, prowadzący do transdukcji sygnału na końcowy akceptor, którym jest białko regulatorowe ComE. Ufosforylowane białko ComE indukuje transkrypcję genu *comX* kodującego syntezę alternatywnej podjednostki sigma polimerazy RNA, odpowiedzialnej za transkrypcję wielu genów strukturalnych zaangażowanych w proces nabywania kompetencji [30, 42, 64]. Przedstawiony na



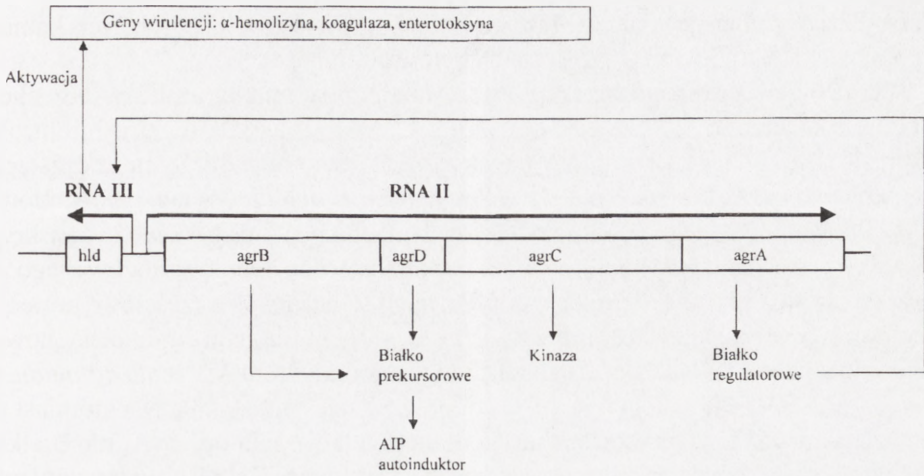
RYCINA 4. Model układu *quorum sensing* u bakterii Gram-dodatnich. Autoinduktorami są krótkie peptydy (■), które powstają w komórkach w wyniku trawienia większego peptydu sygnałowego. Częsteczki sygnałowe są następnie transportowane ze środowiska wzrostu bakterii przy pomocy systemu białek transportowych ABC. Sygnały są rozpoznawane przez domenę sensorową (S) kinazy zakotwiczonej w błonie komórkowej, która podlega autofosforylacji na reszcie histydynowej. Kolejno, grupa fosforanowa (P) jest przenoszona na białko regulatorowe (R). Ufosforylowane zaś białko regulatorowe na reszcie asparaginianowej aktywuje transkrypcję docelowych genów

rycinie 5 schemat QS w populacjach *B. subtilis* obrazuje zarówno niezwykłą złożoność, jak i precyzję mechanizmu rozpoznawania i transdukcji sygnałów w regulacji wzrostu wegetatywnego, sporulacji i nabywania kompetencji komórek, w odpowiedzi na zmiany szybkości wzrostu populacji uzależnionej od warunków środowiska, w tym szczególnie od dostępności źródeł węgla i energii. Populacja komórek *B. subtilis* nabywa kompetencji pod koniec fazy logarytmicznego wzrostu i na początku fazy stacjonarnej. W tym okresie część komórek zamiera i ulega lizie, a uwolniony z nich DNA, aktywnie pobierany ze środowiska przez subpopulację komórek kompetentnych jest prawdopodobnie wykorzystany w procesach naprawy uszkodzeń ich genomów. Proces sporulacji jest natomiast inicjowany w warunkach ograniczonej dostępności źródeł węgla i energii w środowisku i zahamowania wzrostu wegetatywnego bakterii. Okazało się, że omawiane procesy kompetencji i sporulacji w populacjach *B. subtilis* są kontrolowane przez dwa odmienne oligopeptydy, odpowiednio, ComX (ang. *competence factor*) i CSF (ang. *competence and sporulation factor*). Akumulacja autoinduktora ComX do odpowiednio wysokiego stężenia uruchamia w komórkach szlak reakcji, które prowadzą do ekspresji wielu



RYCINA 5. Regulacja kompetencji i sporulacji u *Bacillus subtilis*. Komórki *B. subtilis* syntetyzują dwa rodzaje autoinduktorów, z których jeden CSF (◀▶) reguluje proces sporulacji, a drugi ComX (▶◀) proces nabywania kompetencji. Białko ComP (◊) jest kinazą pełniącą funkcję białka sensorowego dla autoinduktora ComX, a białko ComA (◡) pełni funkcję regulatora aktywującego transkrypcję genu *comS*, zaś akumulowane w komórkach białko ComS (◡) zwiększa poziom białka ComK (◡), bowiem hamuje jego proteolizę. Tak stabilizowany poziom białka ComK aktywuje transkrypcję genów odpowiedzialnych za nabywanie kompetencji. Autoinduktor CSF jest transportowany do komórek przy udziale białek systemu transportu Opp. Białko RapB (◯) jest fosfatazą, defosforylującą białko regulatorowe Spo0A (◡). Zatem hamowanie (-) syntezy tej fosfatazy przez wysokie stężenie CSF prowadzi do podniesienia poziomu ufosforylowanego białka Spo0A, co w konsekwencji kieruje metabolizm komórki na drogę sporulacji. Ponadto, wysokie stężenie w komórce CSF hamuje aktywność białka ComS, a w konsekwencji hamuje transkrypcję genów kompetencji, promując natomiast w tych warunkach szlak sporulacji. Niskie stężenie CSF hamuje ekspresję (-) białka fosfatazy RapC (◡), w efekcie prowadząc do podniesienia w komórce (+) poziomu ufosforylowanego białka ComA, co w rezultacie kieruje komórki na drogę nabywania kompetencji (więcej informacji w tekście)

białek odpowiedzialnych za nabycie kompetencji. W szlaku tym funkcję sensora dla autoinduktora ComX spełnia kinaza ComP, która inicjuje transdukcję sygnału poprzez białka przekaźnikowe, z wytworzeniem białka regulatorowego, którym jest ufosforylowane białko ComA. Białko regulatorowe ComA aktywuje zaś syntezę białka ComS, które spełnia funkcję inhibitora proteolizy drugiego białka regulatorowego ComK. To ostatnie, jest czynnikiem transkrypcyjnym, aktywującym ekspresję białek komórkowych odpowiedzialnych za nabycie kompetencji [76, 89, 91].



RYCINA 6. Organizacja i mechanizm regulacji genów regionu agr *Staphylococcus aureus*. W transkrypcie RNA II geny *agrC* i *agrA* kodują syntezę, odpowiednio, sensora sygnału kinazy AgrC oraz białka regulatorowego AgrA. Obecne w transkrypcie RNA II geny *agrD* i *agrB* są odpowiedzialne za syntezę prekursora i końcowego oktapeptydu, pełniącego funkcję autoinduktora AIP. Wzrost w komórkach poziomu ufosforylowanego białka AgrA, w odpowiedzi na wzrost stężenia autoinduktora AIP, zwiększa pulę transkryptu RNAIII, który jako efektor aktywuje transkrypcję wielu genów kodujących czynniki wirulencji, w tym gen hemolizyny (*hld*)

Drugi z wymienionych autoinduktorów CSF spełnia funkcję cząsteczki sygnałowej zarówno w procesie nabywania kompetencji, jak i sporulacji. CSF, podobnie jak inne autoinduktory, akumuluje się w środowisku wzrostu w miarę powiększania się liczby komórek w populacji, spełniając funkcje zewnątrzkomórkowej cząsteczki sygnałowej. Jednak w odróżnieniu od innych opisywanych autoinduktorów spełnia dodatkowo funkcję wewnątrzkomórkowego sygnału, który kieruje komórki na drogę sporulacji w warunkach deficytu źródeł pokarmowych [40, 62]. W warunkach wysokiego wewnątrzkomórkowego stężenia CSF obserwuje się zahamowanie aktywności białka ComS, a w efekcie zahamowanie szlaku transdukcji sygnałów prowadzącego do nabycia kompetencji. I odwrotnie, niskie wewnątrzkomórkowe stężenie CSF prowadzi do zahamowania aktywności fosfatazy RapC, a w efekcie do podwyższenia puli ufosforylowanego białka ComA i skierowania komórek na drogę kompetencji. Niezwykle ważną funkcją CSF jest hamowanie aktywności fosfatazy RapB, enzymu defosforylującego regulatorowe białko sporulacji *B. subtilis*, SpoOA. Zatem zahamowanie aktywności tej fosfatazy podwyższa pulę ufosforylowanego białka SpoOA, odpowiedzialnego za indukcję złożonego szlaku sporulacji. W tym niezwykle precyzyjnym mechanizmie regulacji sporulacji i kompetencji *B. subtilis*, kluczową rolę sygnałów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych spełniają dwa odmienne oligopeptydy oraz specyficzne kinazy jako receptory tych sygnałów [23, 61, 70, 75]. Ponadto, precyzyjna regulacja zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej puli czynnika CSF przy udziale białka transportowego Opp, w

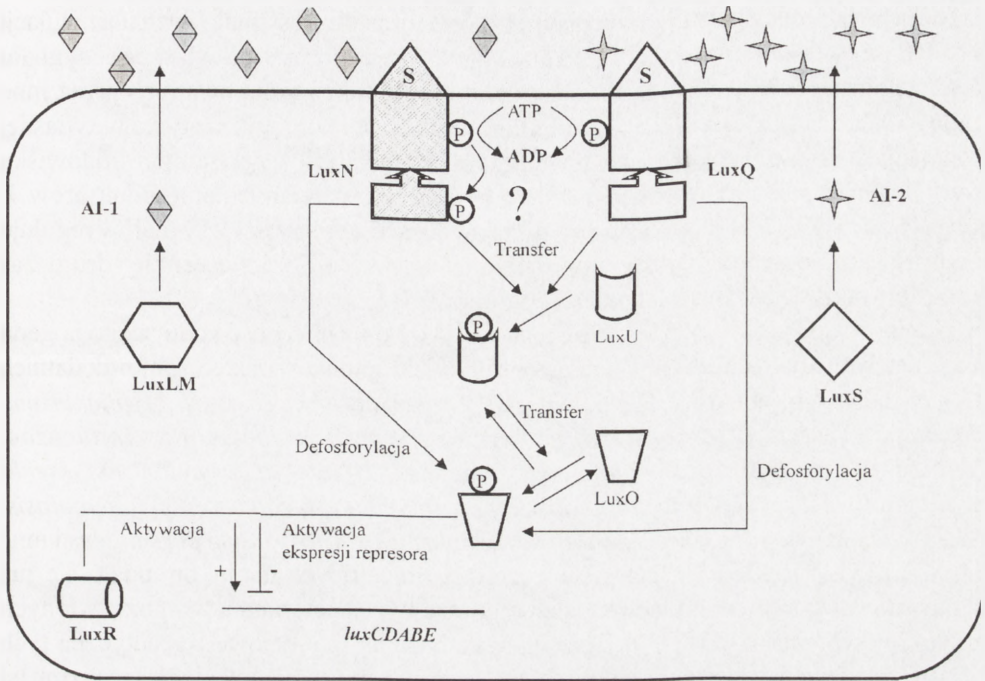
odpowiedzi na zmieniające się czynniki środowiska, przystosowuje sposób życia komórek w populacji do aktualnych warunków ich bytowania.

W końcowej części tego rozdziału przedstawiono system *quorum sensing* chorobotwórczych bakterii *Staphylococcus aureus*, zwany *agr*BDCA, który kontroluje ekspresję szeregu zewnątrzkomórkowych czynników wirulencji. Synteza cząsteczek sygnałowych oraz ich sensorów jest kodowana przez geny locus *agr*BDCA, które są transkrybowane z jednego promotora P2 z wytworzeniem policistronowego transkryptu RNAII (ryc. 6). Gen *agrD* koduje syntezę prekursorowego peptydu zbudowanego z 46 aminokwasów, który po kolejnych modyfikacjach, związanych z częściową proteolizą i wytworzeniem oktapeptydu oraz przyłączeniem pod kontrolą genu *argB* tiolaktonowego pierścienia, nabiera właściwości specyficznego autoinduktora AIP (ang. *autoinducing peptide*) [32, 33, 53]. Kolejny gen *agrC* odpowiada za syntezę kinazy, natomiast pod kontrolą genu *agrA* syntetyzowane jest końcowe białko regulatorowe AgrA. Białko to prawdopodobnie zwiększa pulę antysensownego transkryptu RNAIII, syntetyzowanego z promotora, zlokalizowanego w locus *agr* powyżej genu *agrB*. Region 5' tego transkryptu, o długości 512 nukleotydów, spełnia w komórkach *S. aureus* rolę pozytywnego regulatora ekspresji genów, aktywując syntezę szeregu białek sekrecyjnych na poziomie ich translacji, w tym α -hemolizyny, koagulazy, enterotoksyny oraz innych czynników wirulencji [34, 44, 54].

Co niezwykle ciekawe, wśród chorobotwórczych szczepów *S. aureus* wyróżnia się cztery grupy izolatów, syntetyzujących odmienne oligopeptydy jako szczepowo-specyficzne autoinduktory. Te odmienne oligopeptydy są rozpoznawane jako cząsteczki sygnałowe wyłącznie przez specyficzne kinazy. Co więcej, oligopeptyd syntetyzowany przez daną grupę szczepów nie tylko nie aktywuje genów *agr* innej grupy szczepów, ale całkowicie hamuje ich ekspresję. Zatem chorobotwórczy szczep *S. aureus*, który jako pierwszy skolonizuje gospodarza i uruchomi swój system QS, skutecznie konkuruje ze szczepami tego samego gatunku, ale należącymi do innej grupy, uniemożliwiając im inwazję tego samego gospodarza [33, 48, 56].

5. UNIWERSALNY AUTOINDUKTOR AI-2 JEST CZĄSTECZKĄ SYGNAŁOWĄ UMOŻLIWIAJĄCĄ KOMUNIKOWANIE SIĘ KOMÓREK BAKTERII W POPULACJACH MIESZANYCH

Badania możliwości międzygatunkowego komunikowania się komórek bakterii w naturalnych środowiskach zostały zintensyfikowane w ostatnich latach, a impulsem była praca Bassler i wsp. opublikowana w 1997 roku [1], w której autorzy przedstawili wyniki na ten temat u wolnożyjących bakterii morskich *Vibrio harveyi* zdolnych do bioluminescencji. Bakterie tego gatunku, w odróżnieniu od wcześniej opisanego, symbiotycznego gatunku *V. fischeri*, nie są symbiontami, ale wolnożyjącymi w płytkich wodach morskich, w osadach sedymentacyjnych, a także na powierzchni ciała lub w



RYCINA 7. Schemat układu *quorum sensing* *Vibrio harveyi*. Dwa odmienne autoinduktory AI-1 i AI-2, odpowiednio, acetylowany lakton homoseryny (\diamond) i cykliczny związek, pochodna 4,5-dihydroxy-2,3-pentandionu (\star) (ryc. 8) są syntetyzowane przez białka, odpowiednio, LuxLM (\hexagon) i LuxS (\diamond). Dwa odmienne białka kinaz sensorowych rozpoznają sygnały, odpowiednio, LuxQ sygnał AI-2 i LuxN sygnał AI-1. Sygnały z obu kinaz są przenoszone poprzez ich defosforylację i następnie fosforylację białka fosfotransferazy LuxU (\cup), która pełni funkcję integracyjną dla obu dróg przekazywania sygnałów. Fosfotransferaza LuxU przenosi sygnał na kolejne białko LuxO (∇), które w formie ufosforylowanej spełnia funkcję negatywnego regulatora (−) dla transkrypcji genów operonu lucyferazy luxCDABE. Białko LuxR (\square), odmienne od wcześniej omawianego białka regulatorowego LuxR *Vibrio fischeri*, spełnia rolę czynnika transkrypcyjnego, aktywującego (+) geny operonu lucyferazy luxCDABE (szczegółowe informacje w tekście)

przewodzie pokarmowym wielu zwierząt morskich. Populacja komórek *V. harveyi*, podobnie jak *V. fischeri*, ma zdolność bioluminescencji w określonych warunkach, aczkolwiek mechanizm tego zjawiska jest u tego gatunku odmienny. Najogólniej, populacja komórek *V. harveyi*, podobnie jak inne gatunki bakterii Gram-ujemnych, wykorzystuje acyl-HSL jako cząsteczki sygnałowe, ale system rozpoznawania i transdukcji tego typu sygnałów są analogiczne do tych, jakie funkcjonują u bakterii Gram-dodatnich.

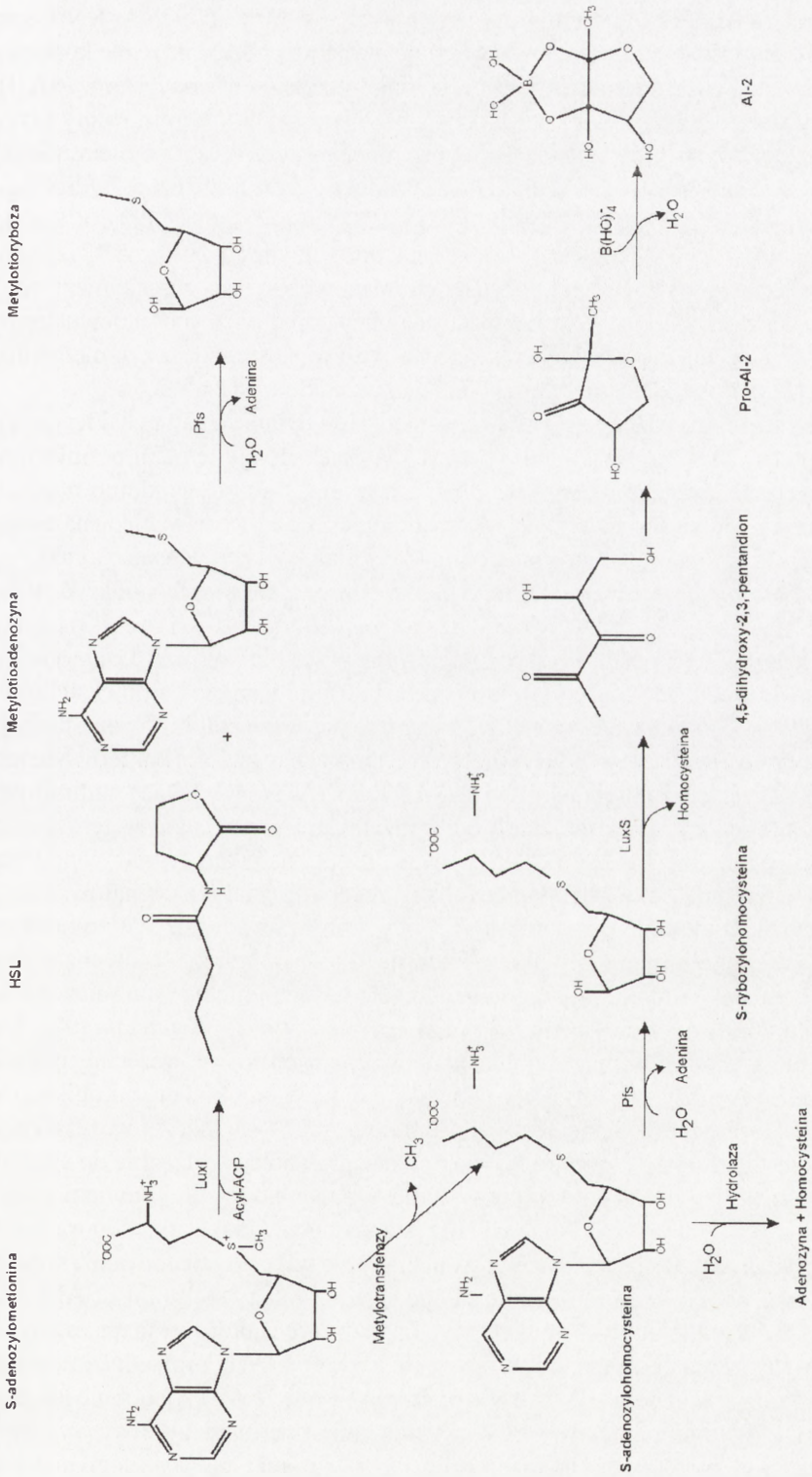
Najważniejszym odkryciem było wykazanie, że *V. harveyi* syntetyzuje i rozpoznaje zupełnie odmienny autoinduktor, zwany AI-2, który przeznaczony jest do komunikowania się z komórkami innych bakterii, żyjących wspólnie w tej samej niszy. W naturalnych środowiskach *V. harveyi* żyje i rozwija się w postaci międzygatunkowych,

mieszanych populacji. Stąd, synteza acyl-HSL jako cząsteczek sygnałowych dla regulacji aktywności własnej populacji, a także zdolność syntezy zarówno własnego, sygnału AI-2, jak i rozpoznawania cząsteczek sygnałowych AI-2 produkowanych przez inne gatunki bakterii, pozwala *V. harveyi* monitorować gęstość komórek nie tylko we własnej populacji, ale także w populacjach innych gatunków żyjących w tym samym środowisku (ryc. 7). Na zupełnie odmienne funkcje biologiczne omawianych autoinduktorów *V. harveyi* acyl-HSL i AI-2 wskazują wyniki dowodzące, iż pierwszy z sygnałów reguluje ekspresję operonu luxCDABE odpowiedzialnego za bioluminescencję, drugi zaś kontroluje aktywność innych genów i operonów [51].

Zdolność do syntezy cząsteczki sygnałowej AI-2 oraz obecność kodującego ją genu *luxS* zostały w ostatnich latach potwierdzone dla wielu gatunków bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, takich jak: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serotyp *Typhimurium*, *Salmonella enterica* serotyp *Typhi*, *Shigella flexnerii*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia pestis*, *Clostridium perfringens* i inne [3, 8, 13, 51, 81, 82, 85]. Dla niektórych z wymienionych gatunków udało się już skonstruować bardzo dogodne modele badawcze w postaci mutantów pozbawionych zdolności syntezy AI-2 (*luxS*-). Szczegółowe badania fenotypowe i genetyczne tych mutantów pozwolą zapewne w najbliższym czasie na lepsze zrozumienie mechanizmu tej regulacji oraz na dokładniejsze poznanie kontrolowanych w ten sposób genów i operonów [10, 36, 45]. Wiemy już, że autoinduktor AI-2 indukuje geny wyspy patogenności u chorobotwórczych szczepów *E. coli* O157:H7 [77] oraz jest odpowiedzialny za regulację syntezy hemolizyny i proteazy u *V. vulnificus*, a także za sekrecję proteazy cysteinowej *S. pyogenes* [46] oraz za ekspresję genu wirulencji *virB* *Shigella flexnerii* [10]. Donoszono także o roli tego autoinduktora w tworzeniu powodującego próchnicę zębów biofilmu przez *P. gingivalis* i *Streptococcus gordonii* [49]. Sądzi się, że sposób komunikowania się komórek różnych gatunków bakterii przy pomocy uniwersalnego alfabetu, jakim jest cząsteczka sygnałowa AI-2, został wykształcony przed ich dywergencją na dwie współcześnie żyjące grupy bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, które posługują się odmiennymi cząsteczkami sygnałowymi oraz innymi mechanizmami ich rozpoznawania i transdukcji sygnałów [5, 51, 71, 83, 97].

Autoinduktor AI-2 pozostaje nadal intrygującą cząsteczką sygnałową nie tylko ze względu na swoją uniwersalną funkcję dla większości (o ile nie dla wszystkich bakterii), ale także ze względu na budowę chemiczną oraz szlak biosyntezy.

Wspomniano wcześniej, że cząsteczki sygnałowe syntetyzowane przez różne gatunki bakterii Gram-ujemnych (acyl-HSL) oraz bakterii Gram-dodatnich (oligopeptydy) różnią się, odpowiednio, długością łańcucha acylowego oraz liczbą i rodzajem aminokwasów. Zatem, takie specyficzne gatunkowo sygnały mogą być rozpoznawane i transdukowane wyłącznie przez komórki należące do określonego gatunku, nie są zaś rozpoznawane przez inne, nawet blisko spokrewnione gatunki bakterii. W odróżnieniu, autoinduktor AI-2 ma identyczną budowę chemiczną i powstaje w identycznym szlaku biosyntezy, niezależnie od szczepu, gatunku, czy rodzaju bakterii [71]. Substratem dla syntezy AI-2, podobnie jak dla acyl-HSL, jest S-adenozylometionina (SAM). SAM jest ważnym



RYCINA 8. Szlaki syntezy autoinduktora AI-1 oraz laktonów homoseryny (HSL)

metabolitem, bowiem jest donorem grup metylowych dla metylacji DNA, RNA oraz wielu białek. Metylotransferazy, przenosząc grupę metylową z SAM na różne końcowe akceptory, generują w komórkach produkt pośredni S-adenozylhomocysteinę (SAH). SAH jest wysoce toksyczny dla komórki i dlatego jest szybko eliminowany przez nukleozydazę Pfs, która odłącza adeninę z wytworzeniem S-rybozylo-homocysteiny (SHR) [7, 71]. SHR jest substratem dla białka LuxS, produktu genu *luxS*, które hydrolizuje SHR do homocysteiny (HC) i 4,5-dihydroksy-2,3-pentandionu (DPD), a ten po spontanicznej cyklizacji i skompleksowaniu atomu boru przyjmuje postać AI-2 (diestru furanozylo-boranowego) [5, 22, 71]. Przedstawiony na rycinie 8 schemat syntezy AI-2 wskazuje, że substratem dla biosyntezy zarówno gatunkowo specyficznych autoinduktorów klasy acyl-HSL, jak i tej uniwersalnej cząsteczki sygnałowej jest S-adenozylometionina, a w szlaku reakcji biorą udział metylotransferazy oraz nukleozydaza Pfs.

Wciąż intrygującym i oczekującym na wyjaśnienie jest pytanie o naturę bakteryjnych białek, receptorów AI-2. Z wyjątkiem *V. harveyi*, gdzie funkcję tę pełni periplazmatyczne białko LuxP (ang. *ribosome-like binding protein*), nic nie wiadomo o takich białkach u innych gatunków bakterii [5]. Można domniemywać, że ze względu na naturę chemiczną AI-2 białka takie winny należeć do klasy białek wiążących reszty cukrowe (ang. *sugar binding proteins*). Jednym z bardziej nieoczekiwanych odkryć w tej dziedzinie, opisanym w 2002 roku, było wykazanie, że prekursor AI-2 (pro-AI-2) tworzy kompleks z borem i w tej postaci jest rozpoznawany przez białko LuxP *V. harveyi*, co udowodniono na podstawie analizy struktury kryształu omawianego kompleksu LuxP/pro-AI-2/Bor [5]. Zgodnie z naszą wiedzą, byłaby to pierwsza, zdefiniowana funkcja biologiczna boru w regulacji ważnych procesów życiowych w świecie bakterii. Nie jest wykluczone, że cząsteczka prekursorowa pro-AI-2 może w środowiskach naturalnych tworzyć kompleksy z innymi metalami bądź związkami, a powstałe w ten sposób autoinduktory, pochodne AI-2, mogą aktywować drogi transdukcji sygnałów poprzez różne białka, pochodne LuxP, spełniające funkcję receptorów takich sygnałów.

Należy jednak stwierdzić, że pomimo iż geny kontrolowane przez autoinduktor AI-2 zostały wykryte u wielu gatunków bakterii, to jednak wiedza, o mechanizmie komunikowania się komórek przy jego udziale, jest wciąż niepełna i ograniczona do trzech gatunków: *V. harveyi*, *V. cholerae* i *S. enterica* serotyp *Typhimurium* [97]. Nie brak w literaturze przedmiotu także publikacji podważających dość powszechny pogląd, że AI-2 jest uniwersalną cząsteczką sygnałową dla międzygatunkowej komunikacji w świecie bakterii. Przytacza się nowe wyniki lub interpretuje się inaczej wcześniejsze dane wskazując, że funkcji białka LuxS nie można sprowadzić wyłącznie do syntezy cząsteczki sygnałowej AI-2 i jego roli w systemie QS. Białko to pełni bowiem ważną funkcję w szlakach syntezy SAM oraz wykorzystania tego związku jako donora grupy metylowej. Stąd, inaktywacja genu *luxS* prowadziłaby nie tylko do zahamowania syntezy prekursora AI-2, ale także do zaburzenia całego szlaku syntezy metioniny, SAM oraz metylacji kwasów nukleinowych i białek [95]. Zdaniem tych autorów nie ma zatem nic dziwnego w tym, że mutacja genu *luxS* w szczepie *E. coli* 0157:H7 prowadzi do zmiany ekspresji aż około 400 genów [12, 78]. Nie brak też głosów, że AI-2, podobnie jak jego prekursor (DPD), jest mutagenny i toksyczny dla komórki, a stąd musi być wydalany z komórek do środowiska w czasie logarytmicznego wzrostu i intensywnego metabo-

lizmu. Jednakże w czasie fazy stacjonarnej i deficytu źródeł węgla i energii AI-2 nie jest wydalany, jak to wykazano dla *S. enterica* serotyp *Typhi*, *E. coli*, *S. pyogenes* i *N. gonorrea*, ale aktywnie pobierany z otoczenia i wykorzystywany jako ekwiwalent rybozy [45, 82, 96]. W konkluzji należałoby stwierdzić, że rola cząsteczki sygnałowej AI-2 jako globalnego regulatora QS w populacjach *V. harveyi* nie podlega obecnie dyskusji, natomiast jej uniwersalny udział w świecie bakterii jako globalnego autoinduktora systemu QS wymaga jeszcze głębszych badań. Bakterie w czasie wzrostu i rozwoju wydają do środowiska wzrostu wiele różnorodnych, niskocząsteczkowych metabolitów, które mogą spełniać funkcję pozytywnych lub negatywnych regulatorów ekspresji genów, mogą także spełniać funkcję aktywatorów lub inhibitorów określonych białek enzymatycznych. Często nie jest więc łatwo zdecydować, czy obserwowane zmiany fenotypowe, metaboliczne w populacjach bakterii są efektem działania bakteryjnego QS, czy też może przejawem zupełnie odmiennych mechanizmów regulacji metabolicznej.

Zgodnie z propozycją Klausa Winzera i współpracowników [95] metabolit, który może być uznany za dyfuzyjną cząsteczkę sygnałową w systemie *quorum sensing*, winien spełniać następujące kryteria:

- synteza takiego związku powinna zachodzić w warunkach fizjologicznych, w ściśle określonej fazie wzrostu populacji i w odpowiedzi na zmiany warunków środowiska,
- związek ten winien być akumulowany zewnątrzkomórkowo i być rozpoznawany przez specyficzne białko receptorowe,
- akumulacja związku w określonym stężeniu winna wywoływać skoordynowaną odpowiedź całej populacji lub jej większości,
- fizjologiczna i metaboliczna odpowiedź komórek populacji winna obejmować inne aktywności niż te, które są związane z detoksyfikacją takiego związku lub jego wykorzystaniem jako źródła węgla i energii.

6. ROLA BIOLOGICZNA QS W NATURALNYCH ŚRODOWISKACH BAKTERII

Systemy QS umożliwiając wewnątrz- i międzygatunkową komunikację komórek pozwalają bakteriom na koordynację różnorodnych aktywności biologicznych w obrębie populacji danego gatunku, a także na ustalenie wzajemnych relacji pomiędzy populacjami różnych gatunków bakterii, które w środowiskach naturalnych mogą przyjąć charakter współdziałania, kompetycji lub antagonizmu. Poniżej przedstawiono kilka dobrze poznanych przykładów takich międzygatunkowych współzależności, w ustalaniu których międzygatunkowa komunikacja bakterii przy udziale dyfuzyjnych cząsteczek sygnałowych odgrywa decydujące znaczenie. Jednym z takich przykładów międzygatunkowych interakcji są komórki wcześniej diskutowanego gatunku *V. harveyi*, które żyjąc w mieszanych populacjach wykorzystują cząsteczkę AI-2, syntetyzowaną przez inne gatunki, do regulacji ekspresji własnych genów.

Innym, często cytowanym przykładem jest biofilm, tworzony przez populacje komórek *P. aeruginosa* i *Burkholderia cepacia* u pacjentów z mukowiscydozą. Chorzy na mukowiscydozę produkują nadmierne ilości śluzu, który jest bogatym podłożem dla rozwoju wymienionych bakterii w formie biofilmu. W tworzeniu omawianego biofilmu zasadniczą rolę ogrywa międzygatunkowa komunikacja przy udziale cząsteczek sygnałowych [13, 20, 57, 73, 87]. Dowiedziono w układach doświadczalnych, że obecność autoinduktora produkowanego przez komórki *P. aeruginosa* z funkcjonalnym systemem białek LasI/LasR jest warunkiem koniecznym dla indukcji ekspresji czynników wirulencji *B. cepacia*. Na tej podstawie przyjmuje się, że u pacjentów z CF najpierw dochodzi do infekcji i rozwoju populacji *P. aeruginosa* i akumulacji dyfuzyjnej cząsteczki sygnałowej acyl-HSL, która jest rozpoznawana przez komórki *B. cepacia* jako sygnał dla ekspresji własnych czynników wirulencji ułatwiających kolonizację tkanki przez tego groźnego patogena. Dobrze udokumentowanym przykładem roli systemu QS w układach antagonistycznych i kompetycyjnych są wcześniej wspomniane wyniki, które uzyskano w badaniach chorobotwórczych bakterii *S. aureus*. W tym przypadku specyficzny acyl-HSL, syntetyzowany przez jedną grupę szczepów, hamuje ekspresję genów wirulencji innej grupy szczepów, uniemożliwiając im w ten sposób kolonizację tej samej niszy [33, 48, 56]. Inna strategia eliminowania konkurentów z środowiska jest opisywana dla bakterii *P. aureofaciens* zdolnych do syntezy antybiotyków. Synteza antybiotyków u tego gatunku jest indukowana obecnością w środowisku cząsteczek sygnałowych acyl-HSL, produkowanych także przez inne gatunki bakterii żyjących w tej samej niszy. Szybka akumulacja autoinduktora w środowisku, jako rezultat współdziałania różnych gatunków, indukuje szlak produkcji antybiotyku w populacji komórek *P. aureofaciens*, co w konsekwencji eliminuje inne gatunki ze wspólnego środowiska [77]. Alternatywną strategią eliminacji bakterii *E. carotovora* wykształciły populacje komórek *B. subtilis*. W tym przypadku syntetyzowana przez *B. subtilis* i wydzielana do środowiska metalohydrolaza (AiiA) inaktywuje autoinduktor produkowany przez *E. carotovora*, którego obecność jest konieczna dla indukcji ekspresji genów odpowiedzialnych za proces kolonizacji roślin [14]. Podobnie, glebowe bakterie z rodzaju *Variovorax* mają zdolność wykorzystywania różnych autoinduktorów klasy acyl-HSL jako źródła węgla i azotu, ograniczając w ten sposób możliwość komunikowania się komórek w populacjach innych gatunków bakterii, żyjących w tej samej niszy ekologicznej [41].

Badania na temat roli systemu QS w kształtowaniu rozmaitych interakcji pomiędzy różnymi gatunkami bakterii, a także pomiędzy bakteriami i organizmami wyższymi są dopiero w początkowej fazie. Można się spodziewać w najbliższych latach dalszych, ważnych odkryć w tej dziedzinie, związanych z jednej strony ze znaczeniem tego zjawiska w procesie infekcji, w tworzeniu groźnych biofilmów na materiałach medycznych, z drugiej zaś z ukierunkowanym działaniem specyficznych inhibitorów, naturalnych i syntetycznych analogów dyfuzyjnych cząsteczek sygnałowych, które potencjalnie mogą być zastosowane jako nowe leki blokujące ekspresję czynników wirulencji. Dobrze udokumentowanym przykładem hamowania bakteryjnego systemu QS i zapobiegania w tworzeniu biofilmu jest zdolność do syntezy halogenowanych furanonów przez morski glon *Delisea pulchra*. Okazało się, że związki te są wysoce aktywne w zapobieganiu

tworzenia biofilmu na statkach rybackich i sieciach jako kompetycyjne analogi acylowanych laktonów homoseryny. Szczegółowe badania wskazują, że halogenowane furanony prawdopodobnie konkurują z autoinduktorem o miejsce wiązania na białku receptorowym LuxR i w ten sposób blokując system QS *Serratia liquefaciens* hamują proces kolonizacji i tworzenia biofilmu [47, 88]. Nie można także wykluczyć, że przyłączenie inhibitora destabilizuje białko LuxR poprzez drastyczne obniżenie czasu jego półtrwania lub zablokowanie procesu dimeryzacji cząsteczki [8, 81].

W poszukiwaniu naturalnych i syntetycznych związków chemicznych jako potencjalnych nowych leków antybakteryjnych, bardzo obiecujące są prace dowodzące, że również syntetyczne halogenowane furanony mogą być skutecznymi inhibitorami tworzenia biofilmu przez *E. coli* oraz ruchu pełzakowatego przez *P. aeruginosa*, a więc procesów kontrolowanych przez system QS [29, 67]. Wskazuje się również, że różne gatunki roślin wyższych, takie jak: ryż, groch, pomidor i gryka, syntetyzują i wydzielają do środowiska bliżej jeszcze niezidentyfikowane substancje, które jako analogi cząsteczek sygnałowych, w tym również prawdopodobnie analogi AI-2, kontrolują aktywność populacji bakterii w danych niszach ekologicznych [5]. Wydaje się, że ważnym poznawczym kierunkiem poszukiwań naukowych u bakterii chorobotwórczych winny być badania enzymów szlaków biosyntezy autoinduktorów oraz struktury i funkcji specyficznych białek receptorowych oraz białek przekaźnikowych. Dokładne poznanie natury i funkcji tych białek stworzyłoby szansę dla syntezy specyficznych inhibitorów jako leków blokujących rozpoznanie lub transdukcję sygnałów, a w konsekwencji blokujących QS i hamujących ekspresję czynników wirulencji.

7. PODSUMOWANIE

W świetle obecnej wiedzy na temat bakteryjnego systemu QS populacje bakterii zarówno w hodowlach, jak i w ich środowiskach naturalnych należy rozpatrywać jako zespoły zsynchronizowanych komórek, regulujących zbiorowo ważne funkcje życiowe w sposób podobny jak komórki tkanek organizmów wyższych. Populacje bakterii jako zbiorowości jednokomórkowych organizmów w biofilmach mogły być jednym z wczesnych etapów ewolucji organizmów wielokomórkowych. System QS pozwalał bowiem ogromnej populacji indywidualnych komórek koordynować w sposób globalny różnorodne aktywności, w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska, dostępność substancji pokarmowych oraz obecność innych gatunków bakterii w tej samej niszy ekologicznej. Atrakcyjność badań systemu QS wynika z ogólnobiologicznego i biotechnologicznego znaczenia procesów i aktywności kontrolowanych przez te wyspecjalizowane układy sygnałów i przekaźników u różnych gatunków bakterii środowiskowych i chorobotwórczych. Pełniejsze zrozumienie elementów i mechanizmów odpowiedzialnych za komunikowanie się bakterii w środowiskach naturalnych może przynieść nowe propozycje o znaczeniu biotechnologicznym. Kontrola kolonizacji roślin przez bakterie symbiotyczne i chorobotwórcze, kontrola tworzenia biofilmów w środowiskach naturalnych, na materiałach urządzeń medycznych, to jedno z

obecnie dyskutowanych oczekiwań o znaczeniu biotechnologicznym. Duże nadzieje wiąże się również z badaniami, których perspektywicznym celem jest opracowanie nowych leków, które jako inhibitory QS mogą pozwolić na opracowanie nowej strategii skutecznego leczenia wielu bakteryjnych chorób człowieka.

LITERATURA

- [1] BASSLER BL, GREENBERG EP, STEVENS AM. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 1997; **179**: 4043–4045.
- [2] BASSLER BL. How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 1999; **2**: 582–587.
- [3] BASSLER BL. A multichannel two-component signaling relay controls quorum sensing in *Vibrio harveyi*. W: Dunny GM, Winans SC [red.] Cell-cell Signaling in Bacteria. Washington DC: ASM Press 1999: 259–273.
- [4] BRINT JM, OHMAN DE. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* 1995; **177**: 7155–7163.
- [5] CHEN X, SCHAUDER S, POTIER N, VAN DORSSEALER A, PELCZER I, BASSLER BL, HUGHSON FM. Structural identification of bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 2002; **415**: 545–549.
- [6] CHOI SH, GREENBERG EP. The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proc Natl Acad Sci* 1991; **88**: 1115–1119.
- [7] CORNELL KA, SWARTS WE, BARRY RD, RISCOE MK. Characterization of recombinant *Escherichia coli* 5'-methyl-thioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase: Analysis of enzymatic activity and substrate specificity. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **228**: 724–732.
- [8] DANIELS R, VANDERLEYDEN J, MICHIELS J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2003; **28**: 261–289.
- [9] DAVIES DG, PARSEK MR, PEARSON JP, IGLEWSKI BH, COSTERTON JW, GREENBERG EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998; **280**: 295–298.
- [10] DAY WA Jr, MAURELLI AT. *Shigella flexneri* LuxS quorum sensing system modulates virB expression but is not essential for virulence. *Infect Immun* 2001; **69**: 15–23.
- [11] DE KIEVIT TR, IGLEWSKI BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationship. *Infect Immunol* 2000; **68**: 4839–4849.
- [12] DELISA MP, WU CF, WANG L, VALDES JJ, BANTLEJ WE. DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001; **183**: 5239–5247.
- [13] DONABEDIAN H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect* 2003; **46**: 207–214.
- [14] DONG YH, XU JL, LI XZ, ZHANG LH. AIIA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3526–3531.
- [15] DUNNY GM, BROWN BL, CLEWELL DB. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 3479–3483.
- [16] DWORKIN M, KAISER D. Cell interaction in myxobacterial growth and development. *Science* 1985; **230**: 18–24.
- [17] ENGBRECHT J, SILVERMAN M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 4154–4158.
- [18] FUQUA C, WINANS SC, GREENBERG EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR/LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994; **176**: 269–275.
- [19] FUQUA C, WINANS SC, GREENBERG EP. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 1996; **50**: 727–751.
- [20] GOVAN JR, HUGHES JE, VANDAMME P. *Burkholderia cepacia*: Medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol* 1996; **45**: 395–407.

- [21] GRAY KM, PASSADOR L, IGLEWSKI BH, GREENBERG EP. Interchangeability and specificity of components from the quorum-sensing regulatory systems of *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1994; **176**: 3076–3080.
- [22] GREENE RG. Biosynthesis of methionine. W: Neidhardt F [red.] *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : Cellular and Molecular Biology. Washington DC: ASM Press 1996 : str 542–560.
- [23] GROSSMAN AD. Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* 1995; **29**: 477–508.
- [24] HANZELKA BL, PARASEK MR, VAL DL, DUNLAP PV, CRONAN JE, GREENBERG EP. Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J Bacteriol* 1999; **181**: 5766–5770.
- [25] HASSETT DJ, MA JF, ELKINS JG, MCDERMOTT TR, OCHSNER UA, WEST SE, HUANG CT, FREDERICS J, BURNETT S, STEWART PS, et al. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol Microbiol* 1999; **34**: 1082–1093.
- [26] HASTINGS J, NEALSON KH. Bacterial bioluminescence. *Annu Rev Microbiol* 1977; **31**: 549–595.
- [27] HAVERSTEIN LS, COOMARASWAMY G, MORRISON DA. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 11140–11144.
- [28] HAVERSTEIN LS, MORRISON DA. Quorum sensing and peptide pheromones in Streptococcal competence for genetic transformation. W: Dunny GM, Winans SC [red.] Cell-cell Signaling in Bacteria. Washington DC: ASM Press 1999: 9–26.
- [29] HENTZER M, RIEDEL K, RASMUSSEN TB, HEYDORN A, ANDERSEN JB, PARSEK MR, RICE SA, EBERL L, MOLIN S, HOIBY N, KJELLEBERG S, GVISOV M. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* 2002; **148**: 87–102.
- [30] HUI FM, ZHOU L, MORRISON DA. Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: organization of a regulatory locus with homology to two lactococcal A secretion genes. *Gene* 1995; **153**: 25–31.
- [31] HWANG I, LI PL, ZHANG L, PIPER KR, COOK DM, TATE ME, FARRAND SK. TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4639–4643.
- [32] JI G, BEAVIS R, NOVICK RP. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 12055–12059.
- [33] JI G, BEAVIS R, NOVICK RP. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 1997; **276**: 2027–2030.
- [34] JOHANSSON J, COSSART P. RNA-mediated control of virulence gene expression in bacterial pathogens. *Trends Microbiol* 2003; **11**: 280–285.
- [35] JONES S, YU B, BAINTON NJ, BIRDSALL M, BYCROFT BW, CHHABRA SR, COX AJ, GOLBY P, REEVES PJ, STEPHENS S, et al. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J* 1993; **12**: 2477–2482.
- [36] JOYCE EA, BASSLER BL, WRIGHT A. Evidence for a signaling system in *Helicobacter pylori*: detection of a luxS-encoded autoinducer. *J Bacteriol* 2000; **182**: 3638–3643.
- [37] KAPLAN HB, GREENBERG EP. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* 1985; **163**: 1210–1214.
- [38] KLEEREBEZEM M, QUADRI LE, KUIPERS OP, DE VOS WM. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction system in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 1997; **24**: 895–904.
- [39] LAFITI A, FOGLINO M, TANAKA K, WILLIAMS P, LAZDUNSKI A. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 1996; **21**: 1137–1146.
- [40] LAZZERA BA, SOLOMON JM, GROSSMAN AD. An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *Bacillus subtilis*. *Cell* 1997; **89**: 917–925.
- [41] LEADBETTER JR, GREENBERG EP. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol* 2000; **182**: 6921–6926.
- [42] LEE MS, MORRISON DA. Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J Bacteriol* 1999; **181**: 5004–5016.
- [43] LEWENZA S, CONWAY B, GREENBERG EP, SOKOL PA. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J Bacteriol* 1999; **181**: 748–756.

- [44] LINA G, JARRAUD S, JI G, GREENLAND T, PEDRAZA A et al. Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the agr signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1998; **28**: 655–662.
- [45] LYON WR, MADDEN JC, STEIN J, CAPARON MG. Mutation of luxS affects growth and virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 2001; **42**: 145–157.
- [46] LYON GJ, WRIGHT JS, MUIR TW, NOVICK RP. Key determinants of receptor activation in the agr autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 2002; **41**: 10095–100104.
- [47] MANFIELD M, DE NYS R, KUMAR N, READ R, GIVSKOV M, STEINBERG P, KJELLEBERG S. Evidence that halogenated furanones for *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* 1999; **145**: 283–291.
- [48] MAYVILLE P, JI G, BEAVIS R, YANG H, GOGER M, NOVICK, RP, MUIR TW. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 1218–1223.
- [49] McNAB R, FORD SK, EL SABAENY A, BARBIERI B, COOC GS, MAMONT RJ. LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 2003; **185**: 274–284.
- [50] MIAMOTO CM, BOYLAN M, GRAHAM AF, MEIGHEN EA. Organization of the lux structural genes of *Vibrio harveyi*. Expression under the T7 bacteriophage promoter, mRNA analysis, and nucleotide sequence of the luxD gene. *J Biol Chem* 1988; **263**: 13393–13399.
- [51] MILLER MB, BASSLER BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001; **55**: 165–199.
- [52] MORE MI, FINGER LD, STRYKER JL, FUQUA C, EBERHARD A, WINANS SC. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* 1996; **272**: 1655–1658.
- [53] MORFELD E, TAYLOR D, VON GABAIN A, ARVIDSON S. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAlII. *EMBO J* 1995; **14**: 4569–4577.
- [54] NOVICK R, ROSS H, PROJAN S, KORNBLUM J, KREISWIRTH B, MOGHAZEH S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* 1993; **12**: 3967–3975.
- [55] NOVICK RP, PROJAN SJ, KORNBLUM J, ROSS HF, JI G et al. The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 1995; **248**: 446–458.
- [56] OTTO M, SUSSMUTH R, VUONG C, JUNG G, GOTZ F. Inhibition of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus* by the *Staphylococcus epidermidis* agr pheromone and derivatives. *FEBS* 1999; **450**: 257–262.
- [57] PARSEK MR, GREENBERG EP. Quorum sensing signals in development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Methods Enzymol* 1999; **310**: 43–55.
- [58] PARSEK MR, GREENBERG EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8789–8793.
- [59] PASSADOR L, COOK JM, GAMBELLO MJ, RUST L, IGLEWSKI BH. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 1993; **260**: 1127–1130.
- [60] PEARSON JP, PASSADOR L, IGLEWSKI BH, GREENBERG EP. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 1490–1494.
- [61] PEREGO M, HANSTEIN C, WELSH KM, DJAVAKHISHVILI T, GLASER P, HOCH JA. Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *Bacillus subtilis*. *Cell* 1994; **79**: 1047–1055.
- [62] PEREGO M. A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 8612–8617.
- [63] PESCI EC, PEARSON JP, SEED PC, IGLEWSKI BH. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1997; **179**: 3127–3132.
- [64] PESTOVA EV, HAVARSTEIN LS, MORRISON DA. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol* 1996; **21**: 853–862.
- [65] PIERSON LS 3rd, KEPPELLE VD, WOOD DW. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J Bacteriol* 1994; **176**: 3966–3974.
- [66] POZZI G, MASALA L, INNAELI F, MANGANELLI R, HAVARSTEIN LS, et al. Competence for genetic transformation in encapsulated strains of *Streptococcus pneumoniae*: two allelic variants of the peptide pheromone. *J Bacteriol* 1996; **178**: 6087–6090.

- [67] REN D, SIMS JJ, WOOD TK. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environ Microbiol* 2001; **3**: 731–736.
- [68] REN D, SIMS JJ, WOOD TK. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Lett Appl Microbiol* 2002; **34**: 293–299.
- [69] SCHAEFER AL, HANZELKA BL, EBERHARD A, GREENBERG EP. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. *J Bacteriol* 1996; **178**: 2897–2901.
- [70] SCHAUDER S, BASSLER BL. The languages of bacteria. *Genes Dev* 2001; **15**: 1468–1480.
- [71] SCHAUDER S, SHOKAT K, SURETTE MG, BASSLER BL. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* 2001; **41**: 463–476.
- [72] SHADEL GS, YOUNG R, BALDWIN TO. Use of regulated cell lysis in a lethal genetic selection in *Escherichia coli*: identification of the autoinducer-binding region of the LuxR protein from *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *J Bacteriol* 1990; **172**: 3980–3987.
- [73] SINGH PK, SCHAEFER AL, PARSEK MR, et al. Quorum sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000; **407**: 762–764.
- [74] SLOCK J, VANRIET D, KOLIBACHUK D, GREENBERG EP. Critical region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein defined by mutational analysis. *J Bacteriol* 1990; **172**: 3974–3979.
- [75] SOLOMON JM, MAGNUSON R, SRIVASTAVA A, GROSSMAN AD. Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factor in *Bacillus subtilis*. *Genes* 1995; **9**: 547–548.
- [76] SOLOMON JM, LAZZAZZERA BA, GROSSMAN AD. Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes* 1996; **10**: 2014–2024.
- [77] SPERANDIO V, MELLIES JL, NGUYEN W, SHIN S, KAPER JB. Quorum sensing controls expression of the tape III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 15196–15201.
- [78] SPERANDIO V, TORRES AG, KAPER JB. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol Microbiol* 2002; **43**: 809–821.
- [79] STEVENS AM, GREENBERG EP. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: Essential elements for activation of the luminescence genes. *J Bacteriol* 1997; **179**: 557–562.
- [80] STEVENS AM, FUJITA N, ISHIHAMA A, GREENBERG EP. Involvement of the RNA polymerase alpha-subunit C-terminal domain in LuxR-dependent activation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes. *J Bacteriol* 1999; **181**: 4704–4707.
- [81] SUGA H, SMITH KM. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Curr Opin Chem Biol* 2003; **7**: 586–591.
- [82] SURETTE MG, BASSLER BL. Regulation of autoinducer production in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 1999; **31**: 585–595.
- [83] SURETTE MG, MILLER MB, BASSLER BL. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 1639–1644.
- [84] TAGA ME, SEMMELHACK JL, BASSLER BL. The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 2001; **42**: 777–793.
- [85] TAGA ME, BASSLER BL. Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **2**: 14549–14554.
- [86] TAGA ME, MILLER ST, BASSLER BL. Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 2003; **50**: 1411–1427.
- [87] TAYLOR RF, GAYA H, HODSON ME. *Pseudomonas cepacia*: Pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *Respir Med* 1993; **87**: 187–192.
- [88] TEPLITSKI M, ROBINSON JB, BAUER WD. Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activates and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 2000; **13**: 637–648.
- [89] TURGAY K, HAHN J, BURGHOORN J, DUBNAU D. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J* 1998; **17**: 6730–6738.
- [90] VAL DL, CRONAN JE Jr. *In vivo* evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases. *J Bacteriol* 1998; **180**: 2644–2651.

- [91] VAN SINDEREN D, LUTTINGER A, KONG L, DUBNAUD, VENEMA G, HAMOEN L. comK encodes the competence transcription factor, the key regulatory protein for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 1995; **15**: 455–462.
- [92] WHITELEY M, LEE KM, GREENBERG EP. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 13904–13909.
- [93] WHITELEY M, PARSEK MR, GREENBERG EP. Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2000; **182**: 4356–4360.
- [94] WINZER K, FALCONER C, GARBER NC, DIGGLE SP, CAMARA M, WILLIAMS P. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol* 2000; **182**: 6401–6411.
- [95] WINZER K, HARDIE KR, WILLIAMS P. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now – gone to lunch. *Curr Opin Microbiol* 2002; **5**: 216–222.
- [96] WINZER K, SUN YH, GREEN A, DELORY M, BLACKLEY D, HARDIE KR, BALDWIN TJ, TANG C. The role of *Neisseria meningitidis* luxS in cell-to-cell signaling and bacteremic infection. *Infect Immun* 2002; **70**: 2245–2248.
- [97] XAVIER K, BASSLER BL. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin* 2003; **6**: 191–197.
- [98] ZHANG L, MURPHY PJ, KERR A, TATE ME. *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. *Nature* 1993; **362**: 446–448.
- [99] ZHU J, BEABER JW, MORE MI, FUQUA C, EBERHARD A, WINANS SC. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 1998; **180**: 5398–5405.
- [100] ZHU J, WINANS S.C. The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 1507–1512.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 14.01.2005 r.

Przyjęto 04.02.2005 r.

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

GHRELINA – NOWY HORMON REGULUJĄCY NIE TYLKO POBIERANIE POKARMU I WYDZIELANIE HORMONU WZROSTU

**GHRELIN – REGULATION OF FEEDING, GROWTH HORMONE
RELEASE AND OTHER ACTIONS OF A NEW HORMONE**

Zbigniew KMIEĆ, Magdalena WYRZYKOWSKA

Katedra Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku

Streszczenie: Ghrelina to peptyd stanowiący endogenny ligand receptora syntetycznych stymulatorów wydzielania hormonu wzrostu, GHS-R. Ghrelina syntetyzowana jest głównie w komórkach X/A żołądka, a w mniejszych ilościach także w podwzgórzu, przysadce mózgowej, jelitach, korze nadnerczy, gonadach, łożysku, kardiomiocytach, limfocytach T i monocytach. Peptyd ten zwiększa uwalnianie hormonu wzrostu działając na przysadkę mózgową bezpośrednio i pośrednio, synergistycznie z somatoliberyną. Ghrelina to jedyny hormon obwodowy pobudzający apetyt i pobieranie pokarmu poprzez stymulację komórek wydzielających neuropeptyd Y i AgRP w jądrze łukowatym podwzgórza oraz hamowanie anoreksygenego działania melanokortyny. Stężenie ghreliny we krwi rośnie w stanach ujemnego bilansu energetycznego, jest też obniżone u osób otyłych. Ponadto ghrelina pobudza wydzielanie kwasu solnego oraz motorykę żołądka i jelit działając za pośrednictwem nerwu błędnego, wpływa na proliferację niektórych rodzajów komórek, wywiera efekty gastro- i kardioprotekcyjne.

Słowa kluczowe: ghrelina, kontrola pobierania pokarmu, wydzielanie GH.

Summary: Ghrelin, an acetylated peptide composed of 28 amino-acids, is an endogenous ligand for the growth hormone secretagogues receptor, GHS-R. Ghrelin is mainly produced by the X/A cells of the oxyntic glands in the stomach and, to a much lesser extent, in hypothalamus, pituitary, adrenal gland, intestine, gonads, heart, T lymphocytes, and monocytes. Ghrelin increases growth hormone secretion independently on and synergistically with somatoliberin. It is the only peripheral hormone that increases appetite and food intake by stimulating hypothalamic neurons that secrete key orexinogens, neuropeptide Y and AgRP, and by inhibiting anorexigenic α -MSH neurons. Serum level of ghrelin increases during fasting and becomes suppressed by refeeding and in obesity. Ghrelin increases secretory activity and motility of stomach and ileum, induces proliferation of some cell lines and shows gastro- and cardioprotective properties.

Key words: ghrelin, feeding regulation, GH secretion, energy homeostasis.

ODKRYCIE I WYSTĘPOWANIE GHRELINY

Pobieranie pokarmu stanowi podstawową funkcję życiową organizmu kontrolowaną przez złożone układy regulacyjne obejmujące ściśle współdziałanie procesów nerwowych i endokrynych. W ostatnim dziesięcioleciu odkryto wiele nowych peptydów biorących udział w regulowaniu homeostazy energetycznej ustroju. Jednym z nich jest ghrelina, 28-aminokwasowy peptyd o masie cząsteczkowej 3,3 kDa, mający resztę kwasu oktanowego (C8:0) związaną z seryną (Ser3); obecność reszty acylowej warunkuje aktywność biologiczną peptydu umożliwiając jego wiązanie się z receptorami typu GHS-R1a oraz ułatwiając przenikanie przez barierę krew-mózg [7,42]. Ghrelina okazała się być intensywnie poszukiwanym, endogennym ligandem sklonowanego wcześniej receptora (GHS-R) syntetycznych związków pobudzających wydzielanie hormonu wzrostu (GHS, *GH secretagogues*) z komórek somatotropowych przysadki mózgowej. Jak dotąd poznano dwie izoformy receptora, aktywną biologicznie postać GHS-R1a oraz nieaktywny GHS-R1b, które występują w podwzgórzu, hipokampie, pniu mózgu, przysadce mózgowej, trzustce oraz w wielu innych narządach [65]. Należy zaznaczyć, że receptory GHS różnią się istotnie od receptorów somatoliberyny, GHRH, która jest głównym naturalnym stymulatorem wydzielania hormonu wzrostu. Nazwę hormonu utworzono w oparciu o słowo „*ghre*”, które stanowi w języku proto-indoeuropejskim rdzeń słowa „wzrost”, oraz przyrostek *-relin* wskazujący na udział peptydu w uwalnianiu GH (ang. *release*). Gen ludzkiej ghreliny, złożony z 4 egzonów i 3 intronów, zlokalizowany jest na chromosomie 3 (w locus 3p25-26) [42], u człowieka ma on dwa miejsca inicjacji transkrypcji [40]. Ghrelina powstaje w wyniku proteolizy znacznie dłuższego prekursora, preproghreliny, zbudowanego ze 117 aminokwasów. Ghreliny szczura i człowieka różnią się 2 aminokwasami, a ludzki gen kodujący preproghrelinę jest homologiczny ze szczurzym w 82% [42]. Gen ghreliny małp *Rhesus* jest w 91% homologiczny z ludzkim, zaś sam peptyd różni się od ludzkiego tylko 1 aminokwasem [2]. W żołądku szczura dojrzały peptyd kodowany jest przez egzon 1 i 2, w wyniku alternatywnego składania pierwotnego transkryptu powstają dwa peptydy o identycznych właściwościach biologicznych: „właściwa” ghrelina utworzona przez 28 aminokwasów oraz des-Gln14-ghrelina zbudowana z 27 aminokwasów (w pozycji 14 brak glutaminy), izoformy te nie różnią się aktywnością biologiczną [3,42]. W żołądku człowieka występują jeszcze inne formy ghreliny powstające w rezultacie potranslacyjnych modyfikacji peptydu [34]. Zawartość des-Gln14-ghreliny w żołądku jest bardzo niska i dlatego istotne znaczenie biologiczne przypisywane jest ghrelinie [42]. Żołądek i jelito cienkie wydzielają do krwi znaczne ilości nieacylowanej ghreliny [34], która nie wpływa na wydzielanie hormonu wzrostu i nie aktywuje receptora GHS-R1a [9,42], pobudza natomiast, podobnie jak acylowana ghrelina [17], adypogenezę w szpiku kostnym [70] oraz antagonizuje hamujący wpływ ghreliny na wydzielanie insuliny i stężenie glukozy we krwi [10]. Jak dotąd mechanizm dołączania reszty acylowej do peptydu nie został poznany.

Obecność ghreliny wykryto początkowo w ziarnistościach sekrecyjnych typu A komórek endokrynych gruczołów właściwych trzonu i dna żołądka szczura [22,42,59]

oraz w odpowiadającym im komórkach z ziarnistościami typu P/D₁ w żołądku człowieka lub typu X w żołądku psa [59]. Badania immunocytochemiczne na poziomie ultrastruktury wykazały, że w żołądku ssaków [59] komórki syntetyzujące ghrelinę tworzą dość liczną populację komórek hormonalnie czynnych, które stanowią 20–25% wszystkich komórek endokrynnych błony śluzowej żołądka [68]. Gastrektomia powoduje spadek poziomu ghreliny w surowicy krwi ludzi o 65% [3], a u szczura o 80% [23], co wskazuje na syntezę tego hormonu także poza żołądkiem. Występowanie ghreliny w innych narządach przedstawiono w tabeli 1. Zwraca uwagę obecność peptydu nie tylko w komórkach enteroendokrynnych ściany jelita i trzustki, ale również w podwzgórzcu, części gruczołowej przysadki mózgowej oraz innych gruczołach dokrewnych. U człowieka mRNA ghreliny wykryto przy pomocy czulej techniki PCR praktycznie we wszystkich badanych narządach i komórkach, co może wskazywać na liczne funkcje tego peptydu poza ośrodkowym układem nerwowym [27]. Ponadto mRNA/peptyd ghreliny obecne są w wielu nowotworach wywodzących się z komórek endokrynnych [26].

RECEPTORY GHRELINY I MECHANIZMY WEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ TRANSDUKCJI SYGNAŁU

Odkryto dwa podtypy receptora, aktywny biologicznie GHS-R1a oraz nieaktywny GHS-R1b [65]. Gen kodujący GHS-R zawiera dwa egzony, jest on zlokalizowany na chromosomie 3 (3q26.2) [56]. GHS-R1a zbudowany jest z 366 aminokwasów, a jego masa cząsteczkowa wynosi 41 kDa, należy on do grupy receptorów o siedmiu domenach transbłonowych sprzężonych z białkami G. Natomiast GHS-R1b zbudowany jest z 289 aminokwasów, które tworzą 5 domen transbłonowych [65]. Ludzki GHS-R1a jest homologiczny w stosunku do szczurzego w 96%, a w stosunku do receptora świni w 93% [56].

Receptory ghreliny typu GHS-R1 występują we wszystkich komórkach syntetyzujących ghrelinę, w wielu strukturach układu nerwowego, które nie wykazują obecności mRNA ghreliny, a także w tkankach obwodowych (tab. 1). Większość danych przedstawionych w tabeli 1 uzyskano przy pomocy techniki PCR, w której stosowano startery nieodróżniające genu *GHS-R1a* od genu *GHS-R1b*. Po zastosowaniu odpowiednich starterów silną ekspresję genu *GSR-1a* zaobserwowano w podwzgórzcu, przysadce mózgowej oraz, na znacznie niższym poziomie, w tarczycy, trzustce, śledzionie, mięśni serca i nadnerczach, a więc w ograniczonej liczbie narządów [27]. Natomiast obecność mRNA receptorów typu GHS-R1b wykryto w znacznie większej liczbie narządów [27]. Aktywność metaboliczna nieacylowanej postaci ghreliny, która nie jest ligandem receptorów GHS-R1a, wskazuje na istnienie niezidentyfikowanej jeszcze innej podgrupy receptorów ghreliny [9,70]. Pod względem występowania receptorów typu GHS w obrębie przewodu pokarmowego występują dość duże różnice międzygatunkowe [21].

W ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) przyłączenie do receptora GHS-R agonistów naturalnych (ghreliny i des-Gln14-ghreliny) oraz syntetycznych stymulatorów wydzielania hormonu wzrostu (m.in. heksareliny i niepeptydowego agonisty MK-0677) prowadzi do aktywacji fosfolipazy C i podwyższenia wewnątrzkomórkowego stężenia trójfosforanu inozytolu i jonów wapnia [42]. Zjawisko to jest skutkiem napływu wapnia

TABELA 1. Występowanie ghreliny (mRNA i/lub peptyd) oraz receptorów GHS-R

Lokalizacja ghreliny		Występowanie receptorów GHS
Przewód pokarmowy (żołądek: trzon i dno > wpust żołądka > dwunastnica > jelito cienkie > jelito grube)	[21,22, 23,42,60]	Wszystkie komórki syntetyzujące ghrelinę (sąsiednia kolumna) oraz ośrodkowy układ nerwowy: podwzgórze (ARC, PVN, DMV, LHA), pień mózgu, jądro traktu samotnego i pole najdalsze, hipokamp, istota czarna, grzbietowe i brzuszne jądro szwu, pole brzuszne nakrywki, zakręt zębaty
Podwzgórze (jądro łukowate, grupa komórek wokół komory III)	[19,42,46]	Przysadka mózgowia
Przysadka mózgowia (komórki somato-, lakto- i tyrotropowe)	[14,43]	Tarczycza
Wyspy trzustkowe (brak u dorosłych szczurów)	[76]	Kora nadnerczy, gonady, płuca, wątroba
Tarczycza płodu	[60]	Wyspy trzustkowe
Kora nadnerczy (warstwa kłębkowata)	[1,27]	Żołądek i jelita
Nerka	[50]	Serce
Komórki tłuszczowe	[42]	Limfocyty T, monocyty
Mięśnie szkieletowe	[2]	
Mięsień sercowy i aorta	[35]	
Jądro (komórki Leydiga i Sertoliego)	[26]	
Łożysko	[27]	
Limfocyty T i monocyty	[25,79]	

przez kanały typu N, przy czym efekt ten zależny jest również od powstania cAMP oraz aktywacji kinazy białkowej A [43]. Podobnie jak receptory innych hormonów, GHS-R1a podlega także internalizacji i recyrkulacji: po związaniu ghreliny kompleks ligand-receptor ulega przemieszczeniu w postaci pęcherzyka endocytarnego do okolicy okołojądrowej w ciągu ok. 60 minut, zaś powrót receptora do błony komórkowej następuje po ok. 6 godzinach [13].

WPLYW GHRELINY NA OŚRODKI KONTROLUJĄCE POBIERANIE POKARMU I RÓWNOWAGĘ ENERGETYCZNĄ

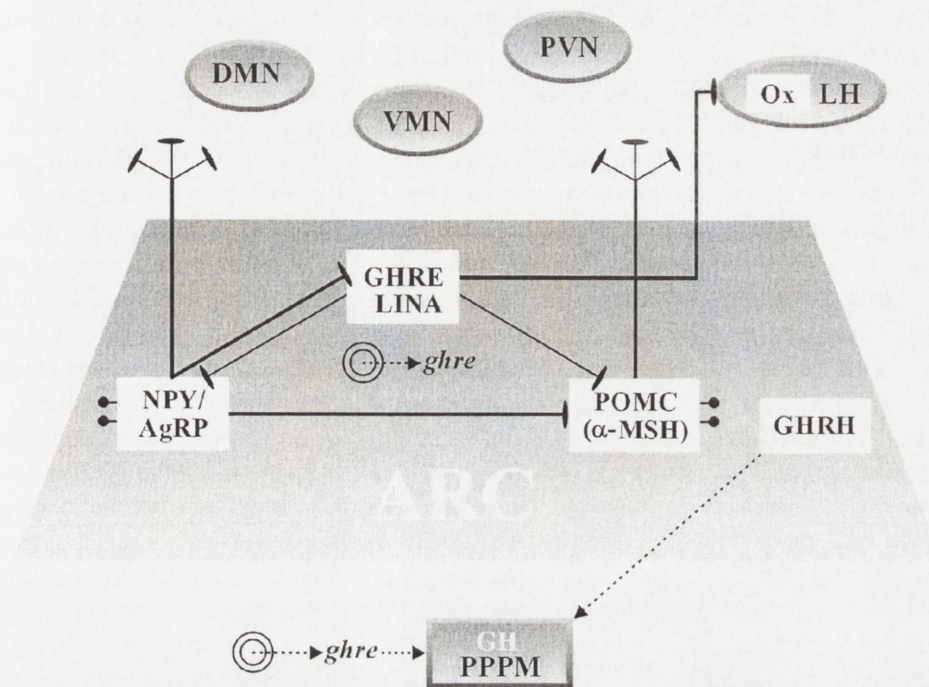
Wysunięta w latach pięćdziesiątych ub. wieku dualistyczna koncepcja ośrodkowej kontroli homeostazy energetycznej przez „ośrodek głodu” zlokalizowany w okolicy bocznej podwzgórza (LH, *lateral hypothalamic area*) oraz przez „ośrodek sytości” w jądrze brzuszno-przyśrodkowym podwzgórza (VMN, *ventromedial hypothalamic nucleus*) uległa znacznej modyfikacji w ciągu ostatnich kilkunastu lat. Uważa się obecnie, że w obrębie podwzgórza funkcjonuje kilka nakładających się na siebie czynnościowych sieci neuronalnych, które operują wykorzystując neurony zlokalizowane w podwzgórzu i pniu mózgu. Najważniejsze znaczenie przypisywane jest obecnie jądru łukowatemu (ARC, *arcuate hypothalamic nucleus*), które odbiera sygnały hormonalne i nerwowe (z innych struktur mózgowia) oraz jądra przykomorowego (PVN, *paraventricular nucleus*), które ma pełnić, w niewyjaśniony dokładnie sposób, rolę generatora bodźców wyzwalających złożone aktywności związane z pobieraniem pokarmu. Istotne znaczenie przypada też strukturom pnia mózgu (odbiór bodźców nerwowych z przewodu pokarmowego oraz sygnałów hormonalnych i metabolicznych docierających drogą krwi), a także jądra grzbietowo-przyśrodkowego podwzgórza (DMN, *dorsomedial nucleus*) i jądra okołosklepieniowemu (*perifornical nucleus*) [36].

Podwzgórzowy układ kontroli przyjmowania pokarmu w krótkiej perspektywie czasowej (mniej lub bardziej regularne epizody łaknienia i spożywania pokarmu w ciągu doby) oparty jest na antagonizmie najsilniejszego związku oreksygennego, neuropeptydu Y (NPY), który jest wytwarzany głównie w neuronach ARC oraz jednej z melanokortyn, anoreksygennego hormonu melanotropowego (α -MSH) powstającego w neuronach podwzgórza wytwarzających prekursor α -MSH, proopiomelanokortynę (POMC). W obrębie ARC około 90% neuronów zawierających NPY syntetyzuje też inny oreksygeny peptyd, AgRP (*agouti-related protein*), endogeny antagonist receptoru melanokortyn [36]), który hamuje uwalnianie α -MSH z leżących w bezpośrednim sąsiedztwie neuronów zawierających POMC [58]. Neurony NPY/AgRP oraz neurony POMC wysyłają liczne projekcje do wielu okolic podwzgórza. Wykazano, że główny mechanizm oreksygennego działania ghreliny w podwzgórzu polega na nasileniu ekspresji NPY oraz AgRP w neuronach jądra łukowatego [37,43,51,62,63]. Świadczą o tym obserwacje wskazujące na to, że zablokowanie aktywacji neuronów NPY/AgRP przez antagonistów receptora NPY typu 1 (Y1-R) [63] oraz przez przeciwciała antyghrelinowe [51] hamuje pobieranie pokarmu stymulowane przez ghrelinę. W badaniach elektrofizjologicznych izolowanych skrawków podwzgórza wykazano znaczne zwiększenie spontanicznej aktywności neuronów zawierających NPY pod wpływem ghreliny [19]. Jak

dotąd nie rozstrzygnięto, czy oreksygenne działanie ghreliny spowodowane jest aktywnością peptydu powstającego lokalnie w podwzgórzu, czy też hormonu wytwarzanego w tkankach obwodowych (głównie w żołądku), ponieważ ilość ghreliny syntetyzowana w podwzgórzu stanowi tylko niewielką część produkcji hormonu w żołądku [3,23]. Neurony zawierające ghrelinę zlokalizowane są w podwzgórzu w ciągłym paśmie komórek leżących bocznie od jądra przykomorowego, a następnie pomiędzy jądrem grzbietowo-przyśrodkowym i brzuszno-przyśrodkowym, w okolicy okołosklepieniowej, w ependymie III komory oraz w środkowej części jądra łukowatego [19,30,42]. Aksony tych neuronów docierają do presynaptycznych terminali neuronów leżących w ARC, DMN, LH oraz PVN, a także do innych struktur mózgu poza podwzgórzem [19,30]. Zaobserwowano, że w obrębie ARC neurony zawierające ghrelinę tworzą synaptyczne połączenia aksodendrytyczne i aksosomatyczne z neuronami NPY/AgRP oraz z neuronami POMC [19]. Występowanie obustronnych kontaktów synaptycznych między neuronami ghrelinowymi a neuronami NPY/AgRP w obrębie jądra łukowatego [30] może wskazywać na istnienie ujemnej pętli sprzężenia zwrotnego kontrolującej uwalnianie silnego oreksygeny, jakim jest NPY. Oreksygeny efekt działania ghreliny ulega dodatkowo wzmocnieniu pośrednio wskutek zahamowania przez AgRP syntezy anoreksygennego α -MSH w neuronach zawierających POMC, które sąsiadują z neuronami NPY/AgRP [19,58]. Pod wpływem ghreliny ulega też obniżeniu ekspresja receptorów leptyny w neuronach NPY/AgRP [73], co prowadzi do osłabienia anoreksygennego działania leptyny. Wpływ ghreliny na ośrodki podwzgórza uczestniczące w regulacji przyjmowania pokarmów przedstawiono schematycznie na rycinie 1.

Obok jądra łukowatego także inne części podwzgórza odgrywają istotną rolę w działaniu ghreliny: podanie tego peptydu do jądra bocznego silnie zwiększało immunoreaktywność białka Fos, wczesnego wskaźnika aktywacji neuronów, w takich jądrach podwzgórza, jak ARC, PVN i DMN [33]. Aksony zawierające ghrelinę tworzą bezpośrednie połączenia synaptyczne z neuronami LH produkującymi oreksynę (peptyd pobudzający apeptyt), zaś ośrodkowo podana ghrelina silnie indukuje białko Fos w oreksyno-immunoreaktywnych neuronach LH [54,72]. Zakończenia synaptyczne zawierające ghrelinę obserwowano też na aksonach neuronów zawierających NPY w jądrze przykomorowym oraz na niektórych neuronach tego jądra produkujących kortykoliberynę (CRF) [19]. Podanie ghreliny do jądra przykomorowego indukowało aktywność białka Fos w neuronach PVN, ARC, DMN, a także w neuronach ciała migdałowego i w jądrze pasma samotnego [53].

Przytoczone dane dokumentujące udział ghreliny w ośrodkowej kontroli pobierania pokarmu nie przesądzają o miejscu pochodzenia peptydu, który może docierać do podwzgórza zarówno drogą krwi, drogą dyfuzji poprzez narząd okołokomorowy, jak też może być uwalniany lokalnie z zakończeń nerwowych (ryc. 1). Transport ghreliny poprzez barierę krew-mózg zachodzi za pośrednictwem białka przenośnikowego w kierunku od krwi do mózgu oraz bez udziału transportera w kierunku od mózgu do krwi, jednak efektywność transportu domózgowego jest niewielka [7].



RYCINA 1. Schemat przedstawia w uproszczeniu sposób główne połączenia neuronów (prostokąty) pobudzających i hamujących pobieranie pokarmu w obrębie jądra łukowatego (ARC). Neuronów ghrelino-Ir (immunoreaktywne) (GHRE) tworzą połączenia z komórkami NPY/AgRP-Ir oraz POMC-Ir [19,30], z komórkami oreksyno-Ir (OX) w jądrze bocznym podwzgórza (LH) [71], a także z neuronami DMN, PVN oraz strukturami poza podwzgórzem [19,30]. Neuronów NPY/AgRP tworzą połączenia z komórkami ghrelino-Ir [30] oraz hamują aktywność komórek produkujących α-MSH [19]. Neuronów NPY/AgRP oraz POMC/α-MSH leżące w jądrze łukowatym mają receptory dla leptyny (Ob-R[•]) oraz wysyłają liczne projekcje do jąder podwzgórza (PVN, LH, VMN, DMN) oraz pnia mózgu, głównych ośrodków uczestniczących w kontroli pobierania pokarmu. Nie zaznaczono obecności receptorów leptyny na neuronach innych jąder podwzgórza oraz receptorów innych hormonów i neuropeptydów uczestniczących w kontroli równowagi energetycznej. W ARC znajdują się też neuronów syntetyzujące somatotropinę, GHRH, pobudzającą syntezę i uwalnianie hormonu wzrostu (GH) w przednim płacie przysadki mózgowej (PPPM). Podwójne koła oznaczają transport ghreliny (*ghre*) do ARC i PPPM drogą krwi

ROLA GHRELINY W MECHANIZMACH NERWOWEJ I HORMONALNEJ KONTROLI POBIERANIA POKARMU I RÓWNOWAGI ENERGETYCZNEJ. CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA STĘŻENIE GHRELINY W SUROWICY KRWI

Kontrola pobierania pokarmu następuje w wyniku skomplikowanych oddziaływań zachodzących na szlakach neurogennych i dokrewnych określanych jako oś: podwzgórze → pień mózgu → tkanki obwodowe albo oś: mózg → żołądek-jelita → tkanka tłuszczowa [44]. Kluczowe dla takiego ujęcia ma określenie relacji pomiędzy sygnałami ośrodkowymi generowanymi przede wszystkim w podwzgórzem a sygnałami obwodowymi, takimi, jak impulsacja neurogenna, hormony (m.in. cholecystokina, ghrelina,

leptyna, insulina) oraz wchłonięte produkty trawienia (glukoza, kwasy tłuszczowe, aminokwasy). Istotny aspekt w regulowaniu ilości przyjmowanego pokarmu, a tym samym kontrolowaniu zasobów energetycznych organizmu odgrywa także czas oddziaływania sygnałów na ośrodki sterujące. Wśród krótko działających czynników nerwowych, hormonalnych i metabolicznych wyróżnić można „sygnały sytości” (impulsy aferentne ze ściany przewodu pokarmowego, cholecystokinina i inne hormony żołądkowo-jelitowe, insulina, wzrost stężenia glukozy we krwi) oraz „sygnały głodu” reprezentowane głównie przez ghrelinę i obniżenie stężenia glukozy we krwi. Wydaje się natomiast, że leptyna (wydzielana głównie przez adipocyty, a także przez komórki główne błony śluzowej żołądka) stanowi czynnik, który w normalnych warunkach odzwierciedla poziom zasobów energetycznych (ilość trójglicerydów w adipocytach), dzięki czemu można ją uważać za sygnał decydujący o długoterminowej kontroli homeostazy energetycznej. Kontrola ta zachodzi zarówno poprzez ośrodki podwzgórza kontrolujące pobieranie pokarmu, jak i poprzez wpływ na narządy i tkanki obwodowe kluczowe dla magazynowania i przetwarzania substratów energetycznych, takie jak: tkanka tłuszczowa, mięśnie szkieletowe i wątroba. Leptyna stanowi jednocześnie „sygnał sytości”, ponieważ jej stężenie we krwi rośnie po zapoczątkowaniu spożywania pokarmu [5], zaś u prawidłowo odżywionych ludzi i zwierząt hormon ten hamuje pobieranie pokarmu po upływie kilku godzin po podaniu dożylnym, dokomorowym i do jądra łukowatego podwzgórza [74]. Obecność biologicznie aktywnej postaci receptora leptyny typu Ob-R stwierdzono na neuronach wielu jąder podwzgórza, a szczególnie duże ich zagęszczenie wykazano w jądrze łukowatym [18,74]. Aktywacja receptorów leptyny w podwzgórzu prowadzi do zahamowania uwalniania NPY oraz AgRP [36] i do wydzielania anoreksygennego α -MSH [18]. Zaproponowano, że leptyna wywiera stały tonizujący wpływ na aktywność neuronów NPY/AgRP, zaś zahamowanie jej działania na te komórki, m.in. przez zmniejszenie przez ghrelinę ekspresji Ob-R na tych komórkach [73], może zwiększać oreksygenne działanie NPY [36]. Ten zasadniczo prawdziwy, choć uproszczony, model antagonistycznego udziału ghreliny i leptyny w regulacji przyjmowania pokarmu poprzez ich oddziaływanie na neurony jądra łukowatego pomija wpływ tych hormonów na inne struktury ośrodkowego układu nerwowego, nie uwzględnia też roli insuliny jako hormonu uczestniczącego w długoterminowej regulacji homeostazy energetycznej.

Badania ostatnich lat wskazują na to, że ghrelina może stanowić główny sygnał niezbędny do zapoczątkowania karmienia i dostosowania ilości spożywanego pożywienia do wydatków energetycznych. Hormon ten, wydzielany przez żołądek w dużej ilości tuż przed rozpoczęciem pobierania pokarmu [20], może stanowić pierwotny sygnał uruchamiający aktywność oreksygenną podwzgórza. Stężenie ghreliny we krwi jest wysokie w stanie głodzenia [61,71,74] i szybko obniża się po rozpoczęciu karmienia [20]. Podczas głodzenia zawartość mRNA ghreliny w żołądku, podwzgórzu i przysadce mózgowej wielokrotnie rośnie [41,42,74], podobnie jak ekspresja receptorów GHS-R1a w podwzgórzu, co sprzyja szybkiej i skutecznej aktywacji mechanizmów pobudzających pobieranie pokarmu. Wydzielanie ghreliny, które ma charakter pulsacyjny, jest ściśle związane z rytmem okołodobowym: jej stężenie we krwi szczura silnie rośnie przed początkiem fazy ciemnej cyklu świetlnego i wyraźnie spada tuż po jej rozpoczęciu, czyli

po rozpoczęciu pobierania pokarmu [61]. U ludzi bodźce węchowe i smakowe, po których nie następowało spożywanie pokarmu (tzw. *sham feeding*), obniżały stężenie ghreliny we krwi, co wskazuje na istotną rolę układu nerwowego w regulacji wydzielania peptydu [4]. Obok ośrodków korowych i podkorowych ważną rolę odgrywa aktywacja układu przywspółczulnego, która prowadzi do sekrecji ghreliny, natomiast zablokowanie receptorów muskarynowych obniża poziom hormonu we krwi [11].

Wydzielanie ghreliny zmienia się w różnych fazach ontogenezy, przy czym obserwuje się specyfikę gatunkową: podczas starzenia się ludzi stężenie ghreliny w surowicy krwi ulega obniżeniu [59], podobnie jak zawartość mRNA ghreliny w żołądku starych myszy [48]. Natomiast stężenie ghreliny w surowicy krwi małp *Rhesus* jest niższe u zwierząt w średnim wieku, a podwyższone u osobników młodych i starych [2].

Przewlekłe podawanie ghreliny parenteralnie, dokomorowo lub w okolicę jądra łukowego prowadziło u kontrolnych, normalnie karmionych zwierząt i ludzi do zwiększonego pobierania pokarmu oraz umiarkowanego przyrostu masy ciała [78], który w znacznej mierze spowodowany był wzrostem masy tkanki tłuszczowej wskutek zmniejszonego zużycia lipidów [74]. Do pewnego stopnia stężenie ghreliny we krwi jest odwrotnie proporcjonalne do wskaźnika masy ciała (BMI): u osób otyłych poziom ghreliny jest obniżony [59], zaś redukcja masy ciała prowadzi u nich do wzrostu stężenia hormonu [31]; poziom ghreliny jest też wyższy u osób szczupłych oraz u chorych na jadłowstręt psychiczny [59]. U ludzi rodzaj pokarmu (bogaty w węglowodany, lipidy lub białka), płeć, stopień otyłości oraz występowanie insulinooporności wywierają istotny wpływ na stężenie ghreliny w surowicy krwi [8,28].

Zmiany stężenia ghreliny w surowicy krwi przebiegają przeciwnie niż leptyny, której stężenie we krwi rośnie po spożyciu posiłku, natomiast podczas głodzenia amplituda pulsów ghreliny rośnie, zaś leptyny maleje [5]. Różne czynniki i stany wpływające na stężenie ghreliny we krwi wymieniono w tabeli 2. Niejednoznaczny wpływ leptyny i insuliny na stężenie ghreliny w surowicy krwi (tab. 2) może wynikać z różnego okresu podawania tych hormonów oraz innego stanu odżywienia badanych zwierząt.

WPŁYW GHRELINY NA UWALNIANIE HORMONU WZROSTU I INNYCH HORMONÓW

Drugą, poza udziałem w regulacji przyjmowania pokarmu i homeostazy energetycznej, istotną funkcję ghreliny stanowi stymulacja uwalniania hormonu wzrostu, co wykazano *in vivo* [42,69] oraz *in vitro* [42]. Podobnie do syntetycznych związków pobudzających uwalnianie hormonu wzrostu (GHS) ghrelina pobudza uwalnianie GH [65] zarówno poprzez bezpośredni wpływ na komórki somatotropowe przysadki mózgowej [38], jak też pośrednio poprzez uwalnianie somatoliberyny [38,57]. Łączne podanie GHRH oraz ghreliny wywiera synergistyczny wpływ na wydzielanie hormonu wzrostu [32,57]. Wzrost stężenia GH we krwi pod wpływem ghreliny jest zależny od obecności receptorów typu GHS-R, ponieważ nie występuje u myszy pozbawionych genu tego

TABELA 2. Czynniki wpływające na stężenie ghreliny w surowicy krwi

Stężenie ghreliny we krwi			
obniża:		podwyższa:	
spożycie pokarmu	[20]	głodzenie	[20,71,74]
glukoza i dieta bogata w węglowodany	[20,28,74]	posiłek bogaty w lipidy (u człowieka)	[28]
insulina	[39,47]	hipoglikemia po podaniu insuliny	[71]
leptyna	[39]	glukagon	[39]
glukokortykoidy	[55]	leptyna	[71]
kortystatyna	[10]		
somatostatyna	[10,47]		
GLP-1 (<i>glucagon-like peptide 1</i>)	[47]		
gastryna	[47]		
GIP (<i>gastric inhibitory polypeptide</i>)	[47]		
otyłość	[31]		

receptora [66]. Z drugiej strony wykazano, że somatoliberyna nasila ekspresję genu ghreliny w przysadce mózgowej, a zmniejszenie sekrecji GHRH w stanach, takich jak: hyperkortyzolemia, nadczynność tarczycy i głodzenie, skorelowane jest z obniżoną zawartością ghreliny w przysadce [38]. W warunkach naturalnych u człowieka [45], ale nie u swobodnie poruszających się szczurów [52] zaobserwowano występowanie korelacji między pulsacyjnym wydzielaniem GH a pulsami sekrecji ghreliny w godzinach wieczornych i nocnych. Ghrelina znacznie słabiej podwyższa stężenie hormonu wzrostu w surowicy krwi osób w podeszłym wieku [8], co może wpływać na zmniejszenie amplitudy sekrecji GH w tym okresie życia.

Obecność ghreliny w komórkach somato-, lakto- i tyreotropowych (ale nie kortykotropowych) przysadki mózgowej wskazuje na możliwość udziału tego peptydu w regulowaniu funkcji tych komórek w drodze parakrynej [14]. U ludzi ghrelina podwyższa stężenie we krwi GH, prolaktyny, ACTH i kortyzolu [8], natomiast glikokortykosterydy zarówno endogenne, jak i egzogenne obniżają stężenie peptydu we krwi [54]. Obserwacje te wskazują na możliwość udziału ghreliny w regulacji odpowiedzi na stres.

Ghrelina wpływa też na obwodowe gruczoły dokrewne. W wyspach trzustkowych obecne są komórki (tzw. *small endocrine cells*) syntetyzujące ghrelinę, która prawdopodobnie oddziałuje na drodze parakrynej na inne komórki wysp Langerhansa [75]. Ghrelina syntetyzowana jest też w komórkach warstwy kłębkowatej kory nadnerczy, a jej miejscowe działanie może obejmować pobudzenie proliferacji tych komórek, przy braku stymulacji syntezy hormonów sterydowych [1]. W przeciwieństwie do nadnerczy, w jądrach szczura ghrelina, obok zwiększenia liczby komórek Leydiga, nasila syntezę i uwalnianie testosteronu [8].

DZIAŁANIE GHRELINY W UKŁADZIE POKARMOWYM I NACZYNIOWO-SERCOWYM

Występowanie komórek syntetyzujących ghrelinę w bezpośrednim sąsiedztwie innych komórek endokrynych, które produkują liczne peptydy wpływające na motorykę przewodu pokarmowego i wydzielanie soków trawiennych, nasunęło przypuszczenie o możliwym wpływie tego hormonu na funkcje tego układu. Istotnie, zaobserwowano, że parenteralne podanie ghreliny pobudza opróżnianie żołądka poprzez nasilenie skurczów mięśniówki gładkiej, a także wzrost kurczliwości innych odcinków cewy pokarmowej [21,24,49]. Wzrost wydzielania kwasu solnego w żołądku pod wpływem ghreliny zachodzi poprzez aktywację nerwu błędnego [49], ponieważ ghrelina nie wywiera bezpośredniego wpływu na aktywność sekrecyjną komórek okładzinowych żołądka produkujących kwas solny oraz komórek endokrynych żołądka wydzielających histaminę, gastrynę i somatostatynę [24]. Ghrelina działa cytoprotekcyjnie w stosunku do uszkodzeń błony śluzowej żołądka wywołanych u szczura przez podanie dożołądkowe podanie etanolu lub przez stres zanurzenia w wodzie: ochronny efekt hormonu zachodzi poprzez aktywację nerwu błędnego oraz zwiększenie miejscowego przepływu krwi wywołane przez tlenek azotu i prostaglandyny [12,64].

Interesujące dane przyniosły badania nad wpływem ghreliny na układ sercowo-naczyniowy. Ghrelina, a także syntetyczne stymulatory wydzielania hormonu wzrostu, wykazują właściwości kardioprotekcyjne w modelu reperfuzyjnego uszkodzenia mięśnia sercowego [15] oraz w hodowli komórkowej. Efekty te mogą być związane z hamowaniem apoptozy kardiomiocytów, przy czym podobne właściwości ma też nieacylowana postać ghreliny [6]. Ghrelina hamowała aktywację czynnika transkrypcyjnego NFκB oraz sekrecję cytokin prozapalnych indukowaną przez TNF (czynnik martwicy nowotworów) w hodowlach komórek śródbłonna naczyń, a także u zwierząt poddanych działaniu endotoksyny [46].

ROLA GHRELINY W ŚWIETLE BADAŃ NA GENETYCZNIE ZMODYFIKOWANYCH MYSZACH

Uzyskanie szczepów myszy pozbawionych genów ghreliny, jej receptora, NPY, AgRP, NPY i AgRP (tzw. podwójny nokaut) oraz receptora melanokortyny (MCH) typu 4 dostarczyło ciekawych obserwacji. Myszy pozbawione genu ghreliny mają fenotyp podobny do szczepu dzikiego: ich wzrost i masa ciała są prawidłowe, normalnie pobierają pokarm zarówno w warunkach podstawowych, jak i po stymulacji przez egzogenną ghrelinę [67], zaś ekspresja w podwzgórze neuropeptydów uczestniczących w kontroli pobierania pokarmu (NPY, AgRP i MCH) jest podobna do zwierząt szczepu dzikiego [67,77]. U myszy pozbawionych genu receptora GHS ghrelina nie stymuluje ani uwalniania hormonu wzrostu, ani pobierania pokarmu, co świadczy o kluczowej roli receptorów GHS-R w działaniu peptydu; jednak masa ciała takich zwierząt oraz ilość spożywanego przez nie pokarmu nie różnią się istotnie od myszy kontrolnych [66].

U myszy z delecją genu NPY obserwowano wyraźne zahamowanie pobierania pokarmu stymulowanego przez obwodowo podaną ghrelinę, delecja genu AgRP nie wywierała takiego efektu, natomiast u myszy z podwójną delecją genów NPY i AgRP ghrelina w ogóle nie pobudzała pobierania pokarmu, przy czym podstawowa, tj. niestymulowana aktywność pokarmowa była taka sama jak u kontroli [16]. Oreksygeny efekt ghreliny był także wyraźnie osłabiony u myszy pozbawionych genu receptora melanokortyny typu 4 (obecnego m.in. w komórkach POMC/ α -MSH podwzgórza), którego endogennym antagonistą jest AgRP, hamujący anoreksygenne działanie α -MSH [16]. Przedstawione dane wskazują na to, że ośrodkowa kontrola częstości przyjmowania pożywienia, ilości pokarmu i preferencji w wyborze jego odpowiedniego składu przebiega z udziałem kilku kluczowych neuropeptydów i hormonów obwodowych, których nakładające i uzupełniające się działanie stanowi rodzaj zabezpieczenia homeostatu energetycznego przed uszkodzeniami jego podstawowych elementów sterujących.

W świetle wyników przedstawionych badań można przypuszczać, że fizjologiczna rola ghreliny polega na tym, że stanowi ona generowany w żołądku (oraz w podwzgórzu) sygnał aktywujący mechanizmy nerwowe w obrębie podwzgórza i pnia mózgu, które prowadzą do zapoczątkowania pobierania pokarmu w stanach głodu i ujemnego bilansu energetycznego. Aktywność pokarmowa, pobudzana przez ghrelinę, wyraża się integracją czynności ruchowych, autonomicznych, sekrecji neuropeptydów i hormonów oraz wielokierunkową aktywacją układu pokarmowego. W warunkach fizjologicznych ghrelina prawdopodobnie uczestniczy także w kontroli uwalniania hormonu wzrostu. Poznane dotąd właściwości ghreliny wskazują na możliwość terapeutycznego stosowania tego peptydu lub agonistów jej receptora w stanach wyniszczenia organizmu (jadłowstręt psychiczny, AIDS lub choroba nowotworowa). Bliższe poznanie roli ghreliny w patogenezie takich zaburzeń metabolicznych, jak cukrzyca insulino-niezależna lub otyłość, może otworzyć inne możliwości terapeutycznego zastosowania ghreliny, jej agonistów lub antagonistów receptora GHS-R.

LITERATURA

- [1] ANDREISPG, MALENDOWICZLK, TREJTER M, NERIG, SPINAZZIR, ROSSIGP, NUSSDORFERGG. Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor are expressed in the rat adrenal cortex: evidence that ghrelin stimulates the growth, but not the secretory activity of adrenal cell. *FEBS Lett* 2003; **536**: 173–179.
- [2] ANGELONI SV, GLYNN N, AMBROSINI G, GARANT MJ, HIGLEY JD, SUOMI S, HANSEN BC. Characterization of the Rhesus monkey ghrelin gene and factors influencing ghrelin gene expression and fasting plasma levels. *Endocrinology* 2004; **145**: 2197–2205.
- [3] ARIYASU H, TAKAYA K, TAGAMI T, OGAWA Y, HOSODA N, AKAMIZU T, SUDA M, KOH T, NATSUI K, TOYOOKA S, SHIRAKAMI G, USUI T, SHIMATSU A, DOI K, HOSODA H, KOJIMA M, KANGAWA K, NAKAO K. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 4753–4758.
- [4] AROSIO M, RONCHI CL, BECK-PECCOZ P, GEBBIA C, GIAVOLI C, CAPPIELLO V, CONTE D, PERACCHI M. Effects of modified sham feeding on ghrelin levels in healthy human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 5101–5104

- [5] BAGNASCO M, KALRA PS, BAGNASCO M, KALRA PS, KALRA SP. Ghrelin and leptin pulse discharge in fed and fasted rats. *Endocrinology* 2002; **143**: 726–729.
- [6] BALDANZI G, FILIGHEDDU N, CUTRUPI S, CATAPANO F, BONISSONI S, FUBINI A, MALAN D, BAJ G, GRANATA R, BROGLIO F. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 2002; **159**: 1029–1037.
- [7] BANKS WA, TSCHOP M, ROBINSON SM, HEIMAN ML. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **302**: 822–827.
- [8] BROGLIO F, BENSO A, CASTIGLIONI C, GOTTERO C, PRODAM F, DESTEFANIS S, GAUNA C, VAN DER LELY AJ, DEGHENGI R, BO M, ARVAT E, GHIGO E. The endocrine response to ghrelin as a function of gender in humans in young and elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 1537–1542.
- [9] BROGLIO F, GOTTERO C, PRODAM F, GAUNA C, MUCCIOLI G, PAPOTTI M, ABRIBAT T, VAN DER LELY AJ, GHIGO E. Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 3062–3065.
- [10] BROGLIO F, KOETSVELD PV P, BENSO A, GOTTERO C, PRODAM F, PAPOTTI M, MUCCIOLI G, GAUNA C, HOFLAND L, DEGHENGI R, ARVAT E, VAN DER LELY AJ, GHIGO E. Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 4829–4832.
- [11] BROGLIO F, GOTTERO C, VAN KOETSVELD P, PRODAM F, DESTEFANIS S, BENSO A, GAUNA C, HOFLAND L, ARVAT E, van der LELY AJ, GHIGO E. Acetylcholine regulates ghrelin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 2429–2433.
- [12] BRZOWSKI T, KONTUREK PC, KONTUREK SJ, KWIECIEN S, ROZDOWICZ D, BIELANSKI W, PAJDO R, PTAK A, NIKIFORUK A, PAWLIK WW, HAHN EG. Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress-induced gastric damage. *Regul Pept* 2004; **120**: 39–51.
- [13] CAMINA JP, CARREIRA MC, EL MESSARIS, LLORENS-CORTES C, SMITH RG, CASANUEVA FF. Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. *Endocrinology* 2004; **145**: 930–940.
- [14] CAMINOS JE, NOGUEIRAS R, BLANCO M, SEOANE LM, BRAVO S, ALVAREZ CV, GARCIA-CABALLERO T, CASANUEVA FF, DIEGUEZ C. Cellular distribution and regulation of ghrelin messenger ribonucleic acid in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 2003; **144**: 5089–5097.
- [15] CHANG L, REN Y, LIU X, LI WG, YANG J, GENG B, WEINTRAUB NL, TANG C. Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; **43**: 165–170.
- [16] CHEN HY, TRUMBAUER ME, CHEN AS, WEINGARTH DT, ADAMS JR, FRAZIER EG, SHEN Z. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 2004; **145**: 2607–2612.
- [17] CHOI K, ROH SG, HONG YH, SHRESTHA YB, HISHIKAWA D, CHEN C, KOJIMA M, KANGAWA K, SASAKI S. The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology* 2003; **144**: 754–759.
- [18] COWLEY MA, SMART JL, RUBINSTEIN M, CERDAN MG, DIANO S, HORVATH TL, CONE RD, LOW MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 2001; **411**: 480–484.
- [19] COWLEY MA, SMITH RG, DIANO S, TSCHOP M, PRONCHUK N, GROVE KL. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003; **37**: 649–661.
- [20] CUMMINGS DE, PURNELL JQ, FRAYO RS, SCHMIDOVA K, WISSE BE, WEIGLE DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; **50**: 1714–1719.
- [21] DATE Y, KOJIMA M, HOSODA H, SAWAGUCHI A, MONDAL MS, SUGANUMA T, MATSUKURA S, KANGAWA K, NAKAZATO M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acetylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and human. *Endocrinology* 2000; **141**: 4255–4261.
- [22] DASS NB, MUNONYRARA M, BASSIL AK, HERVIEU GJ, OSBOURNE S, CORCORAN S, MORGAN M, SANGER GJ. Growth hormone secretagogue receptors in rat and human gastrointestinal tract and the effects of ghrelin. *Neuroscience* 2003; **120**: 443–453.
- [23] DE LA COUR CD, BJORKIQUIST M, SANDVIK AK, BAKKE I, ZHAO CM, CHEN D, HAKANSON R. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept* 2001; **99**: 141–150.

- [24] DE LA COUR CD, KINDSTROM E, NORLEN P, HAKANSON R. Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regul Pept* 2004; **120**: 23–32.
- [25] DIXIT VD, SCHAFFER EM, PYLE RS, COLLINS GD, SAKTHIVEL SK, PALANIAPPAN R, LILLARD JW, TAUB DD. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest* 2004; **114**: 57–66.
- [26] GAYTAN F, BARREIRO ML, CAMINOS JE, CHOPIN LK, HERINGTON AC, MORALES C, PINILLA L, PANIAGUA R, NISTAL M, CASANUEVA FF, AGUILAR E, DIEGUEZ C, TENA-SEMPERE M. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 400–409.
- [27] GNANAPAVAN S, KOLA B, BUSTIN SA, MORRIS DG, MCGEE P, FAIRCLOUGH P, BHATTACHARYA S, CARPENTER R, GROSSMAN AB, KORBONITS M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 2988–2991.
- [28] GREENMAN Y, GOLANI N, GILAD S, YARON M, LIMOR R, STERN N. Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; **60**: 382–388.
- [29] GUAN XM, YU H, PALLYHA OC, McKEE KK, FEIGHNER SD, SIRINATHSINGHI DJ, SMITH RG, VAN DER PLOEG LH, HOWARD AD. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; **48**: 23–29.
- [30] GUAN JL, WANG QP, KAGEYAMA H, TAKENOYA F, KITA T, MATSUOKA T, FUNAHASHI H, SHIODA S. Synaptic interactions between ghrelin- and neuropeptide Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Peptides* 2003; **24**: 1921–1928.
- [31] HANSEN TK, DALL R, HOSODA H, KOJIMA M, KANGAWA K, CHRISTIANSEN JS, JORGENSEN JO. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; **56**: 203–206.
- [32] HATAYA Y, AKAMIZU T, TAKAYA K, KANAMOTO N, ARIYASU H, SAIJO M, MORIYAMA K, SHIMATSU A, KOJIMA M, KANGAWA K, NAKAO K. A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 4552–4555.
- [33] HEWSON AK, DICKSON SL. Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *Neuroendocrinology* 2000; **12**: 1047–1049.
- [34] HOSODA H, KOJIMA M, MIZUSHIMA T, SHIMIZU S, KANGAWA K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem* 2003; **278**: 64–70.
- [35] IGLESIAS MJ, PINEIRO R, BLANCO M, GALLEGRO R, DIEGUEZ C, GUALILLO O, GONZALEZ-JUANATEY JR, LAGO F. Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2004; **62**: 481–488.
- [36] KALRA SP, KALRA PS. Neuropeptide Y: a physiological orexigen modulated by the feedback action of ghrelin and leptin. *Endocrine* 2003; **22**: 49–56.
- [37] KAMEGAI J, TAMURA H, SHIMIZU T, ISHII S, SHUGIHARA H, WAKABAYASHI I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 2001; **50**: 2438–2443.
- [38] KAMEGAI J, TAMURA H, SHIMIZU T, ISHII S, TATSUGUCHI A, SUGIHARA H, OIKAWA S, KINEMAN RD. The role of pituitary ghrelin in growth hormone (GH) secretion: GH-releasing hormone-dependent regulation of pituitary ghrelin gene expression and peptide content. *Endocrinology* 2004; **145**: 3731–3738.
- [39] KAMEGAI J, TAMURA H, SHIMIZU T, ISHII S, SUGIHARA H, OIKAWA S. Effects of insulin, leptin, and glucagon on ghrelin secretion from isolated perfused rat stomach. *Regul Pept* 2004; **119**: 77–81.
- [40] KANAMOTO N, AKAMIZU T, TAGAMI T, HATAYA Y, MORIYAMA K, TAKAYA K, HOSODA H, KOJIMA M, KANGAWA K, NAKAO K. Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology* 2004; **145**: 4144–4153.
- [41] KIM MS, YOON CY, PARK KH, SHIN CS, PARK KS, KIM SY, CHO BY, LEE HK. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *Neuroreport* 2003; **14**: 1317–1320.
- [42] KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, NAKAZATO M, MATSUO H, KANGAWA K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; **402**: 656–660.
- [43] KOHNO D, GAO HZ, MUROYA S, KIKUYAMA S, YADA T. Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* 2003; **52**: 948–956.

- [44] KONTUREK SJ, KONTUREK JW, PAWLIK T, BRZOZOWSKI T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol* 2004; **55**: 137–154.
- [45] KOUTKIA P, CANAVAN B, BREU J, JOHNSON ML, GRINSPOON SK. Nocturnal ghrelin pulsatility and response to growth hormone secretagogues in healthy men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; **287**: 506–512.
- [46] LI WG, GAVRILA D, LIU X, WANG L, GUNNLAUGSSON S, STOLL LL, MCCORMICK ML, SIGMUND CD, TANG C, WEINTRAUB NL. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation* 2004; **109**: 2221–2226.
- [47] LIPPL F, KIRCHER F, ERDMANN J, ALLESCHER HD, SCHUSDZIARRA V. Effect of GIP, GLP-1, insulin and gastrin on ghrelin release in the isolated rat stomach. *Regul Pept* 2004; **119**: 93–98.
- [48] LIU YL, YAKAR S, OTERO-CORCHON V, LOW MJ, LIU JL. Ghrelin gene expression is age-dependent and influenced by gender and the level of circulating IGF-I. *Mol Cell Endocrinol* 2002; **189**: 97–103.
- [49] MASUDA Y, TANAKA T, INOMATA N, OHNUMA N, TANAKA S, ITOH Z, HOSODA H, KOJIMA M, KANGAWA K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **276**: 905–908.
- [50] MORI K, YOSHIMOTO A, TAKAYA K, HOSODA K, ARIYASU H, YAHATA K, MUKOYAMA M, SUGAWARA A, HOSODA H, KOJIMA M, KANGAWA K, NAKAO K. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett* 2000; **486**: 213–216.
- [51] NAKAZATO M, MURAKAMI N, DATE Y, KOJIMA M, MATSUO H, KANGAWA K, MATSUKURA S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; **409**: 194–198.
- [52] OKIMURA Y, UKAI K, HOSODA H, MURATA M, IGUCHI G, IIDA K, KAJI H, KOJIMA M, KANGAWA K, CHIHARA K. The role of circulating ghrelin in growth hormone (GH) secretion in freely moving male rats. *Life Sci* 2003; **72**: 2517–2524.
- [53] OLSZEWSKI PK, GRACE MK, BILLINGTON CJ, LEVINE AS. Hypothalamic paraventricular injections of ghrelin: effect on feeding and c-Fos immunoreactivity. *Peptides* 2003; **24**: 919–923.
- [54] OLSZEWSKI PK, LI D, GRACE MK, BILLINGTON CJ, KOTZ CM, LEVINE AS. Neural basis of orexigenic effects of ghrelin acting within lateral hypothalamus. *Peptides* 2003; **24**: 597–602.
- [55] OTTO B, TSCHOP M, HELDWEIN W, PFEIFFER AF, DIEDERICH S. Endogenous and exogenous glucocorticoids decrease plasma ghrelin in humans. *Eur J Endocrinol* 2004; **151**: 113–117.
- [56] PETERSENN S, RASCH AC, PENSHORN M, BEIL FU, SCHULTE HM. Genomic structure and transcriptional regulation of human growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 2001; **142**: 2649–2659.
- [57] POPOVIC V, MILJIC D, MICIC D, DAMJANOVIC S, ARVAT E, GHIGO E, DIEGUEZ C, CASANUEVA FF. Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 3450–3453.
- [58] RIEDIGER T, TRAEBERT M, SCHMID H, SCHEEL C, LUTZ TA, SCHARRER E. Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 2003; **341**: 151–155.
- [59] RIGAMONTI AE, PINCELLI AI, CORRA B, VIARENGO R, BONOMO SM, GALIMBERTI D, SCACCHI M, SCARPINI E, CAVAGNINI F, MULLER EE. Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *J Endocrinol* 2002; **175**: 1–5.
- [60] RINDI G, NECCHI V, SAVIO A, TORSELLO A, ZOLI M, LOCATELLI V, RAIMONDO F, COCCHI D, SOLCIA E. Characterisation of gastric ghrelin cells in man and other mammals: studies in adult and fetal tissues. *Histochem Cell Biol* 2002; **117**: 511–519.
- [61] SANCHEZ J, OLIVER P, PICO C, PALOU A. Diurnal rhythms of leptin and ghrelin in the systemic circulation and in the gastric mucosa are related to food intake in rats. *Pflugers Arch* 2004; **448**: 500–506.
- [62] SEOANE LM, LOPEZ M, TOVAR S, CASANUEVA FF, SENARIS R. Agouti-related peptide, neuropeptide Y, and somatostatin-producing neurons are targets for ghrelin actions in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 2003; **144**: 544–551.
- [63] SHINTANI M, OGAWA Y, EBIHARA K, AIZAWA-ABE M, MIYANAGA F, TAKAYA K, HAYASHI T, INOUE G, HOSODA K, KOJIMA M, KANGAWA K, NAKAO K. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 2001; **50**: 227–232.
- [64] SIBILIA V, RINDI G, PAGANI F, RAPETTI D, LOCATELLI V, TORSELLO A, CAMPANINI N, DEGHENGI R, NETTI C. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. *Endocrinology* 2003; **144**: 353–359.
- [65] SMITH RG, SUN Y, BETANCOURT L, ASNICAR M. Growth hormone secretagogues: prospects and potential pitfalls. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004; **18**: 333–347.

- [66] SUN Y, WANG P, ZHENG H, SMITH RG. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 4679–4684.
- [67] SUN Y, AHMED Z, SMITH RG. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Molec Cell Biol* 2003; **23**:7973–7981.
- [68] SUNDLER F, HAKANSON R. Gastric endocrine cell typing at the light microscopic level. W: Hakanson R, Sundler F [red.] *The stomach as an endocrine organ*. Amsterdam: Elsevier 1991: 9–26.
- [69] TANNENBAUM GS, EPELBAUM J, BOWERS CY. Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology* 2003; **144**: 967–974.
- [70] THOMPSON NM, GILL DAS, DAVIES R, LOVERIDGE N, HOUSTON PA, ROBINSON ICAF, WELLS T. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly *in vivo* by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 2004; **145**: 234–242.
- [71] TOSHINAI K, MONDAL MS, NAKAZATO M, DATE Y, MURAKAMI N, KOJIMA M, KANGAWA K, MATSUKURA S. Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **281**: 1220–1225.
- [72] TOSHINAI K, DATE Y, MURAKAMI N, SHIMADA M, MONDAL MS, SHIMBARA T, GUAN JL, WANG QP, FUNAHASHI H, SAKURAI T, SHIODA S, MATSUKURA S, KANGAWA K, NAKAZATO M. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 2003; **144**: 1506–1512.
- [73] TRAEBERT M, RIEDIGER T, WHITEBREAD S, SCHARRER E, SCHMID HA. Ghrelin acts on leptin-responsive neurones in the rat arcuate nucleus. *J Neuroendocrinology* 2002; **14**: 580–586.
- [74] TSCHÖP M, SMILEY DL, HEIMAN ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; **407**: 908–913.
- [75] WIERUP N, YANG S, MCEVILLY RJ, MULDER H, SUNDLER F. Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J Histochem Cytochem* 2004; **52**: 301–310.
- [76] WILLESEN MG, KRISTENSEN P, ROMER J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 1999; **70**: 306–316.
- [77] WORTLEY KE, ANDERSON KD, GARCIA K, MURRAY JD, MALINOVA L, LIU R, MONCRIEFFE M, THABET K, COX HJ, YANCOPOULOS GD, WIEGAND SJ, SLEEMAN MW. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 8227–8232.
- [78] WREN AM, SEAL LJ, COHEN MA, BRYNES AE, FROST GS, MURPHY KG, DHILLO WS, GHATEI M, BLOOM SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **86**: 5992–5997.
- [79] XIA Q, PANG W, PAN H, ZHENG Y, KANG JS, ZHU SG. Effects of ghrelin on the proliferation and secretion of splenic T lymphocytes in mice. *Regul Pept* 2004; **122**:173–178.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 20.12.2004 r.

Przyjęto: 10.02.2005 r.

ul. Dębinki 1, 80-210 Gdańsk

e-mail: zkmiec@amg.gda.pl

BADANIE CHOROBY RESZTKOWEJ U CHORYCH NA SZPICZAKA MNOGIEGO. CZ. I. BADANIE ZA POMOCĄ CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ

MINIMAL RESIDUAL DISEASE ASSESSMENT IN MULTIPLE
MYELOMA PATIENTS. PART I. FLOW CYTHOMETRY METHOD

Małgorzata ROKICKA, Tigran TOROSIAN

Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych AM w Warszawie

Streszczenie Wprowadzenie nowoczesnych metod leczenia chorych na MM wiąże się z koniecznością poszukiwania lepszych technik oceny choroby resztkowej – MRD (ang. *minimal residual disease*) umożliwiających wczesne rozpoznanie i leczenie nawrotu choroby. Najczęściej stosuje się metody fenotypowania i cytometrii przepływowej oraz różne rodzaje ilościowego i jakościowego PCR. W artykule przedstawiono wady i zalety oraz zastosowanie kliniczne różnych metod badania MRD u chorych na MM.

Słowa kluczowe: szpiczak mnogi, choroba resztkowa, cytometria przepływowa.

Summary: Introducing of the new methods of treatment of MM patients is connected with necessity of searching for more sophisticated methods of MRD evaluation and earlier diagnosis and treatment of relapse. The most often used methods are the fenotyping with flow cytometry and different types of qualitative and quantitative PCR. The merits and drawbacks of different method MRD evaluation are described.

Key words: multiple myeloma, minimal residual disease, flow cytometry.

WPROWADZENIE

Szpiczak mnogi – MM (ang. *myeloma multiplex*) jest nowotworem, charakteryzującym się niekontrolowanym rozrostem plazmacytów. Choroba poddaje się leczeniu standardową chemioterapią, jednak niemożliwe jest za pomocą tej metody całkowite wyleczenie MM. Po leczeniu konwencjonalnym średni czas przeżycia chorych wynosi

30 miesięcy. Zastosowanie wysokodawkowanej chemioterapii wspomaganej przeszczepieniem autologicznych komórek macierzystych pozyskanych ze szpiku (ABMT z ang. *autologous bone marrow transplantation*) lub z krwi obwodowej (PBSCT z ang. *peripheral blood stem cell transplantation*) poprawiło wyniki leczenia – częściej udaje się uzyskać całkowitą remisję choroby, wydłużył się czas przeżycia chorych bez objawów choroby oraz czas ich całkowitego przeżycia. Jednak nadal nieuchronny jest nawrót choroby.

Postępy terapii MM stwarzają pilną potrzebę opracowania metod badania obecności MRD w celu monitorowania odpowiedzi na różne typy leczenia oraz analizy materiału przeszczepianego pod kątem zanieczyszczenia komórkami nowotworowymi. Badanie MRD może mieć również istotne znaczenie w poznaniu patofizjologii i biologii choroby [2].

PATOFIZJOLOGIA DOJRZEWANIA PLAZMOCYTÓW A IDENTYFIKACJA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH U CHORYCH NA MM

Możliwość badania MRD u chorych na MM jest uwarunkowana znajomością określonych, charakterystycznych cech komórek nowotworowych. Są one następnie identyfikowane za pomocą różnych metod.

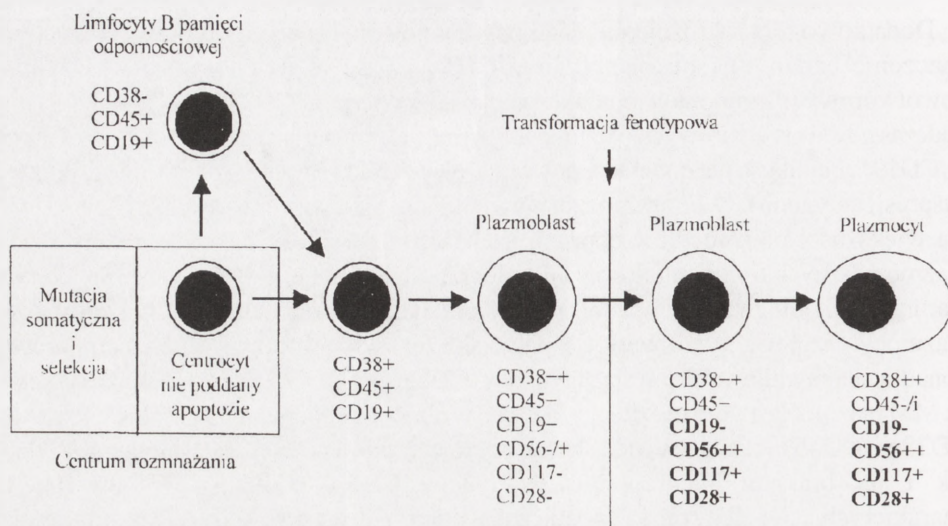
Główną populacją komórek nowotworowych MM, łatwo rozpoznawalną cytologicznie, są oczywiście plazmocyty. Nie można jednak rozróżnić w ten sposób plazmocyty patologicznych od prawidłowych, podczas gdy do klonu komórek nowotworowych w MM należą również postaci prekursorowe plazmocyty, czyli znajdujące się na różnych szczeblach dojrzewania limfocyty B [10,16]. W ostatnich piętnastu latach opracowano dokładniejsze techniki badawcze niezależniające identyfikację komórek MM od badania cytologicznego. Okazało się bowiem, że komórki nowotworowe, określane w piśmiennictwie również jako klonogenne, mogą charakteryzować się nietypową, różną od fizjologicznej, ekspresją antygenów powierzchniowych. Antygeny te wykrywa się swoistymi przeciwciałami monoklonalnymi znakowanymi fluorochromami za pomocą cytometrii przepływowej. Komórki nowotworowe można zidentyfikować także za pomocą nowoczesnych technik biologii molekularnej poprzez wykrycie swoistego przegrupowania genów kodujących informację dla części zmiennej łańcucha ciężkiego cząsteczek immunoglobulin (Ig). Techniki fenotypowania i molekularne będą przedmiotem odrębnego omówienia.

Transformacja fenotypowa, czyli pojawianie się nietypowego zestawu antygenów powierzchniowych na komórkach nowotworowych MM, ma miejsce najprawdopodobniej na szczeblu plazmoblastu. Fizjologicznie, w procesie dojrzewania limfocytów B po opuszczeniu ośrodków rozmnażania w węzle chłonny, ekspresja antygenów powierzchniowych: CD19, CD45 i Ig powierzchniowych (sIg) zmniejsza się, natomiast zwiększa się ekspresja antygeny CD38. Kolejne szczeble dojrzewania limfocytów B można określić poprzez badanie ekspresji swoistych antygenów powierzchniowych. Plazmocyty są komórkami charakteryzującymi się ekspresją antygenów powierzchniowych CD38⁺⁺/CD45ⁱ/CD19⁺, plazmoblasty określa fenotyp CD38⁺⁺/CD45⁺/CD19⁺, a limfocyty B: CD38⁻/CD45⁺/CD19⁺ [13].

Dodatkowo, dla rozróżnienia plazmocytów nowotworowych od prawidłowych ma znaczenie badanie ekspresji antygenów CD56 i CD138. U chorych na MM, klon nowotworowy plazmocytów charakteryzuje się fenotypem CD38⁺⁺/CD56⁺⁺/CD19⁺, podczas gdy u osób zdrowych plazmocytę cechuje ekspresja antygenów CD38⁺⁺/CD56⁻/CD19⁺. Populacja plazmocytów nowotworowych różni się zatem od zdrowych brakiem ekspresji antygenów CD 19 oraz raczej niewielkim natężeniem ekspresji antygenów CD56. Na większości plazmocytów chorych na MM oraz komórkach wywodzących się z plazmocytozarnych linii komórkowych stwierdza się ekspresję antygenów CD138, który w warunkach fizjologicznych jest obecny na dojrzałych plazmocytach [17]. Nowotworowe plazmocytę izolowane zarówno ze szpiku, jak i ze krwi obwodowej może znamionować ponadto nieprawidłowa ekspresja antygenów CD28, CD117 [7,13]. U większości chorych na MM plazmoblasty można zidentyfikować w obrębie subpopulacji komórek o fenotypie CD38⁺⁺/CD45⁺⁺; mogą się one charakteryzować zarówno ekspresją antygenów CD19⁺, jak i jej brakiem. Nieprawidłowe antygeny: CD56, CD117 i CD28 uważane za charakterystyczne dla komórek szpiczaka udaje się wykryć jedynie na komórkach pozbawionych ekspresji antygenów CD19 [14].

Utrata ekspresji antygenów CD19 przez plazmocytę jest uważana za charakterystyczny etap procesu transformacji nowotworowej tych komórek. Mohamoud i wsp. wykazali, że antygen CD19 bierze udział w regulacji proliferacji nowotworowych linii komórkowych wywodzących się z plazmocytów [9]. Białko identyfikowane przez przeciwciała CD19 może być produktem genu hamującego wzrost komórek w drodze przezbłonowej transdukcji sygnału. Przepuszczalnie ostatni etap onkogenezy w procesie powstawania MM dotyczy stadium plazmoblastu [6]. Komórki nowotworowe należące do klonu MM zidentyfikowano w populacji limfocytów B znajdujących się w stadium dojrzewania poprzedzającym etap plazmoblastu za pomocą ASO IgH RT-PCR, co potwierdza tę hipotezę [3,14].

Hipotetyczny przebieg transformacji nowotworowej w MM przedstawiono na rycinie 1. Najbardziej niedojrzałą komórką klonogenną jest limfocyt wywodzący się z ośrodków rozmnażania w węzle chłonny, czyli centrocyt powstały po stymulacji antygenowej i selekcji. W przeciwieństwie do warunków prawidłowych nie podlega on uśmierceniu w następstwie apoptozy. Centrocyty potencjalnie charakteryzuje zdolność do różnicowania się bądź do komórek pamięci odpornościowej, bądź do plazmoblastów. Proces ten wiąże się z uruchomieniem mechanizmu przegrupowania genów kodujących immunoglobuliny (Ig). Najczęstszy typ nieprawidłowości genetycznych u chorych na MM, czyli translokację 14q32 obejmującą rejon rekombinacji somatycznej genów dla Ig, wykrywa się także u osób z rozpoznaniem gammapatii monoklonalnej o nieustalonym znaczeniu (MGUS ang. *monoclonal gammopathy of undetermined significance*). MGUS stanowi najprawdopodobniej etap poprzedzający transformację nowotworową do komórek MM. Klonogenne limfocyty B lub plazmoblasty nie można uznać jeszcze za komórki nowotworowe, ale są one uniesmiertelnionym potomstwem centrocytów. Te ostatnie uważa się zatem za komórki prekursorowe MM [14]. Z tej również populacji wywodzi się najprawdopodobniej klon komórek opornych na wysokodawkowaną chemioterapię.



RYCINA 1. Dojrzewanie komórki szpiczakowej. Limfocyty B należą do klonu komórek szpiczaka. Najmniej różnicowaną komórką jest centrocyt, który po ekspozycji na antygen nie ginie w procesie apoptozy. Centrocyt może różnicować się do limfocytów B pamięci odpornościowej lub plazmocyty. Komórka pamięci odpornościowej może być komórką prekursorową dla szpiczaka. Na etapie plazmoblastu dochodzi do transformacji fenotypowej: zmniejsza się ekspresja antygenu CD19, następuje ekspresję markerów nowotworowych CD56, CD28, CD117 (zmodyfikowane – wg Ramussen i wsp.)

METODY BADANIA MRD

Standardowe kryteria remisji MM stosowane w praktyce klinicznej zaproponowali Blade i wsp. Obejmują one badanie: stężenia białka monoklonalnego w surowicy lub białkomoczu dobowego (w przypadkach choroby łańcuchów lekkich), odsetka plazmocyty w szpiku i ocenę swoistych zmian osteolitycznych w badaniu radiologicznym kości [4]. Wprowadzenie nowoczesnych metod leczenia, zwłaszcza wysokodawkowanej chemioterapii wspomaganą SCT, stworzyło nagłą potrzebę wynalezienia udoskonalonych metod badania choroby resztkowej (MRD) umożliwiających wykrywanie małych liczb komórek nowotworowych. Po transplantacji komórek krwiotwórczych konieczne jest precyzyjne monitorowanie chorych pod kątem pojawienia się komórek nowotworowych w szpiku lub w krwi obwodowej. Określanie całkowitej remisji MM klasycznymi metodami jest niewystarczające ze względu na ich małą czułość. W praktyce klinicznej ważne jest ponadto możliwie wczesne wykrycie nawrotu choroby. Nowoczesne protokoły lecznicze, pomimo coraz większej skuteczności, nie doprowadzają do usunięcia wszystkich klonogennych komórek MM z organizmu. Próg wykrywalności komórek nowotworowych za pomocą technik cytomorfologicznych wynosi 1–5%, co w praktyce oznacza, że dostarczają one jedynie orientacyjnych informacji na temat skuteczności leczenia. Ponadto w przypadku leczenia przeszczepianiem autologicznych komórek macierzystych istotne jest określenie stopnia „zanieczyszczenia” materiału przeszczepowego komórkami nowotworowymi. Pożądana czułość technik oceniających MRD wynosi co najmniej 10^{-3} komórek (jedna komórka

nowotworowa na 1000 prawidłowych). Docelowo poszukuje się metod umożliwiających precyzyjne wykrywanie i monitowanie MRD charakteryzujących się czułością od 10^{-4} do 10^{-6} komórek MM.

W ostatnich kilkunastu latach wprowadzono wymienione poniżej metody badania MRD u chorych na MM:

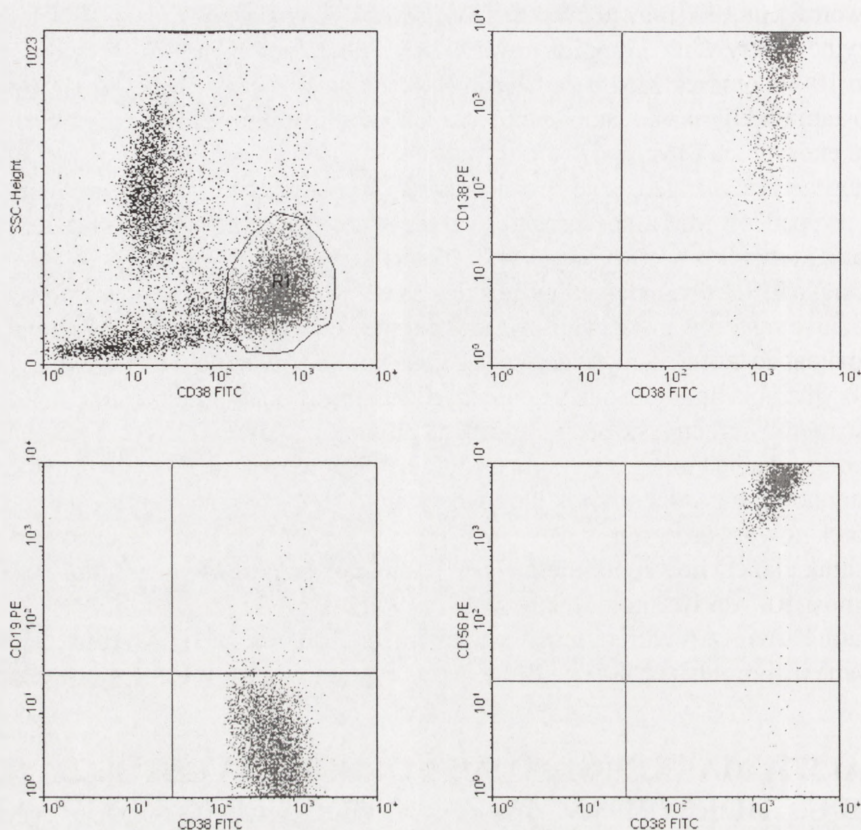
- a) cytogenetyka: charakteryzuje się czułością 10^{-2} komórek, zastosowanie jest ograniczone do przypadków MM z obecnością charakterystycznej aberracji chromosomalnej i użycia komórek nowotworowych w fazie metafazy cyklu komórkowego,
- b) technika FISH: charakteryzuje się czułością 10^{-2} do 10^{-3} komórek nowotworowych, możliwe zastosowanie również tylko w przypadkach z określoną aberracją chromosomalną, do której identyfikacji są dostępne komplementarne sondy DNA [5],
- c) hybrydyzacja Southern służy do identyfikacji określonego fragmentu DNA – czułość metody szacuje się na 10^{-2} do 10^{-3} komórek nowotworowych,
- d) fenotypowanie komórek za pomocą cytometrii przepływowej – analiza markerów immunologicznych komórek klonogennych MM, czułość szacuje się na 10^{-3} komórek nowotworowych,
- e) technika łańcuchowej polimerazy (PCR ang. *polymerase chain reaction*) czułość wynosi 10^{-4} do 10^{-5} komórek nowotworowych.

Ostatnie dwie z wymienionych wyżej metod badania MRD są coraz częściej stosowane u chorych na MM i będą one przedmiotem szczegółowego omówienia.

ANALIZA MARKERÓW IMMUNOLOGICZNYCH – BADANIE MRD U CHORYCH NA MM ZA POMOCĄ FENOTYPOWANIA I CYTOMETRII PRZEPLÝWOWEJ

Harada i wsp. wykazali za pomocą techniki dwukolorowej cytometrii przepływowej, że jednocześnie oznaczenie ekspresji antygeny CD38 przeciwciałami znakowanymi FITC i ekspresji antygenów: VLA-4, VLA-5, MPC-1, CD44, CD55, CD19, CD20, CD24, CD10 przy użyciu przeciwciał znakowanych PE umożliwia odróżnienie plazmacytów nowotworowych od prawidłowych. Jak uprzednio wspomniano, u osób zdrowych plazmocyty identyfikowane jako CD38⁺⁺ charakteryzują się ekspresją antygeny CD19, natomiast są niemal pozbawione ekspresji antygeny CD56. U chorych na MM komórki CD38⁺⁺ nie wykazują ekspresji antygeny CD19, natomiast w większości przypadków wykrywa się antygen CD56. Wyniki badań Harady i wsp. potwierdziły tę obserwację. Badania chorych z rozpoznaniem MGUS, uważanej za stan poprzedzający ujawnienie się MM, wykazały po analizie ekspresji tych trzech antygenów występowanie zarówno plazmacytów o prawidłowym, jak i nowotworowym fenotypie. Oznaczanie ekspresji wymienionych antygenów może zatem służyć do rozpoznawania i monitorowania leczenia chorych na MM i MGUS w praktyce klinicznej [7, 8]. Ilustrację metody badania fenotypowego komórek nowotworowych MM przedstawiono na rycinie 2.

Techniką cytometrii przepływowej posłużył się Pope i wsp. do badania zanieczyszczenia komórkami nowotworowymi materiału przeszczepowego uzyskanego w drodze



RYCINA 2. Przykładowy wynik fenotypu komórek szpiku chorego na szpiczaka mnogiego (ze zbiorów Kliniki)

leukaferez. Metodę oznaczania antygenów CD38⁺⁺ na komórkach nowotworowych wzbogacono o wykrywanie poziomu tzw. restrykcji łańcuchów lekkich w tych komórkach, czyli określania stosunku cytoplazmatycznych łańcuchów lambda do kappa. Obecność jednego rodzaju łańcuchów lekkich w plazmocytach dowodzi ich charakteru nowotworowego. We wszystkich badanych produktach leukaferez stwierdzono obecność plazmocytoz, ale restrykcję izotypową (jeden rodzaj łańcuchów lekkich w komórkach) stwierdzono jedynie w 16% badanych próbek. Autorzy wnioskują, że plazmocyty obecne w produktach leukaferez w większości reprezentują typ poliklonalny wytwarzania łańcuchów lekkich, ale niektóre z nich charakteryzują się typem monoklonalnym identyfikowanym zwłaszcza we frakcji dojrzałych plazmocytoz [12].

Porównywano również stopień zanieczyszczenia komórkami nowotworowymi produktów leukaferez u chorych na MM, w grupach mobilizowanych tradycyjnie tylko cyklofosfamidem oraz poprzez chemioterapię nacelowaną na tzw. oczyszczanie *in vivo* (ang. *purging in vivo*) polegające na podaniu skojarzonej, sekwencyjnej chemioterapii wysokodawkowanej zawierającej poza cyklofosfamidem, wepezyd oraz deksametazon w celu zmniejszenia stopnia potencjalnej MRD. Zastosowano oznaczenie

liczby plazmocytoów nowotworowych za pomocą cytometrii przepływowej określając ekspresję antygenów CD38 i CD138 z jednoczesną ekspresją nieprawidłowego antygeny CD138 na tych komórkach. Stwierdzono, że chemoterapia skierowana na oczyszczanie *in vivo* umożliwi uzyskanie materiału przeszczepowego o mniejszym zanieczyszczeniu komórkami klonogennymi MM, ale ich nie eliminuje [11].

Almeida i wsp. wykazali, że czułość badania MRD za pomocą cytometrii przepływowej można zwiększyć poprzez jednoczesne oznaczanie zawartości DNA w komórkach MM. U około 60% chorych na MM stwierdza się aneuploidię. Badaniem objęto grupę chorych w okresie remisji całkowitej ustalonej zgodnie z klasycznymi kryteriami. Równoczesne immunofenotypowanie i badanie zawartości (ploidy) DNA przeprowadzono w próbkach szpiku i materiału przeszczepowego uzyskanego w drodze leukaferoz. W oddzielonej populacji komórek CD 38+++/138+ oznaczano występowanie nieprawidłowego fenotypu CD56+, CD28+ oraz CD33+ i asynchronicznej ekspresji antygenów CD117, sIg i CD20. Badanie zawartości DNA oparto na barwieniu jodkiem propydydy. Zastosowanie tych dwu technik umożliwiło wykrycie nieprawidłowego lub/i aneuploidalnego fenotypu u 95% chorych. Cechy MRD stwierdzano zarówno w szpiku chorych po PBSCT, jak i w próbkach materiału przeszczepowego. Autorzy szacują czułość opisanej metody na 10^{-5} , co odpowiada w przybliżeniu czułości metod molekularnych [1].

W 2002 roku Rawstron i wsp. opublikowali wyniki badania MRD jednocześnie za pomocą dwu metod: cytometrii przepływowej i PCR u chorych na MM leczonych wysokodawkowaną chemioterapią. Autorzy zastosowali metodę cytometrii przepływowej ze specjalnym sposobem wstępnego bramkowania i separacji komórek nowotworowych MM na podstawie ekspresji antygenów CD138 i CD19. Z uzyskanej w ten sposób populacji komórek izolowano następną, wysoce oczyszczoną populację komórek nowotworowych, charakteryzującą się ekspresją antygenów CD19 i CD56. Autorzy podkreślają, że duże znaczenie dla tego rodzaju diagnostyki ma jakość badanego materiału, która zależy od techniki pobrania szpiku (konieczne badanie pierwszej puli komórek z aspiratu szpiku), jakość i precyzja bramkowania komórek w trakcie wykonywania badania. Przy zachowaniu wskazanych warunków czułość metody jest zbliżona do czułości metod molekularnych, a nawet może ją przewyższać, biorąc pod uwagę trudności techniczne wykonywania niektórych metod molekularnych. Analiza materiału klinicznego umożliwiła wyodrębnienie grup chorych o różnym rokowaniu w zależności od stopnia MRD [15]. Metoda podwójnego, stopniowanego bramkowania w czasie cytometrii przepływowej wydaje się obiecująca, jednak dla oceny jej znaczenia klinicznego konieczne są dalsze badania porównawcze przeprowadzane przez inne ośrodki.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALMEIDA J., ORFAO A., OCQUETEAU M., MATEO G., CORRAL M., CABALLERO M. D. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1999; **107**: 121–131.
- [2] ATTAL M., HAROSSEAU JL., STOPPA AM., SOTTO JJ, FUZIBET JG, ROSSI JF, CASASSUS P, MAISONNEUVE H, FACON T, IFRAH N, PAYEN C, BATAILLE R. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *New Engl J Med* 1996; **335**: 991–997.

- [3] BILLADEAU D, AHMANN G, GREIPP P, VAN NB. The bone marrow of multiple myeloma patients contains B cell populations at different stages of differentiation that are clonally related to the malignant plasma cell. *J Exp Med* 1993; **178**: 1023–1031.
- [4] BLADE J, SAMSON D, RECCE D, APPERLEY J, BJORKSTRAND B, GAHRTON G, GERTZ M, GIRALT S, JAGANATH S, VESOLE D. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 1998; **102**: 1115–1123.
- [5] GENEVIEVE F, ZANDECKI M, LAI JL, HENNACHE B, FAUCOMPRES JL, STALNIKIEWICZ L, BAUTERS F, FACON T. Evaluation of minimal residual disease by interphase FISH in multiple myeloma: does complete remission exist? *Leukemia* 1999; **13**: 641–644.
- [6] HALLEK M, LEIF BP, ANDERSON KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998; **91**: 2–21.
- [7] HARADA H, KAWANO MM, HUANG N, HARADA Y, IWATO K, TANABE O, SAKAI A, ASAOKU H, KURAMOTO A. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 1993; **81**: 2658–2663.
- [8] LIN P, OWENS R, TRICOT G, WILSON C S. Flow cytometric immunophenotypic analysis of cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* 2004; **121**: 482–488.
- [9] MAHMOUD MS, FUJI R, ISHIKAWA H, KAWANO MM. Enforced CD19 expression leads to growth inhibition and reduced tumorigenicity. *Blood* 1999; **94**: 3551–3558.
- [10] OCQUETEAU M, ORFAO A, ALMEIDA J, BLADE J, GONZALES M, GARCIA-SANZ R, LOPEZ-BERGES MC, MORO MJ, HERNANDEZ J, ESCRIBANO L, CABALLERO MD, ROZMAN M, SAN-MIGUEL JF. Gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol* 1998; **152**: 1655–1665.
- [11] OMEDE P, TARELLA C, PALUMBO A, ARGENTINI CH, CARACCILOLO D, CORRADINI P, DOMINIETTO A, GIARETTA F, RAVAGLIA R, TRIOLO R, TRIOLO S, PILERI A, BOCCADORO M. Multiple myeloma: reduced plasma cell contamination in peripheral blood progenitor cell collections performed after repeated high-dose chemotherapy courses. *Br J Haematol* 1997; **99**: 685–691.
- [12] POPE B, BROWN, GIBSON J, JOSHUA D. Plasma cell in peripheral blood stem cell harvests from patients with multiple myeloma are predominantly polyclonal. *Bone Marrow Transplant* 1997; **20**: 205–210.
- [13] RASMUSSEN T, JENSEN L, JOHNSEN HE. The clonal hierarchy in multiple myeloma. *Acta Oncol* 2001; **39**: 765–770.
- [14] RASMUSSEN T. The presence of circulating clonal CD19 cells in multiple myeloma. *Leuk Lymph* 2001; **42**: 1359–1366.
- [15] RAWSTRON AC, DAVIES FE, DASGUPTA A R, ASHCROFT J, PATMORE R, DRAYSON MT, OWEN RG, JACK AS, CHILD JA, MORGAN GJ. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002; **100**: 3095–3100.
- [16] RUIZ-ARGUELLES GJ, SAN MIGUEL JF. Cell surface markers in multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 1994; **69**: 684–690.
- [17] WIJDENES J, VOOJI WC, CLEMENT C, POST J, MORARD F, VITA N, LAURENT P, SUN RX, KLEIN B, DORE JM. A plasmacyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 1996; **94**: 318–323.

Redaktor prowadzący – Jan Żeromski

Otrzymano: 01.10.2004 r.

Przyjęto: 04.03.2005 r.

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

e-mail: mrokicka@amwaw.edu.pl

BADANIE CHOROBY RESZTKOWEJ U CHORYCH NA SZPICZAKA MNOGIEGO. CZ. II. ANALIZA MARKERÓW MOLEKULARNYCH

MINIMAL RESIDUAL DISEASE ASSESSMENT IN MULTIPLE
MYELOMA PATIENTS. PART II. MOLECULAR MARKERS ANALYSIS

Małgorzata ROKICKA, Tigran TOROSIAN

Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych AM w Warszawie

Streszczenie: Wprowadzenie nowoczesnych metod leczenia chorych na MM wiąże się z koniecznością poszukiwania lepszych technik oceny choroby resztkowej (MRD, ang. *minimal residual disease*) umożliwiających wczesne rozpoznanie i leczenie nawrotu choroby. Najczęściej stosuje się metody fenotypowania i cytometrii przepływowej oraz różne rodzaje ilościowego i jakościowego PCR. W artykule przedstawiono wady i zalety oraz zastosowanie kliniczne różnych metod badania MRD u chorych na MM.

Słowa kluczowe: szpiczak mnogi, choroba resztkowa, PCR, PCR w czasie rzeczywistym.

Summary: Introducing of the new methods of treatment of MM patients is connected with necessity of searching for more sophisticated methods of MRD evaluation and earlier diagnosis and treatment of relapse. The most often used methods are the fenotyping with flow cytometry and different types of qualitative and quantitative PCR. The merits and drawbacks of different method MRD evaluation are described.

Key words: Multiple myeloma, minimal residual disease, PCR, real time PCR.

WPROWADZENIE

Szpiczak mnogi (MM, ang. *myeloma multiplex*) jest nowotworem, charakteryzującym się niekontrolowanym rozrostem plazmocytołów. Choroba poddaje się leczeniu standardową chemioterapią, jednak niemożliwe jest za pomocą tej metody całkowite wyleczenie MM. Po leczeniu konwencjonalnym średni czas przeżycia chorych wynosi 30 miesięcy. Zastosowanie wysokodawkowanej chemioterapii wspomaganą przeszczec-

pieniem autologicznych komórek macierzystych pozyskanych ze szpiku (ABMT z ang. *autologous bone marrow transplantation*) lub z krwi obwodowej (PBSCT z ang. *peripheral blood stem cell transplantation*) poprawiło wyniki leczenia – częściej udaje się uzyskać całkowitą remisję choroby, wydłużył się czas przeżycia chorych bez objawów choroby oraz czas ich całkowitego przeżycia. Jednak nadal nieuchronny jest nawrót choroby.

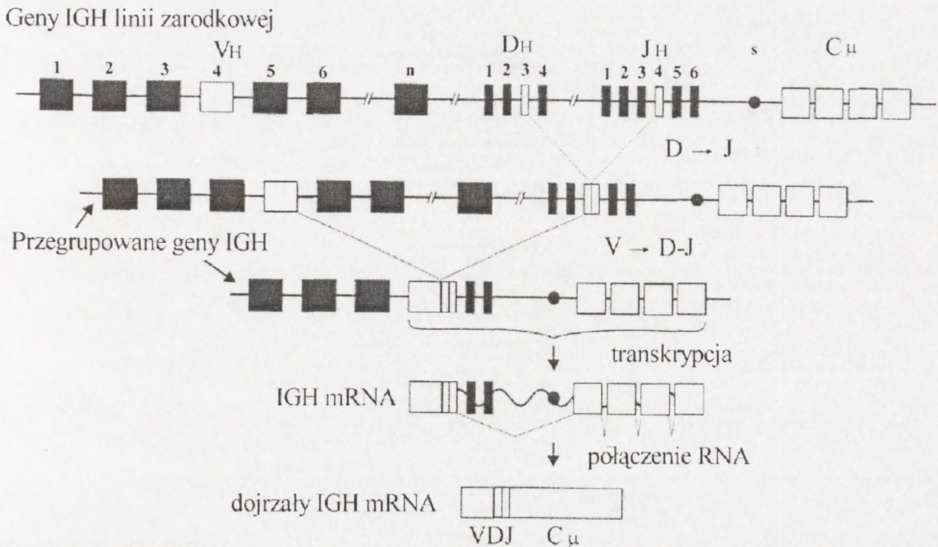
Postępy terapii MM stwarzają pilną potrzebę opracowania metod badania obecności MRD w celu monitorowania odpowiedzi na różne typy leczenia oraz analizy materiału przeszczepianego pod kątem zanieczyszczenia komórkami nowotworowymi. Badanie MRD może mieć również istotne znaczenie w poznaniu patofizjologii i biologii choroby.

ANALIZA MARKERÓW MOLEKULARNYCH. ZASTOSOWANIE JAKOŚCIOWEJ REAKCJI ŁAŃCUCHOWEJ POLIMERAZY (PCR) W BADANIU MRD U CHORYCH NA MM

Układ odporności jest zdolny do rozpoznawania i odpowiedzi na szeroką gamę antygenów dzięki ogromnej zmienności przeciwciał produkowanych przez limfocyty B, a zwłaszcza różnorodności miejsc wiążących antygen w Ig. O swoistym rozpoznawaniu różnych antygenów decydują części zmienne łańcuchów ciężkich i lekkich Ig. Zróżnicowanie odpowiedzi immunologicznej jest pochodną rekombinacji genowych oraz ich dodatkowym przegrupowaniem w okresie transkrypcji materiału genetycznego.

Proces generowania zmienności przeciwciał jest niezwykle złożony. W okresie wczesnych etapów różnicowania komórek układu odpornościowego, każdy odcinek zmienny Ig jest kodowany przez dwa lub więcej segmenty genu, połączone ze sobą w procesie przegrupowania DNA kodującego Ig. Domena zmienna łańcucha Ig jest kodowana przez gen złożony z sekwencji dla części zmiennej (*V* ang. *variable*), różnorodności (*D* ang. *diversity*), i łączącej (*J* ang. *joining*). Proces rekombinacji genów dla łańcucha ciężkiego Ig zaczyna się od połączenia genu *D* z *J*, następnie jest przyłączany gen *V*. Uproszczony schemat organizacji genów dla Ig przedstawiono na rycinie 1. Dodatkowa modyfikacja budowy Ig zwiększająca jej różnorodność zachodzi między innymi poprzez: delecje niektórych nukleotydów w łańcuchu DNA, nieprecyzyjne łączenie się egzonów oraz dodawaniu na złączach VDJ sekwencji kilkunukleotydowych kodujących dodatkowe aminokwasy.

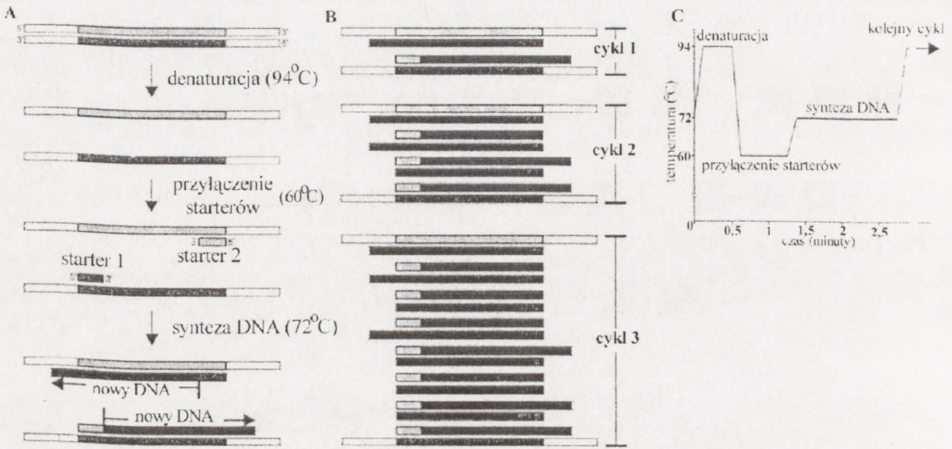
Repertuar swoistości Ig może być dodatkowo zwiększony i adaptowany po ekspozycji limfocytów na różne antygeny. Proces ten nosi nazwę mutacji somatycznych, kiedy nieliczne geny linii zarodkowej dają początek wielu zmutowanym genom w czasie życia osobnika podczas cięcia i łączenia nici DNA do wolnych końców. Ponadto mogą przyłączać się również dodatkowe nukleotydy, a wiele różnych fragmentów genów może podlegać rekombinacji przed utworzeniem genu *V*. Mutację somatyczne oraz rekombinacje somatyczne są czasem spotykane również w niektórych nowotworach



RYCINA 1. Schemat przegrupowania genów dla ludzkiego genu IgH, w tym przypadku DH3 jest w pierwszym etapie przyłączony do JH4. Następnie VH4 przyłącza się do DH3-JH4

układu chłonnego. Odcinek łączący J w powstałym w ten sposób łańcuchu Ig jest niepowtarzalny, charakterystyczny osobniczo, bywa porównywany do linii papilarnych. Jest on typowy nie tylko dla każdego limfocytu oraz również dla nowotworu wywodzącego się z układu chłonnego. Jest on, zatem idealnym celem badania MRD za pomocą technik molekularnych, np. najbardziej popularnej PCR, w których stosuje się swoiste sondy o budowie komplementarnej do poszukiwanego nieprawidłowego odcinka genu [29].

Technika PCR umożliwia wybiórczą amplifikację określonego regionu DNA [32] i polega na przeprowadzeniu wielu cykli syntezy DNA z wykorzystaniem starterów flankujących określony odcinek DNA. Warunkiem wykonania badania jest znajomość sekwencji nukleotydów ograniczających powielany odcinek DNA tak, aby można było syntetyzować dwa komplementarne startery o długości ok. 20 nukleotydów. Typowa reakcja obejmuje 30 powtarzających się cyklicznie etapów: termicznej denaturacji powielanego DNA, wiązania starterów z matrycą i syntezy DNA (ryc. 2). Analiza produktów PCR polega na ich uwidocznieniu poprzez elektroforezę w żelach agarozowych lub poliakrylamidowych oraz ocenie wielkości amplifikowanego DNA przez porównanie względem wzorca. Zwiększone ilości powielanego fragmentu DNA, w którym występuje poszukiwana mutacja lub polimorfizm otrzymane w następstwie reakcji, służą do dalszej analizy badanego materiału genetycznego za pomocą technik, takich jak np. badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR RFLP, ang. *restriction fragment length polymorphism*) lub klonowanie i sekwencjonowanie materiału genetycznego [27]. Niektóre z nich, znajdujące zastosowanie w badaniu MRD u chorych na MM, będą przedmiotem dalszego omówienia.



RYCINA 2. Schemat przebiegu reakcji PCR: A – Fazy reakcji PCR przebiegają w różnych temperaturach: w 94°C – DNA podlega denaturacji, w 60°C – przyłączenie starterów do nici DNA, 72°C – synteza DNA przy udziale Taq polimerazy. W pierwszym cyklu reakcji amplifikacji ulega cała nić DNA i powstaje tak zwany długi produkt. B – W następnych cyklach matrycą staje się tzw. długi produkt DNA, po amplifikacji powstają „krótkie produkty PCR”. Każdy cykl podwaja liczbę produktów PCR. C – Zależność przebiegu reakcji od temperatury. Każdy cykl trwa 5–10 min, zależnie od wielkości produktu PCR

Najlepszym markerem molekularnym dla MM jest odcinek genu zawierający informację odnośnie budowy łańcucha ciężkiego Ig. Charakteryzuje się on największą różnorodnością w zakresie sekwencji biblioteki egzonów V-D, D-J. Jest to tak zwany odcinek nadzmienny – CDR 3 (ang. *chain determining region 3*) genu dla Ig. Brisco i wsp. opracowali najczęściej stosowaną, do dziś bardzo popularną technikę PCR umożliwiającą amplifikację regionu CR 3 o budowie unikalnej dla każdego indywidualnego przypadku MM [4]. Badania PCR wykonano na materiale genetycznym uzyskanym z różnych nowotworowych linii komórkowych, przy użyciu starterów komplementarnych do tzw. uzgodnionych (z ang. *consensus*) sekwencji odcinków V- i J-genu dla łańcucha ciężkiego Ig. Billadeau i wsp. udoskonalili tę technikę konstruując tzw. ASO-PCR (z ang. *allele specific oligonucleotide*) [2]. Autorzy przeprowadzili badania rearanżacji regionu CDR3 w materiale genetycznym uzyskanym z komórek szpiku pobranego od chorych na MM i inne nowotworowe wywodzące się z układu chłonnego. Metodą ASO-PCR wykryto także komórki nowotworowe we krwi obwodowej u chorych na MM [7]. Owen i wsp. [23] zwiększyli możliwość wykrywania MRD w materiale genetycznym z komórek szpiku chorych poprzez zastosowanie zestawów różnych kombinacji starterów. I tak spektrum poszukiwanych rearanżacji genów rozszerzono badając zarówno odcinki genu CDR3, jak i CDR2 oraz CDR1, a jednocześnie poszukiwano nieprawidłowości w różnych częściach odcinka J. Zestawienie metod badania MRD u chorych na MM opartych na technikach PCR zawarto w tabeli 1.

Technologie molekularne wykrywania MRD u chorych na MM oparte na PCR są swoiste, czułe i specyficzne jednak nie są pozbawione wad. W 60–70% przypadków

TABELA 1. Najczęściej stosowane warianty metody jakościowego PCR w badaniu MRD u chorych na MM (PCR służy do amplifikacji DNA, potem są stosowane inne sposoby analizy molekularnej)

Metoda	Opis	Rodzaj poszukiwanej rearanżacji	Literatura
PCR	Bezpośrednia amplifikacja <i>in vitro</i> określonych fragmentów DNA, sekwencjonowanie	CDR3	Brisco i wsp. [4]
PCR-ASO	Hybrydyzacja oligonukleotydów specyficznych dla allelu z produktem PCR, sekwencjonowanie	CDR3, Fr 3, Fr1f, Fr2, Fr1 con, JH con, JH3, JH6	Billadeau D. i wsp. Owen R.G i wsp. Cremer FW [2,23]
PCR wewnętrznie (<i>nested</i>)	Zastosowanie dwu par starterów druga para wewnętrznie do pierwszej	CDR3, VDJ	Voena i wsp.[31]
DNA <i>finger-printing</i>	Identyfikacja prostych powtórzeń oligonukleotydowych	CDR3	Bird i wsp. [3]
PCR-GS (<i>gene scanning</i>)	Bezpośrednia amplifikacja DNA, sekwencjonowanie analiza za pomocą programu Gene Scan	CDR3/JH con	Galimberti S. i wsp. [13]
<i>Heteroduplex</i> PCR	Wykrywanie nie w pełni komplementarnych nici DNA (niesparowanych)	FR3, FR2 i JH	García-Sanz i wsp [14]
RT-PCR-odwrócone PCR	Izolacja RNA, uzyskiwanie c DNA do przeprowadzenia PCR	FR 1	Aubin i wsp. [1]

nie udaje się uzyskać amplifikacji za pomocą par uzgodnionych starterów odcinka genu dla Ig, który uległ rearanżacji ze względu na wysoką częstość występowania somatycznych hypermutacji w komórkach nowotworowych [1,23]. ASO - PCR jest uważane za najczulszą metodę molekularną wykrywania MRD, jednak wymaga bardzo dużego wkładu pracy. Ponadto badanie to nie daje możliwości rozróżnienia pomiędzy komórkami MM a limfocytami B zawierającymi klonalną rearanżację genów. Z tego względu jej przydatność jest ograniczona. W interpretacji badania PCR należy liczyć się z możliwością otrzymania fałszywie negatywnych wyników zależnych od niereprezentatywnej próbki materiału, nierównomiernego rozproszenia komórek nowotworowych w szpiku oraz rzadko spotykaną, ale jednak możliwą zmianę pierwotnej budowy DNA w przebiegu ewolucji klonalnej choroby.

Badanie MRD za pomocą PCR u chorych na MM znalazło jednak różnorodne zastosowanie kliniczne. Techniki molekularne mogą służyć do badania materiału przeszczepowego. Vescio i wsp. [30] udowodnili, że komórki krwiotwórcze uzyskane z krwi obwodowej charakteryzują się mniejszym zanieczyszczeniem komórkami nowotworowymi w porównaniu z komórkami szpiku chorych na MM, co stanowi

potwierdzenie założeń teoretycznych. Z tego względu w praktyce nie wykonuje się autologicznych zabiegów przeszczepiania komórek szpiku chorych na MM. Preparaty PBSC są jednak zawsze, chociaż w różnym stopniu, zanieczyszczone komórkami MM. W celu wyeliminowania zanieczyszczenia tymi komórkami próbowano izolować czystą populację komórek CD34+ odpowiadającą wielopotencjalnym komórkom macierzystym z preparatów PBSC przez sortowanie lub specjalne techniki separacji. Cremer i wsp. [10] wykazali za pomocą techniki ASO-PCR, że w populacji komórek CD34+ uzyskanych z produktów leukaferoz od chorych na MM nie stwierdza się produktów amplifikacji genów dla Ig specyficznych dla MM, natomiast są one obecne we frakcji komórek CD19+. Skrajnie różne wyniki przedstawili Martinelli i wsp. Stwierdzili oni bowiem, że izolacja komórek CD34+ z produktów leukaferoz prowadzi do istotnego, szacowanego na 3 log, zmniejszenia ilości komórek MM, natomiast nie jest możliwe całkowite ich usunięcie [22].

Lemoli i wsp. przedstawili wyniki leczenia wysokodawkowaną chemioterapią wspomaganą autoprzeszczepieniem selekcionowanych komórek macierzystych CD34+ u 31 chorych z rozpoznaniem MM. Nie stwierdzono różnic w częstości uzyskiwania remisji na poziomie klinicznym i molekularnym oraz w czasie trwania remisji w porównaniu z grupą chorych leczonych niemodyfikowanym PBSCT [20]. Wstępne dane wskazują, że zastosowanie jako materiału przeszczepowego komórek CD34 nie poprawia wyników leczenia MM. Corradini i wsp. opublikowali wyniki terapii za pomocą APSCT chorych na MM, u których monitorowano molekularnie MRD po zabiegu. We wszystkich przypadkach, w których jako źródło komórek przeszczepowych stosowano materiał PCR dodatni, wykrywano MRD po zabiegach APBSCT [8].

Badania molekularne MRD przeprowadzano także w stosunkowo dużej grupie chorych na MM leczonych za pomocą przeszczepienia allogenicznego szpiku. Bird i wsp. [3] stwierdzili, że negatywizacja PCR następuje w rok po zabiegu i jest trwała, co przemawia za możliwością całkowitego wyleczenia MM metodą przeszczepiania allogenicznych komórek krwiotwórczych. W materiale klinicznym opracowanym przez Cavo i wsp. całkowitą eliminację MRD po alloprzeszczepieniu zanotowano tylko w części przypadków [5,6]. Martinelli i wsp. wykazali z kolei, że można osiągnąć remisję molekularną u 50% chorych leczonych allotransplantacją komórek krwiotwórczych, występuje ona szybciej u chorych po podaniu PBSCT – po około 6 miesiącach, natomiast po podaniu komórek szpiku po roku. W piśmiennictwie przeważa pogląd, że istnieje prawdopodobnie grupa chorych na MM, u których jest możliwe całkowite zniszczenie klonu komórek nowotworowych [21].

Określenie przydatności jakościowego badania MRD za pomocą PCR pozostaje na razie kwestią przyszłości. Wykazano, że nawet w przypadkach negatywnego wyniku PCR u chorych na MM mogą wystąpić wczesne nawroty choroby, czyli uzyskanie wyniku negatywnego badania MDR za pomocą PCR ma ograniczone znaczenie prognostyczne. Badanie jakościowe PCR u chorych na MM nie pozwala też przewidzieć, jaki będzie kliniczny przebieg choroby po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych [25,28].

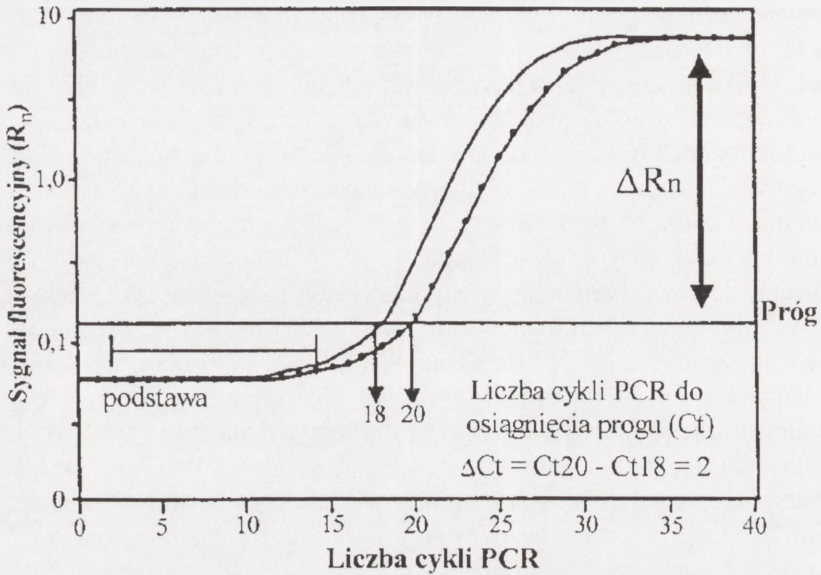
Ocena ilościowa MRD za pomocą PCR, ze względu na większą czułość budzi większe nadzieje co do przydatności w ustalaniu rokowania i doborze leczenia.

Zastosowanie techniki półilościowej ASO - PCR w badaniu chorych na MM opracował Cremer i wsp. [9]. Badanie liczby komórek nowotworowych w seryjnie pobieranych próbkach szpiku od chorych na MM pozwala zidentyfikować grupę chorych o złym rokowaniu, ponieważ po wysokodawkowanej chemioterapii nadal wykrywa się u nich komórki klonogenne MM w podobnej liczbie jak przed chemioterapią [11]. Można także wyróżnić grupę chorych o dobrym rokowaniu charakteryzującą się wyraźną redukcją masy komórek MM zwłaszcza po pierwszym kursie wysokodawkowanego melfalanu wspomaganego przeszczepienia PBST. Badanie półilościowe ASO PCR zastosowano do oszacowania wpływu chemioterapii na komórki klonogenne MM zawarte w subpopulacji limfocytów o fenotypie CD19+ [18]. Wykazano, że postęp choroby w przypadkach MM ściśle wiąże się z ekspansją klonu komórek nowotworowych identyfikowanych zarówno w subpopulacji komórek CD19+, jak i CD19-. Przetrwale, odporne na leczenie komórki MM odpowiedzialne za nawrót i uogólnienie choroby znajdują się głównie w obrębie frakcji o fenotypie CD19+. Komórki klonogenne MM wykrywa się również we frakcji limfocytów CD20+, przetrwałych po chemioterapii wysokimi dawkami, co stwarzałoby w przyszłości możliwość stosowania w leczeniu choroby przeciwciał anti CD20 [26].

ILOŚCIOWE BADANIE MRD-PCR W CZASIE RZECZYWISTYM

Po raz pierwszy opisano metodę ilościowego badania PCR w czasie rzeczywistym w 1993 r. [17]. Metoda ta polega na pomiarze produktu reakcji amplifikacji w czasie rzeczywistym, tzn. w okresie, w którym amplifikacja DNA w reakcji PCR przebiega wykładniczo (faza *plateau*) [16]. Dokonywanie pomiarów w tym właśnie okresie jest istotne, ponieważ umożliwia przeprowadzenie wstecznej ekstrapolacji koniecznej dla określenia początkowej ilości DNA matrycowego. Podstawowym parametrem w tym typie badania jest wartość tzw. proggu cyklu (Ct, ang. *Cycle threshold*). Ct oznacza liczbę cykli PCR konieczną dla wyemitowania sygnału fluorescencyjnego przekraczającego tzw. wartość progową oznaczającą generację sygnału większego niż fluorescencja tła. Wartość Ct jest wprost proporcjonalna do ilości początkowego DNA matrycowego. Służy do obliczenia poziomu ekspresji mRNA lub pomiaru liczby kopii DNA za pomocą specjalnego oprogramowania komputerowego. Hipotetyczny wykres reakcji wraz z objaśnieniami przedstawiono na rycinie 3. W metodzie PCR w czasie rzeczywistym stosuje się obecnie różne metody generowania sygnału fluorescencyjnego. Najczęściej wykorzystywana jest metoda 5' - nukleazowa, w której światło fluorescencyjne powstaje po przecięciu znakowanej fluoresceiną cząsteczki na końcu 5' specyficznego nukleotydu. Opisana reakcja jest w pełni zautomatyzowana. Na rynku są dostępne urządzenia zwane termocyklerami wyposażone w oprogramowanie ułatwiające uzyskiwanie i interpretacje wyników.

PCR w czasie rzeczywistym zastosowano do badania ilościowego MRD u chorych na MM w 1998 r. Użyto starterów, podobnie jak w klasycznym PCR, swoistych dla genu dla regionu nadzmiennego Ig CDR3 i V IgH. Przeprowadzono badania próbek



RYCINA 3. Przykładowy wykres reakcji PCR w czasie rzeczywistym wprowadzający podstawowe pojęcia, związane z tą techniką. Wykres reakcji amplifikacji przedstawia zależność natężenia sygnału fluorescencyjnego w stosunku do liczby cykli. Podstawa jest definiowana jako cykle, w których powstaje sygnał, ale jego natężenie jest poniżej czułości instrumentu wykrywającego. Pomiar sygnału jest używany dla wyznaczenia progu. Wartość progową oblicza się jako 10 x odchylenie standardowe średniego sygnału podstawowego. Sygnał fluorescencyjny o natężeniu przekraczającym próg jest uważany za rzeczywisty sygnał konieczny do określenia progu cyklu (C_t) dla badanej próbki. Z definicji C_t jest to kolejny cykl PCR, w którym sygnał fluorescencyjny przekracza minimalny poziom jego wykrywania. Na wykresie dwie linie: ciągła i kropkowana oznaczają przebieg reakcji dla dwu różnych produktów. Przecięcie ciągłej odpowiada 18 cyklowi PCR, a kropkowanej – 20 cyklowi PCR. Stwierdza się zatem różnicę dwu cykli pomiędzy dwoma produktami – $\Delta C_t = 2$. Uwzględniając wykładniczy typ reakcji PCR ΔC_t może być przekształcony do postaci linearnej – $2^{-\Delta C_t}$ (ΔC_t), czyli różnica syntezy produktów wynosi 4

szpiku i PBSC uzyskanych u chorych na MM przed i seryjnie po leczeniu chemioterapią. Wykazano, że metoda jest powtarzalna, czuła oraz umożliwiała ilościowe badanie MRD [15]. Rasmussen i wsp. opracowali technikę oznaczania ilościowego MRD za pomocą tzw. technologii TaqMan opartej na badaniu ASO PCR. Zastosowano startery komplementarne do typowego markeru klonalnego w MM – regionu nadzmiennego CDR3 oraz VDJ. Badania wykonano u 7 chorych po leczeniu autologicznym PBSCT. Wykazano, że technologia jest czuła i specyficzna. Autorom udało się wykryć komórki MM w przypadkach, w których inne badania wskazywały na całkowitą remisję, co udowadnia jej niezwykłą użyteczność [24]. Właśnie przypadki całkowitej remisji MM rozpoznawane na podstawie klasycznych kryteriów oraz jakościowych badań molekularnych stanowią docelowo grupę chorych, u której badanie MRD metodą PCR ilościowego wydaje się mieć największe zastosowanie w przyszłości w celu ustalenia wskazań do dalszego leczenia [12].

PCR w czasie rzeczywistym może również służyć do badania zanieczyszczenia komórkami klonogennymi MM materiału przeszczepowego. Ladetto i wsp. badali obecność komórek MM w materiale przeszczepowym uzyskanym ze szpiku lub z krwi obwodowej u chorych

na MM poddanych dwukrotnie mobilizacji. Wykorzystano startery komplementarne dla regionu nadziemnego CDR3 lub V IgH. Wykazano, że materiał przeszczepowy uzyskany z krwi obwodowej jest mniej zanieczyszczony komórkami nowotworowymi w porównaniu ze szpikiem po pierwszym kursie mobilizacyjnym chemioterapii. Materiał pobierany z różnych leukaferoz nie różni się istotnie pod względem zanieczyszczenia komórkami MM. Stwierdzono, że powtarzanie kursów chemioterapii mobilizacyjnej ma niewielkie znaczenie w uzyskaniu redukcji liczby komórek nowotworowych w materiale przeszczepowym. Stwierdzono także, znaczne różnice w ilościowej ocenie MRD za pomocą PCR w czasie rzeczywistym i cytometrii przepływowej. Należy przypuszczać, że komórki o fenotypie CD38⁺⁺ uznawane za typowe dla MM tylko w części należą do klonu nowotworowego, ponieważ badanie PCR w czasie rzeczywistym wykazywało mniejszy stopień MRD niż ocena za pomocą cytometrii [19].

PCR w czasie rzeczywistym jest nowoczesną metodą oceny MRD u chorych na MM, której przydatność zweryfikuje najbliższa przyszłość. Ma ona niewątpliwe zalety w postaci wysokiej czułości, powtarzalności oraz wygody w wykonaniu zwłaszcza w porównaniu z metodami półilościowymi PCR, które wymagają badania MRD w wielu rozcieńczeniach. Seryjne badanie MRD tą metodą może służyć do ustalenia wskazań do wczesnego wdrożenia leczenia w momencie, kiedy nawrót choroby jest jeszcze niemożliwy do rozpoznania innymi metodami. Wadami są wysoka cena termocyklerów i odczytników, a zwłaszcza sond znakowanych fluoresceiną.

UWAGI KOŃCOWE

W polskich warunkach nadal najważniejsze jest przeprowadzanie rzetelnej oceny efektów leczenia za pomocą klasycznych kryteriów EBMT. Nie unikniemy jednak, wprowadzając nowoczesne metody leczenia MM, konieczności nowoczesnego badania poziomu MRD. Przedstawiony powyżej przegląd piśmiennictwa na ten temat pokazuje, jak dużo nowoczesnych metod jest do dyspozycji. Najbardziej przydatna wydaje się technika fenotypowania i cytometrii przepływowej, której czułość można zwiększyć prostymi technikami bramkowania. W przyszłości konieczne będzie zapewne badanie MRD za pomocą PCR w czasie rzeczywistym. Jest to jedyny sposób wczesnego wykrycia progresji MM po PBSCT i ustalenia wskazań do zastosowania leczenia.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AUBIN J, DAVI F, NUGUYEN-SALOMON F, LÉBOEUF D, DEBERT C, TAHER M. Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies. *Leukemia* 1995; **9**: 471–476.
- [2] BILLADEAU D, BLACKSTADT M, GREIPP P, KYLE RA, OKEN MM, KAY N, VAN NESS B. Analysis of B-lymphoid malignancies using allele-specific polymerase chain reaction: a technique for sequential quantitation of residual disease. *Blood* 1991; **78**: 3021–3029.
- [3] BIRD JM, RUSSELL NH, SAMSON D. Minimal residual disease after bone marrow transplantation for multiple myeloma: for cure in long - term survivors. *Bone Marrow Trans* 1993; **12**: 651–654.

- [4] BRISCO MJ, TAN LW, ORSBORN AM, MORLEY AA. Development of highly sensitive assay, based on the polymerase chain reaction, for rare B-lymphocyte clones in a polyclonal population. *Br J Haematol* 1990; **75**: 193–167.
- [5] CAVO M, TERRAGANA C, MARTINELLI G, RONCONI S, ZAMAGNI E, TOSI P, LEMOLI RM, BENNI M, PAGLIANI G, BANDINI G, TURA S. Molecular monitoring of minimal residual disease in patients in long-term complete remission after allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Blood* 2000; **96**: 355–357.
- [6] CAVO M, TERRAGANA C, MARTINELLI G, RONCONI S, ZAMAGNI E, TOSI E, LEMOLI RM, BENNI M, PAGLIANI G, BANDINI G, TURA S. Molecular monitoring of minimal residual disease in patients in long-term complete remission after allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Blood* 2000; **96**: 355–357.
- [7] CORRADINI P, VOENA C, OMEDE P, ASTOLFI M, BOCCADORO M, DALLA-FAVERA R. Detection of circulating tumor cells in multiple myeloma by a PCR-based method. *Leukemia* 1993; **7**: 1879–1882.
- [8] CORRADINI P, VOENA C, TARELLA C, ASTOLFI M, LADETTO M, PALUMBO A, VAN LINT M, BACIGALUPO A, SANTORO A, MUSSO M, MAJOLINO I, BOCCADORO M, PILERI A. Molecular and clinical remission in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 208–215.
- [9] CREMER FW, KIEL C, WALLMEIER M, GOLDSMITH H, MOOS M. A quantitative PCR assay for detection of low amounts of malignant cells in multiple myeloma. *Ann Oncol* 1997; **8**: 633–636.
- [10] CREMER FW, KIEL K, SUCKER C, WACKER J, ATZBERGER A, HAAS R, GOLDSCHMIDT H, MOOS M. A rationale for positive selection of peripheral blood stem cells in multiple myeloma: highly purified CD34+ cell fractions of leukapheresis products do not contain malignant cells. *Leukemia* 1997, **11** Suppl. 5: S41–46.
- [11] CREMER FW, EHRBRECHT E, KIEL K, BENNER A, HEGENBART U, HO AD, GOLDSCHMIDT H, MOOS M. Evaluation of the kinetics of the bone marrow tumor load in the course of sequential high-dose therapy assessed by quantitative PCR as a predictive in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2000; **26**: 851–858.
- [12] FENK R, AK M, KOBBE G, STEIDL U, ARNOLD C, KORTH HUNERLITURKOGLU A, ROHR UP, KLISZEWSKI S, BERNHAN HAAS R, KRONENWETT R. Levels of minimal residual disease detected by quantitative molecular monitoring herald relapse in patients with multiple with multiple myeloma. *Haematologica* 2004; **89**: 557–566.
- [13] GALIMBERTI S, BRIZZI F, MAMELI M, PETRINI M. An advantageous method to evaluate IgH rearrangement and its role in minimal residual disease detection. *Leuk Res* 1999; **23**: 921–929.
- [14] GARCIA-SNAZ R, LOPEZ-PEREZ R, LANGERAK AW, GONZALES D, CHILLON MC, BALANZATEGUI A, MATEOS MV, ALAEJOS I, GONZALES M, VAN DONGEN JJ, SAN MIGUEL JF. Heteroduplex PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes for clonality assessment in multiple myeloma. *Haematologica* 1999; **84**: 328–335.
- [15] GERARD CJ, OLSSON K, RAMANATHAN R, READING C, HANANIA EG. Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards. *Canc Res* 1998; **58**: 3957–3964.
- [16] GIZINGER DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; **30**: 503–512.
- [17] HOGUCHI R, FOCKLER C, DOLLINGER G, WATSON R. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; **11**: 1026–1031.
- [18] KIEL K, CREMER FW, ROTTENBURGER C, KALLMEYER C, EHRBRECHT E, ATZBERGER A, HEGENBART U, GOLDSCHMIDT H, MOOS M. Analysis of circulating tumor cells in patients with multiple myeloma during the course of high-dose therapy with peripheral stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl* 1999; **23**: 1019–1027.
- [19] LADETTO M, OMEDE P, SAMETTIS S, DONOVAN J.W, ASTOLFI M, DRANDI D, VOLPATO F, GIACCONE L, GIARETTA F, PALUMBO A, BRUNO B, PILERI A, GRIBBEN JG, BOCCADORO M. Real time polymerase chain reaction in multiple myeloma: Quantitative analysis of tumor contamination of stem cell harvests. *Exp Haematol* 2002; **30**: 529–536.
- [20] LEMOLLI RM, MARTINELLI G, ZAMAGNI E, MOTTA MR, RIZZI S, TERRAGANA C, RONDELLI RONCONI S, CURTI A, BONIFAZI F, TURA S, CAVO M. Engraftment, clinical, and molecular follow-up of patients with multiple myeloma who were reinfused with highly purified CD34+ cells to support single or tandem high-dose chemotherapy. *Blood* 2000; **95**: 2234–2239.

- [21] MARTINELLI G, TERRAGANA C, ZAMAGNI E, RONCONI S, TOSI P, LEMOLI R, BANDINI G, TESTONI N, AMABILE M, OTTAVIANI E, BUONAMICI S, SOVERINI S, MONTEFUSCO V, DE VIVO A, BONIFAZI F, TURA S, CAVO M. Polymerase chain reaction-based detection of minimal residual disease in multiple myeloma patients receiving allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2000; **85**: 930–934.
- [22] MARTINELLI G, TERRAGANA C, LEMOLI RM, CAVO M, BENNI M, MOTTA MR, AMABILE M, OTTAVIANI E, TESTONI N, DE VIVO A, TURA S. Clinical and molecular follow-up by amplification of the CDR-III IgH region in multiple myeloma patients after autologous transplantation of hematopoietic CD34+ stem cells. *Haematologica* 1999; **84**: 397–404.
- [23] OWEN RG, JOHNSON RJ, RAWSTRON AC, EVANS PA, JACK A, SMITH GM, CHILD JA, MORGAN GJ. Assessment of IgH PCR strategies in multiple myeloma. *J Clin Pathol* 1996; **49**: 672–675.
- [24] RASMUSSEN T, POULSEN TS, HONORE L, JOHNSEN HE. Quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using an allele-specific real-time PCR assay. *Exp Haematol* 2000; **28**: 1039–1045.
- [25] RASMUSSEN T. The presence of circulating clonal CD19 cells in multiple myeloma. *Leuk Lymph* 2001; **42**: 1359–1366.
- [26] ROTTENBURGER CH, KIEL K, BOSING T, CREMER FW, MOLDENHUER G., HO AD, GOLDSCHMIDT H, MOSS M. Clonotypic CD20+ and CD19+ B cells in peripheral blood of patients with multiple myeloma post high-dose therapy and peripheral blood stem cell transplantation. *Br J Haematol* 1999; **106**: 545–552.
- [27] SŁOMSKI R, NAPIERAŁA D, KWIATKOWSKA J. Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR) w badaniach naukowych i diagnostyce molekularnej. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 195–217.
- [28] SWEDIN A, LENHOFF S, OLOFSSON T, THURESSON B, WESTIN J. Clinical utility of immunoglobulin heavy gene rearrangement identification for tumor cell detection in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1998; **103**: 1145–1151.
- [29] VAN DONGEN JM, SZCZEPAŃSKI T, LANGERAK AW, PONGERS-WILLEMSE MJ. Detection of minimal residual disease in lymphoid malignances. W: Degos L, Linch DC, Löwenberg B, Martin Dunitz [red.] Textbook of malignant haematology. 1999: 685–724.
- [30] VESCIO RA, HAN EJ, SCHILLER GJ, LEE JC, WU CH, CAO J, SHIN J, KIM A, LICHTENSTEIN AK, BERENSON JR. Quantitative comparison of multiple myeloma tumor contamination in bone marrow harvest and leukapheresis autografts. *Bone Marrow Transpl* 1996; **18**: 103–110.
- [31] VOENA C, LADETTO M, ASTOLFI M, PROVAN D, GRIBBEN JG, BOCCADORO M, PILERI A, CORRADINI P. A novel nested-PCR strategy for detection of rearranged immunoglobulin heavy-chain genes in B cell tumors. *Leukemia* 1997; **11**: 1793–1798.
- [32] WHITE TJ, ARNHEIM N, ERLICH HA. The polimerase chain reaction. *Trends Genet* 1989; **5**: 185–189.

Redaktor prowadzący – Jan Zeromski

Otrzymano: 01.10.2004 r.

Przyjęto: 04.03.2005 r.

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

MIKRODOMENY (RAFTY) LIPIDOWE W BŁONACH KOMÓRKOWYCH: STRUKTURA, FIZJOLOGIA I ZNACZENIE W PROCESACH PATOLOGICZNYCH

LIPID MICRODOMAIN (LIPID RAFTS) IN CELL MEMBRANE:
STRUCTURE, PHYSIOLOGY AND ITS ROLE IN PATHOLOGICAL
PROCESSES

Urszula WOJEWÓDZKA¹, Barbara GAJKOWSKA¹, Jerzy JURKIEWICZ²,
Robert GNIADZECKI³

¹Zakład Ultrastruktury Komórki, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN oraz ²Klinika Neurochirurgii II Wydziału Lekarskiego AM i Zespół Badawczo-Lecznicy Neurochirurgii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie;
³ Klinika Dermatologii, Bispebjerg Hospital, Uniwersytet w Kopenhadze, Dania

Streszczenie: Klasyczny model struktury błony komórkowej zaproponowany przez Singera i Nicolsona w 1972 roku został ostatnio zmodyfikowany. Badania wykazały, że cząsteczki lipidów w błonie komórkowej nie mają przypadkowego rozmieszczenia, lecz tworzą mikrodomeny wzbogacone w cholesterol, sfingolipidy i gangliozydy. Te mikrodomeny lipidowe (zwane też raftami lipidowymi) zostały uwidocznione w żywych komórkach za pomocą technik mikroskopii fluorescencyjnej, mikroskopii wykorzystującej skanowanie powierzchni komórek sondą (*scanning probe microscopy*) oraz mikroskopii elektro nowej mroźeniowej. Rafty mogą być oczyszczane za pomocą ultrawiwrowania lub flotacji. Rafty lipidowe pełnią kluczową rolę w metabolizmie komórki poprzez ich związek z różnymi ważnymi molekułami błonowymi, takimi jak: cytokiny, receptory czynników wzrostowych, receptory śmierci lub niereceptorowe kinazy białkowe. W tej pracy przedstawiamy przegląd zebranych informacji dotyczących roli raftów lipidowych w homeostazie komórki oraz w patogenezie chorób zakaźnych, nowotworowych, przewlekłego zapalenia, cukrzycy i chorób degeneracyjnych centralnego układu nerwowego.

Słowa kluczowe: mikrodomeny lipidowe (=rafty lipidowe), cholesterol, gangliozydy, receptory czynników wzrostowych.

Summary: The classical bilayer model of cell membrane structure proposed by Singer and Nicholson in 1972 has recently been modified. Research has shown that lipid molecules in the membrane do not have a random horizontal distribution but form submicroscopic domain enriched in cholesterol, sphingolipids and gangliosides. These lipid microdomain (also named lipid rafts) have been visualised in living cells by a variety of methods including fluorescence microscopy with lipid-specific probes, scan-

ning probe microscopy and cryoelectron microscopy. Rafts can be purified by ultracentrifugation and flotation techniques. Lipid rafts play a key functional role in cell metabolism by means of their association with a variety of important membrane molecules, including cytokine and growth factor receptors, death receptors or non-receptor protein kinases. In this paper we briefly review the role of lipid rafts in cell homeostasis and their pathogenic significance in infection diseases, cancer, chronic inflammation, diabetes and degenerative disorders of the central nervous system.

Key words: lipid rafts, cholesterol, gangliosides, plasma membrane, growth factor receptors.

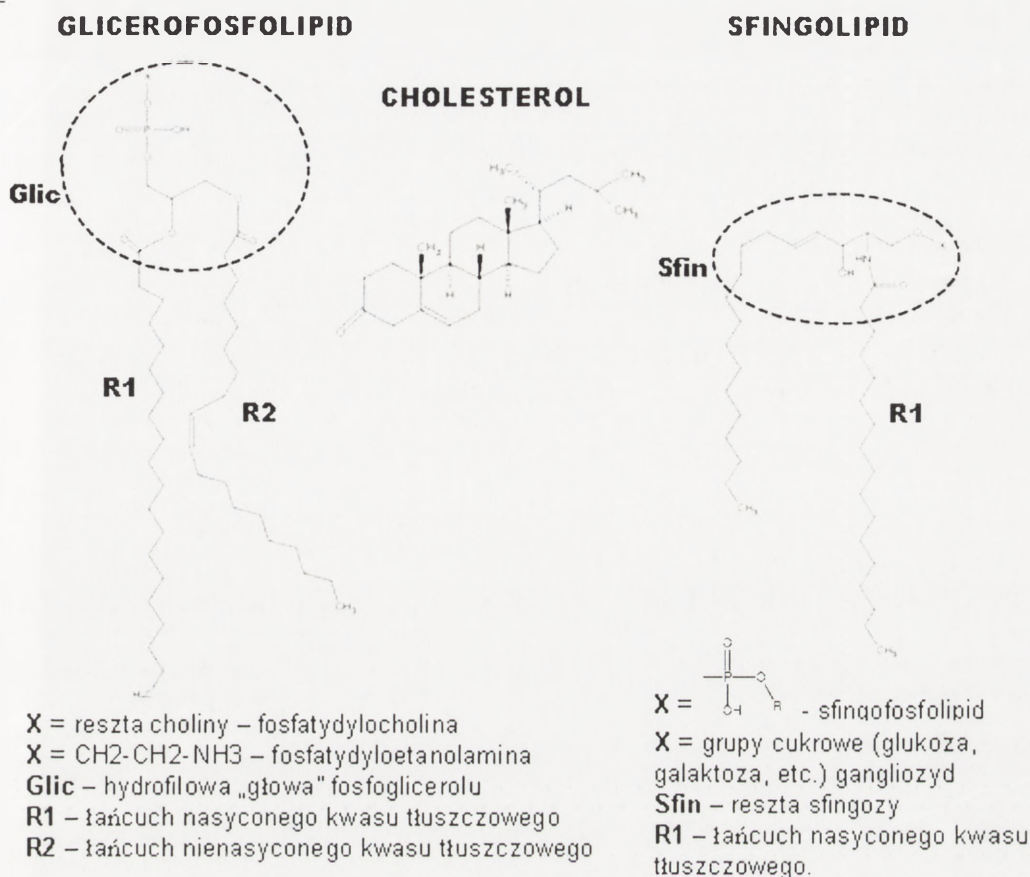
Mozaikowa struktura błon biologicznych zaproponowana w 1972 roku przez Singera i Nicholsona była przez wiele dziesięcioleci traktowana jako ostateczna. Według tego modelu błony biologiczne składają się z homogennej, podwójnej warstwy glicerofosfolipidów zbudowanej głównie z fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanolaminy i fosfatydyloseryny z domieszką sfingolipidów. Polarne grupy fosfolipidów zwrócone są na zewnątrz i kontaktują się ze środowiskiem wodnym, natomiast hydrofobowe łańcuchy kwasów tłuszczowych zwrócone są do środka błony. Glicerofosfolipidy w błonach komórkowych zawierają zwykle nienasycony łańcuch w pozycji sn-2, co wzmacnia „płynność” i termodynamiczną niestabilność błon. Dlatego też w błonach komórkowych znajduje się cholesterol, którego funkcją jest stabilizacja błon poprzez „wypełnianie” przestrzeni pomiędzy nienasyconymi łańcuchami acylowymi a co za tym idzie zwiększenie uporządkowania i stabilności fosfolipidów (ryc. 1A, 1B) [36]. W błonach komórkowych znajdują się również białka pełniące funkcje receptorowe i sygnalizacyjne w komórkach oraz inne komponenty lipidowe, głównie sfingofosfolipidy i glikolipidy.

Mozaikowy model błon biologicznych tłumaczy wiele zjawisk w zakresie fizjologii komórkowej. Nie jest jednak w stanie utrzymać się w konfrontacji z nowszymi wynikami badań nad strukturą błon plazmatycznych. W przeciwieństwie do tradycyjnego modelu, gdzie cholesterol i glicerofosfolipidy są równomiernie rozproszone w błonie komórkowej, wydaje się obecnie, iż cholesterol, sfingo- i glikolipidy zagęszczone są w małych obszarach błon, tworząc swoiste mikrodomeny lipidowe. Są one również nazywane raftami lipidowymi. Nazwa rafty lipidowe (ang. *lipid rafts*) utworzona została na podstawie pewnego podobieństwa zgrubiałych mikrodomen do tratw (ang. *rafts*) pływających po gładkiej tafli wodnej, która w przypadku błon odpowiada warstwie fosfolipidów (ryc. 1B).

W niniejszej pracy streścimy dane doświadczalne sugerujące istnienie raftów. Opiszemy także centralne znaczenie tych struktur w regulacji aktywności receptorów błonowych, sygnalizacji komórkowej oraz w niektórych procesach patologicznych.

WIELKOŚĆ RAFTÓW LIPIDOWYCH I ICH ROZMIESZCZENIE W KOMÓRCIE

Rafty lipidowe można zdefiniować jako odgraniczone mikroobszary (domeny) w błonach komórkowych, które charakteryzują się większą grubością i gęstością frakcji lipidowej oraz zwiększoną zawartością cholesterolu i glikolipidów niż otoczenie. Struktura mikrodomenowa obserwowana jest nie tylko w żywych komórkach, ale także w sztucznie utworzonych membranach składających się z mieszaniny fosfolipidów,



RYCINA 1. Główne lipidy obecne w błonach komórkowych i ich udział w powstawaniu raftów lipidowych: A: Błony komórkowe tworzone są przez mieszaninę glicerofosfolipidów (takich jak fosfatydylocholina, fosfatydyloetanolina i fosfatydyloseryna), sfingolipidów (ceramidy i sfingofosfolipidy), glikolipidów (cerebrozydy, gangliozydy) i cholesterolu. Glicerofosfolipidy zawierają często nienasycony łańcuch kwasu tłuszczowego (np. kwas oleinowy), natomiast sfingolipidy zawierają głównie reszty nasycone. Neutralne glicerofosfolipidy, takie jak fosfatydylocholina, znajduje się w obu listkach błony komórkowej, tłuszcze o ładunku ujemnym (fosfatydyloseryna i fosfatydyloetanolina) oraz prawdopodobnie cholesterol znajdujące się głównie w listku wewnętrznym

cholesterolu i sfingolipidów na powierzchni buforu. Metoda ta, od nazwisk odkrywców nazywana techniką Langmuira-Blodgetta, jest szeroko stosowana w badaniach biofizycznych i termodynamicznych właściwości raftów lipidowych (dokładny opis metody znaleźć można w następujących publikacjach: [10, 75, 55]).

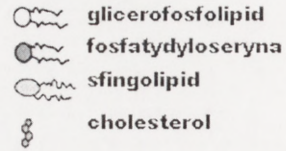
Na podstawie eksperymentów techniką Langmuira-Blodgetta przewidziano, iż rafty lipidowe powinny być obecne w błonach komórkowych w warunkach fizjologicznych. Jednakże wizualizacja raftów napotyka poważne problemy metodologiczne. Najprostszą metodą jest wizualizacja ogniskowych zagęszczeń cholesterolu i glikolipidów w błonach komórkowych przy pomocy swoistych barwników fluorescencyjnych, takich jak np. filipina III czy podjednostka B toksyny cholery – CTXB (ang. *cholera toxin B-subunit*). Polienowy antybiotyk, filipina III, wiąże się swoiście z cholesterolem wykazując absorpcję w ultrafiolecie i emisję fluorescencji w zakresie światła niebieskiego. CTXB

B

Zewnątrz komórki

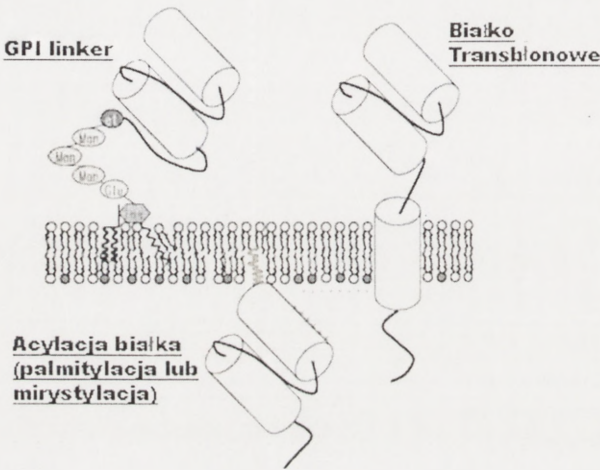


Wewnątrz komórki

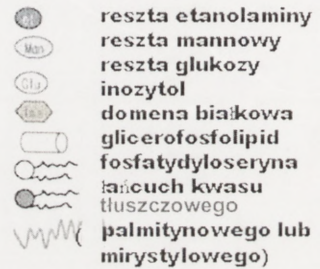


RAFT LIPIDOWY

C



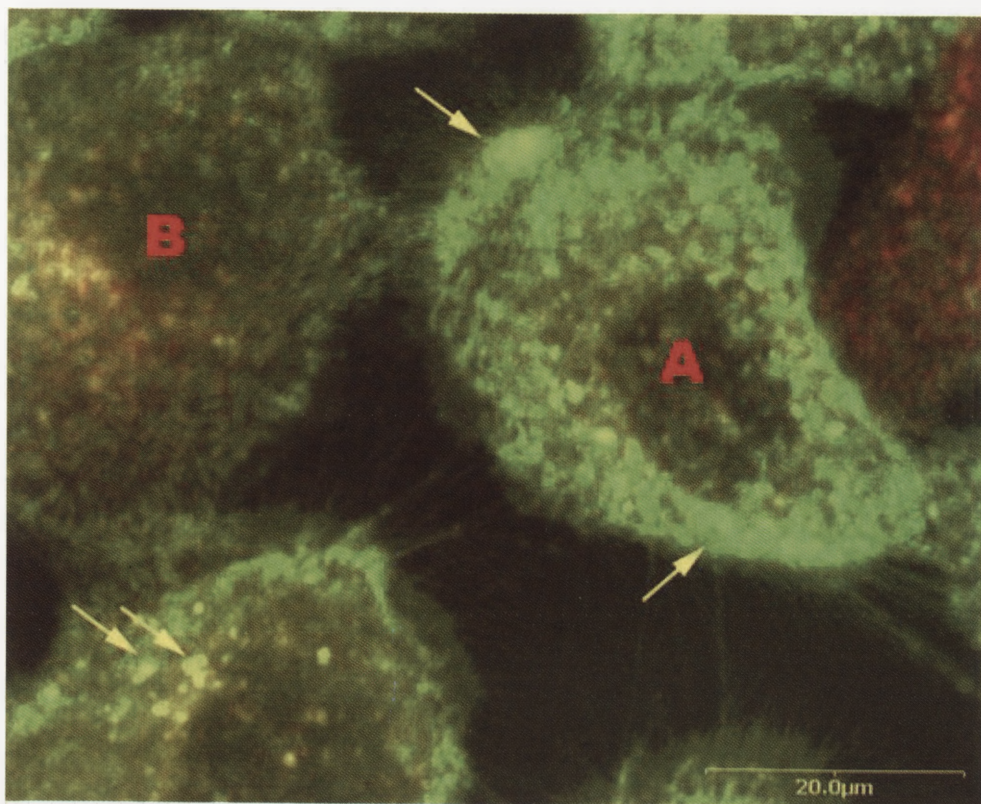
Acylacja białka
(**palmitylacja** lub
mirystylacja)



RYCINA 1. Główne lipidy obecne w błonach komórkowych i ich udział w powstawaniu raftów lipidowych: **B:** Rafty lipidowe to obszary, gdzie dochodzi do agregacji tłuszczów posiadających reszty nasyconych kwasów tłuszczowych (gangliozydy i sfingolipidy). Cholesterol spełnia funkcję „wypełniacza” obszarów pomiędzy nienasyconymi łańcuchami kwasów tłuszczowych, dodatkowo zwiększając upakowanie reszt hydrofobowych cząsteczek tłuszczu, a co za tym idzie, stabilizację raftów.

C: Interakcje białek z raftami lipidowymi – Hydrofobowe odcinki białek transmembranowych (np. receptor EGF) oddziałują bezpośrednio z hydrofobowymi resztami glicerofosfolipidów, sfingolipidów i cholesterolu. Białka niebędące białkami transmembranowymi ulegają kowalencyjnym modyfikacjom pozwalającym na stabilne łączenie się z raftami. Do najważniejszych modyfikacji zaliczamy grupy glikozylofosfatydyloinozytolowe (GPI) oraz dołączenie reszt kwasów tłuszczowych: mirystylacja (łańcuch nasycony 14-węglowy) i palmitylacja (łańcuch nasycony 16-węglowy). Białka połączone za pomocą GPI znajdują się głównie w listku zewnętrznym błony, natomiast białka acylowane – po stronie wewnętrznej (cytoplazmatycznej). Pojedyncza mirystylacja jest z reguły niewystarczająca dla stabilnego osadzenia białka w błonie. Trwałą interakcję białka z błoną osiąga się wskutek podwójnej acylacji (mirystylacja + palmitylacja) lub wskutek interakcji dodatkowo naładowanej domeny białka z negatywnie naładowanymi cząsteczkami fosfatydyloseryny i fosfatydyloctanolaminy

wiąże się swoiście z gangliozydem GM1, obecnym w raftach lipidowych. Barwienie komórek przyżyciowo filipiną III i koniugatem CTXB z fluorochromami (np. z fluoresceiną, CTX-FITC) wykazuje w niektórych komórkach plamiste barwienie błon. Obszary o zwiększonej fluorescencji odpowiadają przypuszczalnie raftom lipidowym (ryc. 2). Obszary barwliwe przy pomocy filipiny lub CTXB są stosunkowo duże (mikrometry), co jest wartością o kilka rzędów większą niż średnica raftów w błonach Langmuira-Blodgetta. Świadczy to o tym, że w warunkach fizjologicznych rafty nie



RYCINA 2: Rafty lipidowe w keratynocytach ludzkich w hodowli. Komórki barwiono przyżyciowo koniugatem podjednostki B toksyny cholery z fluorosceiną (zielona fluorescencja) i obserwowano w konfokalnym mikroskopie fluorescencyjnym. Strzałki wskazują na konglomeraty raftów lipidowych. Zawartość raftów lipidowych w komórkach zależy od stopnia zróżnicowania; w komórce A) zawartość raftów jest wysoka, natomiast błona komórki B) barwi się słabo

występują pojedynczo, ale w konglomeratach. Dlatego też zaproponowany został termin określający je jako „flotyle” raftów [47].

Technika barwienia w mikroskopii fluorescencyjnej może być jednak krytykowana z kilku względów. Po pierwsze, barwniki fluorescencyjne mogą poprzez wiązanie się z raftami wpływać na ich strukturę. Jest to szczególnie ważne w odniesieniu do filipiny III, która wiążąc się z cholesterolem powoduje jego sekwestrację z błony, co przy długotrwałej inkubacji ma wpływ destrukcyjny na funkcje raftów. Po drugie, w niektórych komórkach, takich jak limfocyty, barwienie CTXB uwidacznia strukturę domenową tylko po wiązaniu krzyżowym z przeciwciałem. Można więc przypuszczać, iż naturalnie występujące rafty mają wielkość mniejszą niż rozdzielczość mikroskopu fluorescencyjnego i dopiero agregaty raftów mogą być uwidocznione. Mimo to dzięki swej łatwości barwienie filipiną i CTXB to w dalszym ciągu najbardziej rozpowszechnione metody wizualizacji raftów w komórkach. Dzięki nim możliwe jest uwidocznienie domen lipidowych w takich komórkach, jak: limfocyty, makrofagi, komórki tuczne, neurony, keratynocyty i w wielu typach komórek nowotworowych.

Do bardziej wyrafinowanych, lecz mniej rozpowszechnionych technik obrazowania raftów należy metoda mikroskopii wykorzystującej skanowanie sondą (*scanning probe microscopy*) [75], fluorescencyjna mikroskopia polaryzacyjna [68], mikroskopia krio-elektronowa [21] oraz mikroskopia fluorescencyjna komórek transfekowanych konstrukcjami kodującymi specyficzne białka wiążące się z raftami połączonymi z GFP lub YFP (ang. *green fluorescent protein, yellow fluorescent protein*).

Wielkość raftów i ich ruchomość w błonie została oceniana technikami czynnościowymi FRAP (ang. *fluorescence recovery after photobleaching*) czy FRET (ang. *fluorescence resonance energy transfer*). Metoda FRAP polega na przyżyciowym barwieniu komórek fluorochromem (np. CTXB-FITC lub transfekcją plazmidem kodującym pewne białko błonowe połączonym z GFP), a następnie dezaktywacji fluorescencji (ang. *bleaching*) w małym regionie komórki. Czas potrzebny do odzyskania fluorescencji (ang. *fluorescence recovery*) jest proporcjonalny do stopnia ruchomości pozostałych cząsteczek fluorochromu w błonie. Metoda FRET pozwala na pomiar odległości i ruchomości cząsteczek. Wynika to ze zdolności znajdujących się bardzo blisko siebie cząsteczek dwu różnych fluoro-chromów do rezonansowego przekazywania energii. Zastosowanie obu metod doprowadziło jednak do sprzecznych wniosków odnośnie struktury raftów lipidowych. Wykazano, że w niektórych komórkach domeny lipidowe są bardzo niestabilne i bardzo małej wielkości (rzędu 20–100 nm) [68, 51], natomiast w innych obecne są większe i bardziej stabilne struktury lipidowe [57]. Nasuwa to wniosek, że wielkość i ruchomość raftów lipidowych jest różna w różnych typach komórek.

Interesujące są także dane pokazujące rozmieszczenie raftów w różnych typach komórek. W spolaryzowanych komórkach nabłonkowych i neuronach rafty skoncentrowane są w apikalnej i aksonalnej błonie plazmatycznej. W izolowanych limfocytach i fibroblastach rafty rozmieszczone są bez wyraźnej polaryzacji [20].

Fibroblasty pobudzone do migracji wykazują wyraźną koncentrację raftów na wypustkach [20]. Keratynocyty w hodowli wykazują koncentrację raftów na obrzeżach komórki, co zaakcentowane jest w starszych jednowarstwowych hodowlach [18]. Przykładem tkanki charakteryzującej się nierównomiernym rozmieszczeniem raftów w komórkach jest naskórek. Rafty spotykane są jedynie w keratynocytach w warstwie podstawnej i to głównie w komórkach o zwiększonej aktywności mitotycznej (tzw. *transit amplifying cells*) [1]. Tak, więc rozmieszczenie raftów w komórkach jest zależne od typu komórki oraz od jej stanu czynnościowego.

IZOLACJA RAFTÓW I ICH SKŁAD BIOCHEMICZNY

Jak wspomniano powyżej, struktura molekularna raftów charakteryzuje się zwiększonym stopniem uporządkowania cząsteczek lipidowych wynikającym bezpośrednio z bocznego ruchu cząsteczek [5]. Bardziej ściśle upakowanie lipidów w raftach prowadzi do zwiększonej oporności raftów na detergenty. Ta właśnie właściwość jest powszechnie wykorzystywana do izolacji raftów. Komórki (lub tkanki) poddaje się działaniu detergentu w takich warunkach, aby rozpuszczona została błona komórkowa bez naruszenia struktury raftów. Najczęściej używany jest 1% Triton X-100 w

temperaturze 4°C lub Brij 98 w temperaturze 37°C. Następnie rafty izolowane są na gradiencie sacharozy lub Opti-Prep poprzez długotrwałe ultrawirowanie (flotację) [45]. Tak oczyszczone rafty nazywa się frakcją DRMs (ang. *detergent resistant membranes*).

DRMs wzbogacone są w cholesterol i sfingolipidy, kosztem glicerofosfolipidów. Na przykład w komórkach nerki (MDCK) DRMs zawierają 32 mol% cholesterolu i 14 mol% sfingomielin. Dla porównania, niefrakcjonowana błona komórkowa zawiera ok. 12 mol% cholesterolu i 1% sfingomielin [6]. Ocena raftów lipidowych z komórek ludzkiej linii nowotworowej KB (wywodzącej się z komórek nabłonka wyściełającego jamę ustną) wykazała dwukrotnie większą ilość cholesterolu i około 30% więcej sfingomielin niż we frakcji błony plazmatycznej [49].

Inną metodą preparatyki raftów jest poddawanie lizie całych komórek buforem węgla sodowego o pH 11. Podwyższone pH wspomaga usuwanie białek błony plazmatycznej. Następnie stosuje się sonikację lizatu oraz wirowanie na gradiencie cukrowym [63]. Metoda jest stosunkowo prosta. Jednak flotacja w 35% cukrozie jest dosyć agresywna dla fragmentów błon o niskiej gęstości. Problem może również stanowić obecność wszystkich błon wewnątrzkomórkowych, co może dawać zawyżoną ilość raftów w otrzymanej frakcji. Bardziej selektywna metoda oczyszczania raftów lipidowych polega na lizowaniu komórek w izotonicznym roztworze cukrozy i oczyszczaniu wyizolowanego supernatantu przez sedymentację w gradiencie Percollu [62]. Takie traktowanie zapewnia oddzielenie błon plazmatycznych od błon aparatu Golgiego, siateczki endoplazmatycznej i mitochondriów. Możliwe jest też modyfikowanie otrzymanej frakcji za pomocą zamiany pH i jonowego składu Percollu w celu otrzymania optymalnej separacji [45]. Sonikacja uwalnia rafty lipidowe z błon plazmatycznych, które są następnie rozdzielane na gradiencie Opti-Prep w roztworze izotonicznym. Metoda ta pozwala na izolację raftów wysokiej czystości, które prawdopodobnie najwierniej oddają skład tych mikrodomen rezydujących w komórce.

Tak, więc metody biochemiczne potwierdziły przypuszczenie, iż rafty wzbogacone są w cholesterol i sfingolipidy. Jednakże najbardziej interesujące dane z badań biochemicznych dotyczą identyfikacji białek wiążących się z raftami. Białka te stanowią klucz do zrozumienia funkcji raftów w homeostazie komórek.

SKŁAD BIAŁKOWY RAFTÓW LIPIDOWYCH

Białka izolowane we frakcji raftów lipidowych można podzielić na dwie grupy. Pierwsza grupa to białka strukturalne zwiększające stabilność raftów, natomiast do drugiej grupy należą białka spełniające funkcje sygnalizacyjne i receptorowe w komórkach. Do białek strukturalnych zalicza się głównie kaweoliny i flotyliny. Kaweolina jest zdolna do wiązania cholesterolu, przez co zwiększa uporządkowanie lipidów w raftach. Pełni także istotną rolę w procesach pinocytozy poprzez kaweole (patrz poniżej).

Niezwykle istotny jest fakt, że część receptorów błonowych ma zdolność do dynamicznego wiązania się z raftami lipidowymi. Spośród znanych receptorów mających powinowactwo do raftów należy wymienić EGFR (*epidermal growth factor receptor*),

PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), Fas, TCR (*T-cell receptor*), Fc ϵ RI (receptor typu I dla fragmentu Fc immunoglobuliny ϵ). Wiązanie się z raftami jest dla tych receptorów etapem umożliwiającym regulację aktywności receptora. Ponadto, wiele enzymów błonowych związanych z sygnalizacją komórkową wiąże się z raftami, np. kinaza białkowa src, niektóre izoformy kinazy białkowej C (PKC), syntaza tlenu azotu (NOS), czy podjednostka p85 kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3-K). Białka transmembranowe, takie jak EGFR, wiążą się z raftami poprzez powinowactwo ich hydrofobowej części transmembranowej do lipidowych struktur raftów (ryc. 1C) [70]. Białka nieposiadające części transbłonowej (np. src) łączą się kowalencyjnie z raftami poprzez grupy GPI (glikozylofosfatydyloinozytol) lub grupy acetylowe (ryc. 1C). Przedstawione dane świadczą o zróżnicowaniu mechanizmów, które są zaangażowane w łączenie białek z raftami lipidowymi.

UDZIAŁ RAFTÓW LIPIDOWYCH W PROCESACH TRANSDUKCJI SYGNAŁU

Wiele receptorów błonowych tworzy wielocząsteczkowe agregaty błonowe w trakcie procesu aktywacji. Składają się one z licznych cząsteczek receptora oraz niereceptorowych kinaz białkowych, co pozwala na zapoczątkowanie kaskady sygnalizacji.

Rafty mogą być uważane za miejsca ułatwiające agregację indywidualnych receptorów aktywowanych przez liganda. Jeśli aktywacja receptorów ma miejsce w raftach, to kompleks sygnalizacyjny jest zabezpieczony przed enzymami nieposiadającymi powinowactwa do raftów. Przykładem mogą być niektóre fosfatazy błonowe, które zaangażowane są w hamowanie niektórych procesów sygnalizacyjnych. Rafty tworzą przypuszczalnie mikrośrodowisko, gdzie aktywność kinaz i fosfataz regulowana jest niezależnie od innych części błon komórkowych.

Szczególnie dobrze poznany jest udział raftów w aktywacji receptora Fc ϵ RI [2, 13, 23, 59]. Fc ϵ RI jest tetramerem składającym się z jednego łańcucha α , jednego β i dwu γ . Łańcuch α wiąże fragment Fc cząsteczki IgE. Oligomeryzacja receptorów przez IgE rekrutuje acylowaną kinazę Lyn do raftów zawierających Fc ϵ RI, a następnie przyłączenie kinazy Syk/ZAP-70 do łańcuchów β i γ [13, 59]. Ponieważ zarówno receptor Fc ϵ RI oraz kinaza Lyn są izolowane we frakcji DRMs, co wskazuje na zaangażowanie raftów lipidowych w sygnalizację z tego receptora. Prawdopodobnie rafty stanowią platformę, na której możliwa jest oligomeryzacja Fc ϵ RI oraz jego interakcja z Lyn. Dodatkowym dowodem są dane wskazujące, że zniszczenie struktury raftów za pomocą metyl- β -cyklodekstryny (M β CD) powoduje blokadę aktywacji receptora Fc ϵ RI przez IgE [71].

Użycie związków powodujących sekwestrację cholesterolu i niszczących strukturę raftów, takich jak filipina III czy M β CD, pozwoliło na identyfikację innych receptorów związanych z mikrodomenami lipidowymi. M β CD jest polisacharydem o budowie cyklicznej zdolnym do selektywnego wiązania cholesterolu i usuwania go z zewnętrznego

listka błon komórkowych. Traktowanie komórek M β CD hamuje aktywację nie tylko Fc ϵ R1, ale także innych istotnych receptorów, takich jak TCR czy receptora typu I dla czynnika nekrozy nowotworów (TNFR1) [70, 32].

Jednakże w stosunku do niektórych receptorów, takich jak receptor dla czynnika wzrostu naskórka – EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) czy receptora Fas odpowiedzialnego za programowaną śmierć komórki (apoptozę) zaobserwowano odwrotne zjawisko, tzn. paradoksalną aktywację receptora wskutek jego dysocjacji z raftami [48]. Interesujące, iż traktowanie komórek przez M β CD powoduje aktywację EGFR i Fas niezależnie od obecności liganda. Tak, więc receptor aktywowany jest jedynie poprzez zmianę powinowactwa do raftów. Mechanizm tego zjawiska jest bardzo złożony i nie do końca zrozumiany. Wydaje się, iż mechanizm przekazywania sygnału z EGFR jest inny w przypadku aktywacji przez M β CD niż za pośrednictwem EGF. Podczas gdy swoisty ligand powoduje końcową aktywację kinaz z grupy MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*), aktywacja poprzez uszkodzenie raftów prowadzi głównie do aktywacji SAPK (ang. *stress activated protein kinase*) [25]. Poza tym dojądrowy transport EGFR, uważany za istotny komponent w procesie przekazywania sygnału, jest zniesiony w komórkach traktowanych M β CD (własne, niepublikowane dane). Podobną dewiację w sygnalizacji pod wpływem M β CD zaobserwowano w stosunku do receptora TNFR1. W kontrolnych limfocytach aktywacja TNFR1 prowadzi do powstania kompleksu tego receptora z TRAF2, aktywacji NF κ B i zwiększenia tempa proliferacji. Natomiast w komórkach traktowanych M β CD dochodzi do inhibicji tworzenia kompleksu TNF-TRAF2, zahamowania syntezy aktywnego NF κ B i w rezultacie do śmierci komórki pod wpływem TNF [29].

Wpływ raftów na proces sygnalizacji dodatkowo komplikuje fakt, iż drogi przekazywania sygnału przez receptory zależne są od typu komórki. Na przykład traktowanie limfocytów przez M β CD powoduje aktywację receptora Fas w keratynocytach, podczas gdy w limfocytach obserwuje się wyraźną blokadę tego receptora [19, 16]. Nie ulega wątpliwości, że rafty regulują w znacznej mierze transdukcję sygnału, jednakże ich wpływ zależny jest od typu receptora oraz od typu komórki.

UDZIAŁ RAFTÓW W PROCESACH FIZJOLOGICZNYCH W KOMÓRCIE

Kaweole i endocytoza. Kaweole są strukturami komórkowymi powstałymi na wskutek inwaginacji błony plazmatycznej na odcinku 50–70 nm. Kaweole zostały po raz pierwszy opisane 50 lat temu w śródbłonkach przez Palade'a [39]. Są one obecne w większości komórek z wyjątkiem limfocytów i neuronów [42]. Kaweole spotykane są najczęściej w postaci pęcherzyków. W niektórych komórkach jednakże kaweole organizują się w bardziej skomplikowane struktury, na przykład w kanaliki T w mięśniach szkieletowych.

Uważa się, że kaweole stanowią szczególną postać raftów lipidowych. Kaweole są nierozpuszczalne w detergentach wskutek zwiększonej zawartości cholesterolu i gliko-

lipidów i można je izolować poprzez flotację na gradientach sacharozy. Najbardziej charakterystyczną cechą kaweoli jest obecność strukturalnego białka, kaweoliny. Kaweolina występuje w 3 izoformach. Kaweolina 1 i 2 obecna jest w wielu typach komórek, podczas gdy kaweolina 3 jest swoista dla komórek mięśniowych [43]. Badania na myszach transgenicznym pozbawionych genów dla kaweolin wykazały, iż kaweolina 1 jest niezbędna do tworzenia kaweoli, natomiast kaweolina 2 ma jedynie rolę wspomagającą [28, 64, 53, 54].

Kaweoliny mają zdolność wiązania cholesterolu w błonach komórkowych, co powoduje ogniskowy wzrost stężenia cholesterolu i tworzenie kaweoli. Przymuszcza się, że kaweoliny są również zaangażowane w transport cholesterolu do- i na zewnątrz komórki [61, 14]. Ponadto, podobnie jak inne rafty lipidowe, kaweole zaangażowane są w procesach sygnalizacji oraz w regulacji sygnalizacji za pośrednictwem jonów wapnia.

Kaweole mają również udział w procesach endocytozy, głównie substancji występujących w raftach, takich jak: glikofosfolipidy, białka połączone za pomocą GPI oraz ligandy, takie jak: kwas foliowy, albumina czy hormon wzrostu. Endocytoza poprzez kaweole jest zależna od polimeryzacji aktyny i aktywności dynaminy-2, natomiast niezależna od klatryny, czym różni się od innych typów endocytozy [44, 46, 35].

W przeciwieństwie do endocytozy za pośrednictwem pęcherzyków pinocytarnych czy pęcherzyków opłaszczonych klatryną, które prowadzą do tworzenia endosomów, endocytoza za pośrednictwem kaweoli prowadzi do powstania swoistych struktur: kaweosomów, charakteryzujących się obecnością kaweolin [34]. Sytuację komplikuje jednak niedawne odkrycie endocytozy kaweolarniej, która podobnie jak pinocytoza jest niezależna od dynaminy i klatryny [56, 33]. Droga ta jest prawdopodobnie swoista dla endocytozy białek błonowych zawierających łącznik GPI. Wydaje się jednak, że tylko niewielki odsetek kaweoli zaangażowany jest w aktywną endocytozę [66].

Migracja i adhezja komórek. Integryny są jednymi z najważniejszych białek odpowiedzialnymi za adhezję komórek. Integryny są białkami transbłonowymi, które aktywowane są poprzez łączenie się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (kolagen, laminina, fibronektyna). Stymulacja integryn doprowadza do aktywacji szlaku sygnalizacyjnego, na który składają się rekrutacja białka FAK (ang. *focal adhesion kinase*), PAK (ang. *p21-activated kinase*), mDia (ang. *molecule Diaphanous*) i GTPaz Rho, Rac i Cdc42. Obecność raftów lipidowych jest konieczna do aktywacji sygnalizacji poprzez integryny. Uszkodzenie raftów poprzez sekwestrację cholesterolu blokuje przemieszczanie się białka Rac do błony komórkowej i uniemożliwia aktywację białka PAK. Okazuje się bowiem, iż tworzenie się aktywnego kompleksu enzymatycznego zawierającego białka Rac, Rho, PAK i mDia ma miejsce wyłącznie w raftach lipidowych [22, 8, 41]. Proces ten zależny jest od białka FAK [41].

Aktywacja integryn ma również znaczenie w procesach migracji komórek. Stabilizacja mikrotubul wymagana podczas migracji zależna jest od aktywacji Rho i mDia, a co za tym idzie, od obecności nienaruszonych raftów lipidowych [40]. Badania nad migrującymi fibroblastami uwiaryściły flotylle raftów w zrębie prowadzącym błonę plazmatyczną, zawierających gangliozyd GM1, Rho i mDia. Interesującym zjawiskiem jest polaryzacja raftów w migrujących limfocytach. Skład lipidowy (w szczególności gangliozydów) jest inny w raftach obecnych w zrębie od raftów w tylnej części komórki [20].

Polimeryzacja aktyny jest procesem, od którego zależy prawidłowa migracja komórek. Istnieje ścisła zależność pomiędzy raftami lipidowymi a cytoszkieletem aktynowym. Reorganizacja raftów lub ich uszkodzenie, np. za pomocą M β CD powoduje uwolnienie 4,5-fosfatydyloinozytolu(4,5)bisfosforanu (PIP₂) z błony komórkowej do cytoplazmy [50]. PIP₂ jest włączony w regulację polimeryzacji aktyny poprzez wpływ na białka gelsolinę i profilinę, α -aktyninę i winkulinę. W efekcie dochodzi do reorganizacji cytoszkieletu aktynowego w komórce [27]. Na podstawie powyższych danych można wysnuć wniosek, że rafty lipidowe odgrywają rolę w regulacji cytoszkieletu, a co za tym idzie polaryzacji i migracji komórek.

Proliferacja i śmierć komórki. Opisany powyżej związek pomiędzy receptorami apoptotycznymi z rodziny TNF (Fas, TNFR1) a raftami lipidowymi sugeruje udział raftów w regulacji apoptozy. Badania przy użyciu limfocytów i makrofagów sugerują, iż receptor Fas jest aktywny jedynie w powiązaniu z raftami. Uszkodzenie struktury raftów przy pomocy M β CD powoduje deaktywację Fas i zahamowanie apoptozy zależnej od tego receptora. Jednakże, w przeciwieństwie do limfocytów, M β CD stymuluje apoptozę. Zniszczenie raftów lipidowych w linii stransformowanych keratynocytów HaCaT przez M β CD, filipinę III lub poprzez oksydację cholesterolu prowadzi do szybkiej apoptozy [3]. Inkubacja tych komórek w roztworze M β CD prowadzi również do aktywacji receptora Fas niezależnie od liganda oraz aktywacji kaspaz 8 i 3 [19]. Jednakże, blokada aktywnych kaspaz nie hamuje śmierci komórki, wydaje się więc, że receptor Fas nie jest niezbędny do apoptozy wywołanej uszkodzeniem raftów (własne, niepublikowane dane). Podobnie do wyników otrzymanych przez nas na linii HaCaT, inni autorzy opisali śmierć komórek białaczki szpikowej i czerniaka złośliwego wskutek inkubacji ze statynami i M β CD [11, 38]. Wydaje się więc, że w niektórych typach komórek zaburzenia w strukturze raftów są sygnałem inicjującym proces apoptozy.

Aktywność wielu receptorów dla czynników wzrostu regulowana jest przez rafty lipidowe. Pozwala to na wysunięcie hipotezy, iż rafty odgrywają rolę w regulacji cyklu komórkowego. Zaburzenie struktury raftów w keratynocytach za pomocą M β CD powoduje zablokowanie syntezy DNA i różnicowanie komórki [18, 25]. W naskórku ludzkim agregaty raftów są obecne w aktywnie proliferujących keratynocytach warstwy podstawnej, tzw. komórkach amplifikujących (ang. *transit amplifying cells*) [18]. Niedawno opisano jeden z możliwych mechanizmów, wskutek którego proliferacja keratynocytów jest regulowana przez rafty [15]. Czynniki wzrostu naskórka (EGF) jest ważną cytokiną stymulującą wzrost i migrację komórek. Pobudza on mitogenezę poprzez aktywację kinazy Src za pośrednictwem EGFR, co następnie prowadzi do fosforylacji integryny β 4 oraz aktywacji białka Ras i kinazy fosfo-3-inozytolu (PI-3K). Okazało się, iż jedynie palmitylowane łańcuchy integryny β 4 wchodzi w reakcję z Src i są w stanie aktywować Ras. Mutacja cystein w części transbłonowej integryny β 4 prowadzi do zahamowania palmitylizacji, a co za tym idzie braku asocjacji z raftami. W komórkach takich EGF nie jest w stanie stymulować mitogenezy [15].

ZMIANY W SKŁADZIE RAFTÓW LIPIDOWYCH PROWADZĄCE DO PROCESÓW PATOLOGICZNYCH

Zakażenia wirusowe. Niektóre wirusy, takie jak wirus grypy czy HIV, wykorzystują rafty w infekcji komórek gospodarza [76]. Udział raftów w infekcji wirusowej został szczególnie dobrze poznany dla wirusa HIV. Wirus ten łączy się z galaktosylceramidami zlokalizowanymi w apikalnej części komórek nabłonkowych błony śluzowej. Zniszczenie struktury raftów, np. poprzez traktowanie przez M β CD blokuje wirusową transcytozę [1].

W czasie wnikania do komórek docelowych dochodzi do wiązania się komponentów otoczki wirusowej (np. białko Gag) z raftami. Ponadto w raftach znajdują się receptory białkowe dla HIV: białko CD4 i receptory dla chemokin CCR5 i CXLR4. Łączenie białek wirusa HIV z CD4 i receptorami chemokinowymi prowadzi do łączenia się raftów w większe konglomeraty (flotylle) [37, 24]. Ponadto, wczesne białko wirusowe Nef może łączyć się ze związaną z raftami niereceptorową kinazą tyrozynową z rodziny Src, co wydaje się wzmacniać efektywność infekcji limfocytów T przez wirus HIV.

Opuszczanie przez HIV komórki jest również etapem zależnym od raftów [37]. Mirystylowane białko wirusowe Gag podlega multimeryzacji w cytozolowej warstwie błony, pobudzając pączkowanie komórek i uwalnianie wirusa. Przypuszcza się, że białko Gag specyficznie przyłącza się do raftów powodując ich agregację, zwiększenie aktywności cholesterolu i w rezultacie tworzenie pęcherzyka egzocytotycznego zawierającego cząstki wirusa [7].

Choroba Alzheimerera. Głównym etapem w patogenezie choroby Alzheimerera jest zaburzona proteoliza prekursorowego transmembranowego białka amyloidu APP typu I, przez enzymy nazywane α -, β - i γ -sekretozami [57] do nierozpuszczalnego A β . Cholesterol odgrywa kluczową rolę w regulacji proteolizy APP [60]. Poziom cholesterolu i LDL w surowicy koreluje z ilością A β w mózgu chorych na chorobę Alzheimerera. Ponadto zwiększony poziom cholesterolu w diecie powoduje wzrost formowania nierozpuszczalnego amyloidu w mózgach transgenicznym zwierząt doświadczalnych. Statyny, leki blokujące syntezę cholesterolu poprzez hamowanie enzymu reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutaryl-CoA (HMG-CoA), zmniejszają akumulację A β w neuronach [60].

W komórkach część APP jest związana z raftami lipidowymi, a usunięcie cholesterolu może powodować przemieszczenie się APP z raftów do otaczającej błony komórkowej. Jest wysoce prawdopodobne, iż proteoliza APP znajdującego się poza raftami zachodzi w drodze tzw. rozpadu α , gdzie nie wytwarzany jest patogenny A β .

Choroby prionowe. Choroby prionowe powodowane są przez PrP^{sc}, stanowiące nieprawidłową strukturalną formę zakodowanego przez gospodarza białka PrP^c. PrP^{sc} tworzy w mózgu agregaty białkowe odpowiedzialne za patogenezę chorób prionowych (choroba Creutzfeldta-Jakoba, choroba kuru, zespół Gertsmana-Strausslera-Scheinkera). Mechanizm, w którym PrP^c jest przekształcany w PrP^{sc}, nie został dokładnie poznany. Badania dowodzą, że biorą w nim udział rafty lipidowe [65, 4]. Wiadomo, że PrP^c jest połączony z raftami poprzez sfingolipidową domenę [30]. Usunięcie cholesterolu z błony komórkowej prowadzi do zmniejszonego powstawania PrP^{sc} z PrP^c. [26]. Nie jest jednak jasne, w jaki sposób rafty promują nieprawidłowy metabolizm PrP^c.

Choroby nowotworowe. Jak opisano powyżej, rafty lipidowe mają duże znaczenie w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy poprzez ich wpływ na aktywację receptorów błonowych, takich jak: EGFR, TNFR1 czy Fas. Sugeruje to udział raftów w procesach onkogenezy. Hipoteza ta znajdzie poparcie doświadczalne. Po pierwsze, ryzyko zachorowania na niektóre rodzaje nowotworów jest zwiększone u ludzi z podwyższonym poziomem cholesterolu. Statyny, leki obniżające stężenie cholesterolu we krwi i w komórkach, wydają się wykazywać pewną aktywność antynowotworową [9]. Wiele onkogenów, jak np. białka z rodziny Hedgehog oraz niereceptorowe kinazy białkowe (Src, Lyn) aktywne są jedynie w powiązaniu z raftami lipidowymi. Ponadto, istnieją dane sugerujące, iż destrukcja raftów poprzez usunięcie cholesterolu przez MbCD zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na chemioterapeutyki wskutek obniżenia progów indukcji apoptozy [17].

Edelfozyna, syntetyczna pochodna alkilfosfolipidów łączy się selektywnie z raftami prowadząc do śmierci komórki [25]. Interesującym aspektem wskazującym na udział raftów w rozwoju nowotworów jest rola kaweolin w procesach onkogenezy. W zależności od typu nowotworu kaweolina wykazuje właściwości supresyjne lub promujące podczas onkogenezy.

Kaweolina jest jednym z dwudziestu białek mających właściwości supresorowe nowotworu sutka [73]. Redukcję poziomu kaweoliny-1 na poziomie transkrypcji obserwowano w liniach komórek nowotworowych pochodzących z płuc, z szyi i tkanki piersiowej [52]. Na przykładzie fibroblastów transformowanych niektórymi onkogenami wykazano odwrotną zależność między wielkością kolonii komórek nowotworowych rosnących na agarze a komórkowym poziomem kaweoliny [69]. Badania na materiale archiwalnym z biopsji dowiodły, że istnieje związek pomiędzy ekspresją kaweoliny-1 i przerzutami nowotworowymi, szczególnie w rozwoju nowotworów prostaty [74]. W przypadku tego nowotworu zaobserwowano brak kaweoliny-1 w nabłonku gruczołu normalnej prostaty oraz jej zwiększoną ekspresję w słabo zróżnicowanych komórkach nowotworu prostaty. Inne badania udowodniły, że kaweolina-1 jest jednym z biomarkerów raka prostaty u rasy czarnej [72]. Na poziomie molekularnym obniżenie poziomu kaweoliny-1 w niewrażliwych na androgeny komórkach raka prostaty łączy się z powtarzaniem bardziej łagodnego fenotypu. Nadekspresja kaweoliny-1 w linii komórkowej raka prostaty powoduje ich niewrażliwość na apoptozę powodowaną brakiem androgenów [67].

Mechanizm prowadzący do zmian w ekspresji kaweolin w nowotworach nie jest do końca poznany. Pewną rolę spełniają mechanizmy epigenetyczne wskutek hipermetylacji wysp CpG w regionach promotorowych genu kaweoliny. Hipermetylacja wysp CpG jest dobrze znanym mechanizmem supresji ekspresji genów w komórkach nowotworowych.

Cukrzyca. Insulinozależny transport glukozy ma miejsce głównie w mięśniach, a w mniejszym stopniu w tkance tłuszczowej i zależy od transportera glukozy GLUT4. Transporter glukozy jest zlokalizowany głównie w małych pęcherzykach i strukturach tubularno-pęcherzykowatych w cytoplazmie komórki, ale jest translokowany do błony plazmatycznej w odpowiedzi na pobudzenie receptora insulinowego. Wykazano, że

GLUT4 w komórkach tłuszczowych zlokalizowany jest w kaweolach. Stymulacja insulinowa nie tylko powoduje transport pęcherzyków zawierających GLUT4 do błony plazmatycznej, ale również mobilizację kaweoliny z puli cytozolowej do błony plazmatycznej. Na świeżo izolowanych komórkach tłuszczowych stwierdzono, że przemieszczanie się GLUT4 do domen kaweolinowych jest konieczne dla transportu glukozy. Ponadto, u pacjentów z insulinoodporną cukrzycą typu II wykryto mutacje genu dla kaweoliny 1 [53]. Pochodne sulfonilomocznika stosowane w terapii cukrzycy typu II stymulują insulino-zależny wzrost glukozy w komórkach mięśni i komórkach tłuszczowych [31] prawdopodobnie poprzez stabilizację raftów oraz zwiększenie stężenia kaweoliny w błonach komórkowych.

Miażdżyca. Hipercholesterolemia jest głównym czynnikiem powodującym rozwój miażdżycy. Przewlekłe podwyższenie poziomu cholesterolu hamuje rozszerzanie się naczyń zależne od tlenku azotu (NO) między innymi wskutek niskiej aktywności jego syntazy NOS. Kaweolina-1 wydaje się hamować aktywność śródbłonkowego NOS (eNOS) w stanach zwiększonego poziomu cholesterolu. Eksponowanie śródbłonka aorty na surowicę uzyskaną od osobników z hipercholesterolemią prowadziło do wzrostu kaweoliny-1 w tych komórkach oraz do redukcji uwalniania NO wskutek obniżenia aktywności eNOS [12]. Statyny destabilizują kompleks kaweolina - eNOS na skutek obniżenia stężenia cholesterolu w błonie komórkowej. Podobnie blokada ekspresji kaweoliny-1 powoduje wzrost aktywności eNOS i produkcji NO [12].

Reakcje zapalne. Rola raftów w procesach immunologicznych była już wzmiankowana na przykładzie aktywacji receptora FcεRI oraz TCR. Wiele enzymów i receptorów dla cytokin włączonych w reakcje zapalne jest aktywowana poprzez interakcje z raftami. TNF jest jedną z najważniejszych cytokin odpowiedzialnych za indukcję procesu zapalnego w wielu chorobach (m.in. cukrzyca, reumatoidalne zapalenie stawów, choroba Crohna). Aktywność receptora TNFR1 w limfocytach i makrofagach jest zależna od jego wiązania się z raftami (patrz powyżej).

Jak opisano powyżej, aktywność syntazy NO jest również zależna od raftów lipidowych, ponieważ zwiększone stężenia NO są odpowiedzialne za uszkodzenie śródbłonek w reakcjach zapalnych. Blokada NOS poprzez modulację raftów może stanowić nowe podejście w terapii stanów zapalnych.

PODZIĘKOWANIA

Pani Krystynie Mogilnickiej autorzy składają podziękowania za pomoc w starannym przygotowaniu manuskryptu.

LITERATURA

- [1] ALFSEN A, INIGUEZ P, BOUGUYON E, BOMSEL M. Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1. *J Immunol* 2001; **166**: 6257–6265.
- [2] BAIRD B, SHEETS ED, HOLOWKA D. How does the plasma membrane participate in cellular signaling by receptors for immunoglobulin E? *Biophys Chem* 1999; **82**: 109–119.
- [3] BANG B, GNIADDECKI R, GAJKOWSKA B. Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol*. In press.

- [4] BARON GS, WEHRLY K, DORWARD DW, CHESEBRO B, CAUGHEY B. Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. *EMBO J* 2002; **21**: 1031–1040.
- [5] BONDAROWICZ-PIKUŁA J. Domeny w błonach biologicznych i ich znaczenie fizjologiczne. *Post Biochem* 1995; **41**(4): 247–257.
- [6] BROWN DA, ROSE JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 1992; **68**: 533–544.
- [7] CAMPBELL SM, CROWE SM, MAK J. Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J Clin Virol* 2001; **22**: 217–227.
- [8] del POZO MA, ALDERSON NB, KIOSSES WB, CHIANG HH, ANDERSON RG, SCHWARTZ MA. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* 2004; **303**: 839–842.
- [9] DELLAVALLE RP, NICHOLAS MK, SCHILLING LM. Melanoma chemoprevention: a role for statins or fibrates? *Am J Ther* 2003; **10**: 203–210.
- [10] DIETRICH C, BAGATOLLI LA, VOLOVYK ZN, THOMPSON NL, LEVI M, JACOBSON K, GRATTON E. Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J* 2001; **80**: 1417–1428.
- [11] DIMITROULAKOS J, NOHYNEK D, BACKWAY KL, HEDLEY DW, YEGER H, FREEDMAN MH, MINDEN MD, PENN LZ. Increased sensitivity of acute myeloid leukemias to lovastatin-induced apoptosis: A potential therapeutic approach. *Blood* 1999; **93**: 1308–1318.
- [12] FERON O, DESSY C, MONIOTTE S, DESAGER JP, BALLIGAND JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1999; **103**: 897–905.
- [13] FIELD KA, HOLOWKA D, BAIRD B. Fc epsilon RI-mediated recruitment of p53/56lyn to detergent-resistant membrane domains accompanies cellular signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9201–9205.
- [14] FIELDING CJ, BIST A, FIELDING PE. Intracellular cholesterol transport in synchronized human skin fibroblasts. *Biochemistry* 1999; **38**: 2506–2513.
- [15] GAGNOUX-PALACIOS L, DANS M, VAN'T HOF W, MARIOTTI A, PEPE A, MENEGUZZI G, RESH MD, GIANCOTTI FG. Compartmentalization of integrin alpha6beta4 signaling in lipid rafts. *J Cell Biol* 2003; **162**: 1189–1196.
- [16] GAJATE C, DEL CANTO-JANEZ E, ACUNA AU, AMAT-GUERRI F, GEIJO E, SANTOS-BENEIT AM, VELDMAN RJ, MOLLINEDO F. Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Cell Biol* 2004; **200**: 353–365.
- [17] GAJATE C, MOLLINEDO F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 2001; **98**: 3860–3863.
- [18] GNIADOCKI R, BANG B. Flotillas of lipid rafts in transit amplifying cell-like keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2003; **121**: 522–528.
- [19] GNIADOCKI R. Depletion of membrane cholesterol causes ligand-independent activation of Fas and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **320**: 165–169.
- [20] GOMEZ-MOUTON C, ABAD JL, MIRA E, LACALLE RA, GALLARDO E, JIMENEZ-BARANDA S, ILLA I, BERNAD A, MANES S, MARTINEZ AC. Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 9642–9647.
- [21] GRIFFITH M, EWART KV. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnol Adv* 1995; **13**: 375–402.
- [22] GUAN JL. Cell biology. Integrins, rafts, Rac, and Rho. *Science* 2004; **303**: 773–774.
- [23] HOLOWKA D, SHEETS ED, BAIRD B. Interactions between FcεRI and lipid raft components are regulated by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 2000; **113**: 1009–1019.
- [24] HUG P, LIN HM, KORTE T, XIAO X, DIMITROV DS, WANG JM, PURI A, BLUMENTHAL R. Glycosphingolipids promote entry of a board range of human immunodeficiency virus type 1 isolates into cell lines expressing CD4, CXCR4, and/or CCR5. *J Virol* 2000; **74**: 6377–6385.
- [25] JANS R, ATANASOVA G, JADOT M, POU MAY Y. Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *J Invest Dermatol* 2004; **123**: 564–573.
- [26] KANU N, IMOKAWA Y, DRECHSEL DN, WILLIAMSON RA, BIRKETT CR, BOSTOCK CJ, BROCKES JP. Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture. *Curr Biol* 2002; **12**: 523–530.
- [27] KWIK J, BOYLE S, FOOKSMAN, MARGOLIS L, SHEETZ MP, EDIDIN M. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 13964–13969.

- [28] LAHTINEN U, HONSHO M, PARTON RG, SIMONS K, VERKADE P. Involvement of caveolin-2 in caveolar biogenesis in MDCK cells. *FEBS Lett* 2003; **538**: 85–88.
- [29] LEGLER DF, MICHEAU O, DOUCEY MA, TSCHOPP J, BRON C. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF-mediated NF κ B activation. *Immunity* 2003; **18**: 655–664.
- [30] MAHFOUD R, GARMY N, MARESCA M, YAHN N, PUIGSERVER A, FANTINI J. Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins. *J Biol Chem* 2002; **277**: 11292–11296.
- [31] MULLER G. The molecular mechanism of the insulin – mimetic sensitizing activity of the antidiabetic sulfonylurea drug Amaryl. *Mol Med* 2000; **6**: 907–933.
- [32] MUPPIDI JR, SIEGEL RM. Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nat Immunol* 2004; **5**: 182–189.
- [33] NABI IR, LE PU. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 2003; **161**: 673–677.
- [34] NICHOLS BJ. A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 374–378.
- [35] OH P, McINTOSH DP, SCHNITZER JE. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* 1998; **141**: 101–114.
- [36] OHVO-REKILA H, RAMSTEDT B, LEPPIMAKI P, SLOTTE JP. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* 2002; **41**: 66–97.
- [37] ONO A, FREED EO. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 13925–13930.
- [38] OSTERMEYER AG, BECKRICH BT, IVARSON KA, GROVE KE, BROWN DA. Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane rafts in melanoma cells. methyl-beta-cyclodextrin does not affect cell surface transport of a GPI-anchored protein. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34459–34466.
- [39] PALADE GE. Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys* 1953; **24**: 1424.
- [40] PALAZZO AF, COOK TA, ALBERTS AS, GUNDERSEN GG. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 723–729.
- [41] PALAZZO AF, ENG CH, SCHLAEFFER DD, MARCANTONIO EE, GUNDERSEN GG. Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science* 2004; **303**: 836–839.
- [42] PARTON RG, RICHARDS AA. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* 2003; **4**: 724–738.
- [43] PARTON RG. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 542–548.
- [44] PARTON RG. Ultrastructural localization of gangliosides: GM1 is concentrated in caveolae. *J Histochem Cytochem* 1994; **42**: 155–166.
- [45] PAYRASTRE B, PLANTAVID M, ETIEVAN C, RIBBES G, CARRATEO C, CHAP H, DOUSTE-BLAZY L. Characterization of plasma membranes from A431 cells, isolated by self-generating Percoll gradient: a rapid isolation procedure to obtain plasma membranes with functional epidermal growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* 1988; **939**: 355–365.
- [46] PELKMANS L, PUNTENER D, HELENIUS A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 2002; **296**: 535–539.
- [47] PIERINI LM, MAXFIELD FR. Flotillas of lipid rafts fore and aft. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 9471–9473.
- [48] PIKE LJ, CASEY L. Cholesterol levels modulates EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. *Biochemistry* 2002; **41**: 10315–10322.
- [49] PIKE LJ, HAN X, CHUNG KN, GROSS RW. Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmalogen-ethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry* 2002; **41**: 2075–2088.
- [50] PIKE LJ, MILLER JM. Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* 1998; **273**: 22298–22304.
- [51] PRALLE A, KELLER P, FLORIN EL, SIMONS K, HORBER JK. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* 2000; **148**: 997–1007.
- [52] RACINE C, BELANGER M, HIRABAYASHI H, BOUCHER M, CHAKIR J, COUET J. Reduction of caveolin 1 gene expression in lung carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **225**: 580–586.
- [53] RAZANI B, SCHLEGEL A, LISANTI MP. Caveolin proteins in signaling, oncogenic transformation and muscular dystrophy. *J Cell Sci* 2000; **113**: 2103–2109.
- [54] RAZANI B, WANG XB, ENGELMAN JA, BATTISTA M, LAGAUD G, ZHANG XL, KNEITZ B, HOU HJr, CHRIST GJ, EDELMANN W, LISANTI MP. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 2329–2344.

- [55] ROBERTS G. Langmuir-Blodgett Films. Plenum Press, New York 1990.
- [56] SABHARANJAK S, SHARMA P, PARTON RG, MAYOR S. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytotic pathway. *Dev Cell* 2002; **2**: 411–423.
- [57] SCHUTZ GJ, KADA G, PASTUSHENKO VP, SCHINDLER H. Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J* 2000; **19**: 892–901.
- [58] SELKOE DJ. Alzheimer disease: genes, proteins and therapy. *Physiol Rev* 2001; **81**: 741–766.
- [59] SHEETS ED, HOLOWKA D, BAIRD B. Critical role for cholesterol in Lyn-mediated tyrosine phosphorylation of FcepsilonRI and their association with detergent-resistant membranes. *J Cell Biol* 1999; **145**: 877–887.
- [60] SIMONS M, KELLER P, DICHGANS J, SCHULZ JB. Cholesterol and Alzheimer's disease: is there a link? *Neurology* 2001; **57**: 1089–1093.
- [61] SMART EJ, YING YS, DONZELL WC, ANDERSON RGW. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 1996; **271**: 29427–29435.
- [62] SMART EJ, YING YS, MINEO C, ANDERSON RG. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 10104–10108.
- [63] SONG KS, LI SHENGWEN, OKAMOTO T, QUILLIAM LA, SARGIACOMO M, LISANTI MP. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem* 1996; **271**: 9690–9697.
- [64] SOWA G, PYPAERT M, FULTON D, SESSA WC. The phosphorylation of caveolin-2 on serines 23 and 36 modulates caveolin-1-dependent caveolae formation. *Proc Nat Acad Sci USA* 2003; **100**: 6511–6516.
- [65] TARABOULOS A, SCOTT M, SEMENOV A, AVRAHAMI D, LASZLO L, PRUSINER SB. Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* 1995; **129**: 121–132.
- [66] THOMSEN P, ROEPSTORFF K, STAHLHUT M, VAN DEURS B. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytosis trafficking. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 238–250.
- [67] TIMME TL, GOLTSOV A, TAHIR S, LI L, WANG J, REN C, JOHNSTON RN, THOMPSON TC. Caveolin-1 is regulated by c-myc and suppresses c-myc-induced apoptosis. *Oncogene* 2000; **19**: 3256–3265.
- [68] VARMA R, MAYOR S. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 1998; **394**: 798–801.
- [69] VOLONTE D, GALBIATI F, LISANTI MP. Visualization of caveolin-1, a caveolar marker protein, in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras: the subcellular distribution of caveolin-1 is modulated by cell-cell contact. *FEBS Lett* 1999; **445**: 431–439.
- [70] YAMABHAI M, ANDERSON RG. Second cysteine-rich region of epidermal growth factor receptor contains targeting information for caveolae/rafts. *J Biol Chem* 2002; **277**: 24843–24846.
- [71] YAMASHITA T, YAMAGUCHI T, MURAKAMI K, NAGASAWA S. Detergent-resistant membrane domains are required for mast cell activation but dispensable for tyrosine phosphorylation upon aggregation of the high affinity receptor for IgE. *J Biochem* 2001; **129**: 861–868.
- [72] YANG G, ADDAI J, ITTMANN M, WHELLER TM, THOMPSON TC. Elevated caveolin-1 levels in African-American versus white-American prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 3430–3433.
- [73] YANG G, TRUONG LD, TIMME TL, REN C, WHEELER TM, PARK SH, NASU Y, BANGMA CH, KATTAN MW, SCARDINO PT, THOMPSON TC. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 1873–1880.
- [74] YANG G, TRUONG LD, WHEELER TM, THOMPSON TC. Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker. *Cancer Res* 1999; **59**: 5719–5723.
- [75] YUAN C, JOHNSTON LJ. Atomic force microscopy studies of ganglioside GM1 domains in phosphatidylcholine and phosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *Biophys J* 2001; **81**: 1059–1069.
- [76] ZHANG J, PEKOSZ A, LAMB RA. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J Virol* 2000; **74**: 4634–4644.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 10.12. 2004 r.

Przyjęto: 20.02.2005 r.

Ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa

e-mail: urszula@cmdik.pan.pl

REAKTYWNE FORMY TLENU W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH I ENZYMATYCZNE SYSTEMY OBRONNE*

REACTIVE OXYGEN SPECIES IN PLANT CELLS AND ANTIOXIDATIVE DEFENSE SYSTEMS

Arleta MAŁECKA, Barbara TOMASZEWSKA

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

Streszczenie: Wszystkie organizmy żywe narażone są na działanie reaktywnych form tlenu (RFT), takich jak: nadtlenek wodoru, anionorodnik ponadtlenkowy czy rodnik hydroksylowy, które powstają jako nieuchronny produkt metabolizmu tlenowego. Liczne czynniki biotyczne i abiotyczne, takie jak: patogeny, zanieczyszczenie powietrza, zasolenie, ksenobiotyki, metale ciężkie, promieniowanie UV, powodują wzmożone generowanie RFT. Głównymi źródłami RFT w komórkach roślinnych są: chloroplasty, peroksysomy i mitochondria. RFT uszkadzają wiele makromolekuł, takich jak: białka, tłuszcze oraz kwasy nukleinowe, prowadząc do śmierci komórek. Przypisuje się im również funkcję cząsteczek sygnałowych. Organizmy aerobowe przed uszkodzeniami spowodowanymi przez RFT są chronione przez antyoksydacyjny system obronny, składający się z katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy i alternatywnej oksydazy oraz ze składników nieenzymatycznych: askorbinianu, glutationu, homoglutationu, cysteiny.

Słowa kluczowe: reaktywne formy tlenu, stres oksydacyjny, enzymy antyoksydacyjne.

Summary: All organisms are exposed to reactive oxygen species such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and hydroxyl radical ($\cdot OH$) as unavoidable products of oxidative metabolism. Many biotic and abiotic factors such as: pathogens, air pollutants, salts, xenobiotic, heavy metals, UV radiation initiate ROS formation. The main sites of ROS formation in plant cells are chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. ROS can cause wide-ranging damage to many macromolecules including proteins, lipids and nucleic acids, eventually leading to cell death. Recently considered positive biological roles of ROS act as signal-transducing molecules. To minimize the damaging effects of ROS, aerobic organisms evolved several antioxidant defense mechanisms, including catalase, superoxide dismutase, peroxidases and alternative oxidase, and non-enzymatic molecules such as: ascorbic, glutathione, homoglutathione, cysteine.

Keywords: reactive oxygen species, oxidative stress, antioxidant enzymes.

*Praca finansowana z grantu KBN nr 2PO4G 069 26

1. REAKTYWNE FORMY TLENU (RFT)

Paradoks związany z obecnością tlenu w atmosferze polega na tym, że z jednej strony metabolizm tlenowy dostarcza organizmom aerobowym więcej energii w porównaniu z metabolizmem beztlenowym u anaerobów, z drugiej jednak strony stopniowa redukcja O_2 do H_2O prowadzi do powstawania RFT, takich jak: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), nadtlenuk wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$). Różnorodne stresy środowiskowe, takie jak: wysoka i niska temperatura, zasolenie, promieniowanie UV, metale ciężkie, ksenobiotyki czy patogeny, prowadzą do podwyższenia poziomu reaktywnych form tlenu. Dowiedziono, że metale ciężkie, takie jak: Cd, Pb, Al, Zn, powodują generowanie RFT i przyczyniają się do wystąpienia w komórkach roślinnych warunków stresu oksydacyjnego [7, 14, 18, 68, 72, 78, 84]. RFT powstają również jako produkty uboczne transportu elektronów przez błony komórkowe [84]. Niebezpieczeństwo powstawania anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenuk wodoru polega na tym, że w obecności jonów metali (Fe, Cu, Cr, Ni, Co, Mn) zachodzi reakcja Fentona, której są one substratami, a produktem jest rodnik hydroksylowy, najbardziej reaktywna cząsteczka, jaka występuje w układach biologicznych [8, 14, 33, 71].

2. ŹRÓDŁA POWSTAWANIA RFT W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

W komórce roślinnej istnieje wiele potencjalnych źródeł RFT. Są to: chloroplasty, mitochondria, peroksosomy, błona komórkowa, dwuwarstwowa błona jądrowa i retikulum endoplazmatyczne oraz apoplast [4, 11–15, 29]. Organellami o szczególnie wysokiej aktywności metabolizmu tlenowego są: mitochondria, chloroplasty oraz peroksosomy.

2.1. Chloroplasty

W chloroplastach wytwarzany jest $O_2^{\cdot-}$ głównie w reakcji Mehlera [8, 66, 77, 86]. Stwierdzono, że szybkość wytwarzania tego rodnika w normalnych warunkach wynosi $120\text{--}250 \mu\text{Ms}^{-1}$ i zwiększa się do $720 \mu\text{Ms}^{-1}$ w warunkach stresowych [72]. W chloroplastach źródłem anionorodnika ponadtlenkowego może być także zredukowana forma monodehydroksyaskorbinianu, jak również elementy kompleksu PSII: chlorofil P_{680} i białko Q_A [19]. Chloroplasty, a dokładnie fotosystem II (PS II) stanowią również źródło tlenu singletowego [52, 86] oraz nadtlenuozotynu ($ONOO^-$) [86].

2.2. Peroksosomy

W peroksosomach głównym źródłem H_2O_2 są oksydazy flawinowe. Nadtlenuk wodoru jest wytwarzany także w procesie b-oksydacji przez oksydazę acylo-CoA. W matriks peroksosomalnej i NADH- zależnym łańcuchu transportu elektronów w błonie

peroksymalnej wykazano również wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego przez oksydazę ksantynową. Charakterystyczna dla peroksysomów brodawek korzeniowych roślin motylkowatych, oksydaza ksantynowa katalizuje reakcje przekształcenia ksantyny do kwasu moczowego w wyniku czego powstaje $O_2^{\cdot-}$. Kwas moczowy ulega przekształceniu do alantoiny przez oksydazę moczanową, co również jest źródłem powstawania RFT [8, 19, 21, 22].

W błonie peroksysomalnej występują trzy polipeptydy (PMPs) o masie cząsteczkowej 18 (PMP18), 29 (PMP29) i 32 kDa (PMP32), w obecności których powstaje $O_2^{\cdot-}$ [22, 48]. Przyjmuje się, że polipeptyd PMP18 należy do grupy cytochromów typu-b i jest NADH- zależny. PMP32 jest również NADH- zależny i najprawdopodobniej odpowiada reduktazie monodehydroaskorbinianowej (MDHAR), która została wcześniej wykryta w błonie peroksysomalnej komórek liści grochu [36].

W błonach peroksysomów i tylakoidach chloroplastów liści szpinaku również odkryto pośredni udział MDHAR w produkcji $O_2^{\cdot-}$ [56].

Peroksysomalna syntaza tlenu azotu (EC 1.14.13.39) wytwarza NO w reakcji NADPH-zależnej przekształcenia L-argininy do NO i cytruliny w obecności tlenu, wapnia, kalmoduliny, FAD, FMN i tetrahydrobiopteryny [5]. NO może reagować z $O_2^{\cdot-}$ tworząc silnie utleniający anion ponadtlenoazotynowy, który może wpływać na przekształcanie dehydrogenazy ksantynowej w generującą $O_2^{\cdot-}$ oksydazę ksantynową [19].

2.3. Mitochondria

W mitochondrialnym łańcuchu oddechowym do 2% tlenu ulega przekształceniu do RFT [9, 13, 32]. Anionorodnik ponadtlenkowy może powstawać w łańcuchu oddechowym w wyniku jednoelektronowej redukcji zachodzącej z udziałem flawin lub ubichinonu [58]. Miejscem tworzenia $O_2^{\cdot-}$ jest kompleks I [oksydoreduktaza NADH : ubichinon], kompleks II [oksydoreduktaza bursztynian : ubichinon] oraz kompleks III [oksydoreduktaza ubichinol : cytochrom c] [13, 19, 27, 58]. W mitochondriach w obecności substratu oddechowego, lecz w stanie wyczerpania akceptora fosforanu (ADP) oraz przy spadku aktywności oksydazy cytochromowej wzrasta powstawanie RFT. W obu sytuacjach wzrasta stężenie tlenu i poziom zredukowanych donorów jednoelektronowych, co w konsekwencji powoduje wzrost tempa ich reakcji z tlenem [46]. Mitochondria roślinne, w odróżnieniu od zwierzęcych, charakteryzują się występowaniem alternatywnej drogi oddechowej, która kontroluje generowanie RFT i pełni funkcje ochronne. Alternatywna oksydaza katalizuje przeniesienie elektronów z puli ubichinonu bezpośrednio na tlen, z wyłączeniem drogi cytochromowej. Regulacja ta prowadzi do zmniejszenia generowania RFT w mitochondriach [27, 28, 38, 76]. Ponadto mitochondrialna syntaza tlenu azotu (NOS) powoduje powstanie NO, który w wyniku reakcji z $O_2^{\cdot-}$ prowadzi do powstania nadtlenoazotynu. Oprócz tego anionorodnik ponadtlenowy w reakcji dysmutacji ulega przekształceniu do nadtlenku wodoru [40, 41, 43, 86].

2.4. Inne źródła RFT

RFT powstają także w błonach komórkowych, w reakcjach katalizowanych przez oksydazę NADPH [33] oraz w apoplazmie i ścianie komórkowej, gdzie pH-zależne

peroksydazy ściany komórkowej odpowiadają za powstawanie nadtlenu wodoru [19, 65]. Przypuszczalnie źródłem RFT w apopląście mogą być takie enzymy, jak oksydaza szczawianowa oraz diamino- i poliamino-oksydazy [45]. Ponadto źródłem RFT może być retikulum endoplazmatyczne. W mikrosomach występuje kompleks cytochrom P-450 i reduktaza NADH, które mogą generować $O_2^{\cdot -}$ i H_2O_2 [91].

3. SKUTKI DZIAŁANIA RFT NA KOMÓRKI ROŚLINNE

RFT w wysokich stężeniach działają negatywnie na funkcje wszystkich organelli komórkowych, uszkadzając białka, lipidy oraz kwasy nukleinowe [64, 72, 73, 84, 89]. W wyniku działania RFT na białko może dochodzić do specyficznych modyfikacji ich reszt aminokwasowych, fragmentacji łańcucha polipeptydowego, powstawania wiązań poprzecznych i agregacji lub zmiany ładunku. Szczególnie podatne na uszkodzenia oksydacyjne są białka zawierające reszty histydyny, argininy, lizyny, proliny, metioniny i cysteiny oraz białkowe centra żelazowo-siarkowe. Główną konsekwencją oksydacyjnych uszkodzeń białek jest zwiększenie ich degradacji przez proteazy [68].

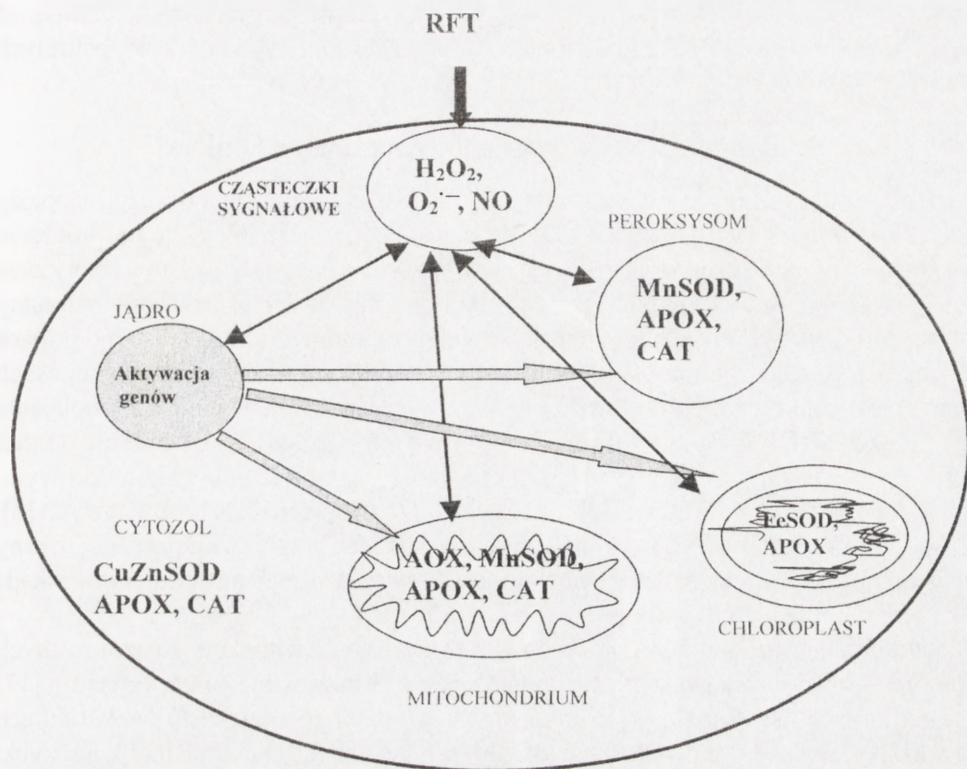
RFT są przyczyną szerokiego spektrum uszkodzeń DNA. Uszkodzenia te obejmują pęknięcia zarówno pojedynczej, jak i obu nici w helisie DNA, powstanie miejsc apurynowych i apirimidowych oraz modyfikacje zasad [37]. Rodnik hydroksylowy powoduje zmiany w zasadach azotowych, polegające na usuwaniu lub wstawianiu atomów H, co prowadzi do zakłócenia prawidłowej struktury podwójnej helisy DNA [15].

Rodnik hydroksylowy i tlen singletowy reagują z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi odrywając od nich atom wodoru, co w konsekwencji prowadzi do powstania hydroksynadtlenków lipidów. Związki te mogą być degradowane do różnych produktów, w tym aldehydów i alkoholi, a w obecności katalizatora metalicznego biorą udział w reakcji Fentona, która prowadzi do powstania reaktywnych rodników alkoksylowych ($RO\cdot$). Rodnik hydroksylowy inicjuje więc reakcję łańcuchową prowadzącą do peroksydacji lipidów [8, 57]. RFT mogą indukować niespecyficzne uprzepuszczalnianie błony mitochondrialnej, co powoduje obniżenie potencjału błonowego i wypływ Ca^{2+} z mitochondriów [6, 40].

3.1. RFT jako cząsteczki sygnałowe

Dwoisty charakter RFT przejawia się tym, iż poza wcześniej opisanymi właściwościami pełnią one funkcję cząsteczek sygnałowych [19, 64, 71, 80]. H_2O_2 jest niezwykle mobilną cząsteczką i może indukować szereg molekularnych, biochemicznych i fizjologicznych odpowiedzi komórkowych. Nadtlenek wodoru indukuje ekspresję genów kodujących takie białka, jak np. S-transferazy glutationowe (GST) oraz peroksydazy glutationowe (GPOX).

Wykazano, że akumulacja H_2O_2 w zawieszynie komórkowej *Arabidopsis thaliana* indukowała ekspresję genów GST i amoniakolizazy fenyloalaniny (PAL) [63]. Ponadto wykazano, że H_2O_2 aktywował geny kodujące oksydazę NADPH [24] i peroksydazę askorbinianową w liściach *Arabidopsis thaliana* [39], a także katalazę w nasionach i liściach kukurydzy [31].



RYCINA 1. Model ilustrujący komunikację między organellami komórkowymi (mitochondrium, jądrem, chloroplastem i peroksyssomem) za pośrednictwem cząstek sygnałowych (H₂O₂, O₂^{•-}, NO) oraz lokalizację enzymów antyoksydacyjnych w komórce roślinnej

Wielu autorów wskazuje, że RFT aktywują kaskadę kinaz białkowych MAPK. W zawieszynie komórkowej *Arabidopsis thaliana* scharakteryzowano kaskadę MAPK, której funkcją jest odbieranie sygnału redoks i indukowanie ekspresji genów białek obronnych np. S-transferazy glutationowej. Na szczycie tej kaskady znajduje się kinaza ANP1 (o funkcji MAPKKK), a kolejne jej elementy stanowią kinazy AtMPK3 i AtMPK6. Liście transgenicznego tytoniu z nadekspresją ANP1 cechowały się zwiększoną tolerancją na szok cieplny, zamarzanie oraz zasolenie. Wskazuje to na fakt, iż indukowanie określonych etapów drogi przekazywania sygnałów w roślinach może chronić je przed różnymi stresami środowiskowymi [42].

Funkcje cząsteczki sygnałowej pełni również NO. Tlenek azotu bierze udział w regulacji różnorodnych procesów w komórkach roślinnych, takich jak: wzrost i rozwój, metabolizm oddechowy, reakcja na patogeny, procesy starzenia i dojrzewania oraz odpowiedź na warunki stresowe. Cząsteczka NO pełni funkcję sygnałową. Transdukcja sygnału NO odbywa się przez cGMP (cykliczny guanozynomonofosforan) i aktywację cyklazy guanylowej [10, 30].

W ostatnich latach ukazało się szereg prac [19, 20, 71] sugerujących, iż również O_2^- , niezależnie od H_2O_2 , funkcjonuje jako cząsteczka sygnałowa w roślinnych reakcjach obronnych.

3. 2. Udział RFT w programowanej śmierci komórki

Stres oksydacyjny może być przyczyną programowanej śmierci komórki, czyli apoptozy (ang. *Programmed Cell Death* – PCD), która jest istotnym, fizjologicznym procesem występującym w czasie rozwoju rośliny i jest odpowiedzią na stres biotyczny i abiotyczny.

Apoptozę komórek wywołują zarówno reaktywne formy tlenu i azotu, jak i produkty ich reakcji, związki powstające z rozpadu tych produktów oraz czynniki indukujące lub podwyższające generowanie RFT oraz powodujące zakłócenia w procesach energetycznych, aktywację polimerazy poli-A, wzrost poziomu wapnia w cytoplazmie [6, 10, 20]. RFT mogą indukować apoptozę powodując fragmentację DNA, aktywowanie lub hamowanie aktywności kaspaz, czy też interferencję z komórkowymi szlakami przekazywania informacji zależnymi od fosforylacji reszt tyrozynowych [6]. Kluczowym etapem PCD jest wzrost przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz uwolnienie cytochromu c do cytoplazmy, gdzie ma miejsce kaskada zdarzeń promująca PCD [40, 49].

Stwierdzono, że podanie cytochromu c techniką mikroiniekcji do izolowanych komórek spowodowało wystąpienie apoptozy [90]. W zawiesinie komórkowej soi [17] i w komórkach liści tytoniu [4] zaobserwowano, że generowanie H_2O_2 w warunkach stresu oksydacyjnego, spowodowanego atakiem patogena lub elicytora, indukuje szybki wpływ Ca^{2+} z komórki prowadząc do apoptozy. Jedną z hipotez zakłada, że niespecyficzne uprzepuszczalnienie błony mitochondrialnej w warunkach stresu oksydacyjnego prowadzące do apoptozy jest jednym z komórkowych mechanizmów obronnych przeciwko nadmiernej produkcji RFT [6, 40].

Wielu autorów [25, 55] wykazało udział H_2O_2 w programowanej śmierci komórki. Śmierć komórki roślinnej poznano najlepiej w reakcji nadwrażliwości komórek (HR, ang. *hypersensitive response*) roślinnych podczas infekcji patogenem. Zmiany poziomu H_2O_2 nie są same w sobie bezpośrednimi egzekutorami programu śmierci, ale wywołują kaskadę transdukcji sygnału, która ostatecznie uruchamia program śmierci komórkowej. Prawdopodobnie następuje to, w wyniku wzajemnego oddziaływania H_2O_2 z innymi cząsteczkami sygnałowymi, takimi jak: etylen czy kwas salicylowy [64, 65] oraz NO [30]. Źródłem wybuchu tlenowego, który indukuje reakcję nadwrażliwości, może być zarówno kompleks oksydazy NADPH, jak i pH- zależne peroksydazy ściany komórkowej [12]. Stwierdzono spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych w reakcji nadwrażliwości komórki w trakcie ataku patogena, powodujący wzrost poziomu RFT.

W komórkach roślin tytoniu, poddanych reakcji nadwrażliwości spowodowanej przenikaniem elicytorów grzybowych, akumulacja H_2O_2 była skorelowana z obniżeniem poziomu transkryptów *CAT1* i *CAT2* oraz obniżeniem aktywności katalazy [14]. Stwierdzono, że H_2O_2 już w 5 mM stężeniu inicjował śmierć komórek w zawiesinie komórkowej *Arabidopsis thaliana*. Zainicjowany proces śmierci komórki był już nieodwracalny [25].

Tlenkowi azotu przypisuje się również udział w programowanej śmierci komórki [20] i aktywacji kaskady kinaz białkowych MAPK [64].

4. ENZYMATYCZNY SYSTEM ANTYOKSYDACYJNY

Rośliny wykształciły różne mechanizmy obronne, które umożliwiają usuwanie RFT, a tym samym zapobiegają postępującym uszkodzeniom komórki prowadzącym do jej śmierci lub je minimalizują. System antyoksydacyjny składa się zarówno z enzymów (dysmutazy ponadtlenkowe, katalaza, peroksydaza askorbinianowa oraz alternatywna oksydaza), jak i związków niskocząsteczkowych (askorbinian, cysteina, glutation, α -tokoferol). Enzymy antyoksydacyjne można podzielić na: bezpośrednio usuwające RFT i enzymy cyklu Halliwell-Asady, uczestniczące w ich unieczynianiu poprzez antyoksydanty niskocząsteczkowe.

4.1. Katalaza (CAT)

Katalaza [EC 1.11.1.6] jest tetramerem hemoproteinowym o masie cząsteczkowej 240 kDa kodowanym przez genom jądrowy. Wyizolowano trzy formy izoenzymatyczne: CAT-1, CAT-2 i CAT-3. Dwie pierwsze formy występują głównie w miejscach obfitego powstawania H_2O_2 : peroksydomach, glioksydomach i cytozolu, uniemożliwiając jego rozprzestrzenianie się. CAT-3 jest obecny w mitochondriach i cytozolu [27, 79]. Enzym ten katalizuje reakcje dysmutacji nadtlenu wodoru. Katalaza ma również właściwości peroksydazowe, może utleniać takie substancje, jak: metanol, etanol, formaldehyd, azotyny i chinony [8, 14]. Jest to enzym o bardzo wysokiej liczbie obrotów, reagujący z nadtlakiem wodoru 10 000 razy szybciej niż typowe peroksydazy roślinne. Stała szybkości katalizowanej przez nią reakcji wynosi $1,7 \times 10^7 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{s}^{-1}$, lecz wartość stałej Michaelisa K_m jest duża, rzędu $1 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ [8].

Wielu autorów [14, 34] stwierdziło, iż forma izoenzymatyczna CAT-1 związana jest z tkankami fotosyntetyzującymi, bierze udział w usuwaniu H_2O_2 powstałego podczas fotooddychania. Druga izoforma tego enzymu CAT-2 występuje w dużych ilościach w tkankach roślin naczyniowych i być może bierze udział w lignifikacji ścian komórkowych, jego właściwa rola biologiczna pozostaje dotychczas nieznaną. Natomiast izoforma CAT-3 występuje w znacznych ilościach w nasionach i młodych roślinach, a jego aktywność związana jest z usuwaniem H_2O_2 powstałego podczas degradacji kwasów tłuszczowych w cyklu glioksalowym w glioksydomach.

Prawdopodobnie to produkty genu *CAT2* pełnią znaczącą rolę ochronną w warunkach stresu oksydacyjnego. Ekspozycja roślin na ozon, dwutlenek siarki czy promieniowanie UV prowadzi do szybkiego obniżenia poziomu transkrypcji genu *CAT1*, a jednocześnie zaobserwowano wzrost transkrypcji genu *CAT2* [34].

Z rzodkiewnika, tytoniu, ryżu i kukurydzy wyizolowano cDNA dla trzech klas katalazy. U *Nicotiana plumbaginifolia* *CAT1* występuje głównie w komórkach mięksiszu palisadowego, a jego produkty stanowią około 80% całkowitej aktywności katalazy w liściu. Natomiast gen *CAT2* zlokalizowany jest głównie we floemie, zaś jego produkty stanowią około 20% całkowitej aktywności katalazy.

Badania transgenicznej linii tytoniu CAT1AS, z wyciszonym genem *CAT1* wykazały większą wrażliwość tych roślin niż roślin dzikich na herbicydy, ozon, stres solny [14].

4.2. Dysmutazy ponadtlenkowe (SOD)

Dysmutazy ponadtlenkowe [EC 1.15.1.1] katalizują reakcję dysmutacji anionorodników ponadtlenkowych i odgrywają ważną rolę w ochronie komórek przed toksycznym działaniem $O_2^{\cdot-}$, wytwarzanym w różnych kompartmentach komórkowych. Wykazano obecność SOD w chloroplastach, mitochondriach i peroksosomach, a więc w organellach komórkowych zaangażowanych w wytwarzanie RFT [22].

Bardzo wysoka stała szybkość katalizowanej reakcji wynosząca ok. $2 \times 10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$ świadczy o tym, że jest ona ograniczana praktycznie tylko przez dyfuzję $O_2^{\cdot-}$ [91]. Dysmutazy ponadtlenkowe są metaloproteinami i ze względu na rodzaj związanego kofaktora wyróżniamy: CuZnSOD, MnSOD i FeSOD. Wszystkie izoformy SOD są kodowane przez genom jądrowy, a ich ekspresja jest regulowana niezależnie.

Dysmutazy miedziowo-cynkowe (CuZnSOD) występują głównie w chloroplastach, cytozolu, przestrzeniach: międzykomórkowej i mitochondrialnej oraz w peroksosomach [2, 9, 44, 91]. CuZnSOD można podzielić na dwie grupy: pierwszą stanowią formy cytoplazmatyczna i periplazmatyczna, występujące w postaci homodimerów, a drugą występujące w chloroplastach i na powierzchni komórek (pozakomórkowa EC-SOD) będące homotetramerami. CuZnSOD przez długi czas była uważana za enzym wyłącznie eukariotyczny, do czasu wykrycia ich w komórkach bakterii, takich jak: *Photobacterium leiognathi*, *Caulobacter crescentus* czy *Pseudomonas*. Dalsze badania sugerują, iż ta forma enzymu pierwotnie występowała u *Prokaryota*, a znacznie później pojawiła się u organizmów eukariotycznych [2].

Dysmutazy miedziowo-cynkowe występują u niemal wszystkich gatunków roślin. Komórki jednego gatunku zawierać mogą kilka izoform CuZnSOD. Enzymy pochodzące z chloroplastów wykazują większą odporność na nadtlenuk wodoru i wysoką temperaturę, co jest zapewne związane z wysoką produkcją $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 w tych organellach [91]. Ostatnie badania immunologiczne z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw cytozolowej CuZnSOD dowiodły występowania tego enzymu w apoplacie oraz w jądrze komórkowym. Wysłunęto tezę, iż CuZnSOD apoplastyczna uczestniczy w procesie lignifikacji, natomiast jądrowa chroni przed fatalnymi w skutkach mutacjami spowodowanymi przez $O_2^{\cdot-}$ [2].

Dysmutazy miedziowo-cynkowe, o masie cząsteczkowej 32–33 kDa, składają się z dwóch podjednostek zawierających 8 fragmentów o strukturze β . Jon miedziowy bezpośrednio uczestniczy w procesie katalitycznym. Jego ligandami są cztery reszty imidazolowe histydyny. W pobliżu znajdujący się jon Zn^{2+} jest kompleksowany przez trzy reszty histydynowe i resztę asparaginową. Jedna z reszt histydyny uczestniczy równocześnie w wiązaniu jonu miedzi. Stabilna budowa cząsteczki sprawia, że szybkość działania dysmutaz miedziowo-cynkowych jest nieco wyższa niż MnSOD i FeSOD, są one również mniej wrażliwe na działanie różnych czynników fizycznych i chemicznych [8, 91]. Dysmutazy miedziowo-cynkowe cechuje wysoki stopień homologii struktury pierwszorzędowej dla różnych gatunków roślin, dla enzymów chloroplastowych podobieństwo jest rzędu 80–90%, a dla form cytozolowych około 68% [2].

Dysmutazy pozakomórkowe (ECSOD) są tetramerami zlokalizowanymi głównie w komórkach ssaków, związanymi z osoczem krwi, limfą, płynem maziowym i płynem śródmiąższowym stawów [2, 8, 53]. ECSOD wykryto również u roślin, np. w szpilkach sosny *Pinus sylvestris* [8] oraz u bakterii gram-dodatnich, np. *Nocardia asteroides* [85]. Te dysmutazy są tetramerami o masie cząsteczkowej każdej z podjednostek wynoszącej około 30 kDa, a w centrum aktywnym zawierają miedź i cynk [53].

Dysmutazy manganowe (MnSOD) występują prawie u wszystkich organizmów żywych: bakterii, glonów, grzybów, zwierząt i roślin wyższych. MnSOD u roślin wyższych występują głównie w mitochondriach i peroksosomach [23]. MnSOD są tetramerami o masie cząsteczkowej około 92 kDa lub homodimerami o masie 41 kDa, np. u bakterii brodawkowych roślin motylkowatych. Podjednostka zawiera dwie domeny: N-końcową, zawierającą pięć odcinków α -helikalnych i domenę C-końcową zawierającą trzy fragmenty o strukturze β i dwie niewielkie α -helisy. Jon manganu biorący udział w procesie katalitycznym jest wiązany przez trzy reszty histydyny i resztę kwasu asparaginowego [9, 91]. Struktury pierwszorzędowe MnSOD z różnych, niespokrewnionych ze sobą gatunków roślin, są bardzo do siebie podobne, np. enzym z grochu (*Pisum sativum*) wykazuje odpowiednio 79,8% i 71,5% homologii w porównaniu z tym z tytoniu (*Nicotiana plumbaginifolia*) oraz kukurydzy (*Zea mays*) [91].

Dysmutazy żelazowe (FeSOD) występują zarówno u organizmów eukariotycznych, jak i prokariotycznych. Roślinne dysmutazy żelazowe zlokalizowane są w chloroplastach. FeSOD można podzielić na dwie grupy. Pierwszą grupę stanowią formy homodimeryczne, zbudowane z dwóch identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej 20 kDa każda, które wykazano między innymi u: *Escherichia coli*, w chloroplastach *Ginkgo biloba* czy *Brassica campestris*. Druga grupa tych enzymów występuje u roślin wyższych, a są one tetramerami zbudowanymi z czterech równych podjednostek o masie cząsteczkowej 80–90 kDa [2]. W miejscu aktywnym znajduje się jon żelaza, a jego ligandami są trzy reszty histydyny i reszta kwasu asparaginowego. FeSOD pochodzenia roślinnego cechuje duże, dochodzące do 76%, podobieństwo sekwencyjne [91].

4.3. Peroksydazy (POX)

Peroksydazy powszechnie występują w świecie roślin, katalizują reakcje rozkładu H_2O_2 , utleniając jednocześnie różne substraty organiczne lub nieorganiczne. Są hemoproteinami o różnej lokalizacji i specyficzności wobec substratu, który wykorzystują jako donor elektronów [84]. Można je podzielić na dwie grupy. Pierwszą stanowią peroksydazy o znaczeniu fizjologicznym, zaliczane do kluczowych enzymów kontrolujących różnicowanie się i rozwój komórek roślinnych. Biorą one udział w takich procesach, jak: opadanie liści i owoców, starzenie się, tolerancja na zimno, stan odrętwienia, dojrzewanie owoców, kiełkowanie, wczesny rozwój, reakcje przeciw patogenom, a także lignifikacja i metabolizm auksyn.

Drugą grupę stanowią enzymy uczestniczące w unieczynnianiu RFT, takie jak: peroksydaza glutationowa, gwajakolowa czy askorbinianowa [51, 70].

Peroksydaza glutationowa [EC 1.11.1.9] (GPOX) powszechnie występuje u zwierząt, obecna jest także u roślin. Wyróżnia się wiele izoenzymów, które katalizują redukcję H_2O_2 i hydroksynadtlenków lipidów przez zredukowany glutation [16].

TABELA 1. Enzymy pełniące funkcję antyoksydacyjną w komórkach roślinnych (AH_2^* – zredukowany askorbinian; QH_2^{**} – zredukowany ubiquinon)

Nazwa enzymu	Funkcja
Dysmutazy ponadtlenkowe	Katalizowanie reakcji dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Katalazy	Katalizowanie reakcji dysmutacji nadtlenu wodoru $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$
Peroksydazy np. peroksydaza askorbinianowa	Katalizowanie reakcji usuwania nadtlenu wodoru i nadtlenków organicznych (ROOH) oraz utleniania związków np. AH_2^* w cyklu Halliwela-Asady $AH_2^* + H_2O_2 (ROOH) \rightarrow 2H_2O (ROH + H_2O) + A$
Alternatywna oksydaza	Katalizowanie reakcji redukcji tlenu do wody w łańcuchu oddechowym przy ograniczeniu drogi cytochromowej w warunkach stresowych, zachowując stężenie O_2 na niskim poziomie. Pełni funkcje obronną w warunkach stresowych ograniczając generowanie RFT. $QH_2^{**} + e^- + 1/2O_2 \rightarrow H_2O + Q$

Peroksydaza gwajakolowa [EC 1.11.1.7] jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 50 kDa, zlokalizowaną w cytozolu, wakuoli, ścianie komórkowej i przestrzeni międzykomórkowej. Bierze ona udział zarówno w procesach lignifikacji, biosyntezy etylenu, obrony przed patogenami, jak i wykazuje właściwości antyoksydacyjne [9, 84].

Peroksydaza askorbinianowa [EC 1.11.1.11] (**APOX**) występuje w chloroplastach, cytozolu, wakuoli i apoplasmie. APOX jest hemoproteiną, zawierającą 4 cysteiny, które są odpowiedzialne za jego wrażliwość na związki inaktywujące grupy tiolowe. Stwierdzono wzrost aktywności tego enzymu w warunkach stresu oksydacyjnego spowodowanego takimi czynnikami, jak: intensywne światło, niska i wysoka temperatura, ozon, parakwat czy susza [79]. APOX stanowi element cyklu askorbinianowo-glutationowego, nazywanego cyklem Halliwela-Asady, którego funkcją jest usunięcie H_2O_2 z kompartmentów komórkowych. Enzymy tego szlaku zlokalizowano głównie w chloroplastach, ale także w cytozolu [62] oraz mitochondriach i peroksydomach [36]. W liściach grochu potwierdzono występowanie APOX o masie cząsteczkowej 35 kDa w błonie peroksydomalnej, po stronie cytozolowej [22, 36].

Nie tylko enzymy uczestniczą w obronie antyoksydacyjnej przed szkodliwym działaniem RFT. Bardzo efektywnymi zmiataczami RFT są również antyoksydanty niskocząsteczkowe, występujące w stosunkowo dużych stężeniach w komórkach roślinnych, takie jak: askorbinian, glutation, cysteina i α -tokoferol.

4.4. Alternatywna oksydaza (AOX)

Mitochondria wszystkich roślin, niektórych grzybów, glonów i nielicznych pierwotniaków zawierają niewrażliwą na cyjanek, alternatywną oksydazę, która przy ograniczeniu drogi cytochromowej katalizuje reakcję redukcji tlenu do wody w łańcuchu oddechowym [56, 59, 60, 76, 81]. Droga alternatywna jest drogą niefosforylującą, elektrony omijają kompleksy III i IV, stąd jest ona niewrażliwa na inhibitory drogi cytochromowej

– antymycynę i cyjanek [75]. Przepływ elektronów przez alternatywną oksydazę nie prowadzi do przemieszczania protonów w poprzek błony wewnętrznej mitochondriów, przez co cała uwalniana energia podczas transportu elektronów z ubichinolu na tlen jest rozpraszana w postaci ciepła [38, 74, 76].

Alternatywna oksydaza jest homodimerem, o masie cząsteczkowej 32–36 kDa. Ostatnio poznanie sekwencji genów *AOX* pozwoliło stwierdzić, iż alternatywna oksydaza nie jest białkiem transbłonowym, lecz białkiem peryferycznie zasocjowanym od strony matriks z wewnętrzną błoną mitochondrialną i połączonym z nią oddziaływaniami białko-białko [1, 3]. Występuje w dwóch formach: utlenionej (nieaktywnej) i zredukowanej (aktywnej). W formie utlenionej dwa łańcuchy polipeptydowe są połączone mostkiem disulfidowym, natomiast w formie zredukowanej grupy sulfhydrylowe nie tworzą wiązania, zatem dimer jest utrzymywany przez oddziaływania konwalencyjne [59].

AOX u roślin wyższych jest kodowane przez genom jądrowy. Wyizolowano geny *AOX1*, *AOX2a* oraz *AOX2b* (nazywany *AOX3*) wśród roślin nietermogennych, jednoliściennych i dwuliściennych. Gen *AOX1* występuje zarówno u roślin jedno-, jak i dwuliściennych, zaś gen *AOX2* jest głównie obecny u roślin dwuliściennych. Przyjęto, iż ekspresja genu *AOX1* jest wynikiem adaptacji roślin na różne czynniki stresowe, natomiast ekspresja genu *AOX2* zależy od tkanki i stadium rozwojowego rośliny i jest wymagana dla prawidłowego funkcjonowania metabolizmu oddechowego [38]. Ostatnio wyznaczono sekwencje cDNA dla białka *AOX* kilku roślin wyższych i grzybów [26, 27, 83]. Analiza sekwencyjna roślinnych białek alternatywnej oksydazy wykazuje dużą konserwatywność na poziomie helis, począwszy od pierwszej hydrofobowej helisy przy N-końcu aż do znacznej części domeny hydrofilowej przy C-końcu [81].

Wielu autorów [27, 38, 61, 81] zaobserwowało zwiększony udział drogi alternatywnej w oddychaniu mitochondrialnym w warunkach niskiej temperatury, zranienia, ataku patogena, dojrzewania roślin, stresu osmotycznego czy zwiększenia poziomu kwasu salicylowego. Podanie antymycyny A, inhibitora drogi cytochromowej, do zawiesiny komórek tytoniu indukowało transkrypcję genu *AOX1* w ciągu 60 minut, indukując syntezę białka *AOX* w ciągu 3–5 godzin, a po upływie 5 godzin obserwowano wyraźny wzrost aktywności alternatywnej oksydazy. To samo obserwowano po dodaniu cytrynianu lub nadtlenu wodoru [50]. Transkrypcja genu *AOX* w komórkach roślinnych indukowana jest przez różne czynniki, takie jak: niska temperatura [35], nadtlenek wodoru, cytrynian czy cysteina [82]. U *Magnaporthe grisea* [88] i *Arabidopsis thaliana* [69] stwierdzono wzrost ilości transkryptu mRNA *AOX* na skutek zahamowania drogi cytochromowej poprzez inhibicję kompleksu III.

Stwierdzono, że droga cytochromowa może być hamowana przez NO, którego poziom w mitochondriach gwałtownie wzrasta w warunkach stresowych [54]. W mitochondriach wątroby świń, u których nie występuje alternatywna oksydaza, zaobserwowano wzrost poziomu H_2O_2 pod wpływem NO, natomiast w mitochondriach hipokotyli fasoli nie stwierdzono stymulacji generowania H_2O_2 przez NO. Te wyniki podtrzymują hipotezę, że droga alternatywna obniża wytwarzanie nadtlenu wodoru w sytuacji, gdy droga cytochromowa jest hamowana przez NO [87]. Purvis i Shewfelt [67] jako pierwsi zasugerowali udział *AOX* w regulacji poziomu RFT w mitochondriach oraz w ich usuwaniu.

Wykazano ponadto, że również białko rozprzegające (UCP), które powoduje rozproszenie siły protonomotorycznej wytworzonej w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej, powoduje obniżenie poziomu RFT w tych organellach. Białko rozprzegające i AOX można uważać za endogenny mitochondrialny system antyoksydacyjny, chroniący przed oksydacyjnymi uszkodzeniami, ale działający kosztem wydajności fosforylacji oksydacyjnej [58, 78].

LITERATURA

- [1] AFFOURTIT C, MOORE AL. Purification of the plant alternative oxidase from *Arum maculatum* measurement, stability and metal requirement. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1608**: 181–189.
- [2] ALSCHER RG, ERTURK N, HEATH LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 2002; **53**: 1331–1341.
- [3] ANDERSON ME, NORDLUND P. A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS Lett* 1999; **449**: 17–22.
- [4] BAKER CJ, ORLANDI EW, MOCK NM. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol* 1993; **102**: 1341–1344.
- [5] BARROSO JB, CORPAS JF, CARRERAS A, SANDALIO LM, VALDERRAMA R, PALMA JM, LUPIA-NEZ JA, DEL RIO LA. Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *J Biol Chem* 1999; **274**: 36729–36733.
- [6] BARTOSZ G. Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie. *Post Biochem* 1998; **44**: 22–29.
- [7] BARTOSZ G. Oxidative stress in plants. *Acta Physiol Plant* 1997; **19**: 47–64.
- [8] BARTOSZ G. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydaw. Nauk. PWN, Warszawa 2003.
- [9] BECANA M, DALTON DA, MORAN JF, ITURBE-ORMAETXE I, MATAMOROS MA, RUBIO MC. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. *Physiol Plant* 2000; **109**: 372–381.
- [10] BLAISE GA, GAUVIN D, GANGAL M, AUTHIER S. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* 2005; **208**: 177–192.
- [11] BLOKHINA O, VIROLAINEN E, FAGERSTEDT KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 2003; **91**: 179–194.
- [12] BOLWELL GP, WOJTASZEK P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiol Mol Plant Pathol* 1997; **51**: 347–366.
- [13] BRAIDOT E, PETRUSSA E, VIANELLO A, MACRI F. Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. *FEBS Lett* 1999; **451**: 347–350.
- [14] BREUSEGEM FV, VRANOVA E, DAT JF, INZE D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci* 2001; **161**: 405–414.
- [15] BRIAT JF, LEBRUN M. Plant responses to metal toxicity. *Live Sci* 1999; **322**: 43–54.
- [16] BRIGELIUS-FLOHE R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Rad Biol Med* 1999; **27**: 951–965.
- [17] CHANDRA S, LOW PS. Role of phosphorylation in elicitation of the oxidative burst in cultured soybean cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4120–4123.
- [18] CLIJSTERS H, CUYPERS A, VANGRONSVELD J. Physiological responses to heavy metals in higher plants defence against oxidative stress. *Zeitschrift für Naturforschung* 1999; **54c**: 730–734.
- [19] CORPAS FJ, BARROSO JB, DEL RIO LA. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 145–150.
- [20] DELLEDONNE M, MURGIA I, EDERLE D, SBICEGO PF, BIONDANI A, POLVERARI A, LAMB CH. Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiol Biochem* 2002; **40**: 605–610.
- [21] DEL RIO LA, PASTORI GM, SANDALIO LM, SEVILLA F, CORPAS FJ, JIMENEZ A, LOPEZ-HUER-TAS E, HERNANDEZ JA. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol* 1998; **116**: 1195–1200.

- [22] DEL RIO LA, CORPAS FJ, SANDALIO LM, PALMA JM, GOMEZ M, BARROSO JB. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* 2002; **372**: 1255–1272.
- [23] DEL RIO LA, SANDALIO LM, ALTOMARE DA, ZILINSKAS BA. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *J Exp Bot* 2003; **54**: 923–933.
- [24] DESIKAN R, BURNETT EC, HANCOCK JT, NEILL SJ. Harpin and hydrogen peroxide induce the expression of a homologue of gp91-*phox* in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J Exp Bot* 1998; **49**: 1767–1771.
- [25] DESIKAN R, REYNOLDS A, HANCOCK JT, NEILL SJ. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem J* 1998; **330**: 115–120.
- [26] DINANT M, BAURAIN D, COOSEMANS N, JORIS B, MATAGNE RF. Characterization of two genes encoding the mitochondrial alternative oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* 2001; **39**: 101–108.
- [27] DUTILLEUL C, GARMIER M, NOCTUR G, MATHIEU C, CHETRIT P, FOYER CH, DE PAEPE R. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell Preview* 2003; **15**: 1212–1226.
- [28] FANG J, BEATTIE DS. Alternative oxidase present in procyclic *Trypanosoma brucei* may act to lower the mitochondrial production of superoxide. *Arch Biochem Biophys* 2003; **414**: 294–302.
- [29] FOYER CH, LOPEZ-DELGADO H, DAT JF, SCOTT IM. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* 1997; **100**: 241–254.
- [30] GNIAZDOWSKA A. Rola tlenku azotu w metabolizmie komórki roślinnej. *Kosmos* 2004, **53**: 343–353.
- [31] GUAN LM, SCANDALIOS JG. Hydrogen peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding. *Free Rad Biol Med* 2000, **28**: 1182–1190.
- [32] HAN D, WILLIAMS E, CADENAS E. Mitochondrial respiratory chain- dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 2001; **353**: 411–416.
- [33] HIPPELI S, HEISER I, ELSTNER EF. Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants. *Plant Physiol Biochem* 1999; **37**: 167–178.
- [34] INZE D, MONTAGU MV. Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotech* 1995; **6**: 153–158.
- [35] ITO Y, SAISHO D, NAKAZONO M, TSUTSUMI N, HIRAI A. Transcript level of tandem-arranged oxidase genes in rice are increased by low temperature. *Gene* 1997; **203**: 121–129.
- [36] JIMENEZ A, HERNANDEZ JA, DEL RIO LA, SEVILLA F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* 1997; **114**: 275–284.
- [37] JURGOWIAK M, OLIŃSKI R. Uszkodzenia jądrowego i mitochondrialnego DNA w procesach starzenia. *Kosmos* 1999; **243**: 235–244.
- [38] JUSZCZUK IM, RYCHTER AM. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim Pol* 2003; **50**: 1257–1271.
- [39] KARPIŃSKI S, REYNOLDS H, KARPIŃSKA B, WINGSLE G, CREISSEN G, MULLINEAUX P. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 1999; **284**: 654–657.
- [40] KOWALTOWSKI AJ, VERCESI AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1999; **26**: 463–471.
- [41] KOWALTOWSKI AJ. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. *Braz J Med Biol Res* 2000; **33**: 241–250.
- [42] KOVTUN Y, CHIU WL, TENA G, SHEEN J. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 2940–2945.
- [43] LACZA Z, SNIPES JA, ZHANG J, HORVATH EM, FIGUEROA JP, SZABO C, BUSIJA DW. Mitochondrial nitric oxide synthase in not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Rad Biol Med* 2003; **35**: 1217–1228.
- [44] LANDIS GN, TOWER J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev* 2005; **126**: 365–379.
- [45] LANGEBARTELS CH, WOHLGEMUTH H, KSCHIESCHAN S, GRÜN S, SANDERMANN H. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol Biochem* 2002; **40**: 567–575.
- [46] LENA Z, BOVINA C, FORMIGGINI G, CASTELLI GP. Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences. *Acta Biochim Pol* 1999; **46**: 1–21.
- [47] LINO-NETO T, PIQUES MC, BARBETA C, SOUSA MF, TAVARES RM, PAIS MS. Identification of *Zantedeschia aethiopica* Cat1 and Cat2 catalase genes and their expression analysis during spathe senescence and regreening. *Plant Sci* 2004; **167**: 889–898.

- [48] LOPEZ-HUERTAS E, SANDALIO LM, GOMEZ M, DEL RIO LA. Superoxide radical generation in peroxisomal membranes: evidence for the participation of the 18 kDa integral membrane polypeptide. *Free Radic Res* 1997; **26**: 497–506.
- [49] LYAMZAEV KG, IZYUMOV DS, AVETISYAN AV, YANG F, PLETJUSHKINA OY, CHERNYAK BV. Inhibition of mitochondrial bioenergetics: the effects on structure of mitochondria in the cell and on apoptosis. *Acta Biochim Pol* 2004; **51**: 553–562.
- [50] MCINTOSH L, EICHLER T, GRAY G, MAXWELL D, NICKELS R, WANG Y. Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1365**: 278–284.
- [51] MEHLHORN H, LELANDAIS M, KORTH HG, FOYER CH. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Lett* 1996; **378**, 203–206.
- [52] MELONI DA, OLIVA MA, MARTINEZ CA, CAMBRAIA J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environ Exp Bot* 2003; **49**: 69–76.
- [53] MICHALSKI WP. Chromatographic and electrophoretic methods for analysis of superoxide dismutases. *J Chrom B* 1996; **684**: 59–75.
- [54] MILLAR AH, DAY DA. Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett* 1996; **398**: 155–158.
- [55] MITTLER R, HERR EH, ORVAR BL, VAN CAMP W, WILLEKENS H, INZE D, ELLIS BE. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1999; **96**: 14165–14170.
- [56] MIYAKE C, SCHREIBER U, HORMANN H, SANO S, ASAKA K. The FAD-enzyme monodehydroascorbate radical reductase mediates the photoproduction of superoxide radicals in spinach thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 821–829.
- [57] MOHAMMADI M, KARR AL. Membrane lipid peroxidation, nitrogen fixation and leghemoglobin content in soybean root nodules. *J Plant Physiol* 2001; **158**: 9–19.
- [58] MÖLLER IA. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001; **52**: 561–591.
- [59] MOORE AL, SIEDOW JN. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1059**: 121–140.
- [60] MOORE AL, UMBACH AL, SIEDOW JN. Structure - function relationships of the alternative oxidases of plant mitochondria: a model of the active site. *J Bioenerg Biomembr* 1995; **27**: 367–377.
- [61] MOORE AL, ALBURY MS, CRICTON PG, AFFOURTIT C. Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 478–481.
- [62] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 1981; **22**: 867–880.
- [63] NAVARRE DA, WINDEHENNE D, DURNER J, NOAD R, KLESSIG DF. Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiol* 2000; **122**: 573–582.
- [64] NEILL SJ, DESIKAN R, CLARKE A, HURST RD, HANCOCK JT. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Expl Bot* 2002; **53**: 1237–1247.
- [65] OVERMYER K, BROSCHE M, KANGASJÄRVI J. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 335–342.
- [66] POLLE A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer stimulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol* 2001; **126**: 445–462.
- [67] PURVIS AC, SHEWFELT RL. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plants tissues? *Physiol Plant* 1993; **88**: 712–718.
- [68] ROMERO-PUERTAS MC, PALMA JM, GOMEZ M, DEL RIO LA, SANDALIO LM. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ* 2002; **25**: 677–686.
- [69] SAISHO D, NAMBARA E, NAITO S, TSUTSUMI N, HIRAI A, NAKAZONO M. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 1997; **35**: 585–596.
- [70] SAKHAROV IY, VESGA BMK, GALAEV IY, SAKHAROVA IV, PLETJUSHKINA OY. Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties. *Plant Sci* 2001; **161**: 853–860.
- [71] SCANDALIOS JG. The rise of ROS. *Trends Biochem Sci* 2002; **27**: 483–486.
- [72] SCHÜTZENDÜBEL A, POLLE A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Experimen Botany* 2002; **53**: 1351–1365.
- [73] SHAH K, KUMAR G, VERMA S, DUBEY RS. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci* 2001; **161**: 1135–1144.

- [74] SIEDOW JN, MOORE AL. A kinetic model for the regulation of electron transfer through the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1142**: 165–174.
- [75] SIEDOW JN, UMBACH AL, MOORE AL. The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a coupled binuclear iron center. *FEBS Lett* 1995; **362**: 10–14.
- [76] SIEDOW JN, UMBACH AL. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1459**: 432–439.
- [77] SLOOTEN L, MONTAGU MV, INZE D. Manipulation of oxidative stress tolerance in transgenic plants. *Transgenic plant research*, Harwood Academic Publishers, 1998; 241–257.
- [78] SLUSE FE, JARMUSZKIEWICZ W. Uncoupling proteins outside the animal and plant kingdoms: functional and evolutionary aspects. *FEBS Lett* 2002; **510**: 117–120.
- [79] STROIŃSKI A. Some physiological and biochemical aspects of plant resistance to cadmium effect. I. Antioxidative system. *Acta Physiol Plant* 1999; **21**: 175–188.
- [80] TIAN M, GU Q, ZHU M. The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. *Plant Sci* 2003; **165**: 701–707.
- [81] WAGNER AM, MOORE AL. Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Biosci Rep* 1997; **17**: 319–333.
- [82] VANLERBERGHE GC, MCINTOSH L. Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria. *Plant Physiol* 1996; **111**: 589–595.
- [83] VANLERBERGHE GC, MCINTOSH L. Alternative oxidase: from gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 1997; **48**: 703–734.
- [84] VERMA S, DUBEY RS. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 2003; **164**: 645–655.
- [85] YAMAHARA T, SHIONO T, SUZUKI T, TANAKA K, TAKIO S, SATO K, YAMAZAKI S, SATOH T. Isolation of a germin-like protein with manganese superoxide dismutase activity from cells of a moss, *Barbula unguiculata*. *J Biol Chem* 1999; **274**: 33274–33278.
- [86] YAMASAKI H. Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition *in vivo*. *The Royal Soc*, 2000; **355**: 1477–1488.
- [87] YAMASAKI H, SHIMOJI H, OHSHIRO Y, SAKIHAMA Y. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric oxide: Biology and Chemistry* 2001; **5**: 261–270.
- [88] YUKIOKA H, INAGAKI S, TANAKA R, KATOH K, MIKIN, MIZUTANI A, MASUKOM. Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1442**: 161–169.
- [89] ZACCHINI M, REA E, TULLIO M, DE AGAZIO M. Increased antioxidative capacity in maize calli during and after oxidative stress induced by a long lead treatment. *Plant Physiol Biochem* 2003; **41**: 49–54.
- [90] ZHIVOTOVSKI B, ORRENIUM S, BRUSTUGUM O, DOSKELAND SO. Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature* 1998; **391**: 449–450.
- [91] ŻUCHOWSKI J. Roślinne dysmutazy ponadtenkowe. *Kosmos* 1999; **242**: 82–93.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 22.12.2004 r.

Przyjęto: 10.03.2005 r.

Adres autora: ul. Fredry 10, 61-701 Poznań.

arlkas@amu.edu.pl

INDUKCJA APOPTOZY JAKO CEL TERAPII GENOWEJ NOWOTWORÓW

INDUCTION OF APOPTOSIS AS A TARGET OF CANCER GENE THERAPY

Maciej MAŁECKI¹, Sylwia RZOŃCA²

¹Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii –
Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie oraz Katedra i Zakład Biochemii i Chemii
Klinicznej, Akademia Medyczna, ²Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii –
Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa

Streszczenie. Śmierć komórek, ich proliferacja są procesami fizjologicznymi, które zachodzą w każdym organizmie. Komórki prawidłowe umierają zarówno w okresie embriogenezy, jak i w dorosłym organizmie. Dla komórek nowotworowych charakterystyczną jest swoista oporność na apoptozę i wynikająca z tego ograniczona wrażliwość na cytostatyki. Proapoptyczna terapia genowa jest strategią terapii genowej chorób nowotworowych. Zakłada się, iż transfer genów, kodujących czynniki proapoptyczne bezpośrednio np. do guzów nowotworowych, może doprowadzić do indukcji apoptozy komórek nowotworowych i ograniczy tym samym wzrost nowotworów. Jak dotychczas większość badań eksperymentalnych dotyczy wykorzystania genów – znanych, dobrze scharakteryzowanych – białek sygnalizacji apoptozy, np. BAX, P53, TNF, kaspaz. Bardzo często rozpatruje się możliwość wykorzystania strategii transferu genów proapoptycznych jako metody wspomagającej klasyczne leczenie nowotworów, np. za pomocą chemioterapii czy radioterapii.

Słowa kluczowe: terapia genowa, apoptoza, nowotwory.

Summary: Cell death, commonly recognized as necrosis or apoptosis, is thought to be a one of biological processes describing cell life. The phenomena of cell recycling during human life is known for a various types of cells and the resistance of cancer cells to apoptosis is also well described. Proapoptotic gene therapy is one of the method of cancer therapy. The main rationales are focused on induction of apoptosis of cancer cells and therefore inhibition its growth. Mostly, gene therapy trials are concerned on genes encoding well known proteins of apoptotic signaling as BAX, P53, TNF, caspases. Proapoptotic gene therapy is also discussed as a supplementary method of the cancer treatment. The classical therapies like chemotherapy or radiotherapy may be assisted by gene transfer strategy.

Key words: gene therapy, apoptosis, cancer.

TERAPIA GENOWA NOWOTWORÓW

Terapia genowa jest nową strategią terapeutyczną. Początkowo była metodą przewidzianą do leczenia wrodzonych defektów metabolicznych (np. SCID/ADA), jednak bardzo szybko zaczęto wykorzystywać metody terapii genowej w próbach leczenia chorób nowotworowych, infekcyjnych czy naczyniowo-sercowych [82]. Ponad 60% prób klinicznych przeprowadzanych na świecie dotyczy chorób nowotworowych. Główne strategie terapeutyczne terapii genowej nowotworów zebrano w tabeli 1. Obejmują one:

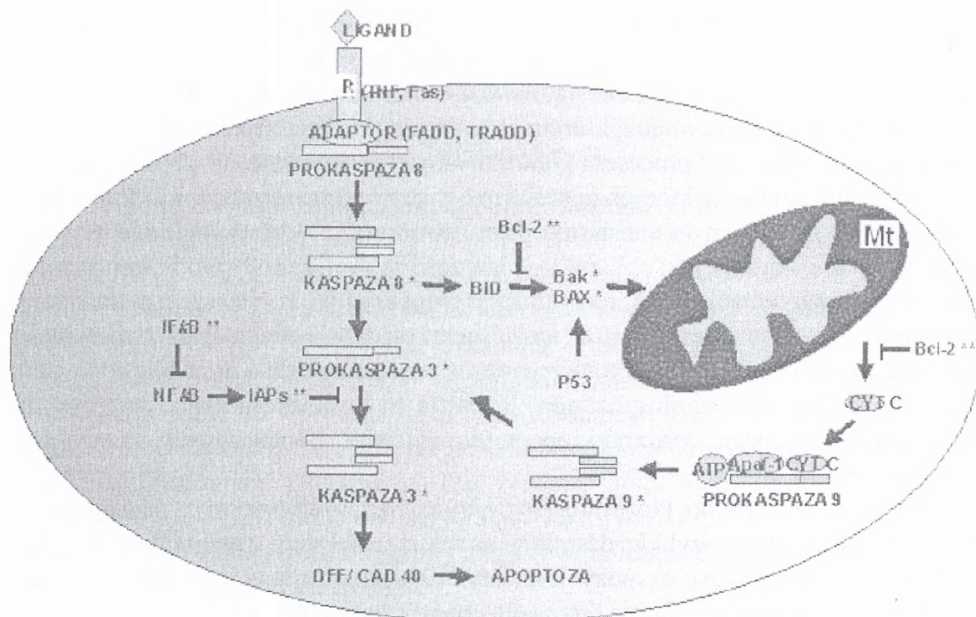
- 1) próby modulowania funkcji onkogenów i genów supresorowych;
- 2) stosowanie genów samobójczych;
- 3) próby immunomodulacji;
- 4) strategię antyangiogenezy oraz
- 5) stosowanie genów proapoptotycznych.

Wykorzystanie strategii onkogeny / supresory sprowadza się do badań mających na celu albo wyciszenie, blokowanie funkcji onkogenów np. przez zastosowanie sekwencji antysensownych (np. hamowanie aktywności onkogeny *ras* [10]) albo też doprowadzenie do nadekspresji supresorów onkogenezy poprzez np. wykorzystanie wektorów ekspresyjnych, kodujących geny supresorowe, np. *P53* [81]. Terapia genami samobójczymi z kolei opiera się na założeniu, iż chorą tkankę można wyposażyć w gen kodujący białko enzymatyczne, które przekształci podany systemowo nietoksyczny substrat w toksyczny produkt. Przykłady zastosowania genów samobójczych to np. podanie do guza wektora z wklonowanym genem dezaminazy cytozynowej, którego białko przekształca w guzie podaną systemowo, nietoksyczną 5-fluorocytozynę w toksyczny 5-fluorouracyl [41]. Immunoterapia nowotworów natomiast bardzo często wiąże się z zabiegami wykonanymi *ex vivo*. Pobrane od pacjenta komórki nowotworowe transfekuje się genami, których produkty wpływają na odpowiedź układu immunologicznego. Najczęściej są to geny cytokin, np. IL-1,2,4,6; INF, TNF [27,49]. Obiecującą strategią terapii genowej nowotworów jest również antyangiogeneza. Opiera się ona na założeniu, iż powstawanie sieci naczyń krwionośnych w masie nowotworu jest

czynnikiem bezpośrednio determinującym jego rozwój i warunkującym jednocześnie tworzenie przerzutów nowotworowych [13,70]. Kilka strategii antyangiogennych jest w trakcie badań eksperymentalnych. Zaliczyć tu można np. próby wykorzystania proteolitycznych fragmentów białek budulcowych (arestyna, angiostatyna, endostatyna), przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciw angiogennym czynnikom wzrostowym, czy rozpuszczalnych fragmentów receptorów dla tychże czynników, np. dla VEGF [13,20]. Do tej pory znanych jest ponad 40 endogennych inhibitorów

TABELA 1. Terapia genowa chorób nowotworowych – główne metody

Terapia genowa chorób nowotworowych	Strategie terapeutyczne
	onkogeny / supresory geny samobójcze immunoterapia antyangiogeneza
	APOPTOZA



RYCINA 1. Szlaki apoptozy – droga receptorowa (R) i mitochondrialna (Mt), schemat wskazuje na wykorzystywane w próbach terapii genowej geny kodujące czynniki proapoptotyczne (*) lub czynniki antyapoptotyczne (**)

angiogenezy, których mechanizm powstawania i działania jest różny [13]. Generalnie hamują one proliferację, migrację komórek śródbłonkowych, dzięki czemu ograniczają wzrost nowotworów i powstawanie przerzutów [13,71]. W wielu badaniach wykorzystuje się czynniki, które bezpośrednio oddziałują z cytokinami proangiogennymi – VEGF, FGF, angiopoetyną-1, Del-1; najczęściej prace dotyczą prób ograniczenia funkcji VEGF [13,20,52]. Podejmowane strategie obejmują wykorzystanie przeciwciał antyVEGF, blokowanie receptorów dla VEGF, hamowanie syntezy VEGF przez sekwencje antysensowne oraz wykorzystanie rozpuszczalnych form receptorów dla VEGF [13]. Terapię genową nowotworów wiąże się również nierzadko z apoptozą. Prace eksperymentalne wskazują, iż w komórkach nowotworowych dochodzi do zaburzenia przebiegu procesu apoptozy [70], a główną przyczyną nieskuteczności np. chemioterapii jest oporność komórek nowotworowych na stosowane cytostatyki [45,70]. Zakłada się, iż transfer genów proapoptotycznych do komórek nowotworowych (proapoptotyczna terapia genowa) może wymusić śmierć komórek w drodze apoptozy.

ŚMIERĆ KOMÓREK

Na podstawie wielu obserwacji rozróżnić można dwa rodzaje śmierci komórek: śmierć w drodze nekrozy i apoptozy. Nekroza najczęściej spowodowana jest uszkodzeniami mechanicznymi komórek. Następuje ona głównie w wyniku utraty

równowagi osmotycznej komórki. W związku z tym dochodzi do biernego transportu jonów (głównie wapnia) do wnętrza komórki, zwiększonego napływu wody, zahamowania syntezy ATP. Zniszczona otoczka jądrowa i błona komórkowa ułatwiają wypływ zawartości komórki na zewnątrz, któremu towarzyszy reakcja zapalna. W odróżnieniu od nekrozy, apoptoza jest procesem kontrolowanym genetycznie. W drodze apoptozy usuwane są np. komórki, których materiał genetyczny został uszkodzony i które mogą być potencjalnym źródłem np. transformacji nowotworowej [54]. Morfologicznie apoptozie towarzyszą takie zmiany, jak: obkurczenie komórki na skutek utraty wody, kondensacja chromatyny, fragmentacja DNA, reorganizacja cytoszkieletu, kondensacja cytoplazmy i powstanie ciałek apoptotycznych (trawionych przez otaczające makrofagi lub sąsiadujące komórki). Zmiany zachodzące w komórce w czasie apoptozy indukują szybką odpowiedź ze strony układu immunologicznego. Pozwala to komórkom fagocytującym na natychmiastowe rozpoznanie komórki apoptotycznej, ciałek apoptotycznych, co zapobiega powstaniu reakcji zapalnej.

Znane są różne czynniki, które mogą być przyczyną zarówno nekrozy, jak i apoptozy. To czy komórka ulegnie szybkiej destrukcji na zasadzie nekrozy, czy uruchomi program apoptozy, zależy od czasu ekspozycji na czynnik uszkadzający, jego dawki, rodzaju komórki i środowiska, w którego otoczeniu ona przebywa [45,54].

APOPTOZA

Terapia genowa wykorzystuje wprowadzane metodami wirusowymi lub niewirusowymi geny kodujące terapeutyczne białka [35]. W przypadku terapii proapoptotycznej klonowane wektory ekspresyjne niosą sekwencje kodujące czynniki o charakterze apoptotycznym. Spośród olbrzymiej grupy białek biorących udział w sygnalizacji apoptozy [54,58], niektóre z nich zdają się zdobywać znaczenie aplikacyjne i stawać się przedmiotem badań terapii genowej.

Rodzina białek BCL-2

W procesie regulacji apoptozy kluczową rolę odgrywa rodzina białek BCL-2. Do grupy tej zalicza się zarówno białka proapoptotyczne, jak i białka hamujące proces apoptozy. Wspólną cechą wszystkich białek tej grupy jest obecność czterech konserwatywnych domen określanych skrótem BH (ang. *BCL-2 homology*) [83]. Antyapoptotyczne białka BCL-2, BCL-XL BCL-W i MCL-1 wykazują w swej budowie obecność wszystkich czterech domen. Wydaje się, że obecność domeny BH1 oraz BH2 decyduje o antyapoptotycznym charakterze tych białek [85]. Białka należące do tej grupy mogą spełniać funkcje regulacyjne poprzez łączenie się z białkiem Apaf-1 uniemożliwiając w ten sposób przyłączanie się prokaspazy 9 do apoptosomu, mogą również pełnić rolę inhibitora uwalniania cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy. Białka proapoptotyczne, takie jak BAX, BAK, BOK, nie mają domeny BH4, natomiast białka BID, BAD, BIM, BLK, BIK/NBK mają tylko i wyłącznie BH3 (ang. *BH3 only*). Proapoptotyczne działanie białek rodziny BCL-2 polega głównie na tworzeniu kanałów

w błonie mitochondrialnej, przez które uwalniane są do cytoplazmy inne czynniki apoptotyczne bądź też na współdziałaniu z megakanałem, a konkretnie z jego anionową częścią zależną od napięcia (ang. *voltage-dependent anion channel*, VDAC) [63].

Białka IAP

W mechanizmy regulacji procesu apoptozy zaangażowana jest grupa białek IAP (ang. *inhibitor of apoptosis protein*). Białka NAIP (ang. *neuronal apoptosis inhibitory protein*), XIAP (ang. *X-linked IAP*), c-IAP 1, c-IAP 2, czy surwiwina działają hamująco na proces apoptozy. Ekspresja tych białek jest regulowana między innymi przez jądrowy czynnik transkrypcyjny NFκB. Relacje pomiędzy białkami IAP a czynnikiem NFκB są bardziej złożone. Uważa się, że IAP są odpowiedzialne za inaktywację inhibitora dla NFκB (IκB), przez co wpływają na aktywność samego czynnika. Białka IAP mogą hamować proces apoptozy na etapie pobudzenia receptorów błonowych poprzez wiązanie białek regulatorowych TRAF (ang. *TNF receptor associated factor*) [78]. Ponadto mogą zapobiegać bądź hamować aktywację niektórych kaspaz (3, 7, 9) poprzez ich bezpośrednie wiązanie. Białka tej grupy mogą również działać jak ligaza ubikwitynowa [68], prowadząc do degradacji kaspaz.

Białka szoku cieplnego

Do niedawna uważano, że białka szoku cieplnego (HSP, ang. *heat shock protein*) są głównie odpowiedzialne za przeżywanie komórek w warunkach stresu wywołanego wysoką temperaturą [32,65]. Aktualnie wiadomo, że odgrywają one istotną rolę w oporności komórek na wiele sygnałów apoptotycznych. HSP mogą hamować proces apoptozy, nawet w momencie, kiedy doszło już do aktywacji kaspaz efektorowych [65].

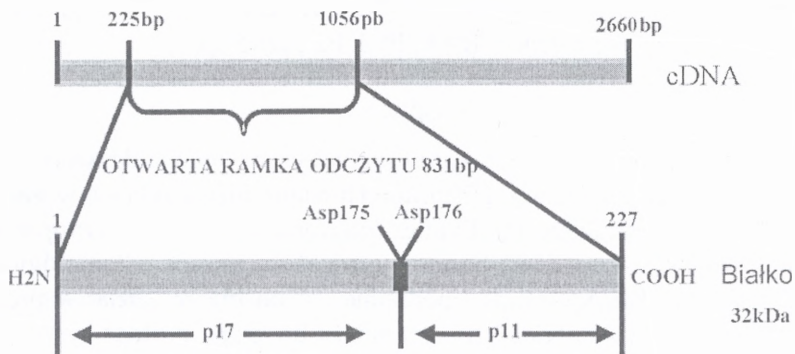
Strażnik genomu – białko p53

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym mającym decydujący wpływ na losy komórki, w której doszło do uszkodzenia DNA. W zależności od stopnia uszkodzenia materiału genetycznego białko p53 poprzez aktywację odpowiednich genów prowadzi do reperacji uszkodzeń DNA (aktywacja genów GADD45, p21^{WAF1}), zahamowania cyklu komórkowego w fazie G-1 (geny 14-3-3σ, GADD45, p21^{WAF1}) bądź aktywacji procesu apoptozy (aktywacja genów BAX, PIG, Fas, DR5) [17].

Kaspazy

Kluczowym etapem indukcji apoptozy jest aktywacja enzymów o aktywności proteaz cysteinowych zwanych kaspazami. Historia tych białek rozpoczęła się w momencie identyfikacji genu kodującego ICM (ang. *interleukin-1 β converting enzyme*), nazwanego później kaspazą 1 [59]. Gen ten jest w dużym stopniu homologiczny do genu *ced-3 Caenorhabditis elegans* i podobnie jak on bierze udział w procesach związanych ze śmiercią komórki. Kaspazy należą do grupy proteaz cysteinowych, rozszczepiających substrat po reszcie kwasu asparaginowego. W organizmie syntetyzowane są w formie nieaktywnej jako proenzymy, aby mogły pełnić swoje funkcje, musi

dojść do ich aktywacji. Do zmian konformacyjnych prowadzących w stronę aktywnego enzymu dochodzi w drodze oligomeryzacji (np. kaspaza 8) bądź poprzez regulację allosteryczną (np. kaspaza 9, allosterycznym regulatorem dla kaspazy 9 jest białko Apaf-1) [6]. Funkcjonalnie kaspazy można podzielić na dwie grupy. Kaspazy inicjatorowe, które biorą udział w przekazywaniu sygnałów apoptotycznych (np. kaspaza 2, 6, 8) oraz kaspazy efektorowe, które ten sygnał realizują (kaspaza 3,7). Wszystkie kaspazy zbudowane są z dwóch podjednostek, małej i dużej (ryc. 2). Przed dużą podjednostką znajduje się tzw. prodomena. Ze względu na jej długość kaspazy dzieli się na dwie grupy: z długą prodomeną (kaspaza 1, 2, 4, 5, 9, 11, 12) oraz z prodomeną krótką (kaspaza 3, 6, 7, 14). Podczas aktywacji dochodzi do rozszczepienia podjednostek, usunięcia prodomeny. Aktywna kaspaza występuje jako homodimer. Specyficzność substratowa kaspaz determinowana jest obecnością w substracie reszty czteroaminokwasowej pasującej do odpowiedniego czteroaminokwasowego motywu w samej kaspazie. Strukturę przestrzenną kaspaz tworzą cztery zmienne pętle (L1-L4) [62]. Pętla L1 i L2 tworzą dużą podjednostkę, L3 oraz L4 wchodzi w skład podjednostki małej. Wśród kaspaz efektorowych kluczową rolę w procesie apoptozy odgrywa kaspaza 3 (ryc. 2). Zidentyfikowana jednocześnie przez trzy grupy badaczy, znana jest jako CPP32 [14], Yama [76] oraz apopain [44]. Aktywowana przez kaspazę 8 oraz kaspazę 9 jest elementem łączącym dwa szlaki apoptotyczne, mitochondrialny oraz od mitochondriów niezależny. Kaspaza 3 dezaktywuje inhibitor DFF/CAD (ang. *DNA fragmentation factor 40kDa / caspase-activated, deoxyribonuclease*), czego wynikiem jest aktywacja endonukleazy DFF40/CAD, przemieszczanie się jej do jądra komórkowego i fragmentacja DNA [62]. Fragmenty DNA wielkości nukleosomów są jednym z bardziej charakterystycznych markerów apoptozy. Otwarta ramka odczytu kaspazy 3 (ryc. 2) liczy 831 pz, białko o masie 32 kDa jest zbudowane z 277 aminokwasów [14]. W wyniku hydrolizy wiązań peptydowych prokaspazy w miejscu Asp-28-Ser-29 oraz Asp-175-Ser-176 [47] powstają dwie podjednostki wielkości 11 kDa oraz 17 kDa. Aktywny enzym, podobnie jak w przypadku innych kaspaz funkcjonuje jako homodimer zbudowany z dwóch małych i dwóch dużych podjednostek [9]. Grupa substratów dla kaspazy 3 jest dosyć duża. Do bardziej znanych zalicza się PARP, DNA-PK_{cs}, Rb,



RYCINA 2. Kaspaza 3 – schemat organizacji sekwencji kodującej i białka

Huntingtyna. Białka, które do niej należą, charakteryzuje obecność czteroamino-kwasowej sekwencji DXXD. Substratem dla kaspazy 3 mogą być również inne kaspazy (kaspaza 2, 6, 9). Wyróżnia się dwa podstawowe szlaki sygnalizacji apoptozy związane z kaskadą kaspaz (ryc.1). Jednym z nich jest szlak niezależny od mitochondriów. Sygnałem do uruchomienia tego szlaku jest przyłączenie się ligandu do jednego z receptorów błonowych z rodziny TNF [19]. Przedstawicielami tej grupy receptorów są m.in. TNFR1, Fas, DR3, DR4, DR5, DcR1, DcR2. Receptory te są ekspresowane na powierzchni wielu komórek, głównie układu immunologicznego, biorąc udział w negatywnej selekcji limfocytów. Przyłączenie ligandu do receptora aktywuje go, jednak do tego, aby spełniał on swoją funkcję, konieczne jest jeszcze białko adaptatorowe. Do lepiej poznanych białek adaptatorowych należą białka: FADD, TRADD, RIP, TRAF2. W budowie mają one tzw. domenę śmierci (ang. DD, ang. *death domain*) [1], taką samą domenę mają receptory z grupy TNF. Oddziaływania pomiędzy receptorami i białkiem adaptatorowym mają charakter oddziaływań homofilowych. W budowie białka pośredniczącego wyróżnia się jeszcze dodatkową domenę zwaną DED (ang. *death effector domain*). Za pośrednictwem tej domeny przyłącza się do kompleksu inicjatorowa prokaspaza 8, która następnie ulega autoaktywacji [1,51,62]. Kaspaza 8 jest bezpośrednim aktywatorem prokaspazy 3, głównego efektoru zmian zachodzących w komórce podczas apoptozy zależnej od kaspaz.

Drugi z komórkowych szlaków aktywacji kaspaz jest procesem zależnym od mitochondriów. Do jego indukcji może dojść w wyniku niedotlenienia, uszkodzenia DNA oraz za pośrednictwem onkogenów. Proces ten jest związany z aktywacją białek z rodziny Bcl- 2/BAX. Aktywna forma jednego z białek tej grupy, białka BID (tBID – *truncated BID*) przemieszcza się z cytoplazmy do mitochondriów. W wyniku oddziaływania białka BID z innymi białkami proapoptotycznymi z grupy BCL-2 (BAX, BAK) w błonie mitochondrialnej tworzą się kanały, dochodzi do zmiany potencjału błonowego i wyrzutu cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytoplazmy. Cytochrom c wraz z cytozolowym białkiem APAF-1 (ang. *apoptosis protease activating factor*), ATP oraz nieaktywną formą kaspazy 9 tworzy kompleks zwany apoptosomem. Celem powstania takiego kompleksu jest utworzenie odpowiednich warunków do aktywacji prokaspazy 9, będącej aktywatorem wspomnianej powyżej prokaspazy 3 [18]. Zarówno szlak aktywacji kaspaz związany z mitochondriami, jak i od mitochondriów niezależny prowadzi do uaktywnienia kaspazy 3. Substratami dla kaspazy 3 jest szereg białek, których wynikiem działania są charakterystyczne dla apoptozy zmiany biochemiczne i morfologiczne komórek.

PROAPOPTOTYCZNA TERAPIA GENOWA

Oporność komórek nowotworowych na apoptozę

Zmiany w komórkach nowotworowych w profilu ekspresji genów kodujących czynniki o charakterze pro- i antyapoptotycznym ujawniają się w postaci oporności komórek na apoptozę. Bardzo często zmieniona wrażliwość na apoptozę jest podstawo-

wym czynnikiem ograniczającym skuteczność terapii nowotworów opartych na wykorzystaniu leków cytostatycznych [45,70]. Mutacje np. genu *P53* obserwuje się w 50% różnych nowotworów, a występowanie niefunkcjonalnej formy białka P53 bądź jego brak w komórkach może być jedną z przyczyn wystąpienia fenotypu opornego na apoptozę [17,43]. Podwyższona ekspresja białka Bcl-2 często skorelowana jest z mutacjami genu *p53* w komórkach. We wczesnych etapach nowotworzenia nadekspresja białka Bcl-2 chroniąc komórki z mutacjami letalnymi sprzyja procesom destabilizacji genetycznej charakterystycznej dla nowotworów [15]. Ograniczona efektywność apoptozy w komórkach nowotworowych związana jest często również z mutacjami genu *BAX*, jednego z głównych efektorów apoptozy indukowanej przez białko supresorowe P53 [40]. Wykazano, iż nadekspresja białka BAX w komórkach raka piersi zwiększa ich wrażliwość na leki [16]. Bardzo często obserwuje się współzależność pomiędzy występowaniem mutacji *P53* w nowotworach a zaburzoną równowagą ekspresji białek BCL-2-BAX [17,43]. Oporność komórek nowotworowych na apoptozę bardzo często wiąże się również ze zmienionym profilem ekspresji inhibitorów apoptozy IAP i surwiwiny. Tamm i wsp. wykazali, iż np. ostre białaczki oraz szpiczaki cechuje wysoka ekspresja czynnika XIAP [74]. Znacznie podwyższony poziom surwiwiny stwierdzono w przypadku raka piersi [75] oraz trzustki [59]. W niektórych nowotworach można stwierdzić obniżony poziom ekspresji negatywnego regulatora dla XIAP-XAF1 [74]. Nadekspresja inhibitorów apoptozy IAP może również zmieniać aktywność kaspazy 3. Zmiany mogą również dotyczyć regulacyjnego białka FLIP. Białko to wykazuje dużą homologię z prokaspazą 8, poprzez przyłączenie się do kompleksu DISC uniemożliwia aktywację kaspazy [28,39]. Przyczyną oporności komórek nowotworowych na apoptozę może być także zmieniony poziom ekspresji receptorów błonowych z grupy TNF [21,46]. Z podwyższonym poziomem np. Fas w komórkach nowotworowych związana jest wyższa ekspresja genu kodującego fosfatazę FAP-1 (ang. *Fas associated phosphatase-1*). Enzym ten zakłóca prawidłowe działanie Fas, przez co nie dochodzi do przekazywania sygnału apoptotycznego do wnętrza komórki [22,30]. Przyczyną nieprawidłowego funkcjonowania receptorów błonowych w komórkach nowotworowych mogą być również ich mutacje, co zmniejsza efektywność wiązania ligandu, hamując w ten sposób apoptozę na etapie jej inicjacji. Występowanie fenotypu opornego może mieć również związek ze zmienionym poziomem ekspresji kaspaz w komórkach nowotworowych. Głównie dotyczy to kaspazy 3, która jako kaspaza efektorowa odgrywa kluczową rolę w procesie apoptozy, a jej brak bądź obniżona ekspresja może w dużym stopniu upośledzić mechanizm apoptozy bądź go całkowicie zahamować. Tak jest w niektórych przypadkach raka nerki, którego oporność na apoptozę może być związana z brakiem kaspazy 3 oraz obniżoną ekspresją kaspaz 7, 8 i 10 [26]. Brak kaspazy 3 stwierdzono również w komórkach MCF-7 (komórki raka piersi) [23] oraz OVP-10 (komórki z wysięku raka jajnika) [34]. W przypadku komórek MCF-7 została zidentyfikowana delecja w obszarze egzonu trzeciego, co wyjaśnia brak produktu białkowego [23]. Warto również wspomnieć, iż paradoksalnie w niektórych nowotworach obserwuje się podwyższony poziom kaspaz; przykładem jest ostra białaczka szpikowa (AML), w której obserwuje się wyższy poziom prokaspaz oraz aktywowanych form kaspazy 2 i 3 [11].

PROAPOPTOTYCZNA TERAPIA GENOWA – PRÓBY EKSPERYMENTALNE

W badaniach stosuje się geny proapoptotyczne, wprowadzane do komórek za pomocą wektorów wirusowych bądź niewirusowych lub nierzadko wykorzystuje się sekwencje antysensowne do genów antyapoptotycznych. Przeprowadzane są np. próby transferu dzikiego typu (wt, ang. *wild type*) genu p53 między innymi do komórek raka płuc, piersi, jajnika [16,81]. Jedną z proponowanych strategii terapii polega na połączeniu chemio- oraz genoterapii. Wprowadzenie sekwencji antysensownej dla komórek z wt p53 znacznie uwrażliwia komórki na cisplatynę [8], choć niektóre doniesienia wskazują na brak indukcji apoptozy w komórkach transfekowanych p53 [25]. Nierzadko obserwuje się również regresję guzów na skutek koinfekcji komórek nowotworowych genami np. p53 i Il-2 [53].

W terapii genowej proapoptotycznej wykorzystuje się również geny kodujące białka z rodziny Bcl-2/BAX. Dotyczy to zarówno pro-, jak i antyapoptotycznych reprezentantów tej grupy. Nadekspresja antyapoptotycznego białka Bcl-2 w komórkach nowotworowych we wczesnych stadiach choroby jest jednym z mechanizmów decydujących o oporności komórek nowotworowych na apoptozę. Terapia z udziałem Bcl-2 polega na blokowaniu aktywności genu poprzez wprowadzenie np. siRNA. Przeprowadzone doświadczenia, polegające na transferze sekwencji antysensownej dla genu *Bcl-2* do komórek raka piersi MCF-7, znacznie zwiększyły wrażliwość tych komórek na cytostatyki: etopozyd oraz doksorubicynę [31]. Miejsce w terapii genowej znajduje również antagonistę Bcl-2, białko BAX, odpowiedzialne za permabilizację – przepuszczalność błony mitochondrialnej i aktywność białek BID oraz Bak, a w konsekwencji wyrzut cytochromu c do cytoplazmy. W zdrowej komórce istnieje równowaga pomiędzy poziomem ekspresji BAX i Bcl-2. Przeprowadzane są próby adenowirusowego transferu BAX do komórek nowotworowych bądź genów o charakterze induktorów dla BAX, [72] np. genu *mda-7* [66]. Odnotowano również addytywny wpływ jednoczesnego wprowadzenia do komórek giejaka genu BAX oraz genu kodującego inicjatorową kaspazę 8 [64]. Wprowadzenie proapoptotycznego genu *Bak* do komórek raka płuca powoduje śmierć komórek w warunkach *in vitro* oraz znaczną regresję guza w warunkach *in vivo* [48]. Oprócz powyżej wymienionych białek regulujących apoptozę z grupy Bcl-2/BAX prowadzone są również badania dotyczące genów np. *BID* oraz *Bcl-X_i* [67]. Znane są również próby wykorzystania w terapii nowotworów genów kodujących egzogenne białka proapoptotyczne pochodzenia wirusowego. Petersen i wsp. [50] wykazali, iż poprzez wprowadzenie do komórek nowotworowych genu kodującego apoptynę dochodzi do indukcji apoptozy i ograniczenia wzrostu guzów. Indukcję apoptozy nowotworów zaobserwowano również w badaniach dotyczących genu wirusowego *E4orf4* [70], choć mechanizm działania nie jest jeszcze poznany. Komórki nowotworowe często charakteryzuje zmienna ekspresja receptorów błonowych z grupy TNF. Obniżona ekspresja i zmiany w budowie są przyczynami oporności komórek na proces apoptozy. Niekiedy wprowadza się do komórek nowotworowych np. gen *FasL* dla receptora Fas [55], w efekcie czego obserwuje się

regresję guza oraz białka TRAIL dla receptora TRAIL-R3 i TRAIL-R4 [42]. Znaną grupą białek wpływającą hamująco na proces programowanej śmierci są białka grupy IAP, np. surwiwina. Białko to ekspresjonowane jest tylko w komórkach nowotworowych. Nie stwierdzono obecności surwiwiny w komórkach zdrowej tkanki. Zablokowanie aktywności antyapoptotycznej surwiwiny, poprzez wprowadzenie antysensu do komórek raka wątroby, indukuje apoptozę oraz uwrażliwia komórki na stosowaną chemioterapię. [86,37].

Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B, jako aktywator IAP, może przyczynić się do zahamowania apoptozy wywołanej obecnością odpowiednich cytokin, promieniowaniem jonizującym czy chemioterapeutykami. W celu zniesienia antyapoptotycznego działania NF- κ B w komórkach nowotworowych wprowadza się gen kodujący jego inhibitor – I κ B [47]. BRCA1, uważany jest za jeden z kluczowych genów odpowiedzialnych za stabilność genomu [61]. Jego zmutowane formy odgrywają istotną rolę w ontogenezie raka jajnika oraz piersi. Znane są próby transferu dzikiej wersji tego genu do komórek nowotworowych (rak jajnika), w efekcie uzyskano znaczne zahamowanie aktywności proliferacyjnej. Po wprowadzeniu prawidłowej formy genu *BRCA1* również obserwowano regresję guzów u myszy [56]. W wielu badaniach wykorzystuje się także konstrukty genowe kodujące białka efektorowe apoptozy – kaspazy. Komórki np. raka wątroby charakteryzuje niższa ekspresja kaspazy 3 niż w prawidłowych hepatocytach [5]. Przeprowadzono próby wprowadzenia *in vitro* do komórek HuH7 adenowirusowego konstrukt z aktywną formą kaspazy efektorowej. Po 7 dniach od dnia infekcji poziom aktywności kaspazy 3 w komórkach transfekowanych był 5 lub 4 razy większy w stosunku do kontroli [5]. Podobne doświadczenia przeprowadzono na komórkach PC II (rak trzustki). Do PC II wprowadzono plazmid pcDNA 3.1 (+)/r-Caspase-3 (plazmid z rearanżowanymi podjednostkami kaspazy 3). Za pomocą analizy RT-PCR uzyskano produkt o wielkości 849 pz, odpowiadający aktywnej formie kaspazy 3 [79]. Wprowadzenie konstrukt z rearanżowaną kaspazą 3 do komórek MCF-7 [84] prowadzi do charakterystycznej dla apoptozy fragmentacji jądra. Istotny jest tu fakt, że w komórkach MCF-7 w obrębie egzonu 3 genu kaspazy 3 występuje mutacja. Brak transkryptu i białka kaspazy 3 jest przyczyną niewrażliwości tych komórek na cyto-statyki. Transfer prawidłowej kopii genu zwiększa wrażliwość komórek MCF-7 m.in. na etopozyd i doksorubicynę [84]. Efekt działania aktywnej formy kaspazy 3 na komórki raka piersi został również określony na modelu mysim. Do guzów (rak piersi; SKBr-3) wprowadzono konstrukt adenowirusowy z rearanżowaną kaspazą 3. W efekcie zaobserwowano znaczną regresję guza. Analiza komórek z chorej tkanki wskazała na znaczny odsetek komórek apoptotycznych [2]. MacNeish i wsp. [38] wykazali natomiast skuteczność łączenia transfekcji genów samobójczych i apoptotycznych (kaspaz). Autorzy prowadzili badania na komórkach raka jajnika i stwierdzono, że proapoptotyczny sygnał systemu kinaza tymidynowa / gancyklovir (TK/GCV) można wzmocnić poprzez kotransfekcję komórek prokaspazą 3. Uzyskane wyniki wykazały, że substrat dla kaspazy 3, PARP jest znacznie szybciej rozcinany w przypadku układu TK/GCV-prokaspaza 3 niż w przypadku zastosowania tylko TK/GCV, co wskazywałoby na wzmoczoną aktywność tej proteazy cysteinowej [38]. Nierzadko wskazuje się również, iż w układzie gen samobójczy/cytostatyk (np. TK/GCV) bardzo często regresja guzów nowotworowych determinowana jest w dużym stopniu przez tzw. efekt *bystander*

[4,7]. Do grupy kaspaz efektorowych obok kaspazy 3 zalicza się również kaspazę 7. Doświadczenia przeprowadzone *in vitro* na komórkach LNCaP (rak prostaty), polegające na adenowirusowym transferze kaspazy 7 do komórek wykazały, że kaspaza 7 jest obok kaspazy 3 głównym induktorem zmian apoptotycznych w komórkach raka prostaty [36]. Kaliberov i wsp. [24] natomiast wykazali ostatnio, iż w „terapii” raka prostaty zasadne jest łączenie terapii genowej z radioterapią. Autorzy wskazują, iż adenowirusowy transfer genu TRAIL pod kontrolą promotora FLT-1 do komórek nowotworowych i śródłonkowych skutecznie ogranicza wzrost nowotworów poddanych promieniowaniu jonizującemu [24].

PODSUMOWANIE

Terapia genowa odzwierciedla postęp w naukach biomedycznych. Leczenie chorób za pomocą genów kodujących terapeutyczne białka budzi ogromny entuzjazm wśród naukowców, klinicystów, a przede wszystkim chyba wśród pacjentów. Proapoptotyczna terapia genowa wykorzystuje geny czynników indukujących apoptozę. Opiera się ona na założeniu, iż transfer proapoptotycznych wektorów ekspresyjnych kodujących geny apoptozy do komórek nowotworowych może wymusić ich apoptozę, tym samym może ograniczyć wzrost nowotworów. Badania dotyczące proapoptotycznej terapii genowej przekroczyły już próg kliniki. Szereg prowadzonych prac klinicznych dotyczy wykorzystania np. genu *p53*. W pracy Buller i wsp. [3] wykazano, iż dootrzewnowe podanie rekombinowanych adenowirusów – Adp53 – jest bezpieczne i dobrze tolerowane przez pacjentki chore na raka jajnika. Obserwowano również spadek poziomu markera CA125 w surowicy krwi pacjentek [3]. Bezpieczeństwo stosowania adenowirusów kodujących *p53* wykazali również np. Kuball i wsp. [29] w badaniu klinicznym zastosowania Adp53 u chorych na raka pęcherza moczowego, a Schuler i wsp. [60] u chorych na niedronokomórkowego raka płuca. Jak pokazano w pracy Wen i wsp. [80] analiza materiału pochodzącego z biopsji od pacjentek z rakiem jajnika, którym podano konstrukt z *p53*, wykazała wzmożoną aktywność genów *p21/WAF1*, *bax* oraz *mdm-2* oraz obniżoną aktywność surwiwiny [80]. W pracy zaś Swisher i wsp. [69] przedstawiono regresję guzów u chorych na raka płuca. Pacjenci poddawani byli radioterapii, zaś doguzowo wprowadzany był konstrukt adenowirusowy kodujący *p53* [69]. W badaniach klinicznych są wykorzystywane również inne niż *p53* geny apoptozy, np. prowadzone są próby kliniczne oparte na genach BRCA1 [73] czy E1A [33] i E1B [77]. Prace eksperymentalne i pierwsze próby kliniczne wskazują, iż terapia genowa wykorzystująca geny apoptozy może być rozpatrywana jako metoda wspomagająca klasyczne procedury leczenia nowotworów, np. chemioterapię czy radioterapię.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ASHKENAZI A, DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; **281**: 1305–1308.
- [2] BAO W, ZHANG LH, JIA LT, QU P, WANG CJ, YANG AG. [Tumor suppression of a constitutively active caspase-3 in the SKBr-3 breast carcinoma xenograft mice model] *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2004; **20**: 23–26.
- [3] BULLER RE, RUNNEBAUM IB, KARLAN BY, HOROWITZ JA, SHAHIN M, BUEKERS T, PETRAUSKAS S, KREIENBERG R, SLAMON D, PEGRAM M. A phase I/II trial of rAd/p53 (SCH 58500) gene replacement in recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther* 2002; **9**: 553–566.
- [4] BURROWS FJ, GORE M, SMILEY WR, KANEMITSU MY, JOLLY DJ, READ SB, NICHOLAS T, KRUSE CA. Purified herpes simplex virus thymidine kinase retroviral particles: III. Characterization of bystander killing mechanisms in transfected tumor cells. *Cancer Gene Ther* 2002; **9**: 87–95.
- [5] CAM L, BOUCQUEY A, COULOMB-L'HERMINE A, WEBER A, HORELLOU P. Gene transfer of constitutively active caspase-3 induces apoptosis in a human hepatoma cell line. *J Gene Med* 2004; **7**: 30–38.
- [6] CHANG DW, DITSWORTH D, LIU H, SRINIVASULA SM, ALNEMRI ES, YANG X. Oligomerization is a general mechanism for the activation of apoptosis initiator and inflammatory procaspases. *J Biol Chem* 2003; **278**: 16466–16469.
- [7] CHO HS, LEE HR, KIM MK. Bystander-mediated regression of murine neuroblastoma via retroviral transfer of the HSV-TK gene. *J Korean Med Sci* 2004 **19**: 107–112.
- [8] DATTA K, SHAH P, SRIVASTAVA T, MATHUR SG, CHATTOPADHYAY P, SINHA S. Sensitizing glioma cells to cisplatin by abrogating the p53 response with antisense oligonucleotides. *Cancer Gene Ther* 2004; **11**: 525–531.
- [9] DEGTEREV A, BOYCE M, YUAN J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003; **22**: 8543–8567.
- [10] DUURSMA AM, AGAMI R. Ras interference as cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 2003; **13**: 267–273.
- [11] ESTROV Z, THALL PF, TALPAZ M, ESTEY EH, KANTARJIAN HM, ANDREEFF M, HARRIS D, VAN Q, WALTERSCHEID M, KORNBLAU SM. Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1998; **92**: 3090–3097.
- [12] FAVROT M, COLL JL, LOUIS N, NEGOESCU A. Cell death and cancer: replacement of apoptotic genes and inactivation of death suppressor genes in therapy. *Gene Ther* 1998; **5**: 728–739.
- [13] FELDMAN A L, LIBUTTI SK. Progress in antiangiogenic gene therapy of cancer. *Cancer* 2000; **89**: 1181–94.
- [14] FERNANDES-ALNEMRI T, LITWACK G, ALNEMRI ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30761–30764.
- [15] FULDA S, MEYER E, DEBATIN KM. Inhibition of TRAIL- induced apoptosis by *Bcl-2* overexpression. *Oncogene* 2002; **21**: 2283–2294.
- [16] GOMEZ-NAVARRO J, ARAFAT W, XIANG J. Gene therapy for carcinoma of the breast. Pro-apoptotic gene therapy. *Breast Cancer Res* 2000; **2**: 32–44.
- [17] GOTTLIEB TM, OREN M. p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1998; **8**: 359–368.
- [18] GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; **281**: 1309–1312.
- [19] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Molecular mechanisms of apoptosis induced by activation of membrane receptors from the TNF-R superfamily. *Post Biochem* 1998; **44**: 8–21.
- [20] HORNIG C, WEICH HA. Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis* 1999; **3**: 33–39.
- [21] IVANOV VN, BHOUMIK A, RONAI Z. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene*. 2003; **19**: 3152–3161.
- [22] IVANOV VN, LOPEZ BERGAMI P, MAULIT G, SATO TA, SASSOON D, RONAI Z. FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface. *Mol Cell Biol*. 2003; **23**: 3623–3635.
- [23] JANICKE RU, SPRENGART ML, WATI MR, PORTER AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998; **273**: 9357–9360.
- [24] KALIBEROV SA, KALIBEROVA LN, STOCKARD CR, GRIZZLE WE, BUCHSBAUM DJ. Adenovirus-mediated FLT-1-targeted proapoptotic gene therapy of human prostate cancer. *Mol Ther* 2004; **10**: 1059–1070.
- [25] KIMURA M, TAGAWA M, TAKENAGA K, YAMAGUCHI T, SAISHO H, NAKAGAWARA A, SAKIYAMA S. Inability to induce the alteration of tumorigenicity and chemosensitivity of p53-null human pancreatic carcinoma cells after the transduction of wild-type p53 gene. *Anticancer Res* 1997; **17**: 879–883.

- [26] KOLENKO V, UZZO RG, BUKOWSKI R, BANDER NH, NOVICK AC, HSI ED, FINKE JH. Dead or dying: necrosis versus apoptosis in caspase-deficient human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1999; **59**: 2838–2842.
- [27] KOWALCZYK DW, WYSOCKI PJ, MACKIEWICZ A. Cancer immunotherapy using cells modified with cytokine genes. *Acta Biochim Pol* 2003; **50**: 613–624
- [28] KRUEGER A, BAUMANN S, KRAMMER PH, KIRCHHOFF S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 8247–8254.
- [29] KUBALL J, WEN SF, LEISSNER J, ATKINS D, MEINHARDT P, QUIJANO E, ENGLER H, HUTCHINS B, MANEVAL DC, GRACE MR, FRITZ MA, STORKEL S, THÜROFF JW, HUBER C, SCHULER M. Successful adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with bladder cancer by intravesical vector instillation. *J Clin Oncol* 2002; **15**: 957–965.
- [30] LI Y, KANKI H, HACHIYA T, OHYAMA T, IRIE S, TANG G, MUKAI J, SATO T. Negative regulation of Fas-mediated apoptosis by FAP-1 in human cancer cells. *Int J Cancer* 2000; **15**: 473–479.
- [31] LIMA RT, MARTINS LM, GUIMARAES JE, SAMBADE C, VASCONCELOS MH. Specific downregulation of bcl-2 and xLAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2004; **11**: 309–316.
- [32] LISOWSKA K, KRAWCZYK Z. Family of hsp70 stress genes in mammals. *Post Biochem* 1998; **44**: 179–192.
- [33] MADHUSUDAN S, TAMIR A, BATES N, FLANAGAN E, GORE ME, BARTON DP, HARPER P, SECKL M, THOMAS H, LEMOINE NR, CHARNOCK M, HABIB NA, LECHLER R, NICHOLLS J, PIGNATELLI M, GANESAN TS. A multicenter Phase I gene therapy clinical trial involving intraperitoneal administration of E1A-lipid complex in patients with recurrent epithelial ovarian cancer overexpressing HER-2/neu oncogene. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 2986–2996
- [34] MAŁECKI M. Przeżywanie komórek w warunkach braku adhezji. *Współczesna Onkologia* 2003; **7**: 90–94.
- [35] MAŁECKI M. Wirusowe strategie w terapii genowej ze szczególnym uwzględnieniem wektorów konstruowanych z wirusów związanych z adenowirusami (AAV). *Post Biol Kom* 2004; **31**: 47–57.
- [36] MARCELLI M, CUNNINGHAM GR, WALKUP M, HE Z, STURGIS L, KAGAN C, MANNUCCI R, NICOLETTI I, TENG B, DENNER L. Signaling pathway activated during apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP: overexpression of caspase-7 as a new gene therapy strategy for prostate cancer. *Cancer Res* 1999; **59**: 382–390.
- [37] McKAY TR, BELL S, TENEV T, STOLL V, LOPES R, LEMOINE NR, McNEISH IA. Procaspase 3 expression in ovarian carcinoma cells increases survivin transcription which can be countered with a dominant-negative mutant, survivin T34A; a combination gene therapy strategy. *Oncogene* 2003; **22**: 3539–3547.
- [38] McNEISH IA, TENEV T, BELL S, MARANI M, VASSAUX G, LEMOINE N. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced cell death is enhanced by co-expression of caspase-3 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 2001; **8**: 308–319.
- [39] MEDEMA JP, SCAFFIDI C, KISCHKEL FC, SHEVCHENKO A, MANN M, KRAMMER PH, PETER ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 1997; **16**: 2794–2804.
- [40] MEIJERINK JP, MENSINK EJ, WANG K, SEDLAK TW, SLOETJES AW, DE WITTE T, WAKSMAN G, KORSMEYER SJ. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* 1998; **91**: 2991–2997.
- [41] MISSOL E, SOCHANIK A, SZALA S. The use of *E. coli* cytosine deaminase gene as an example of suicide gene therapy of cancer. *Biotechnologia* 1996; **4**: 80–90.
- [42] MOHR A, HENDERSON G, DUDUS L, HERR I, KUERSCHNER T, DEBATIN KM, WEIHER H, FISHER KJ, ZWACKA RM. AAV-encoded expression of TRAIL in experimental human colorectal cancer leads to tumor regression. *Gene Ther* 2004; **11**: 534–543.
- [43] MULLAUER L, GRUBER P, SEBINGER D, BUCH J, WOHLFART S, CHOTT A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res* 2001; **488**: 211–231.
- [44] NICHOLSON DW, ALI A, THORNBERRY NA, VAILLANCOURT JP, DING CK, GALLANT M, GAREAU Y, GRIFFIN PR, LABELLE M, LAZEBNIK YA. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; **376**: 37–43.
- [45] NOWAK R, TARASIUK J. Hamowanie procesu apoptozy w komórkach nowotworowych opornych na działanie leków przeciwnowotworowych. *Post Biochem* 2004; **50**: 330–343.
- [46] OZOREN N, EL-DEIRY WS. Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2003; **13**: 135–147.
- [47] PAILLARD F. Induction of apoptosis with I-kappaB, the inhibitor of NF-kappaB. *Hum Gene Ther* 1999; **10**: 1–3.

- [48] PATAER A, FANG B, YU R, KAGAWA S, HUNT KK, MCDONNELL TJ, ROTH JA, SWISHER S. Adenoviral Bak overexpression mediates caspase-dependent tumor killing. *Cancer Res* 2000; **60**: 788–792.
- [49] PAUL S, CALMELS B, ACRES RB. Improvement of adoptive cellular immunotherapy of human cancer using *ex-vivo* gene transfer. *Curr Gene Ther* 2002; **2**: 91–100
- [50] PIETERSEN AM, VAN DER EB MM, RADEMAKER HJ, VAN DEN WOLLENBERG DJ, RABELINK MJ, KUPPEN PJ, VAN DIERENDONCK JH, VAN ORMONDT H, MASMAN D, VAN DE VELDE CJ, VAN DER EB AJ, HOEBEN RC, NOTEBORN MH. Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene. *Gene Ther* 1999; **6**: 882–892.
- [51] PHILCHENKOV A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med* 2004; **8**: 432–444.
- [52] PROCZKA R, POLAŃSKI J, MAŁECKI M. The significance of vascular endothelial growth factor in the neoangiogenesis process. The role of hypoxia in the endothelial cells proliferation process and in the formation of collateral circulation. *Acta Angiologica* 2003; **9**: 143–150.
- [53] PUTZER BM, BRAMSON JL, ADDISON CL, HITT M, SIEGEL PM, MULLER WJ, GRAHAM FL. Combination therapy with interleukin-2 and wild-type p53 expressed by adenoviral vectors potentiates tumor regression in a murine model of breast cancer. *Hum Gene Ther* 1998; **9**: 707–718.
- [54] RADZISZEWSKA E. Fiziologiczna rola apoptozy. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 247–263.
- [55] RAKKAR AN, KATAYOSE Y, KIM M, CRAIG C, OHRI E, LI Z, COWAN KH, SETH P. A novel adenoviral vector expressing human Fas/CD95/APO-1 enhances p53-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 326–333.
- [56] RANDRIANARISON V, MAROT D, FORAY N, CABANNES J, MERET V, CONNAULT E, VITRAT N, OPOŁON P, PERRICAUDET M, FEUNTEUN J. BRCA1 carries tumor suppressor activity distinct from that of p53 and p21. *Cancer Gene Ther* 2001; **8**: 759–770.
- [57] ROŻYŃKOWA D, FILIP A. Endogenne białka przeciwdziałające apoptozie. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 561–578.
- [58] SAKAHIRA H, ENARI M, NAGATA S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; **391**: 96–99.
- [59] SATOH K, KANEKO K, HIROTA M, MASAMUNE A., SATOH A., SHIMOSEGAWA T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* 2001; **92**: 271–278.
- [60] SCHULER M, ROCHLITZ C, HOROWITZ JA, SCHLEGEL J, PERRUCHOUD AP, KOMMOSS F, BOLLIGER CT, KAUCZOR HU, DALQUEN P, FRITZ MA, SWANSON S, HERRMANN R, HUBER C. A phase I study of adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Hum Gene Ther* 1998; **9**: 2075–2082
- [61] SHAO N, CHAI YL, SHYAM E, REDDY P, RAO VN. Induction of apoptosis by the tumor suppressor protein BRCA1. *Oncogene* 1996; **13**: 1–7.
- [62] SHI Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002; **9**: 459–470.
- [63] SHIMIZU S, NARITA M, TSUJIMOTO Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; **399**: 483–487.
- [64] SHINOURA N, SAITO K, YOSHIDA Y, HASHIMOTO M, ASAI A, KIRINO T, HAMADA H. Adenovirus-mediated transfer of bax with caspase-8 controlled by myelin basic protein promoter exerts an enhanced cytotoxic effect in gliomas. *Cancer Gene Ther* 2000; **7**: 739–748.
- [65] SREEDHAR AS, CSERMELY P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2004; **101**: 227–257
- [66] SU ZZ, MADIREDDI MT, LIN JJ, YOUNG CS, KITADA S, REED JC, GOLDSTEIN NI, FISHER PB. The cancer growth suppressor gene mda-7 selectively induces apoptosis in human breast cancer cells and inhibits tumor growth in nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 14400–14405.
- [67] SUMANTRAN VN, EALOVEGA MW, NUNEZ G, CLARKE MF, WICHA MS. Overexpression of Bcl-X sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1995; **55**: 2507–2510.
- [68] SŪZUKI Y, NAKABAYASHI Y, TAKAHASHI R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc. Natl Acad Sci. USA* 2001; **98**: 8662–8667.
- [69] SWISHER SG, ROTH JA, KOMAKI R, GU J, LEE JJ, HICKS M, RO JY, HONG WK, MERRITT JA, AHRAR K, ATKINSON NE, CORREA AM, DOLORMENTE M, DREILING L, EL-NAGGAR AK, FOSSELLA F, FRANCISCO R, GLISSON B, GRAMMER S, HERBST R, HUARINGA A, KEMP B, KHURI FR, KURIE JM, LIAO Z, MCDONNELL TJ, MORICE R, MORELLO F, MUNDEN R, PAPA-DIMITRAKOPOULOU V, PISTERS KM, PUTNAM JB JR, SARABIA AJ, SHELTON T, STEVENS C, SHIN DM, SMYTHE WR, VAPORCIYAN AA, WALSH GL, YIN M. Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 93–101.

- [70] SZALA S. Swoista indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych. *Nowotwory* 2000; **50**: 111–121.
- [71] SZALA S, SZARY J, CICHON T, SOCHANIK A. Antiangiogenic gene therapy in inhibition of metastasis. *Acta Biochim Pol* 2000; **49**: 313–21.
- [72] TAI YT, STROBEL T, KUFE D, CANNISTRA SA. *In vivo* cytotoxicity of ovarian cancer cells through tumor-selective expression of the BAX gene. *Cancer Res* 1999; **59**: 2121–2126.
- [73] TAIT DL, OBERMILLER PS, REDLIN-FRAZIER S, JENSEN RA, WELCSH P, DANN J, KING MC, JOHNSON DH, HOLT JT. A phase I trial of retroviral BRCA1sv gene therapy in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1997; **3**: 1959–1968.
- [74] TAMMI I, KORNBLAU SM, SEGALL H, KRAJEWSKI S. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 1796–1803.
- [75] TANAKA K, IWAMOTO S, GON G, NOHARA T, IWAMOTO M, TANIGAWA N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 127–134.
- [76] TEWARI M, QUAN LT, O'ROURKE K, DESNOYERS S, ZENG Z, BEIDLER DR, POIRIER GG, SALVESEN GS, DIXIT VM. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 1995; **81**: 801–809.
- [77] VASEY PA, SHULMAN LN, CAMPOS S, DAVIS J, GORE M, JOHNSTON S, KIRN DH, O'NEILL V, SIDDIQUI N, SEIDEN MV, KAYE SB. Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 1562–1569.
- [78] WANG CY, MAYO MW, KORNELUK RG, GOEDDEL DV, BALDWIN AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; **281**: 1680–1683.
- [79] WANG W, LIU L, LIU Z, YAN L. [Construction of recombinant caspases-3 gene and the test of its apoptotic activity in pancreatic carcinoma cell strain] *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2003; **20**: 671–674.
- [80] WEN SF, MAHAVNI V, QUIJANO E, SHINODA J, GRACE M, MUSCO-HOBKINSON ML, YANG TY, CHEN Y, RUNNENBAUM I, HOROWITZ J, MANEVAL D, HUTCHINS B, BULLER R. Assessment of p53 gene transfer and biological activities in a clinical study of adenovirus-p53 gene therapy for recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther* 2003; **10**: 224–238.
- [81] WILLIS AC, CHEN X. The promise and obstacle of p53 as a cancer therapeutic agent. *Curr Mol Med* 2002; **2**: 329–345
- [82] www.wiley.co.uk
- [83] YANG E, KORSMEYER SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996; **88**: 386–401.
- [84] YANG XH, SLADEK TL, LIU X, BUTLER BR, FROELICH CJ, THOR AD. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 2001; **61**: 348–354.
- [85] YIN XM, OLTVAI ZN, KORSMEYER SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994; **369**: 321–323.
- [86] ZHANG W, CHEN X, QIU F. An antisense plasmid targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes hepatocarcinoma cells to chemotherapy. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003; **23**: 387–391.

Redaktor prowadzący – Jan Żeromski

Otrzymano: 12.12.2004 r.

Przyjęto: 05.04.2005 r.

ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

e-mail: mahan@poczta.wp.pl

ALFA-SYNUKLEINA W FIZJOLOGII I PATOLOGII MÓZGU*

ALPHA-SYNUCLEIN IN PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY OF THE BRAIN

Joanna SOLECKA, Agata ADAMCZYK, Joanna Benigna STROSZNAJDER

Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału, Instytut Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

Streszczenie: Synukleiny, są rodziną małych (15–20 kDa), rozpuszczalnych, wysoce konserwatywnych białek, które obficie występują w neuronach. Do rodziny tej należą cztery izoformy: α -, β -, γ -Synukleina oraz Synoretina. Wśród rodziny synuklein jedynie α -Synukleina jest białkiem prekursorowym hydrofobowego, 35-amino-kwasowego peptydu NAC (ang. *non-amyloid β component of Alzheimer's disease plaques*). NAC jest presynaptycznym białkiem zlokalizowanym głównie w pęcherzykach synaptycznych oraz w cytosolu. Natywna α -Synukleina, w stanie fizjologicznym jest niepofałdowana. Fizjologiczna rola α -Synukleiny nie jest w pełni wyjaśniona, jednak wiele danych wskazuje na jej udział w funkcji zakończeń synaptycznych, w uwalnianiu neurotransmiterów oraz w plastyczności neuronalnej. Prawidłowe funkcje tego białka ulegają zaburzeniu podczas jego agregacji. Modyfikacje posttranslacyjne, stres oksydacyjny lub zaburzenie degradacji mogą przyspieszać agregację α -Synukleiny. α -Synukleina w formie zagregowanej bierze udział w procesie obumierania komórek w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych, w tym w chorobie Parkinsona, w chorobie Alzheimer'a z ciałami Lewy'ego, jak również w demencji z ciałami Lewy'ego. Peptyd NAC stanowi łącznie z amyloidem β ($A\beta$) składnik płytek starczych występujących w chorobie Alzheimer'a. Zrozumienie procesów prowadzących do agregacji α -Synukleiny oraz uwalniania peptydu NAC może mieć istotne znaczenie w wyjaśnieniu patomechanizmu chorób neurodegeneracyjnych i ich terapii.

Słowa kluczowe: α -Synukleina, agregacja, neurodegeneracja, mózg.

Summary: Synucleins are a family of small (15–20 kDa), soluble, conserved proteins that are predominantly expressed in neurons and include α -, β -, γ -Synuclein and Synoretine. Among the synuclein family exclusively α -Synuclein is the precursor protein for highly hydrophobic 35-amino acid peptide NAC (*non-amyloid β component of Alzheimer's disease plaques*). This presynaptic protein associated with synaptic vesicles is also present in cytosol. Under physiological conditions α -Synuclein is natively unfolded. Cellular function of this protein is till now poorly understood, however, several lines of evidence suggest its potential role in regulation of synaptic function, neuronal plasticity, as well as cell survival. Physiological functions of this protein are disturbed by its aggregation. Posttranslational modi-

*Praca powstała podczas realizacji grantu KBN nr 3PO5A12724.

fication, oxidative stress or catabolism defects can promote its aggregation and deposition in cells in the form of Lewy bodies. Aggregated form of α -Synuclein could be involved in cell death in several neurodegenerative disorders, including Parkinson's disease, subtype of Alzheimer's disease with Lewy bodies, as well as in dementia with Lewy bodies. The understanding of processes responsible for α -Synuclein aggregation and NAC liberation is very important for the elucidation of pathomechanism of several neurodegenerative diseases and their effective therapy.

Key words: α -Synuclein, aggregation, neurodegeneration, brain.

WSTĘP

Synukleiny są rodziną niewielkich białek o długości łańcucha od 113 do 143 aminokwasów, których występowanie opisano tylko u kręgowców, do której należą cztery izoformy: α -, β - i γ - Synukleina oraz Synoretina. Białka te wykazują 60–78% homologii w sekwencji aminokwasowej (ryc. 1). U człowieka geny kodujące synukleiny znajdują się odpowiednio na chromosomach 4q21, 5q35 oraz 10q23. Synoretina, zakwalifikowana do podrodziny γ -synuklein została odkryta najpóźniej i jest najslabiej poznana, a lokalizacja jej genu jest dotychczas nieznana [1].

Synukleiny ulegają szczególnie wysokiej ekspresji w tkance nerwowej, α - i β -izoforma obecna jest w mózgu, natomiast γ -Synukleina występuje zarówno w mózgu, jak i w obwodowym układzie nerwowym. α -Synukleina występuje szczególnie obficie w rejonach związanych z przekazywaniem katecholaminergicznym, podczas gdy izoforma β występuje w układzie cholinergicznym [2]. Obie izoformy zlokalizowane są w głównej mierze w części presynaptycznej zakończeń nerwowych, aczkolwiek ich obecność stwierdzono również w ciele neuronu. Synukleiny α oraz β obecne są zarówno w błonach pęcherzyków synaptycznych, jak i w cytosolu [3]. γ -Synukleina występuje wyłącznie w cytoplazmie neuronów. Synoretina ulega natomiast wysokiej ekspresji w siatkówce [4]. Obecność synuklein stwierdza się również w połączeniach nerwowo-mięśniowych [5] oraz poza układem nerwowym. α -Synukleina obecna jest w płytkach krwi, komórkach hematopoetycznych [6] oraz w mięśniu sercowym [7]. β -Synukleinę stwierdzono np. w komórkach Sertolliego w jądrach. Prace Lia i wsp. [8] wskazują, że γ -Synukleina może brać udział w przebiegu procesu nowotworowego w raku piersi.

α -Synukleinę wyizolowano po raz pierwszy w roku 1988 z narządu elektrycznego morskiej ryby z gatunku *Torpedo californica* i nazwano „synukleina” ze względu na jej obecność w synapsach (ang. *synapse*), jak i w jądrze komórkowym (ang. *nucleus*). W roku 1993 z płytek starczych mózgow alzheimerowskich wyizolowano 35-aminokwasowy peptyd, NAC (ang. *non-amyloid β component of Alzheimer's disease plaques*), czyli „niebędący białkiem β -amyloidowym składnik płytek starczych”. Następnie zsekwencjonowano ludzkie cDNA kodujące białko prekursorowe peptydu NAC, które nazwano NACP (ang. *non-amyloid β component precursor*). Wykazano, że sekwencja aminokwasowa NACP i ludzkiej α -Synukleiny jest identyczna. Zainteresowanie naukowców tym białkiem wzrosło, gdy wykazano związek pomiędzy występowaniem rzadkiej, dziedzicznej postaci choroby Parkinsona a mutacjami w ge-

α -synukleina	MDVF MKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGMVEAAEKTKEGVLIYVGSKTKEGVVH	50
β -synukleina	MDVF MKGLSMAKEGVVAAAEKTKQGMVEAAEKTKEGVLIYVGSKTREGVVQ	50
γ -synukleina	MDVF KKGFSIAKKGVVGAVEKTKQGMVEAAEKTKEGVLIYVGAKTENVVQ	50
synoretina	MDVF KKGFSIAKKGVVGAVEKTKPRMVEAAEKTKEGVLIYVGAKTKEGVVQ	50
α -synukleina	GMATVAEKTKEQVTNVGGA V VTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFMKKDQL	100
β -synukleina	GMASVAEKTKEQASHLGGAVFSG-----AGNIAAATGLMKREEF	89
γ -synukleina	SMTSVAEKTKEQANAVSKAVSSVNTVATKTVEEAENIAVTSGVVRKE--	98
synoretina	SMTSVAEKTKEQANAVSEAVSSVNTVATKTVEEVENIAVTSGVVHKE--	98
α -synukleina	GK--NEEGAPQF F GILEDM--PVD-PDNEAYEM-PSEEGYQDYEPEA	140
β -synukleina	PTDLKPEEVAQFAAEEPLIEPLMEPEGESYEDPPQEE-YQEYEPEA	137
γ -synukleina	--DLRPSAPQ Q FGEASKEKEEVAEEAQSGGD	127
synoretina	--ALKQPVPP P DEAAKAEEQVAEETKSGGD	127

RYCINA 1. Sekwencje aminokwasowe ludzkich białek z rodziny synukleina, w ramach zaznaczono fragmenty konserwatywne we wszystkich izoformach

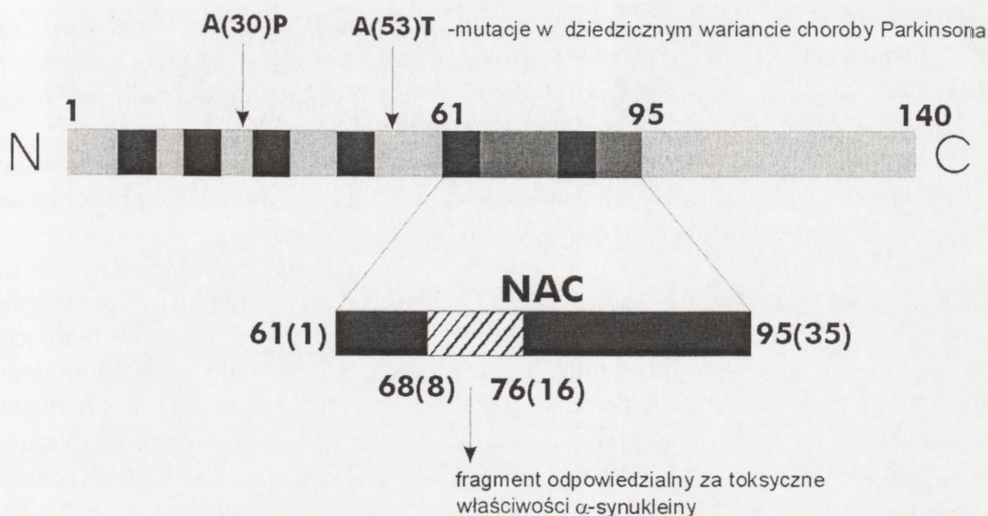
nie kodującym α -Synukleinę. W genie tym wykryto niezależnie dwie mutacje typu podstawienia, które powodują odpowiednio: zamianę alaniny w pozycji 30 na prolinę oraz zamianę alaniny w pozycji 53 na treoninę. Efektem fenotypowym obydwu mutacji jest występowanie ujawniającej się w młodym wieku choroby Parkinsona, która jest dziedziczona w sposób autosomalny dominujący [9]. Wykazano, że α -Synukleina stanowi główny składnik nierozpuszczalnych złogów białkowych tzw. ciał Lewy'ego w chorobie Parkinsona [10], w demencji starczej z ciałami Lewy'ego [11], w wariacie choroby Alzheimera z ciałami Lewy'ego [12] oraz w chorobie Hallervordena-Spatza [13].

EKSPRESJA I LOKALIZACJA α -SYNUKLEINY

α -Synukleina jest bogato reprezentowana w korze mózgowej, hipokampie i prążkowie oraz w niewielkim stopniu w mózdku [14]. Uważa się, że poziom α -Synukleiny w mózgu szczurów podlega regulacji rozwojowej [15, 16]. Stwierdzono zależność od wieku zmiany w poziomie α -Synukleiny w mózgu przy jednoczesnym braku zmian w ekspresji genu [13]. Wykazano, że czynniki, takie jak: zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF z ang. *basic fibroblast growth factor*) [17], czynnik wzrostu nerwów (NGF z ang. *nerve growth factor*) [18] modulują poziom ekspresji tego białka. α -Synukleina po wytworzeniu w ciele komórki jest transportowana wzdłuż aksonu i gromadzona w części presynaptycznej zakończeń nerwowych wokół pęcherzyków synaptycznych [19]. W procesie tym uczestniczą wszystkie trzy typy transportu aksonalnego, przy głównym udziale wolnego transportu b [20]. Wykazano, że w przebiegu starzenia szybkość transportu aksonalnego α -Synukleiny ulega znacznemu zwolnieniu, co może sprzyjać akumulacji i agregacji tego białka w aksonach [21]. Badania immunocytochemiczne wykazały również obecność niewielkich ilości α -Synukleiny w perikarionie, w dendrytach oraz w jądrze komórkowym [3]. Na podstawie obrazów z mikroskopu elektronowego stwierdzono, że α -Synukleina jest związana z błonami pęcherzyków synaptycznych oraz obecna w cytosolu [22]. Dane z ostatnich lat wskazują, że α -Synukleina w warunkach stresu oksydacyjnego lub toksycznego może ulegać translokacji do jądra komórkowego i tworzyć kompleksy z białkami histonowymi [23].

STRUKTURA α -SYNUKLEINY

Ludzka α -Synukleina jest monomerem białkowym o masie cząsteczkowej 14 kDa, opornym na działanie wysokich temperatur oraz dobrze rozpuszczalnym w wodzie. Jest to białko wysoce konserwatywne, α -Synukleina mysia i szczurza są identyczne na odcinku od 1 do 95 aminokwasu, natomiast białko ludzkie różni się od nich tylko dwoma aminokwasami. W strukturze pierwszorzędowej ludzkiej α -Synukleiny można wyróżnić trzy domeny (ryc. 2). Region N-końcowy obfitujący w aminokwasy zasadowe



RYCINA 2. Schemat budowy α-Synukleiny

(aminokwasy 1–60) zawiera cztery jedenastoaminokwasowe, nieregularnie powtarzające się motywy, których rdzeń stanowi konserwatywna sześćioaminokwasowa sekwencja (KTKEGV). Te powtórzenia są oddzielone odcinkami 5–8 reszt aminokwasowych. Region ten wiążąc lipidy tworzy drugorzędową strukturę w postaci amfipatycznej α-helisy, typowej dla domeny wiążącej lipidy w apolipoproteinach klasy A₂ [24, 25] oraz wykazuje homologię strukturalną z apolipoproteiną E [26]. W rejonie tym znajdują się miejsca obydwu mutacji związanych z rodzinnym wariantem choroby Parkinsona. Centralny, silnie hydrofobowy odcinek (aminokwasy 61–95) stanowi amyloidogenną sekwencję NAC [27]. Zawiera on dwa kolejne powtórzenia motywu (KTKEGV). α-Synukleina w stanie natywnym ma strukturę nieuporządkowaną, natomiast pod wpływem szeregu czynników (m.in. stresu oksydacyjnego) może przyjmować konformację β-harmonijki i tworzyć włókna oraz wywierać toksyczny efekt na komórki [28]. Wiele dowodów wskazuje na to, że zdolność α-Synukleiny do samoistnej agregacji odpowiada centralny fragment jej struktury odpowiadający peptydowi NAC. Peptyd ten występuje wraz z amyloidem β w płytkach starczych w mózгах alzheimerowskich, a w warunkach *in vitro* może inicjować agregację peptydów amyloidu β. Wykazano, że fragment NAC samoistnie agreguje oraz działa cytotoksycznie indukując apoptozę w ludzkich komórkach nerwiaka [29]. Ponadto zagregowany peptyd NAC powoduje zwiększenie wytwarzania reaktywnych form tlenu w mitochondriach, aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB (z ang. *nuclear factor kappa B*) w neuronach i astrocytach [30] oraz aktywuje tworzenie rodnika hydroksylowego w zakończeniach synaptycznych (badania własne niepublikowane). Wykazano także, że region NAC zawiera kluczowe dla agregacji sekwencje obecne w innych amyloidogennych polipeptydach, takich jak: białko prionowe czy amyloid β [28]. Stwierdzono natomiast, że rekombinowane białko pozbawione tego

centralnego odcinka traci zdolność tworzenia włókien [31]. Badania nad krótkimi odcinkami peptydu NAC wykazały, że regionem kluczowym dla jego agregacji i toksyczności jest odcinek od 8 do 16 aminokwasu w sekwencji peptydu NAC, co odpowiada aminokwasom 68–76 w sekwencji α -Synukleiny [29].

Region C-końcowy (aminokwasy 96 do 140) obfituje w prolinę oraz aminokwasy kwaśne, które nadają mu ujemny ładunek, co warunkuje przyjmowanie przez białko struktury nieuporządkowanej na tym odcinku [32].

Ważną cechą pierwszorzędowej struktury α -Synukleiny jest obecność sześciu nieregularnie powtarzających się, jedenastoaminokwasowych motywów w obrębie pierwszych 95 aminokwasów. Taka struktura występuje także w innych białkach wiążących odwracalnie lipidy i umożliwia wiązanie α -Synukleiny do fosfolipidów błonowych, co wydaje się mieć kluczowe znaczenie dla jej funkcji [33, 34]. W strukturze α -Synukleiny występują ponadto dwa regiony (2–19 oraz 123–140) wykazujące znaczne podobieństwo do sekwencji charakterystycznych dla cytosolowych białek FABP (z ang. *fatty acid binding protein*) wiążących kwasy tłuszczowe, co sugeruje, że α -Synukleina może należeć do rodziny tych białek [35].

MODYFIKACJE POSTTRANSLACYJNE α -SYNUKLEINY

Dotychczas wiadomo, że α -Synukleina podlega procesom fosforylacji, glikozylacji oraz ubikwitynacji. Fosforylacja α -Synukleiny może mieć udział w regulacji fizjologicznych funkcji tego białka, a także wpływa na jego zdolność do agregacji. Badania Okochi i wsp. [36], na transfekowanych liniach komórkowych PC12 i HEC239 wykazały, że α -Synukleina jest fosforylowana na Ser129 przy udziale kinazy kazeinowej I i II. Modyfikacja ta sprzyja formowaniu fibrylarnych złożeń w warunkach *in vitro* [37], natomiast ciała Lewy^oego w mózgu ludzkim zawierają znaczną ilość α -Synukleiny ufosforylowanej specyficznie w pozycji Ser129 [38]. Synukleiny stanowią także substrat dla kinaz receptorów związanych z białkami G (GRK, ang. *G protein-coupled receptor kinases*) [39]. Fosforylacja przy udziale GRK zmniejsza zdolność α -Synukleiny do interakcji z lipidami błonowymi, co może prowadzić do jej wzmożonej akumulacji w cytosolu i w następstwie tego do agregacji. Fosforylacja α -Synukleiny zależna od GRK znosi hamujące działanie tego białka na aktywność fosfolipazy D₂ (PLD₂). Proces ten może mieć istotne znaczenie w formowaniu się pęcherzyków synaptycznych [39]. Reszty tyrozynowe α -Synukleiny w pozycji 125, 133 i 136 ulegają fosforylacji przy udziale kinazy tyrozynowej p72Syk, co powoduje zmniejszenie podatności α -Synukleiny na agregację [40]. α -Synukleina może być również fosforylowana przez specyficzne kinazy tyrozynowe z rodziny kinaz Src [41, 42]. Reszty tyrozynowe α -Synukleiny w warunkach stresu oksydacyjnego lub nitrozacyjnego mogą ulegać oksydacji do o,o'-dityrozyny lub 3-nitrozylacji. Obydwie modyfikacje znacznie zwiększają zdolność α -Synukleiny do agregacji. W tym aspekcie fosforylacja reszt tyrozynowych α -Synukleiny chroni je przed działaniem stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego oraz zapobiega jej agregacji [43].

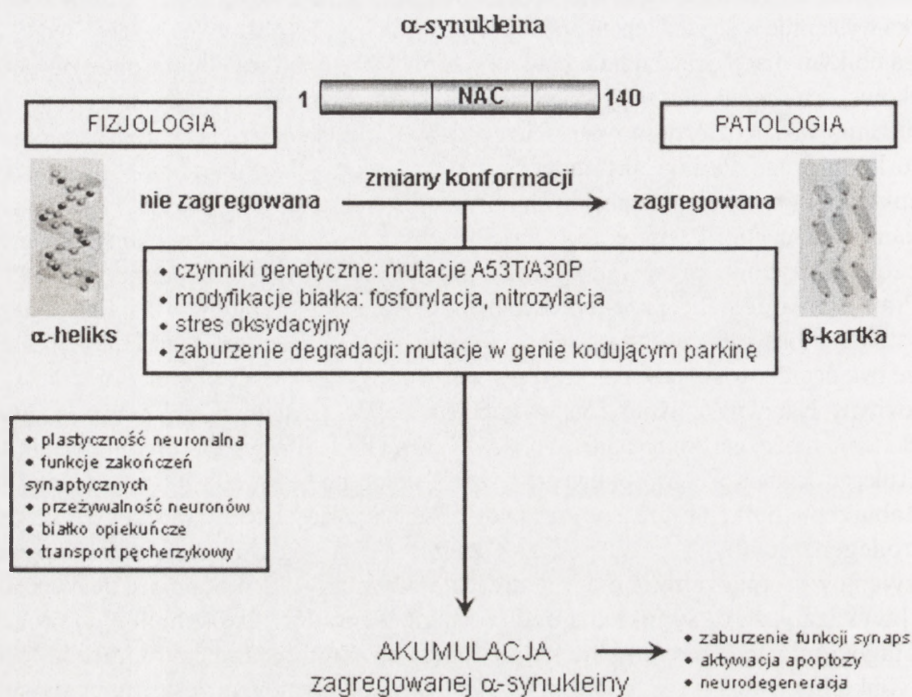
α -Synukleina podlega również procesom O-glikozylacji. W zdrowym mózgu ta forma białka występuje w stężeniach na granicy wykrywalności. O-glikozylowana α -Synukleina ulega ubikwitynacji przy udziale białka Parkiny, które pełni rolę ligazy ubikwitynowo-białkowej, a następnie jest degradowana w drodze proteasomalnej [44]. Proces ten ulega zaburzeniu w dziedzicznym wariacie choroby Parkinsona i związany jest z mutacją genu kodującego Parkinę. Mutacja Parkiny prowadzi do zaburzenia degradacji α -Synukleiny i gromadzenia znacznych ilości jej O-glikozylowanej formy w neuronach. Zmiana zależnej od Parkiny degradacji O-glikozylowanej α -Synukleiny może być kluczowym czynnikiem prowadzącym do śmierci neuronów dopaminergicznych [45].

Prawidłowa degradacja α -Synukleiny jest istotnym czynnikiem zapobiegającym powstawaniu toksycznych form tego białka. Wyniki ostatnich badań wskazują, że α -Synukleina może być degradowana przez proteasomy zarówno w sposób zależny, jak i niezależny od ubikwityny. Natywna α -Synukleina występuje w postaci niesfałdowanej, prawdopodobnie dzięki temu może ona ominąć proces ubikwitynacji i rozfałdowywania przez podjednostkę 19S i ulegać degradacji bezpośrednio przy udziale wolnej podjednostki 20S proteasomu [46].

Zaburzenie funkcji proteasomów, jakie obserwuje się zarówno w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych, jak i podczas starzenia fizjologicznego, stanowi czynnik sprzyjający gromadzeniu się agregatów białkowych [47]. Badania Cuervo i wsp. [48] wykazały, że α -Synukleina podlega także degradacji lizosomalnej w procesie autofagocytozy zależnej od białek opiekuńczych. Zmutowane, patologiczne formy α -Synukleiny wiążą się z receptorami błonowymi lizosomów uczestniczącymi w tym szlaku degradacji i powodują jego zahamowanie. To oddziaływanie może być istotnym czynnikiem warunkującym toksyczność zmutowanych form α -Synukleiny.

FUNKCJE α -SYNUKLEINY

α -Synukleina jest białkiem, którego rola fizjologiczna wciąż nie jest w pełni wyjaśniona. Uważa się, że jej prawidłowa forma uczestniczy w kształtowaniu plastyczności synaptycznej, regulacji transportu pęcherzykowego oraz przekąźnictwa dopaminergicznego. α -Synukleina występująca w postaci agregatów może powodować zaburzenie funkcji synaps i degenerację neuronów (ryc. 3). Białko to może również wpływać na procesy pro- i antyapoptotyczne [49]. α -Synukleina wchodzi w interakcje z licznymi białkami, co może zmieniać jej konformację i prowadzić do częściowego sfałdowania (ryc. 4). Izoforma ta wykazuje zdolności do wiązania PLD₂, białka 14-3-3, różnych izoform PKC, białka BAD, ERK [50] Rab5A [51], kompleksu ELK-1/ERK-2 [52], amyloidu beta (A β), kalmoduliny i wielu innych białek zaangażowanych w przekąźnictwo informacji oraz regulację apoptozy [53]. Jensen i wsp. [54] wykazał, że α -Synukleina wchodzi w interakcję z białkiem Tau i stymuluje jego fosforylację zależną od PKA. Wiązanie to jest odwracalne i hamowane przez Tubulinę. Sugeruje się, że Tubulina stymuluje agregację α -Synukleiny i w ten sposób znosi jej zdolność do wiązania białka Tau, α -Synukleina w formie zagregowanej nie oddziałuje z białkiem Tau. Obserwacje te wskazują, że α -Synukleina poprzez modulację fosforylacji Tau

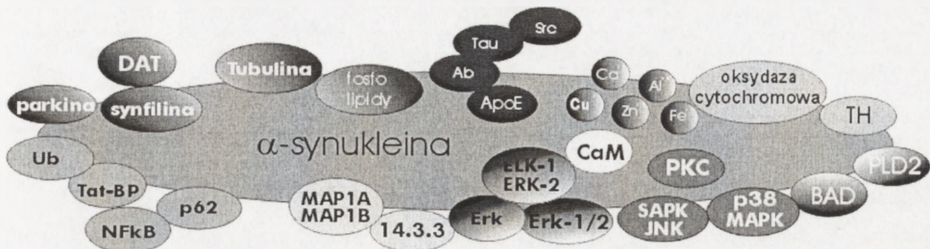


RYCINA 3. Zmiana konformacji α -Synukleiny i jej agregacja w istotny sposób moduluje funkcję tego białka

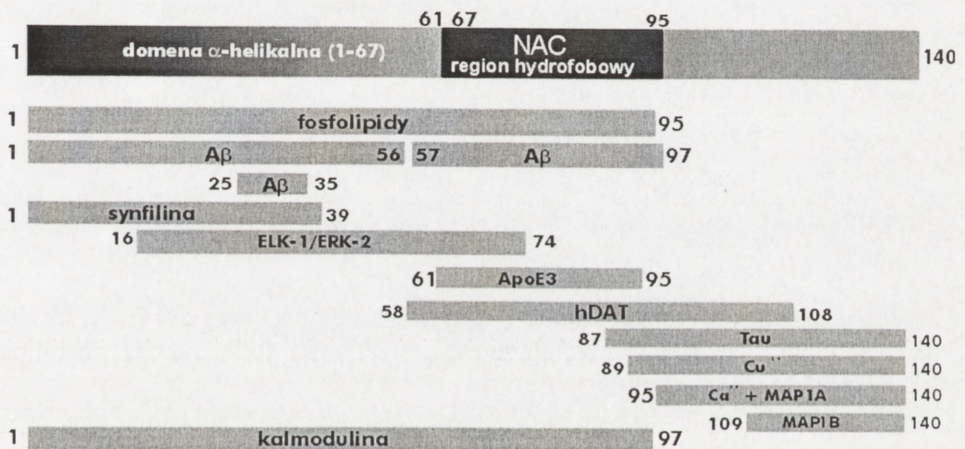
wpływa na stabilność mikrotubuli i cytoszkieletu. α -Synukleina wchodzi również w interakcje z kationami: Fe^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} i Ca^{2+} [55]. Jednakże dokładna rola tych oddziaływań w fizjologii i patologii komórki jest nadal nie wyjaśniona. Do chwili obecnej pozostają nieznane mechanizmy tych wzajemnych oddziaływań. Zmiany pH, temperatury, modyfikacje posttranslacyjne mogą modulować dynamikę wiązania ligandów do α -Synukleiny, a także jej zdolność do agregacji.

Lokalizacja α -Synukleiny w części presynaptycznej zakończeń nerwowych sugeruje jej udział w kształtowaniu plastyczności synaptycznej [56]. Wykazano, że ekspresja α -Synukleiny w hipokampie i korze mózgu szczurów jest najwyższa we wczesnym okresie po urodzeniu, po czym ulega obniżeniu u zwierząt dorosłych [57]. Badania stężenia tego białka w mózgu myszy w różnych okresach rozwoju, począwszy od 12–15-dniowych embrionów wykazały, że jej ilość wzrasta w miarę rozwoju mózgu. Interesujący jest także fakt, że ekspresja α -Synukleiny znacznie wzrasta u młodych kanarków w okresie nauki śpiewania, gdy następuje rozwój związanych z tym procesem ośrodków w mózgu [22]. Badania prowadzone na hodowli komórek hipokampa wykazały, że ekspresja α -Synukleiny pojawia się dopiero po wykształceniu zakończeń synaptycznych [58], natomiast u transgenicznym myszy pozbawionych genu α -Synukleiny nie zaobserwowano nieprawidłowości w zachowaniu, a rozwój układu nerwowego przebiegał prawidłowo [59]. Powyższe dane sugerują, że rola

A

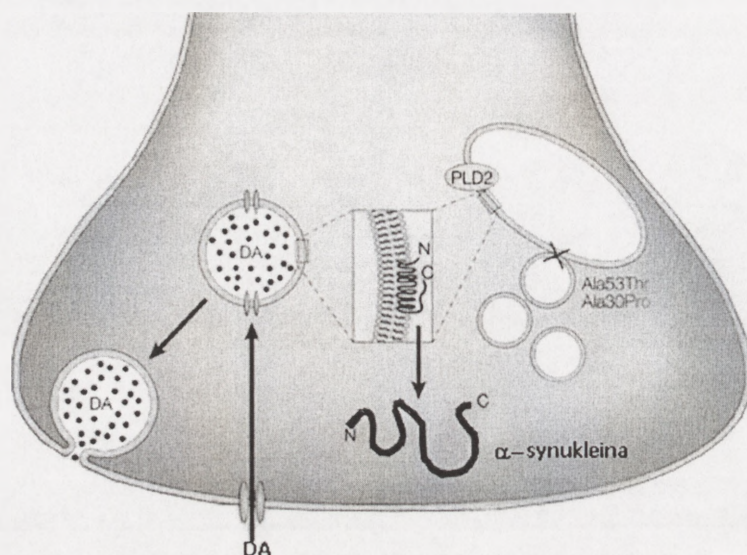


B



RYCINA 4. A – α -Synukleina wchodzi w interakcje z lipidami, białkami i licznymi ligandami. Choć mechanizm tych oddziaływań pozostaje nadal niewyjaśniony, uważa się, że modulują one właściwości α -Synukleiny, w tym jej zdolność do agregacji. B – Domeny α -Synukleiny odpowiedzialne za wiązanie licznych białek i ligandów. Liczby zaznaczone na schemacie wskazują na kolejne aminokwasy w białku α -Synukleiny odpowiedzialne za interakcje z poszczególnymi białkami i ligandami

α -Synukleiny polega raczej na utrzymaniu funkcji już wykształconych synaps niż na udziale w ich formowaniu. Wiele dowodów wskazuje na to, że α -Synukleina bierze udział w formowaniu się pęcherzyków synaptycznych oraz transporcie pęcherzykowym [60]. Białko to może regulować funkcję pęcherzyków synaptycznych poprzez wiązanie się z domeną błon bogatą w kwas fosfatydowy lub poprzez regulację jego uwalniania przez PLD₂. Badania *in vitro* wykazały, że α -Synukleina wiąże się poprzez swoją domenę N-kończową z kwaśnymi fosfolipidami w błonach pęcherzyków synaptycznych i endosomów i hamuje PLD₂, a w konsekwencji uwalnianie kwasu fosfatydowego [61] (ryc. 5) Wolny kwas fosfatydowy odgrywa istotną rolę w powstawaniu pęcherzyków synaptycznych, wiąże się z białkami adaptorowymi pęcherzyków synaptycznych i stymuluje ich powstawanie. Hamowanie aktywności PLD₂ przez α -Synukleinę reguluje dynamikę



RYCINA 5. Udział α -Synukleiny w regulacji transportu pęcherzykowego dopaminy: DA – dopamina, PLD – fosfolipaza D, Ala53Thr, Ala30Pro – mutacje α -Synukleiny w rodzinnym wariantcie choroby Parkinsona

syntezy pęcherzyków synaptycznych. Fosforylacja α -Synukleiny przez GRK, jak również mutacje genu kodującego to białko znoszą jej zdolność do interakcji z fosfolipidami błonowymi oraz inhibicji PLD₂ [39].

α -Synukleina wpływa na procesy transportu i magazynowania dopaminy w pęcherzykach neurosekrecyjnych i w ten sposób reguluje przebieg neurotransmisji dopaminergicznej. Wykazano, że mutacja α -Synukleiny zaburza funkcje pęcherzyków synaptycznych, co prowadzi do gromadzenia się dopaminy w cytosolu oraz zaburzenia przekazywania dopaminergicznego [62]. α -Synukleina tworzy kompleksy z Presynaptycznym Ludzkim Transporterem Dopaminy hDAT (ang. *Human Dopamine Transporter*) poprzez bezpośrednie oddziaływanie centralnego odcinka α -Synukleiny (NAC) z C-kończym regionem hDAT [63] oraz wpływa hamująco na aktywność tego białka powodując zmniejszenie wychwytu zwrotnego dopaminy. Białko to uczestniczy ponadto w regulacji biosyntezy dopaminy poprzez hamowanie aktywności Hydroksylazy Tyrozynowej [64]. Badania ostatnich lat wykazały, że α -Synukleina ma właściwości zarówno anty-, jak i proapoptotyczne. Stwierdzono, że białko to hamuje aktywność Kaspazy-3, moduluje ekspresję białka BCL2 [65] oraz inaktywuje proapoptotyczną drogę zależną od JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway*) [66]. Istnieją jednakże dane, które wskazują, że α -Synukleina indukuje apoptozę poprzez aktywację białka BAD [67]. W ocenie wyników należy mieć na uwadze fakt, że efekt działania α -Synukleiny zależy od jej konformacji i agregacji.

UDZIAŁ α -SYNUKLEINY W NEURODEGENERACJI

Fizjologiczna funkcja α -Synukleiny jest zaburzona, gdy ulega ona agregacji. Uważa się, że neurotoksyczne działanie tego białka jest ściśle związane z przyjmowaniem nieprawidłowej konformacji. α -Synukleina wykazuje tendencję do samoistnego tworzenia fibrylarnych agregatów *in vitro*. Pierwszym etapem tego procesu jest przyjęcie struktury β -harmonijki. Ta forma α -Synukleiny łatwo tworzy włókna. Na początkowym etapie agregacji powstają rozpuszczalne oligomery złożone z kilkunastu cząsteczek α -Synukleiny (tzw. protofibryle) [68]. Formy te stanowią, według najnowszych teorii, pierwotną przyczynę obumierania neuronów dopaminergicznych w przebiegu choroby Parkinsona. Protofibryle mogą wchodzić w interakcje z błonami pęcherzyków synaptycznych, powodując powstawanie w nich porów i uwalnianie zawartości pęcherzyków, m.in. dopaminy do cytosolu. Postępująca agregacja może być mechanizmem chroniącym komórkę przed szkodliwym działaniem oligomerów α -Synukleiny, a jednocześnie prowadzi do powstania nierozpuszczalnych złogów, które uszkadzają komórki na sposób mechaniczny [69]. Ubytek prawidłowej α -Synukleiny może dodatkowo przyczyniać się do zaburzenia funkcji synapsy. Podatność α -Synukleiny na agregację w znacznym stopniu zależy od jej stężenia. Białko to znacznie szybciej zaczyna tworzyć włókna w wysokich stężeniach. Wyniki badań *in vitro* wykazują, że tworzenie ciałek Lewy'ego *in vivo* jest związane z akumulacją w cytosolu α -Synukleiny, która po osiągnięciu krytycznego stężenia ulega agregacji [70]. Wykazano również, że w strukturach mózgu podlegających degeneracji w chorobie Parkinsona, demencji z ciałami Lewy'ego oraz w chorobie Alzheimera z ciałami Lewy'ego ma miejsce wzrost ekspresji α -Synukleiny na poziomie mRNA [71]. Poza zwiększoną ekspresją także mutacje α -Synukleiny sprzyjają tworzeniu włókien o charakterze amyloidowym. Mutacja w regionie N-końcowym w rodzinnej postaci choroby Parkinsona zaburza interakcję α -Synukleiny z fosfolipidami błonowymi, przyspieszając w ten sposób jej agregację i tworzenie włókien [72].

Liczne badania wykazały również udział reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) oraz azotu (RNS, ang. *reactive nitrogen species*) w stymulacji agregacji tego białka [73]. Reszty tyrozynowe w α -Synukleinie w warunkach stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego mogą ulegać utlenieniu do o,o'-dityrozyny lub 3-nitrozylacji, co sprzyja agregacji. Również nadtlenek wodoru i jony metali: Fe^{2+} i Cu^{2+} stymulują agregację α -Synukleiny [74].

Obecnie intensywnie poszukuje się czynników zapobiegających agregacji α -Synukleiny, które mogłyby mieć znaczenie terapeutyczne w chorobach neurodegeneracyjnych. Wyniki najnowszych badań *in vitro* dowodzą, że β - i γ -Synukleina hamują agregację α -Synukleiny, co sugeruje, że proces ten może także przebiegać *in vivo*. Efekt działania ochronnego zależy od stosunku stężenia α -Synukleiny odpowiednio do β - lub γ -Synukleiny. Całkowite zahamowanie procesu agregacji α -Synukleiny zachodzi przy 4-krotnym nadmiarze jej homologów. Mechanizm tego oddziaływania nie został jeszcze dokładnie poznany. Przypuszczalnie β - i γ -Synukleina przyłączają się do oligomerów, tworzonych przez α -Synukleinę w początkowym etapie agregacji. Efektem jest stabilizacja oligomerów, która zapobiega łączeniu się ich w większe agregaty oraz

szkodliwemu oddziaływaniu z błonami pęcherzyków synaptycznych. Powyższe fakty wskazują, że β - i γ -Synukleina mogą w komórce pełnić funkcję białek opiekuńczych, które zmniejszają toksyczność protofibrili α -Synukleiny i hamują tworzenie szkodliwych złożeń. Obniżenie stężenia β - i γ -Synukleiny lub zaburzony stosunek stechiometryczny pomiędzy poszczególnymi izoformami może być jednym z czynników etiologicznych synukleinopatii [75].

PODSUMOWANIE

Obecnie wiadomo, że α -Synukleina jest jednym z kluczowych białek zaangażowanych w etiopatologię licznych chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Parkinsona. Potwierdza to fakt, że jest ona podstawowym składnikiem ciał Lewy'ego obecnych w zdegenerowanych neuronach. α -Synukleina, pod wpływem działania licznych czynników nabywa właściwości toksycznych wobec neuronów układu dopaminergicznego. Złożony mechanizm tego toksycznego oddziaływania nie jest dotychczas w pełni wyjaśniony. Lepsze zrozumienie biologicznej roli α -Synukleiny jest ważnym wyzwaniem badawczym. Wyniki prac nad tym zagadnieniem winny przyczynić się do wyjaśnienia patomechanizmu choroby Parkinsona i innych chorób neurodegeneracyjnych przebiegających z agregacją α -Synukleiny w postaci ciał Lewy'ego oraz do opracowania nowych, bardziej skutecznych strategii terapeutycznych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] MURRAY IVJ, LEE VM-Y, TROJANOWSKI JQ. Synucleinopathies: a pathological and molecular review. *Clinical Neuroscience Research* 2001; **1**: 445–455.
- [2] LI J -Y, HENNING JENSEN P. Differential localization of α -, β - and γ -synucleins in the rat CNS. *Neurosci* 2002; **113**: 463–478.
- [3] MORI KT, YOSHIMOTO M, TAKAHASHI H, WAKABAYASHI K. Immunohistochemical comparison of alpha- and beta-synuclein in adult rat central nervous system. *Brain Res* 2002; **941**: 118–126
- [4] SURGUCHOV A, SURGUCHEVA I, SOLESSIO E. Synoretin – a new protein belonging to the synuclein family. *Mol Cell Neurosci* 1999; **13**: 95–103.
- [5] ASKANAS V, ENGEL WK, ALVAREZ RB, MCFERRIN J, BROCCOLINI A. Novel immunolocalization of alpha-synuclein in human muscle of inclusion-body myositis, regenerating and necrotic muscle fibers, and at neuromuscular junctions. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; **59**: 592–598.
- [6] SHIN EC, CHO SE, LEE DK. Expression patterns of alpha-synuclein in human hematopoietic cells and in *Drosophila* at different developmental stages. *Mol Cells* 2000; **10**: 65–70.
- [7] IWANAGA K, WAKABAYASHI K, YOSHIMOTO M et al. Lewy body-type degeneration in cardiac plexus in Parkinson's and incidental Lewy body diseases. *Neurology* 1999; **52**: 1269–1271.
- [8] JIA T, LIU YE, LIU J, SHI YE. Stimulation of breast cancer invasion and metastasis by synuclein gamma. *Cancer Res* 1999; **59**: 742–747.
- [9] IWAJ A. Properties of NACP/alpha-synuclein and its role in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1502**: 95–109.
- [10] CROWTHER RA, DANIEL SE, GOEDERT M. Characterisation of isolated alpha-synuclein filaments from substantia nigra of Parkinson's disease brain. *Neurosci Lett* 2000 Oct 6 **292**,2: 128–130.

- [11] SHOJI M, HARIGAYA Y. Accumulation of α -synuclein in Lewy body disease and multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; **68**: 605–608.
- [12] ARAI Y, YAMAZAKI M, MORI O, MURAMATSU H, ASANO G, KATAYAMA Y. Alpha-synuclein-positive structures in cases with sporadic Alzheimer's disease: morphology and its relationship to tau aggregation. *Brain Res* 2001; Jan **888**: 287–296.
- [13] NEUMANN M, ADLER S. Alpha-synuclein accumulation in case of neurodegeneration with brain iron accumulation type 1 (NBIA-1, formerly Hallervorden-Spatz syndrome) with widespread cortical and brainstem type Lewy bodies. *Acta Neuropathol* 2000; **100**: 568–574.
- [14] STROSZNAJDER J.B., ZAMBRZYCKA A., SOLECKA J. Alpha-synuclein/NACP in the course of brain aging. Neurotoxicity of NAC and amyloid beta. *J Neurochem* 2004; **88**: S1, p23, P1-3.
- [15] PETERSEN K, OLESEN OF, MIKKELSEN JD. Developmental expression of α -synuclein in rat hippocampus and cerebellar cortex. *Neurosci* 1999; **91**: 651–659.
- [16] JAKOWEC MW, DONALDSON DM, BARBA J, PETZINGER GM. Postnatal expression of alpha-synuclein protein in the rodent substantia nigra and striatum. *Dev Neurosci*, Jan 2001; **23**: 91–99.
- [17] RIDEOUT HJ, DIETRICH P, SAVALLE M. Regulation of α -synuclein by bFGF in cultured ventral mid-brain dopaminergic neurons. *J Neurochem* 2003; **84**: 803–813.
- [18] STEFANIS L, KHOLODILOV N, RIDEOUT HJ, BURKE RE. Synuclein-1 is selectively up-regulated in response to nerve growth factor treatment in PC12 cells. *J Neurochem* February 1, 2001; **76**(4): 1165–1176.
- [19] MURPHY DD, RUETER SM, TROJANOWSKI JQ, LEE VM-Y. Synucleins Are Developmentally Expressed, and α -Synuclein Regulates the Size of the Presynaptic Vesicular Pool in Primary Hippocampal Neurons. *J Neurosci* 2000; **20**: 3214–3220.
- [20] JENSEN PH, LI JY, DAHLSTROM A, DOTTI CG. Axonal transport of synucleins is mediated by all rate components. *Eur J Neurosci* 1999; **11**: 3369–3376.
- [21] LI W, HOFFMAN PN, STIRLING W, PRICE DL, LEE MK. Axonal transport of human α -synuclein slows with aging but is not affected by familial Parkinson's disease-linked mutations. *J Neurochem* 2004; **88**: 401–410.
- [22] DA COSTA AC. Recent Advances on alpha-Synuclein Cell Biology: Functions and Dysfunctions. *Curr Mol Med* 2003; **3**: 17–24.
- [23] GOERS J, MANNING-BOG AB, MCCORMACK AL, MILLETT IS, DONIACH S. Nuclear localization of alpha-synuclein and its interaction with histones. *Biochemistry* 2003; **42**(28): 8465–8471.
- [24] PERRIN RJ, WOODS WS, CLAYTON DF, GEORGE JM. Interaction of human alpha-synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 2000; **275**: 34393–34398.
- [25] JAO CC, DER-SARKISSIAN A, CHEN J, LANGEN R. From The Cover: Structure of membrane-bound α -synuclein studied by site-directed spin labeling. *PNAS* 2004; **101**: 8331–8336.
- [26] SHARON R, GOLDBERG MS, BAR-JOSEF I. alpha-Synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 9110–9115.
- [27] GIASSON BI, MURRAY IV, TROJANOWSKI JQ, LEE VM. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 2001; **276**: 2380–2386.
- [28] EL-AGNAF OM, IRVINE GB. Review: formation and properties of amyloid-like fibrils derived from alpha-synuclein and related proteins. *J Struct Biol* 2000; **130**: 300–309.
- [29] BODLES AM, GUTHRIE DJ, GREER B, IRVINE GB. Identification of the region of non-Abeta component (NAC) of Alzheimer's disease amyloid responsible for its aggregation and toxicity. *J Neurochem* 2001; **78**: 384–395.
- [30] TANAKA S, TAKEHASHI M, MATOH N, IIDA S, SUZUKI T, FUTAKI S, HAMADA H. Generation of reactive oxygen species and activation of NF-kappaB by non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid. *J Neurochem* 2002; **82**: 305–315.
- [31] GIASSON BI, MURRAY IV, TROJANOWSKI JQ, LEE VM. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 2001; **276**, 4: 2380–2386.
- [32] ELIEZER D, KUTLUAY E, BUSSELL R, BROWNE G. Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J Mol Biol* 2001; **307**: 1061–1073.
- [33] BUSSELL R JR, ELIEZER D. A structural and functional role for 11-mer repeats in alpha-synuclein and other exchangeable lipid binding proteins. *J Mol Biol* 2003; **329**: 763–778.

- [34] PAYTON JE, PERRIN RJ, WOODS WS, GEORGE JM. Structural Determinants of PLD2 Inhibition by alpha-Synuclein. *J Mol Biol* 2004; **337**: 1001–1009.
- [35] RONIT SHARON, GOLDBERG MS, BAR-JOSEF I, BETENSKY RA. α -Synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins. *PNAS* Jul 2001; **98**: 9110–9115.
- [36] OKOCHI M, WALTER J, KOYAMA A. Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2000; **275**: 390–397.
- [37] LEE G, TANAKA M, PARK K, LEE SS, KIM YM, JUNN E. Casein kinase II-mediated phosphorylation regulates alpha-synuclein/synphilin-1 interaction and inclusion body formation *J Biol Chem* 2004; **279**: 6834–6839.
- [38] FUJIWARA H, HASEGAWA M, DOHMAE N, KAWASHIMA A, MASLIAH E. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 160–164.
- [39] PRONIN AN, MORRIS AJ. Synucleins Are a Novel Class of Substrates for G Protein-coupled Receptor Kinases. *J Biol Chem* 2000; **275**: 26515–26522.
- [40] NEGRO A, BRUNATI AM, DEANA AD, MASSIMINO ML. Multiple phosphorylation of α -synuclein by protein tyrosine kinase Syk prevents eosin-induced aggregation. *FASEB J* 2002; **16**: 210–212.
- [41] NAKAMURA T, YAMASHITA H, NAGANO Y. Activation of Pyk2/RAFTK induces tyrosine phosphorylation of alpha-synuclein via Src-family kinases. *FEBS Lett* 2002; **521**: 190–194.
- [42] ELLIS CE, SCHWARTZBERG PL, GRIDER TL, FINK DW, NUSSBAUM RL. Alpha-synuclein is phosphorylated by members of the Src family of protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 2001; Feb 9 **276**,6: 3879–3884.
- [43] TETSUYA T, HIROSHI Y. Tyrosine 125 of α -synuclein plays a critical role for dimerization following nitrate stress. *Brain Res* 2002; **938**: 73–80.
- [44] SHIMURA H, SCHLOSSMACHER MG, HATTORI N. Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 2001; **293**: 263–269.
- [45] HEDRICH K, KANN M, LANTHALER AJ, DALSKI A, ESKELSON C, LANDT O, SCHWINGER E. The importance of gene dosage studies: mutational analysis of the parkin gene in early-onset parkinsonism. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 1649–1656.
- [46] TOFARIS GK, LAYFIELD R. α -Synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasomes. *FEBS Lett* 2001; **509**: 22–26.
- [47] KELLER JN, GEE J, DING Q. The proteasome in brain aging. *Ageing Res Rev* 2002; **2**: 279–293.
- [48] CUEVRO AM, STEFANIS L, FREDENBURG R, LANSBURY PT, SULZER D. Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone mediated autophagy. *Science* 2004; **305**: 1292–1295.
- [49] KUMLESH K, HOFELE K, BARBIERI S, BUCHMAN VL. Part II: α -synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* 2003; **45**: 14–44.
- [50] OSTREROVA N, PETRUCELLI L, FARRER M, MEHTA N, CHOI P, HARDY J. alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci* 1999; 5782–5791.
- [51] SUNG JY, KIM J, PAIK SR, PARK JH, AHN YS, CHUNG KC. Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2001; **276**: 27441–27448.
- [52] IWATA A., MARUYAMA M. KANAZAWA I, NUKINA N. alpha-Synuclein affects the MAPK pathway and accelerates cell death. *J Biol Chem* 2001; **276**: 45320–45329.
- [53] LEE D, LEE SY, LEE EN, CHANG CS, PAIK SR. alpha-Synuclein exhibits competitive interaction between calmodulin and synthetic membranes. *J Neurochem* 2002; **82**: 1007–1017.
- [54] JENSEN PH, HAGER H, NIELSEN MS, HOJRUP P, GLIEMANN J, JAKES R.. alpha-Synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J Biol Chem* 1999; **274**: 25481–25489.
- [55] UVERSKY VN, LI J, FINK AL. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J Biol Chem* 2001; **276**: 44284–44296.
- [56] STEIDL JV, GOMEZ T. Altered short-term hippocampal synaptic plasticity in mutant alpha-synuclein transgenic mice. *Neuroreport* 2003; **14**: 219–223.
- [57] PETERSEN K, OLESEN OF, MIKKELSEN JD. Developmental expression of α -synuclein in rat hippocampus and cerebellar cortex. *Neuroscience* 1999; **91**: 651–659.
- [58] MURPHY DD, RUETER SM, TROJANOWSKI JQ, LEE VM: Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci* 2000; **20**: 3214–3220.

- [59] ABELIOVICH A, SCHMITZ Y, FARINAS I, CHOI-LUNDBERG D, HO WH, CASTILLO PE. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* Jan 2000; **25**: 239–252.
- [60] CABIN DE, SHIMAZU K, MURPHY D. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking α -synuclein. *J Neurosci* 2002; **22**: 8797–8807.
- [61] AHN BH, RHIM H, KIM SY. alpha-Synuclein interacts with phospholipase D isozymes and inhibits pervanadate-induced phospholipase D activation in human embryonic kidney-293 cells. *J Biol Chem* 2002; **277**: 12334–12342.
- [62] LOTHARIUS J, BRUNDIN P. Impaired dopamine storage resulting from α -synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Gen* 2002; **11**: 2395–2407.
- [63] LEE FJ, LIU F, ZDENEK B. Direct binding and functional coupling of α -synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J* 2001; **15**: 916–926.
- [64] PEREZ RG, WAYMIRE JC. A role of α -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* 2000; **22**: 3090–3099.
- [65] JI-HEUI S, JONG-CHEOL R, SE HOON CHOI, JAE KS, KYEOUNGSIK M. alpha-Synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3/Akt kinase pathway. *FASEB J* 2002; **10**: 1096/fj.02-0041fje.
- [66] HASHIMOTO M, LEIGH J, ROCKENSTEIN E, TAKENOUCI T, MALLORY M, MASLIAH E. α -Synuclein Protects against Oxidative Stress via Inactivation of the c-Jun N-terminal Kinase Stress-signaling Pathway in Neuronal Cells. *J Biol Chem* 2002; **277**: 11465–11472.
- [67] SAHA AR, NINKINA NN, HANGER DP, ANDERTON BH, DAVIES AM, BUCHMAN VL. Induction of neuronal death by alpha-synuclein. *Eur J Neurosci* Aug 2000; **12**(8): 3073–3077.
- [68] DING TT, LEE SJ, ROCHET JC, LANSBURY PTJ. Annular alpha-synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes. *Biochemistry* 2002; **41**: 10209–10217.
- [69] JELLINGER KA. Recent developments in the pathology of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2003; **62**: 347–376.
- [70] SHTILERMAN MD, DING TT. Molecular crowding accelerates fibrillization of alpha-synuclein: could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? *Biochemistry* 2002; **41**: 3855–3860.
- [71] ROCKENSTEIN E, HANSEN LA, MALLORY M, TROJANOWSKI JQ. Altered expression of the synuclein family mRNA in Lewy body and Alzheimer's disease. *Brain Research* 2001; **914**: 48–56.
- [72] LANSBURY PT, BRICE A. Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. *Curr Opin Gen Dev* 2002; **12**: 299–306.
- [73] NORRIS EH, GIASSON BI, ISCHIROPOULOS H, LEE VM. Effects of oxidative and nitrative challenges on alpha-synuclein fibrillogenesis involve distinct mechanisms of protein modifications. *J Biol Chem* 2003; **278**: 27230–27240.
- [74] YAMIN G, GLASER CB, UVERSKY VN, FINK AL. Certain metals trigger fibrillation of methionine-oxidized alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2003; **278**: 27630–27635.
- [75] HASHIMOTO M, ROCKENSTEIN E, MANTE M, MALLORY M. β -Synuclein inhibits α -Synuclein aggregation: A Possible Role as an Anti-Parkinsonian Factor. *Neuron* 2001; **32**: 213–223.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 10.11.2004 r.

Przyjęto: 05.04.2005 r.

ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa

e-mail: agatazambrycka@hotmail.com

APOPTOZA ERYTROCYTÓW CZŁOWIEKA

APOPTOSIS IN HUMAN ERYTHROCYTES

Agnieszka MARCZAK

Katedra Termobiologii, Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Molekularny mechanizm apoptozy zależy od obecności w komórce określonych czynników apoptotycznych, które obecne są głównie w mitochondriach i jądrze. Dojrzałe erythrocyty człowieka nie mają organelli komórkowych. Przez długi czas uważano, że nie mogą one wchodzić na drogę apoptozy. Badania ostatnich lat zakwestionowały to twierdzenie. Punktem zwrotnym w tych badaniach było wykrycie w dojrzałych erythrocytach człowieka kaspaz – proteinaz cysteinowych, które odgrywają kluczową rolę w efektorowej fazie programowanej śmierci komórki. W niniejszej pracy przedstawiono przebieg apoptozy na różnych etapach rozwoju erythrocytów człowieka oraz w wybranych stanach patologicznych. Dokonano również omówienia programowanej śmierci komórki w erythrocytach w ujęciu ewolucyjnym na przykładzie erythrocytów płazów, gadów, ptaków i ssaków.

Słowa kluczowe: apoptoza, erythrocyty, komórki bezjądrzaste.

Summary: Until very recently, erythrocytes have been considered unable to undergo apoptosis, as they lack mitochondria and nuclei, key organelles in the apoptotic machinery of other cells. However, in most recent observations it does not seem to be the truth. The major spinning point in this research was finding caspases (cysteine proteases), that play the major role in programmed cell death, in humans mature erythrocytes. This article shows the progress of apoptosis in different stadia of humans erythrocytes development as well as in several pathological stadia. With regard to the evolutionary aspect the programmed cell death in erythrocytes of amphibians, reptiles, birds and mammals was also discussed.

Key words: apoptosis, erythrocytes, anucleated cells.

1. WSTĘP

Erythrocyty ssaków uważane są za pływające w osoczu pęcherzyki zawierające hemoglobinę. Rzeczywiście nie mają one jądra i mitochondrium, a więc nie mogą być traktowane jak komórki zawierające organella. Niemniej jednak erythrocyty od dawna były przedmiotem zainteresowania naukowców zajmujących się apoptozą, procesem przypisywanym pierwotnie tylko komórkom jądrzastym.

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki (ang. *Programmed Cell Death*, PCD) ma miejsce podczas całego rozwoju organizmu. W jej wyniku organizm pozbywa się nadmiaru niepotrzebnych komórek podczas różnicowania tkanek i narządów, a także eliminuje zainfekowane, uszkodzone czy też zmutowane komórki. Różne aspekty apoptozy omawiane były w polskich czasopismach [4, 24, 28, 29, 35, 42, 68, 71]. Dotyczyły one jednak komórek jądrazastych. Niniejszy artykuł przedstawia procesy PCD w erytrocytach ssaków, specyficznych komórkach pozbawionych jądra i innych organelli komórkowych.

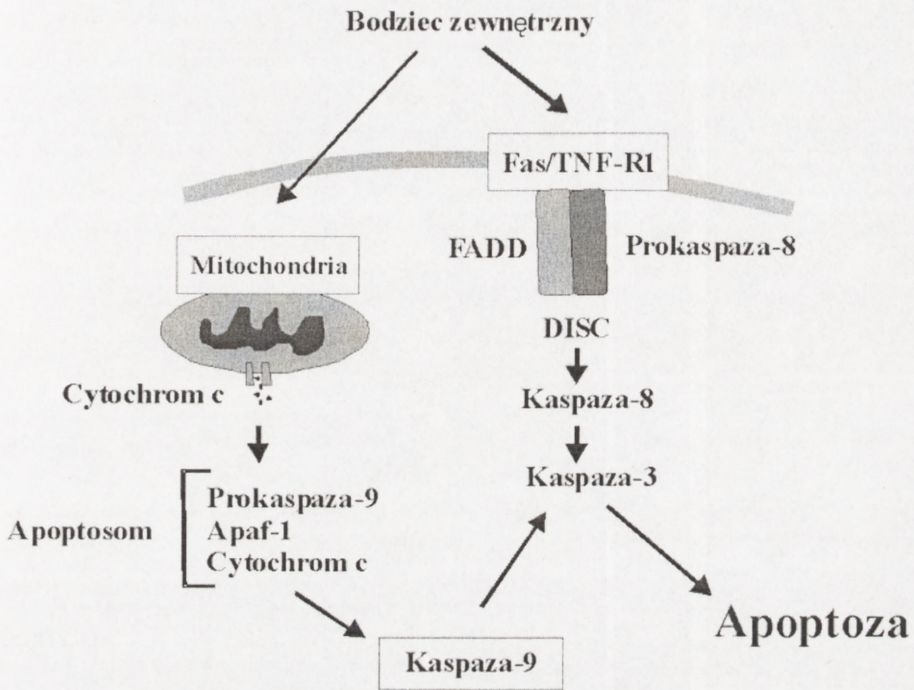
Zainteresowanie problemem apoptozy w erytrocytach wynikało z obserwacji, że komórki te, których czas życia wynosi u człowieka około 120 dni, są po tym czasie usuwane z krwioobiegu, a śmierć erytrocytów poprzedzona jest zmianami charakterystycznymi dla apoptozy. Następuje obkurczenie komórki, uwypuklenie błony plazmatycznej, utrata peryferycznych białek błonowych i asymetrii lipidów prowadząc do przemieszczania się fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej monowarstwy. Zmiany te powodują, że erytrocyty są wychwytywane przez komórki fagocytyczne i niszczone. Dodatkowo już podczas erytropoezy usuwana jest w drodze apoptozy pewna frakcja prekursorów erytrocytów [41].

2. OGÓLNY MECHANIZM APOPTOZY

Proces prowadzący do apoptozy można podzielić na trzy fazy: początkową, efektorową i degradacyjną. Początkowa faza indukowana jest przez wiele czynników zewnętrznych, np. szok termiczny, stres oksydacyjny, aktywacja określonych receptorów błonowych i inne. Dalsze fazy apoptozy polegają na aktywacji w komórkach określonych procesów biochemicznych prowadzących w efekcie do śmierci komórki.

Kluczowe znaczenie dla przebiegu efektorowej fazy apoptozy przypisuje się proteinazom cysteinowym (kaspazom, ang. *caspase-cysteine-dependent aspartate specific protease*) [1, 35]. Są one syntetyzowane jako nieaktywne proenzymy (zymogeny) składające się z czterech podjednostek: NH_2 -terminalnej prodomeny, o różnej wielkości, dwóch domen o masach cząsteczkowych ~ 10 kDa i ~ 20 kDa, połączonych krótkim fragmentem łącznikowym. Prodomena, która utrzymuje kaspazy w formie nieaktywnej, podczas aktywacji zostaje odszczepiona [57, 70]. Początkowo obecność tych enzymów stwierdzono tylko w komórkach jądrazastych, stąd też zjawisko apoptozy przypisywane było tylko takim komórkom. Doniesienia Bratosin i wsp. [9] oraz Berga i wsp. [3], którzy wykazali w dojrzałych erytrocytach człowieka obecność kaspaz i innych czynników apoptotycznych, zmieniły pogląd na tę sprawę. Wykazali oni, że erytrocyty zawierają prokaspazę 3 i prokaspazę 8 w ilościach porównywalnych z poziomem tych enzymów w komórkach Jurkat.

Na rycinie 1 przedstawiono dwie drogi, którymi może przebiegać apoptoza [10]. Szlak zewnętrzny (ang. *extrinsic*) rozpoczyna się od pobudzenia receptorów Fas lub TNF-R należących do nadrodziny TNF-R (ang. *Tumour necrosis factor receptor*). Należą do nich między innymi receptory CD95, które wykryto na niedojrzałych

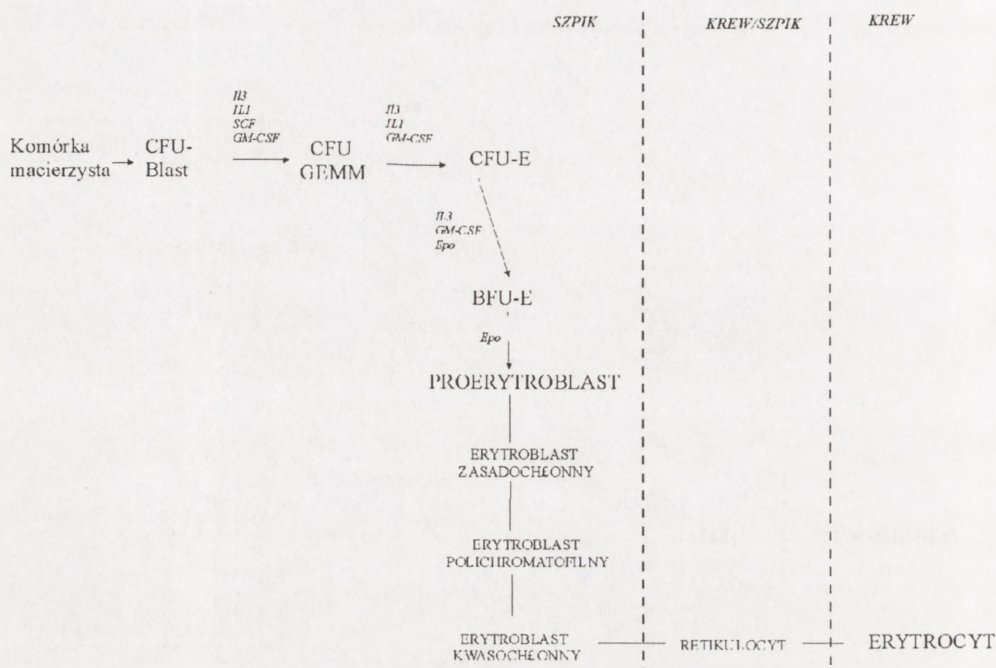


RYCINA 1. Schematyczne przedstawienie dwóch głównych dróg apoptozy [wg 10 za zgodą Elsevier]

erytroblastach. Cechą charakterystyczną receptorów śmierci jest obecność wewnątrzkomórkowej domeny zwanej domeną śmierci (ang. *death domain, DD*) [39, 65]. Na skutek związania liganda z receptorem dochodzi do oligomeryzacji receptora, a następnie do utworzenia kompleksu DISC (ang. *death-inducing signaling complex*) poprzez połączenie domen śmierci z białkiem adaptacyjnym FADD (ang. *fas associated death domain protein*) oraz z prokaspazą 8 [36]. Konsekwencją tego jest aktywacja przez autoproteolizę prokaspazy 8, która bezpośrednio aktywuje kaspazę 3 [69]. Drugi szlak wymaga udziału mitochondriów. Szereg reakcji z udziałem białek z rodziny Bcl-2 (BH3only oraz Bak) prowadzi do utworzenia kanałów uwalniających cytochrom c z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium [37]. Wypływ cytochromu c inicjuje utworzenie kompleksu zwanego apoptosomem [63], w skład którego wchodzi cytochrom c, prokaspaza 9, ATP oraz cytozolowe białko Apaf 1 (ang. *apoptotic protease activating factor-1*). Utworzenie tego kompleksu jest niezbędne do oligomeryzacji, a następnie autoproteolizy prokaspazy 9, która jest bezpośrednim aktywatorem prokaspazy 3 [25].

3. POWSTAWANIE KRWIŃEK CZERWONYCH

Z uwagi na fakt, że podczas rozwoju erytrocytów następują zmiany w zawartości organelli komórkowych, procesy apoptozy należy śledzić w ścisłym powiązaniu z cyklem



RYCINA 2. Schemat erytropoezy [wg 15 w zmienionej postaci]: *Stem cell* – komórka macierzysta szpiku, CFU-Blast (*colony forming unit*) – komórka formująca kolonie komórek blastycznych, CFU-GEMM – komórka formująca kolonie dla szeregów czerwonych, granulocytarnego, płytkowego, monocytarnego, BFU-E (*base forming unit*) – inna forma komórki tworzącej kolonie dla szeregu erytrocytarnego, CFU-E – komórka CFU dla szeregu erytrocytarnego. Czynniki wzrostu dla poszczególnych linii: CSF (*colony stimulating factor*), IL – interleukiny, EPO – erytropoetyna

życia krwinek czerwonych. Cykl ten można podzielić na dwie fazy: pierwsza to erytropoeza, polegająca na tworzeniu dojrzałych erytrocytów w organach hematopoetycznych, druga ma za zadanie utrzymywanie stałej liczby dojrzałych erytrocytów w osoczu.

Krwinki czerwone w życiu pozapłodowym powstają z pierwotnych komórek szpiku (ryc. 2). Ich prekursor – proerytroblast jest typową komórką jądrastą, w której zachodzi wiele różnorodnych procesów biochemicznych. W procesie dojrzewania erytroblast różnicuje się i rozpoczyna aktywne wychwytywanie żelaza, w cytoplazmie następuje zanik RNA i wzrost ilości białka – globiny. Erytroblast polichromatofilny zawiera niewielkie ilości mitochondriów i RNA w cytoplazmie, w której pojawia się hemoglobina. Następne stadium – erytroblast ortochromatofilny – cechuje się znacznym zwiększeniem zawartości hemoglobiny. Komórka praktycznie nie zawiera już mitochondriów i RNA, traci jądro i przechodzi w retikulocyt. Stanowi on ostatnie stadium dojrzewania i różnicowania komórek szpiku w kierunku erytrocytów. Okres ten trwa 7–10 dni [15].

Obecnie wiadomo, że za stymulację erytropoezy odpowiada hormon erytropoetyna (EPO). Przyspiesza ona proliferację komórek szeregu erytroidalnego (BFU-E, CFU-E) oraz

zapobiega zjawisku apoptozy komórek znajdujących się w końcowych etapach różnicowania i dojrzewania (CFU-E i proerytoblastów) z udziałem białka antyapoptotycznego Bcl-X_L [43]. Faktycznie, zablokowanie Bcl-X_L powoduje zatrzymanie w późnym stadium procesu erytropoezy, czego następstwem jest anemia hemolityczna. Natomiast usunięcie erytropoetyny powoduje aktywację kaspaz i śmierć erytoblastów [26].

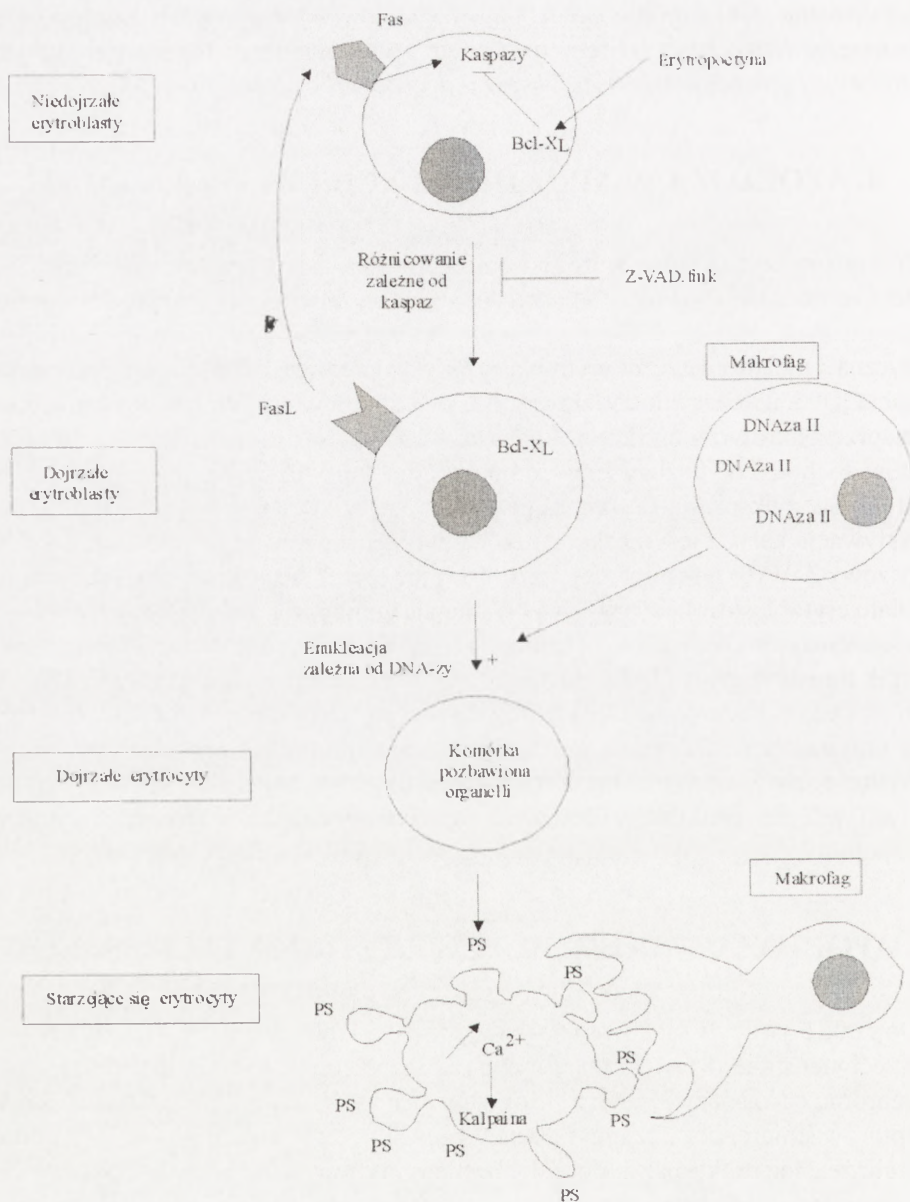
4. APOPTOZA W NIEDOJRZAŁYCH ERYTROCYTACH

Prekursory erytrocytów, które są komórkami zawierającymi organelle, podlegają pełnemu procesowi apoptozy. Pełny proces apoptozy obserwuje się również w stadiach patologicznych, takich jak β -talasemia czy idiopatycznie nabywana anemia sideroblastyczna. Ortochromatyczne erytoblasty ekspresując ligand CD95 stymulują receptor śmierci CD95, należący do rodziny receptorów śmierci Fas. Tworzy się w ten sposób pętla sprzężenia zwrotnego kontrolująca erytropoezę. W procesie dojrzewania erytoblastów dochodzi do pozbawienia komórek jądra, który to proces wymaga obecności makrofagów z ekspresją DNAzy II [14] (ryc. 3A).

Aktywacja kaspaz jest niezbędna do wytworzenia czerwonych krwinek. Inhibitor kaspazowy Z-VAD.fmk powoduje zahamowanie erytropoezy. Podczas dynamicznego podziału erytoblastów kaspazy-3, -6 i -7 ulegają wprawdzie proteolitycznej aktywacji i rozszczepiają białka jądrowe (lamina B i acinus), ale pozostawiają nienaruszony czynnik transkrypcyjny GATA-1 rozpoznający sekwencję nukleotydową GATA. Nie dochodzi także do eksponowania fosfatydyloseryny na powierzchni komórki. Można więc przypuszczać, że pewne procesy programu apoptozy biorą udział w procesie podziału i pozbawiania jądra komórek erytroidalnych. Jednak kaspaza 3 nie powoduje żadnych widocznych skutków ubocznych w procesie erytropoezy, a nadekspresja białka antyapoptotycznego – Bcl-2 nie powoduje zaburzeń w procesie erytropoezy [14].

5. APOPTOZA W DOJRZAŁYCH ERYTROCYTACH SSAKÓW

Dojrzałe erytrocyty ssaków są pozbawione jądra i innych organeli komórkowych i w przeciwieństwie do większości innych komórek nie zawierają czynnika Apaf-1, cytochromu c i kaspazy 2, 6, 7 i 9. Mogłyby więc ulegać apoptozie tylko w obecności receptorów śmierci bez udziału mitochondriów. Początkowo Berg i wsp. [3] zaobserwowali, że choć prokaspazy, które są obecne w erytrocytach, mogą być aktywowane *in vitro* poprzez dodanie egzogennej kaspazy 6, nie ulegają jednak aktywacji w nieuszkodzonych erytrocytach zarówno podczas ich przechowywania, jak i w odpowiedzi na czynniki apoptotyczne. Nie zaobserwowano również w dojrzałych erytrocytach endogennych inhibitorów kaspaz, czyli XIAP, C-IAP1, C-IAP2 [73]. Przypuszczano, że brak aktywacji kaspaz w erytrocytach w warunkach *in vivo* jest spowodowana obecnością jakiegoś innego inhibitora apoptozy lub brakiem Apaf-1 i cytochromu c. Konsekwencją tego jest niezdolność do tworzenia aktywnych apoptosomów. Mandal



RYCINA 3. Zjawiska apoptotyczne w erytrocytach na różnych etapach różnicowania się komórki: Z-VAD.fmk – inhibitor kaspaz; PS – fosfatydyloseryna (wg [14] za zgodą)

i wsp. [51] natomiast wykazali, że prokaspaza 3 (32kDa) jest hydrolizowana do formy aktywnej (20 kDa) w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Obecność aktywnej kaspazy 3 została potwierdzona poprzez obserwację, że lizat komórek erytrocytarnych powodował proteolizę jej substratu Ac-DEVD-pNA. Ponadto zastosowanie inhibitora kaspazy 3, Z-DEV-fmk, powodowało zablokowanie przemieszczania się fosfatydyloseryny z wewnętrznej monowarstwy błony na powierzchnię komórki. Prawdopodobnie aktywacja kaspazy 3 powoduje hamowanie aktywności translokazy aminofosfolipidowej (flipazy) zarówno poprzez bezpośrednie rozszczepienie proteolityczne translokazy, jak i, co jest bardziej prawdopodobne, poprzez pośredni wpływ na regulatory flipaz [51]. Translokaza aminofosfolipidowa odpowiedzialna jest za transport fosfatydyloseryny (PS) do wewnętrznej monowarstwy. Zaburzenia w funkcjonowaniu tego enzymu powodują ekspozycję tego fosfolipidu na powierzchni komórki, co jest jednym z oznak apoptozy.

Należy sobie jednak zdawać sprawę, że również inne proteazy komórkowe, na przykład kalpajny, mogą aktywnie uczestniczyć w procesie apoptozy. Kalpajny to proteazy cysteinowe aktywowane jonami wapnia. Biorą one udział w wielu procesach komórkowych, w tym proliferacji, migracji i śmierci komórki w drodze zarówno apoptozy, jak i nekrozy [60, 74]. Kalpajna występuje w postaci dwóch izoenzymów: kalpajny I (μ -kalpajny), aktywnej w obecności jonów wapniowych w stężeniu μ M i kalpajny II (m-kalpajny), działającej w obecności tego kationu w stężeniu mM. Każda z izoform jest zbudowana z 28 kDa podjednostki, która jest identyczna dla każdej izoformy i unikatowej o masie 80 kDa [58]. Według licznych badań kalpajny związane są również z apoptozą w komórkach jądrzastych. Na przykład farmakologiczne zahamowanie aktywności kalpajny może zapobiec śmierci różnych typów komórek, w tym komórek nerwowych [5,48,67].

W erytrocytach stwierdzono obecność μ -kalpajny [14]. Pod wpływem Ca^{2+} jest ona przekształcana do aktywnej postaci, która odpowiedzialna jest za degradację licznych białek komórkowych m.in. spektryny. Rozszczepia ona wiązania peptydowe wewnątrz łańcucha białkowego, nie wykazując przy tym specyficzności wobec aminokwasów [74]. Kalpajny po aktywacji wywołują proces apoptozy poprzez proteolityczną aktywację kaspaz (w szczególności kaspaz 3, 9 i 12) [56] bądź inaktywację białek antyapopto-tycznych z rodziny Bcl-2 [11,23,76]. W wielu badaniach podkreślano istnienie wzajemnego współdziałania między kaspazami i kalpajnymi. Rosnące dowody wskazują na to, że wszystkie rodzaje proteaz mogą zastępować siebie nawzajem w procesie apoptotycznym [74].

Dojrzałe erytrocyty, pozbawione już jądra i innych organelli komórkowych, mogą być *in vitro* pobudzane do starzenia się poprzez dodanie zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} lub jonoforu Ca^{2+} . Czynniki te wywołują aktywację μ -kalpajny i wyzwala ją zależne od μ -kalpajny zmiany kształtu komórki i zmiany w strukturze błony plazmatycznej. W szczególności obserwowane jest ekspozycję PS na powierzchni komórki podobne jak podczas apoptozy w komórkach jądrzastych [14]. Proces ten kończy się rozpadem erytrocytów i fagocytozą w obecności makrofagów (ryc. 3C).

Ciekawe jest, że w procesie starzenia się erytrocytów *in vitro* występuje zaburzenie homeostazy jonowej. Dochodzi do aktywacji enzymów proteolitycznych. Inhibitory proteaz cysteinowych, takie jak Ac-DEVD-CHO czy leupeptyna, zapobiegają wszystkim właściwościom procesu starzenia się erytrocytów wywołanymi jonoforami Ca^{2+} [14].

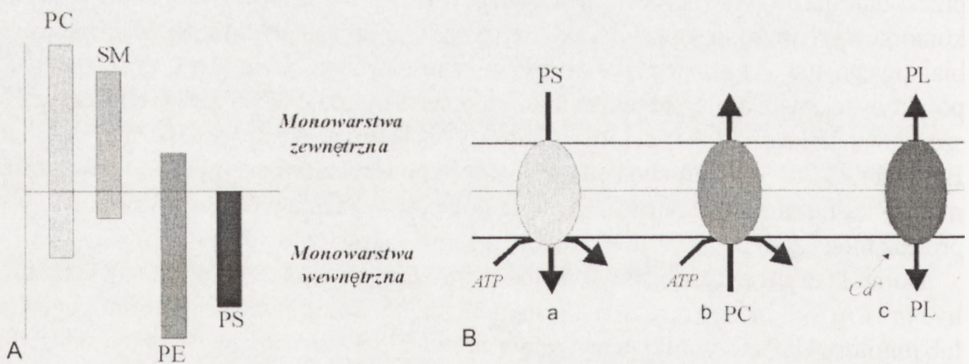
6. ROLA BŁONY KOMÓRKOWEJ W APOPTOZIE

Kaskadę zdarzeń apoptotycznych mogą inicjować uszkodzenia białkowo-lipidowej błony komórkowej. W erytrocytach, które są pęcherzykami wypełnionymi hemoglobina, błona komórkowa ma szczególne znaczenie w inicjowaniu apoptozy. Wykazano, że komórki jądrzaste w stadium apoptozy cechuje zwiększona peroksydacja lipidów [59], a stymulacja receptorów powierzchniowych błony aktywuje sfingomielinazę, która hydrolizuje sfingomielinę do ceramidu i cholicy. Ceramid, aktywujący zależną od niego serynowo-treoninową kinazę białkową, jest uważany za wtórny przekaźnik sygnałów apoptotycznych [31, 38, 61].

Błona komórkowa erytrocytów jest złożoną strukturą, w której można wyróżnić trzy obszary: matrycę białkowo-lipidową, która stanowi centralną warstwę błony, szkielet błony, czyli zespół białek peryferyjnych znajdujący się po wewnętrznej stronie dwuwarstwy lipidowej i glikokaliks, który ogranicza błonę od środowiska zewnętrznego.

Lipidy w błonach biologicznych rozmieszczone są w sposób asymetryczny. Fosfolipidy zawierające cholinę, a więc fosfatydylocholina (PC) i prawie cała sfingomielina (SM) występują na ogół w zewnętrznej monowarstwie. Fosfolipidy zawierające terminalną grupę aminową, fosfatydyloseryna (PS) i fosfatydylo-etanolo-amina (PE), występują preferencyjnie w wewnętrznej, kontaktującej się z cytoplazmą, monowarstwie błony [40] (ryc.4A).

Utrzymanie asymetrii jest możliwe dzięki powolnej poprzecznej dyfuzji lipidów między warstwami błony, interakcji białko-lipid i transportowi z udziałem białek. Wyróżnia się trzy klasy transporterów fosfolipidów: flipazy, w tym translokazę aminofosfolipidową, które transportują aktywnie lipidy z zewnętrznej monowarstwy do wewnętrznej, flopazy



RYCINA 4. Schematyczne rozmieszczenie podstawowych fosfolipidów w dwuwarstwie lipidowej (A) oraz transportery wewnątrz błonowe fosfolipidów w komórkach eukariotycznych (B) (B wg [13] za zezwoleniem), fosfatydylocholina (PC) i sfingomielina (SM) umiejscowione są głównie w zewnętrznej monowarstwie, podczas gdy fosfatydyloetanoloamina (PE) i fosfatydyloseryna (PS) lokują się w monowarstwie wewnętrznej. Ta asymetria jest utrzymywana dzięki (a) flipazie fosfatydyloseryny. W niektórych tkankach wymagana jest obecność flopazy PC (b). Za przypadkowe rozmieszczenie fosfolipidów odpowiadają niespecyficzne skramblazy, aktywowane jonami Ca²⁺

– aktywnie transportujące lipidy w kierunku odwrotnym oraz aktywowane przez jony wapnia skramblazy, transportujące lipidy biernie w obie strony [13] (ryc. 4B). Nagromadzenie lipidów po jednej stronie błony może indukować zagięcia i w konsekwencji zmianę kształtu komórki [22].

Lipidy pozostają w ścisłym powiązaniu z białkami błony. Interakcja ta również umożliwia utrzymanie asymetrycznego rozmieszczenia lipidów. Podstawowym białkiem szkieletu błonowego jest spektryna, która stanowi około 25% masy białek błonowych. Składa się ona z dwóch przeplatających się łańcuchów (α -220 kDa i β -240 kDa) tworzących dimer. Wykazano, że spektryna może łączyć się z fosfatydyloseryną, składnikiem dwuwarstwy lipidowej zlokalizowanym w warstwie wewnętrznej błony. Badania z wykorzystaniem liposomów zbudowanych z fosfatydyloseryny (PS) wykazały, że w wiązaniu tym uczestniczą łańcuchy zarówno α spektryny, jak i β . Miejscami o wysokim powinowactwie do PS okazały się: α 8, α 9–10, β 12, β 13, β 14. Wykazano również powinowactwo do PS w niehomologicznej N-terminalnej domenie łańcucha β . Godne uwagi jest też fakt, że miejsca wiązania PS są skupione w pobliżu miejsc przyłączania ankiryiny i białka pasma 4.1, czyli białek, które uczestniczą w przyłączaniu spektryny do błony komórkowej. Spektryna bowiem połączona jest z dwuwarstwą lipidową poprzez białko ankirynę, która tworzy most między tetramerem spektryny a białkiem transbłonowym pasma 3 oraz poprzez połączenie między białkiem pasma 4.1 a glikoforyną C [16].

Liczne doniesienia wskazują, że interakcja spektryny i PS wpływa na stabilność błony. Bezpośrednie oddziaływanie spektryny z PS w błonie może modulować jej interakcje z białkami i wynikiem tego mogą być lipidowe domeny bogate w PS, obserwowane w błonie erytrocytarnej. Przejście PS do warstwy powierzchniowej jest sygnałem dla usuwania komórki przez makrofagi [20, 27].

Eksternalizacja PS ma miejsce w początkowych etapach apoptozy [19]. Zaburzenia te prowadzą do zmian właściwości powierzchniowych komórki. W błonie, w której lipidy rozmieszczone są asymetrycznie, monowarstwa cytoplazmatyczna ma bardziej ujemny wypadkowy ładunek elektryczny niż ekstracytoplazmatyczna strona błony. Kwasy tłuszczowe fosfatydylocholinyl i sfingomieliny są bardziej nasycone niż kwasy tłuszczowe wchodzące w skład fosfatydyloetanolaminy i fosfatydyloseryny, stąd asymetrii rozmieszczenia głów polarnych fosfolipidów towarzyszy asymetria rozmieszczenia kwasów tłuszczowych, która powoduje, że wewnętrzna monowarstwa jest nieco bardziej płynna. Utrata tych właściwości powoduje przejście komórek w stan prokoagulacyjny [49], obserwuje się wzrost adhezyjności [64] i właściwości agregacyjnych [72]. Komórki takie stają się rozpoznawalne przez komórki fagocytykujące – makrofagi [7,20,21]. W warunkach fizjologicznych procesy apoptozy są podstawą rozwoju organizmu i homeostazy.

7. ROLA KANAŁÓW KATIONOWYCH W INICJOWANIU APOPTOZY

Komórka ulegająca apoptozie uruchamia kaskadę zdarzeń biochemicznych, które w ostateczności prowadzą do jej śmierci. W początkowym etapie procesu apoptozy w większości komórek jest obserwowany wzrost wewnątrzkomórkowego, cytozolowego stężenia wapnia. Wapń jest uniwersalnym wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem kontrolującym różne procesy w komórce [6]. Jony wapnia odgrywają ważną rolę w przekazywaniu sygnału do apoptozy w odpowiedzi na różne czynniki patologiczne [32].

Kanały kationowe w błonach erytrocytarnych są otwierane w wyniku szoku osmotycznego i stresu oksydacyjnego [17,34,45]. Mogą być również aktywowane poprzez usunięcie wewnątrzkomórkowego i zewnątrzkomórkowego Cl^- [17, 34]. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} stymuluje skramblazy, prowadzi do zaburzeń asymetrii lipidów błonowych i stymuluje wrażliwe na jony wapnia kanały K^+ , w wyniku czego dochodzi do utraty K^+ i w następstwie do obkurczenia komórki [45, 46, 55]. Interesujące jest, że traktowanie erytrocytów jonoforem jonomycyny czy A23187, które wywołują zmiany w stężeniu Ca^{2+} wewnątrz komórki, powoduje szybką zmianę kształtu komórki, tworzenie wypustek błonowych, eksternalizację fosfatydyloseryny, czyli typowe zjawiska występujące podczas apoptozy w komórkach jądrzastych [3,9,14]. Prowadzi to również do aktywacji kalpain, ale nie aktywuje kaspaz.

Erytrocyty inkubowane z A23187 były szybko wychwytywane przez makrofagi. Preinkubacja z inhibitorami proteaz zapobiegała wychwytywaniu erytrocytów przez makrofagi zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [33].

Lang i wsp. [46] wykazali, że szok osmotyczny i stres oksydacyjny, które wywoływały apoptozę w komórkach jądrzastych [30, 54], powodowały również przemieszczenie fosfatydyloseryny na powierzchnię komórki w erytrocytach człowieka, co przejawiało się w wiązaniu aneksyny do błony komórkowej. Wykonane później eksperymenty w celu wyjaśnienia komórkowych mechanizmów tego zjawiska wykazały, że obydwa czynniki powodują otwarcie kanałów wapniowych i wzrost stężenia cytozolowego Ca^{2+} . Zastosowanie amiloridu, inhibitora kanałów kationowych [17, 34] hamuje całkowicie ten proces.

W komórkach apoptotycznych obserwuje się zmniejszenie wartości komórkowego pH, które może być związane z aktywacją wymiennika jonowego, antyportu $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ [18, 53] i zmianą zawartości Ca^{2+} w komórce.

8. APOPTOZA W DOJRZAŁYCH ERYTROCYTACH JĄDRZASTYCH

Erytrocyty z płodu ssaków [66], podobnie jak erytrocyty płazów, gadów i ptaków [62, 75] zawierają jądro i te komórki mogą przechodzić typowy proces apoptozy. Erytrocyty z ludzkiego płodu krążące we krwi matki przechodzą proces apoptozy *in situ* [62].

Bratosin i wsp. [8, 9] wykazali, że programowana śmierć komórki może być indukowana w dojrzałych erytrocytach żaby poprzez zwiększenie napływu Ca^{2+} do komórki dzięki zastosowaniu jonoforu A 23178. Proces ten jest hamowany przez inhibitory proteaz cysteinowych (kaspaz i kalpain) – Ac-DEVD-cmk i leupeptyny. Obserwowano przy tym obniżenie potencjału błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$), aktywację kaspazy 3 oraz kondensację i fragmentację chromatyny. Obserwacje mikroskopowe wykazały ponadto zmiany morfologiczne komórki, utratę dwuwklęsłego kształtu, pojawienie się pęcherzyków i utworzenie ciałek apoptotycznych. Miało miejsce również przemieszczenie PS na powierzchnię komórki.

Weil i wsp. [74] zaobserwowali apoptozę w erytrocytach kurcząt wywołaną działaniem staurosporyny i cykloheksimidu zarówno w obecności, jak i przy braku osocza. Obserwowano zmianę kształtu komórki, przemieszczenie PS na powierzchnię komórki, kondensację i fragmentację chromatyny. W przeciwieństwie natomiast do komórek żaby (*Rana*) nie notowano aktywacji kaspaz. Proces apoptozy nie był tu hamowany przez inhibitor kaspaz Z-VAD-fmk.

Analizując proces apoptozy w ujęciu ewolucyjnym można zauważyć, że erytrocyty płazów mają wszystkie główne składniki procesu apoptotycznego, jakie obserwuje się w komórkach jądrazstych. W procesie ewolucji w erytrocytach ptaków nastąpiła inaktywacja kaspaz [75], podczas gdy u ssaków w procesie różnicowania erytrocytów dochodzi do zaniku zarówno jądra, jak i mitochondriów. W procesie ewolucji erytrocyty narażone były na zwiększający się stres oksydacyjny, który przyspiesza proces starzenia się komórek. Ceną, jaką musiały zapłacić za przeżycie, było pozbawienie erytrocytów mitochondriów, co spowodowało uproszczenie procesu apoptozy z uwagi na brak aktywnych apoptosomów. Pociągnęło to jednak za sobą również skrócenie życia erytrocytów. Mitochondria bowiem, chociaż uczestniczą w procesie programowanej śmierci komórki, są też kluczowe dla procesów uzyskiwania energii i tym samym dla życia komórek [8].

9. APOPTOZA W WYBRANYCH SCHORZENIACH GENETYCZNYCH ZWIĄZANYCH Z ERYTROCYTAMI

Choroby o podłożu genetycznym, takie jak anemia sierpowata [44], talasemia [50], upośledzenie przemian glukozy-6-fosforanu [52], powodują skrócenie czasu życia erytrocytów. Skrócenie to jest dość drastyczne. Okres półtrwania krwinek osób chorych na anemię sierpowatą wynosi 6 dni [2], talasemię – 15 dni [77], u osób z upośledzoną przemianą glukozy-6-fosforanu – 22 dni [12].

Erytrocyty pochodzące od osób chorych na wszystkie trzy schorzenia genetyczne są w porównaniu z komórkami osób zdrowych bardziej wrażliwe na takie czynniki, jak stres oksydacyjny i niedobór glukozy. Dodatkowo erytrocyty sierpowate i wykazujące upośledzenie przemian glukozy są bardziej wrażliwe na szok osmotyczny. Ta zwiększona wrażliwość na stres jest powodem skrócenia czasu życia erytrocytów osób cierpiących na te schorzenia genetyczne [44, 47].

Stres oksydacyjny i szok osmotyczny uszkadzają erytrocyty przynajmniej częściowo poprzez te same mechanizmy, to jest aktywację kanałów kationowych. Wzrost wrażliwości komórek z defektami genetycznymi może być wtórnym efektem uwrażliwienia kanałów kationowych bądź wzrostu aktywności skramblaz i późniejszej kaskady zdarzeń biochemicznych i molekularnych. Nie jest to jednak wyłącznie ta przyczyna. Badania z użyciem jonomycyny wykazały bowiem różnice we wrażliwości różnych typów komórek na ten czynnik. Erytrocyty osób z upośledzeniem przemian glukozo-6-fosforanu wykazywały zwiększoną wrażliwość na ten czynnik.

10. PODSUMOWANIE

Programowana śmierć komórki to złożony proces, w wyniku którego organizm eliminuje uszkodzone komórki. W przypadku erytrocytów człowieka powstaje semantyczny problem zastosowania nazwy apoptoza na określenie procesów prowadzących do śmierci tych komórek. Należałoby wyróżnić dwa następujące po sobie procesy. Po pierwsze dojrzałe erytrocyty, będące pozbawionymi organelli pęcherzykami wypełnionymi hemoglobina powstały prawdopodobnie na skutek krótkotrwałej aktywacji kaspaz w początkowym etapie różnicowania komórek. Ponieważ prekursor erytrocytów – proerytoblast – jest typową komórką jądrzastą zawierającą organella komórkowe, nie wyklucza się tu udziału mitochondrium.

Również podczas starzenia się erytrocytów człowieka zakończonego ich śmiercią mają miejsce zjawiska charakterystyczne dla procesu apoptozy. W dojrzałych erytrocytach, tak jak w klasycznej apoptozie komórek jądrzastych, śmierci zawsze towarzyszy obecność fosfatydyloseryny na powierzchni komórki, uwypuklenia błony plazmatycznej i obkurczenie komórki. Zachodzi pytanie, czy procesy te są na tyle podobne, aby można było mówić o apoptozie w bezjądrzastych erytrocytach człowieka. Wykrycie w dojrzałych erytrocytach człowieka kaspaz stanowi ważny krok w tych rozważaniach. Podczas śmierci wywołanej czynnikami apoptotycznymi, jak na przykład stres oksydacyjny czy szok osmotyczny, dochodzi do aktywacji tych enzymów w erytrocytach. Fakt ten, jak również potwierdzony udział jonów Ca^{2+} , przemawiałyby za uznaniem procesów zachodzących w erytrocytach za apoptozę. Ostateczne rozstrzygnięcie tego problemu nie jest jednak jeszcze w tym momencie możliwe.

11. LITERATURA

- [1] ABRAHAM MC, SHAHAM S. Death without caspases, caspases without death. *Trends in Cell Biol* 2004; **14**: 184–193.
- [2] BENIAMIN LJ, MANNING JM. Enhanced survival of sickle erythrocytes upon treatment with glyceraldehyde. *Blood* 1986; **67**: 544–546.
- [3] BERG CP, ENGELS IH, ROTHBART A, LAUBER K, RENZ A, SCHLOSSER SF, SCHULZE-OSTHOFF K, WESSELBORG S. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 1197–1206.

- [4] BIELAK-ŻMIJEWSKA A. Mechanizmy oporności komórek nowotworowych na apoptozę. *Kosmos* 2003; **52**: 157–171.
- [4] BLOMGREN, K, ZHU C, WANG X, KARLSSON JO, LEVERIN AL, BAHR BA, MALLARD C, HAGERBERG H. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of „pathological apoptosis”? *J Biol Chem* 2001; **276**: 10191–10198
- [5] BOOTMAN MD, COLLINS TJ, PEPPIN CM, PROTHERO LS, MAC KENZIE L, DE SMET P, TRAVERS M, TOVEY SC, SEO JT, BERRIDGE MJ, CICCiolINI F, LIPP P. Calcium signaling – an overview. *Cell Dev Biol* 2001; **12**: 3–10.
- [6] BRATOSIN D, ESTAQUIER J, AMEISEN JC, MONTREUIL J. Molecular and cellular mechanisms of erythrocyte programmed cell death: impact on blood transfusion. *Vox Sang* 2002; **83**: 307–310.
- [7] BRATOSIN D, ESTAQUIER J, SLOMIANY C, TISSIER JP, QUATANNENS B, BULAI T, MITROFAN L, MARINESCU A, TRANDABURU I, AMEISEN JC, MONTREUIL J. On the evolution of erythrocyte programmed cell death: apoptosis of *Rana esculenta* nucleated red blood cells involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Biochimie* 2004; **86**: 183–192.
- [8] BRATOSIN D, ESTAQUIER J, PETIT F, ARNOULT D, QUATANNENS B, TISSIER JP, SLOMIANNY C, SARTIAUX C, ALONSO C, HUART JJ, MONTREUIL J, AMEISEN JC. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 1143–1156.
- [9] CECATELLI S, TAMM C, SLEEPER E, ORRENIUS S. Neural stem cells and cell death. *Toxicology Letters* 2004; **149**: 59–66.
- [10] CHEN M, HE H, ZHAN S, KRAJEWSKI S, REED JC, GOTTLIEB RA. Bid is cleaved by calpain to an active fragment *in vitro* and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* 2001; **276**: 30724–30728.
- [11] CORASH L, SPIELBERG S, BARTSOCAS C, BOXER L, STEINHERZ R, SHEETZ M, EGAN M, SCHLESSELMAN J, SCHULMAN JD. Reduced chronic hemolysis during high-dose vitamin E administration in Mediterranean-type glucose-6-phosphate. *N Engl J Med* 1980; **303**: 416–420.
- [12] DALEKE D. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* 2003; **44**: 233–242.
- [13] DAUGAS E, CANDE C, KROEMER G. Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 1131–1133.
- [14] DĄBROWSKI Z. Fizjologia krwi. Wybrane zagadnienia. Wydaw. Nauk. PWN 1998.
- [15] DELAUNAY J. Molecular Basis of Red Cell Membrane Disorders. *Acta Haematol* 2002; **108**: 210–218.
- [16] DURANTON C, HUBER SM, LANG F. Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol* 2002; **539**: 847–855.
- [17] EASTMAN A. Survival factors, intracellular signal transduction, and the activation of endonuclease in apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1995; **6**: 45–52.
- [18] FADOK VA, VOELKER DR, CAMPBELL PA, COHEN JJ, BRATTON DL, HENSON PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; **148**: 2207–2216.
- [19] FADOK VA, BRATTON DL, FRASCH SC, WARNER ML, HENSON PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 1998; **5**: 551–562.
- [20] FADOK VA, BRATTON DL, HENSON PM. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 2001; **108**: 957–962.
- [21] FARGE E, DEVEAUX PF. Shape changes of giant liposomes induced by an asymmetric transmembrane distribution of phospholipids. *Biophys J* 1992; **61**: 347–357.
- [22] GAO G, DOU QP. N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem* 2000; **80**: 53–72.
- [23] GRĄDZKA I. Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Post Biochem* 2000; **46**: 2–16.
- [24] GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; **281**: 1309–1312.
- [25] GREGOLI PA, BONDURANT MC. Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythrocyte progenitors. *J Cell Physiol* 1999; **178**: 133–143.
- [26] GRIMSLEY C, RAVICHANDRAN KS. Cues for apoptotic cell engulfment: eat me, don't-eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol* 2003; **13**: 648–656.
- [27] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej poprzez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R. *Post Biochem* 1998; **44**: 8–21.

- [28] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Apoptoza i nowotwory. *Post Biol Kom* 2000; **27** supl: 9–44.
- [29] GULBINS E, JEKLE A, FERLINZ K, GRASSME H, LANG F. Physiology of apoptosis. *Am J Physiol* 2000; **279**: 605–615.
- [30] HAIMOVITZ-FRIEDMAN A, KAN CC, EHLEITER D, PERSAUND RS, MCLONGHLIN M, FUKS Z, KOLESNICK RN. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 1994; **180**: 525–535.
- [31] HAJNOCZKY G, DAVIES E, MADESH M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Comm* 2003; **304**: 445–454.
- [32] HOLCIK M. Do mature red blood cells die by apoptosis? *Trends Genet* 2002; **18**: 121.
- [33] HUBER SM, GAMPER N, LANG F. Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflugers Arch* 2001; **441**: 551–558.
- [34] KILIAŃSKA ZM, MIŚKIEWICZ A. Kaspazy kręgowców; ich rola w przebiegu apoptozy. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 129–152.
- [35] KISCHKEL FC, LAWRENCE DA, TINEL A, LEBLANC H, VIRMANI A, SCHOW P, GAZDAR A. Death receptor recruitment of endogenous caspase 10 and apoptosis initiation in the absence of caspase 8. *J Biol Chem* 2001; **276**: 466396–46646.
- [36] KLUCK RM, BOSSY-WETZEL E, GREEK DR, NEWMAYER DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; **275**: 1132–1136.
- [37] KOLESNICK RN, HAIMOVITZ-FRIEDMAN A, FUKS Z. The sphingomyelin signal transduction pathway mediates apoptosis for tumor necrosis factor, Fas, and ionizing radiation – Review. *Biochem Cell Biol* 1994; **72**: 471–474.
- [38] KRAMMER PH. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 1999; **71**: 163–210.
- [39] KUYPERS FA. Red cell membrane damage. *J Heart Valve Dis* 1998; **7**: 387–395.
- [40] KUYPERS FA, JONG DE. The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes. *Cell Mol Biol* 2004; **50**: 147–158.
- [41] LACHOWICZ A, RĘBAS E, ŻYLIŃSKA L, LACHOWICZ L. Różnorodne aspekty działania kinaz białkowych w apoptozie. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 111–122.
- [42] LACRONIQUE V, VARLET P, MAYEUX P, PORTENA, GISSEBRECHT S, KAHN A, LACOMBE c. Bcl-2 targeted overexpression into the erythroid lineage of transgenic mice delays but does not prevent the apoptosis of erythropoietin – deprived erythroid progenitors. *Blood* 1997; **90**: 3050–3056.
- [43] LANG F, BUSCH GL, RITTER M, VOLKL H, WALDEGGER S, GULBINS E, HAUSSINGER D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 1998; **78**: 247–306.
- [44] LANG KS, DURANTON C, POEHLMANN H, MYSSINA S, BAUER C, LANG F, WIEDER T, HUBER SM. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 2003; **10**: 249–256.
- [45] LANG KS, MYSSINA S, TANNEUR V, WIEDER T, HUBER SM, LANG F, DURANTON M. Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride. *Arch Pharmacol* 2003; **367**: 391–396.
- [46] LANG KS, ROLL B, MYSSINA S, SCHITTENHELM M, SCHEEL-WALTER HG, KANZ L, FRITZ J, LANG F, HUBER SM, WIEDER T. Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem* 2002; **12**: 365–372.
- [47] LANKIEWICZ S, MARC LC, TRUC BN, KROHN AJ, POPPE M, COLE GM, SAIDO TC, PREHN JH. Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 2000; **275**: 17064–17071.
- [48] LUBIN B, CHIU D, BASTACKY J, ROELOFSEN B, VAN DEENEN LL. Abnormalities in membrane phospholipids organization in sickled erythrocytes. *J Clin Invest* 1981; **67**: 1643–1649.
- [49] MACH-PASCUAL S, DARBELLAY R, PILOTTO PA, BERIS P. Investigation of microcytosis: a comprehensive approach. *Eur J Haematol* 1996; **57**: 54–61.
- [50] MANDAL D, MOITRA PK, SAHA S, BASU J. Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Letters* 2002; **513**: 184–188.
- [51] MAY J, MEYER CG, GROSSSTERLINDEN L, ADEMOWO OG, MOCKENHAUPT FP, OLUMESE PE, FALUSI AG, LUZZATTO L, BIENZLE U. Red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase status and pyruvate kinase activity in a Nigerian population. *Trop Med Int Health* 2000; **5**: 119–123.
- [52] McCONKEY DJ, ORRENIUS S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J Leukocyte Biol* 1996; **59**: 775–783.

- [53] MICHEA L, FERGUSON DR, PETERS EM, ANDREWS PM, KIRBY MR, BURG MB. Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *Am J Physiol* 2000; **278**: 209–218.
- [54] MYSSINA S, LANG PA, KEMPE DS, KAISER S, HUBER SM, WIEDER T, LANG F. Cl⁻ channel blockers NPPB and niflumic acid blunt Ca²⁺-induced erythrocyte “apoptosis”. *Cell Physiol Biochem* 2004; **14**: 241–248.
- [55] NAKAGAWA T, YUAN J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 2000; **150**: 887–894.
- [56] NICHOLSON DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptosis cell death. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 1028–1042.
- [57] NOWAK JZ, ZAWILSKA JB. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. Wydaw. Nauk. PWN, Warszawa 2004.
- [58] OJEDA F, DIEHL HA, FOLCH H. Radiation induced membrane changes and programmed cell death: possible interrelationships. *Scanning Microsc* 1994; **8**: 645–651.
- [59] PERRIN BJ, HUTTENLOCHER A. Calpain. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; **34**: 722–725.
- [60] PUSHKAREVA M, OBEID LM, HANNUN YA. Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression. *Immunol Today* 1995; **16**: 294–297.
- [61] SAKAMOTO MK, MIMA S, TAKAHUSHI KP, TANIMURA T. Apoptotic cell death of erythrocytes in *Xenopus* larvae exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Pathol* 1997; **25**: 398–402.
- [62] SALVESEN GS, RENATUS M. Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev Cell* 2002; **2**: 256–257.
- [63] SCHLEGEL RA, MCEVOY AL, WILIAMSON P. Membrane phospholipids asymmetry and the adherence of loaded red blood cells. *Bibl Haematol* 1985; **51**: 150–156.
- [64] SCHMITZ I, KIRCHHOFF S, KRAMMER PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; **32**: 1123–1136.
- [65] SEKIZAWA A, SAMURA O, ZHEN DK, FALCO V, FARINA A, BIANCHI DW. Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat Diagn* 2000; **20**: 886–889.
- [66] SHIRAIISHI K, NAITO K, YOSHIDA K. Inhibition of calpain but not caspase protects the testis against injury after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod* 2000; **63**: 1538–1548.
- [67] SIKORA E. Mechanizmy śmierci programowanej komórek (apoptozy). *Post Bioch* 1994; **40**: 150–160.
- [68] STENNICKIE HR, JURGENSMEIER JM, SHIN H, DEVERAUX Q, WOLF BB, YANG X, ZHOU Q. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* 1998; **273**: 27084–27090.
- [69] STENNICKIE HR, SALVESEN GS. Caspases – controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1477**: 299–306.
- [70] SULEJCZAK D. Apoptoza i metody jej identyfikacji. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 527–568.
- [71] WALI RK, JAFFE S, KUMAR N, SORGENTE N, KALRA VK. Increased adherence of oxidant treated human and bovine erythrocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 1987; **133**: 25–36.
- [72] WALSH M, LUTZ RJ, COTTER TG, O’CONNOR R. Erythrocyte survival is promoted by plasma and suppressed by a Bak-derived BH3 peptide that interacts with membrane-associated Bcl-X_L. *Blood* 2002; **99**: 3439–3448.
- [73] WANG KKW. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 2000; **23**: 20–26.
- [74] WEIL M, JACOBSON MD, RAFF CM. Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Soem and chicken erythrocytes. *J Cell Biol* 1998; **10**: 369–377.
- [75] YAMAMOTO AM, ZAITSU M, ISHII E, YATSUKI H, MIZUTANI S, EGUCHI M, IHARA K, OKAMURA T, HARA T, MIYAZAKI S. High frequency of fusion transcripts of exon 11 and exon 4/5 in AF-4 gene is observed in cord blood, as well as leukemic cells from infant leukemia patients with t(4;11)(q21;q23). *Leukemia* 1998; **12**: 1467–1472.
- [76] YANG XY, QU Q, YANG TY, CHAN WC, CHU JX, CHEN Z, NING AL, LIU FJ, LIN ZX, ZHOU YL. Treatment of the thalassemia syndrome with splenectomy. *Hemoglobin* 1988; **12**: 601–608.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 07.01.2005 r.

Przyjęto: 04.04.2005 r.

90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16,

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

KOMÓRKI MACIERZyste KRWI PĘPOWINOWEJ

STEM CELLS OF CORD BLOOD

Magdalena STOLAREK, Andrzej MYŚLIWSKI

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

Streszczenie: Krew pępowinowa jest alternatywnym źródłem krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM), w stosunku do szpiku kostnego i krwi obwodowej. Zaletą krwi pępowinowej (KP) jako źródła KKM jest to, że jest ona względnie łatwo dostępna, a ponadto jej KKM mają większy potencjał proliferacyjny i po przeszczepieniu wywołują reakcję GvH mniej nasiloną niż KKM ze szpiku kostnego i krwi obwodowej. Natomiast wadą jest niewielka ilość KP uzyskiwana jednorazowo, a więc i liczba KKM. W praktyce służyć może jedynie do przeszczepów allogenicnych, chociaż propagowane jest, głównie ze względów komercyjnych, bankowanie KP dla ewentualnych przyszłych przeszczepów autologicznych. Jednak nie ma dowodów, że przechowywane przez wiele lat KKM będą równie wartościowe jak świeżo uzyskane. Wiele doniesień wskazuje na to, że KP może być źródłem innych komórek macierzystych niż krwiotwórcze, a mianowicie: neurogennych, kardiomiogennych, mezenchymatycznych, hepatogennych i prekursorowych dla wysp trzustkowych. Jednak publikowane wyniki tych badań nie dla wszystkich są przekonujące.

Słowa kluczowe: krew pępowinowa, krwiotwórcze komórki macierzyste, przeszczep.

Summary: Cord blood is alternative source of the haematopoietic stem cells (HSC) in relation to bone marrow and peripheral blood. Advantage of the cord blood (CB) is its relative accessibility as a source of HSC. HSC of CB present bigger proliferative potential than HSC of bone marrow and peripheral blood. Moreover they evoke weaker GvH reaction. The disadvantage of CB is its small amount obtainable once for all. It can be applied to allogenic transplantation only, although, the banking of CB is becoming popular as a source of HSC for future autologous transplantation. However, it is not proved that HSC after many years of banking will be as good for transplantation as freshly obtained. Quite a number of publications suggest that CB can be a source of stem cells other than haematopoietic, such as: neurogenic, cardiomyogenic, mezenchymal, hepatogenic and precursors of Langerhans islets of pancreas. Yet, not all accept the results of those investigations.

Key words: cord blood, haematopoietic stem cells, transplantation.

WSTĘP

Głównym problemem związanym z przeszczepami szpiku kostnego jest znalezienie zgodnego dawcy. Mimo że międzynarodowe rejestry liczą już ponad 9 mln dawców szpiku, wciąż nie udaje się znaleźć odpowiedniego materiału przeszczepowego dla około 40% ludzi chorych. Krew pępowinowa stanowi dodatkowe alternatywne źródło krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM), które mogą zostać wykorzystane w czasie przeszczepów zarówno allogenicznych, jak i autologicznych zwiększając tym samym pulę potencjalnych dawców i zmniejszyć poziom śmiertelności wśród oczekujących na przeszczep. Po raz pierwszy zostało to potwierdzone po transplantacji komórek krwi pępowinowej dziecku cierpiącemu na ciężką niedokrwistość (anemię Fanconiego) w roku 1988 [22]. W 1993 roku przeprowadzono pierwszą transplantację niespokrewnionemu biorcy krwi pępowinowej wcześniej zbankowanej i zamrożonej [56]. W 1996 roku Wagner i wsp. [66] przedstawili dowody na to, że zamrożona porcja krwi pępowinowej zawiera liczbę komórek macierzystych wystarczającą do repopulacji szpiku biorcy-dziecka przy niższym ryzyku odrzutu przeszczepu w porównaniu z przeszczepami szpiku kostnego. Od tamtej pory zgromadzono już ponad 130 tysięcy porcji komórek macierzystych krwi pępowinowej i przeprowadzono ponad 3500 przeszczepów w terapii chorób nowotworowych, zaburzeń hematologicznych i chorób dziedzicznych [21,23,24]. Wadą krwi pępowinowej jako źródła KKM jest to, że liczba tych komórek uzyskiwana z jednej porcji krwi pępowinowej jest mniejsza niż liczba analogicznych komórek uzyskiwana ze szpiku kostnego czy mobilizowanej krwi obwodowej, w związku z tym największe zastosowanie krew pępowinowa ma do przeszczepów u dzieci. Aczkolwiek, wykonuje się już zabiegi przeszczepiania kilku porcji krwi pępowinowej jednemu dorosłemu dawcy [3,47], ponieważ liczba przeszczepianych komórek jednej porcji bywa poważnym ograniczeniem [42,67]. Na świecie przeprowadzono już bardzo wiele zabiegów przeszczepiania komórek macierzystych krwi pępowinowej biorcom dorosłym cierpiącym na choroby nowotworowe [43,55] i ciężkie zaburzenia hematologiczne. Dowiedziono, że do powodzenia przeszczepu komórek macierzystych u ludzi dorosłych wystarcza nawet niewielka objętość krwi pępowinowej [42]. Wyniki tych badań sugerują, iż krew pępowinowa może być z powodzeniem wykorzystywana jako alternatywne źródło komórek do całkowitej odbudowy szpiku kostnego dorosłego biorcy niemającego całkowicie zgodnego dawcy [32]. Wyniki badań Rocha i wsp. [55] nie wykazały istotnych różnic w wartościach parametrów, takich jak: śmiertelność czy stopień niepowodzenia przeszczepu pomiędzy biorcami całkowicie zgodnego szpiku kostnego oraz niezgodnej krwi pępowinowej. Inne doświadczenia potwierdziły jednak wyższość szpiku kostnego o 100% zgodności nad innymi źródłami komórek do przeszczepu [43].

Badania pokazują, że czas przeżycia bez nawrotu choroby jest porównywalny do tego uzyskiwanego po przeszczepie komórek macierzystych/prekursorowych ze szpiku kostnego oraz mobilizowanej krwi obwodowej. Przeszczepy komórek krwi pępowinowej są jednak związane z opóźnieniem efektu zasiedlania szpiku kostnego i odbudowy hematopoezy w porównaniu z komórkami ze szpiku kostnego [55]. Po przeszczepieniu

pacjentom krwi pępowinowej, gdy występowała najczęściej niezgodność pod względem dwóch lub więcej antygenów HLA, odnotowano niewielki odsetek ciężkiej postaci choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. *Graft versus Host Disease* – GVHD). Testy kliniczne wykazały, że skuteczny stosunek ilości komórek CD34⁺ krwi pępowinowej na kg ciała biorcy wynosi 1–3,7 x 10⁶/kg, co stanowi zaledwie dziesiątą część tej ilości potrzebnej do przeszczepu szpiku kostnego (10–41 x 10⁶/kg), co wskazuje na wysoki potencjał proliferacyjny tych komórek [9].

Krew pępowinowa jest bogatym źródłem krwiotwórczych komórek macierzystych, zawiera także więcej naiwnych limfocytów T niż szpik kostny, co zapobiega wystąpieniu ostrej reakcji GVHD. Możliwość uzyskania pełnej zgodności w przypadku krwi pępowinowej jest możliwa w przypadku przeszczepu autologicznego, a przy przeszczepie allogenicznym niezgodność 1–3 antygenów HLA jest tolerowana przez organizm biorcy. Przeszczepy komórek krwi pępowinowej nawet o częściowej niezgodności antygenów HLA są mniej alloreaktywne niż przeszczepy komórek macierzystych ludzi dorosłych [30].

Dodatkową zaletą stosowania krwi pępowinowej jako alternatywnego źródła KKM jest szybsza i nieinwazyjna procedura pozyskiwania, a przez to jednocześnie bezpieczna dla noworodka i dla matki. Ważne również jest minimalne ryzyko zakażenia wirusem CMV [54]. Jest to związane z tym, że <0,1% zdrowych noworodków jest zakażone tym wirusem, podczas gdy ochotnicy dorośli w 10–60% są nosicielami cytomegalowirusa [30]. Czas pozyskiwania i przygotowania do przeszczepu zgodnej porcji komórek macierzystych jest o wiele krótszy w przypadku krwi pępowinowej niż w przypadku szpiku kostnego, w którym wynosi co najmniej 4 miesiące. Tak wydłużony okres oczekiwania na komórki szpikowe do przeszczepu związany jest z długą procedurą znalezienia odpowiedniego dawcy oraz przygotowania go do zabiegu pobrania krwi szpikowej. Ponieważ krew pępowinowa jest mrożona i przechowywana w bankach, jest ona łatwo dostępna i czas ten ulega skróceniu do kilku tygodni. Jest to szczególnie ważne dla pacjentów cierpiących na ciężkie, niestabilne choroby. Ze względu na fakt starzenia się populacji komórek macierzystych, te wyizolowane z krwi pępowinowej zawierają wiele "młodych" komórek macierzystych o wyższym potencjale proliferacyjnym, dłuższych telomerach oraz zdolności do tworzenia większych kolonii *ex vivo* w porównaniu z analogiczną populacją pochodzenia szpikowego [21]. Dodatkową zaletą jest brak ograniczeń natury etycznej związanych z pobraniem krwi pępowinowej, co stanowi poważny problem w przypadku embrionalnych komórek macierzystych. Jednakże istnieje jednocześnie ryzyko, że przeszczepiane komórki będą naznaczone genetycznymi zmianami. Przeprowadzany przed pobraniem krwi pępowinowej wywiad rodzinny dotyczący chorób nowotworowych i dziedzicznych, jakie pojawiły się w rodzinie noworodka daje częściową pewność. Aczkolwiek wiele chorób, których zagrożenie niosą geny dziecka - dawcy, dopiero po latach może się ujawnić.

KRWIOTWÓRCZE KOMÓRKI MACIERZYSTE

Krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM) stanowią 5–10% leukocytów mobilizowanej krwi obwodowej [32] oraz następujący odsetek komórek jednojądrzastych: krwi pępowinowej – 0,1–0,5% i szpiku kostnego – 0,5–3%. Są to najprymitywniejsze prekursorzy komórek wszystkich linii hematopoezy zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* dają wzrost wszystkim liniom krwiotwórczym. Mają zdolność do somopowielania utrzymując tym samym stałą pulę komórek pluripotencjalnych począwszy od wczesnych faz rozwoju embrionalnego poprzez całe dorosłe życie osobnika.

Do identyfikacji i izolacji krwiotwórczych komórek macierzystych używane są markery powierzchniowe, tj. CD34, CD45, CD38, c-Kit. Antygen CD34 jest glikoproteiną eksponowaną na powierzchni KKM i komórek progenitorowych, chociaż zidentyfikowano niewielką populację komórek krwi pępowinowej o właściwościach komórek macierzystych i o fenotypie CD34⁻. Stwierdzono, że komórki o fenotypie Lin⁻CD34⁻ ludzkiej krwi pępowinowej i wykazujące jednocześnie koekspresję markera CD133 były zdolne odtworzyć hematopoezę u myszy NOD/SCID (ang. *nonobese diabetic/severe combined immunodeficient*). Aczkolwiek wydajność tego procesu była niższa w porównaniu z ich odpowiednikami o fenotypie CD34⁺ [18]. Ostatnie badania sugerują, że tak niska zdolność komórek CD34⁻ do repopulacji szpiku myszy z niedoborami immunologicznymi może być spowodowana tym, że komórki te nie docierają do szpiku po dożylniej iniekcji. Podanie komórek CD34⁻ krwi pępowinowej bezpośrednio do szpiku dało rezultat porównywalny do otrzymanego po przeszczepieniu komórek CD34⁺ [68].

W praktyce laboratoryjnej w celu określenia potencjału proliferacyjnego krwiotwórczych komórek zdeterminowanych liniowo stosuje się testy klonogenne (CFU-GM; CFU-GEMM; BFU-E) [34] i hodowlane (LTCIC) [70]. Dzięki zastosowaniu odpowiedniego koktajlu cytokin oraz ściśle zdefiniowanych pożywek można rutynowo prowadzić hodowle ludzkich erytroblastów, megakarioblastów oraz prekursorów linii granulocytowo-monocytarnej. Testy klonogenne umożliwiają ocenę potencjału proliferacyjnego wczesnych prekursorów krwiotworzenia na podstawie liczby i wielkości tworzonych przez te komórki kolonii. W porównaniu z komórkami macierzystymi ludzi dorosłych, KKM krwi pępowinowej tworzą większe kolonie *in vitro* oraz wymagają innych warunków hodowli [21]. Dodatkowo tego typu testy mają szerokie zastosowanie w klinice w czasie diagnozowania chorób hematologicznych. Ponadto liczbę komórek macierzystych ocenić można przy wykorzystaniu testów *in vivo* na podstawie szybkości i stopnia odtworzenia przez te komórki hematopoezy u myszy z niedoborami immunologicznymi, u których upośledzona jest funkcja podstawowych komórek układu immunologicznego: limfocytów B, T u myszy SCID oraz dodatkowo komórek NK u myszy NOD/SCID [30]. Wszczepione komórki krwi pępowinowej osiedlają się w szpiku zwierzęcia doświadczalnego i przejmują funkcje defektywnych mysich krwiotwórczych komórek macierzystych [29,68].

Najczęściej stosowaną metodą określania immunofenotypu komórek macierzystych/progenitorowych jest cytometryczna analiza obecności markerów, tj. CD34, CD45 na powierzchni komórek po wyznakowaniu ich odpowiednimi przeciwciałami sprzężonymi z fluorochromami.

Ze względu na wyjątkową rzadkość KKM metody ich izolacji muszą być niezwykle precyzyjne. Obecnie stosuje się rutynowo kilka metod pozwalających na identyfikację oraz selekcję komórek macierzystych/prekursorowych wszystkich linii hematopoezy [70].

Dwie z nich wymagają zastosowania specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko markerom obecnym na powierzchni docelowych komórek. W przypadku KKM i komórek prekursorowych są to receptory: CD34, CD45, CD117, c-Kit i inne. Przy pomocy cytometru sortującego izoluje się komórki wyznakowane przeciwciałami sprzężonymi z fluorochromami. Do izolowania wykorzystuje się także wartości parametru FSC (*forward scatter*), korelującego z wielkością komórek oraz SSC (*side scatter*), odzwierciedlającego ilość ziarnistości w badanych komórkach.

Metoda immunomagnetyczna MACS® wykorzystuje magnetycznie znakowane przeciwciała. Selekcja pozytywna pozwala na zatrzymanie docelowych, wyznakowanych komórek na kolumnie umieszczonej w polu magnetycznym. Pozyskuje się je poprzez wypłukanie buforem z kolumny usuniętej wcześniej z pola magnetycznego. W czasie selekcji negatywnej docelowa frakcja komórek niewyznakowanych eluuje z kolumny podczas przepłukiwania buforem.

Komórki uzyskane w wyniku izolacji metodą immunomagnetyczną dają większą liczbę kolonii w porównaniu z komórkami uzyskanymi przy pomocy cytometru sortującego [61].

Do izolowania wczesnych komórek krwiotwórczych wykorzystuje się również barwienie fluorochromami metabolicznymi, tj. Rodaminą 123 czy Hoechst 33342 [62]. Izolacja chemotaktyczna zaś wykorzystuje zdolność komórek prekursorowych poszczególnych linii ukierunkowanych do chemotaksji w kierunku chemoatraktantów (SDF-1; LIF, SF/MGF) regulujących ich migrację w czasie ontogenezy [41].

NEKRWIOTWÓRCZE KOMÓRKI MACIERZYSTE KRWI PĘPOWINOWEJ

Komórki macierzyste krwi pępowinowej o właściwościach neurogennych

Nadzieją terapii chorób neurodegeneracyjnych, urazów i udarów mózgu jest znalezienie łatwo dostępnego źródła nerwowych komórek macierzystych. Potomstwo takiej komórki mogłoby zastąpić uszkodzone neurony, astrocyty i oligodendrocyty w obszarze mózgu człowieka dotkniętym patologią. Zaobserwowano, że wszczepione myszom zaraz po urodzeniu nerwowe komórki macierzyste były zdolne różnicować się w komórki o funkcjach i budowie odpowiednich dla danego obszaru mózgu integrując się jednocześnie z komórkami gospodarza. Takie komórki mogą zostać wyposażone w transgeniczny gen mogący naprawić defekt genetyczny oraz poprawić funkcjonowanie mózgu [16]. Ostatnie badania pokazały także, że komórki wyizolowane ze szpiku dorosłego człowieka mogą wykazywać ekspresję markerów komórek tkanki nerwowej

[57]. Podobne komórki po podaniu dożylnym mają potencjał migrowania i akumulacji w mózgu szczura, gdzie część z nich wykazuje ekspresję markerów komórek nerwowych i glejowych [5,8].

Obecnie prowadzone są na szeroką skalę badania mające na celu zidentyfikowanie komórek macierzystych tkanki nerwowej we krwi pępowinowej. Otrzymane w specyficznych warunkach *in vitro* oraz *in vivo* komórki układu nerwowego stanowiłyby środek terapeutyczny do regeneracji upośledzonych funkcji tego układu.

Dane literaturowe dowodzą, że pierwsze takie próby powiodły się. Po hodowli komórek macierzystych z krwi pępowinowej w obecności czynnika wzrostu nerwów (ang. *nerve growth factor* – NGF) i kwasu retinowego (ang. *retinoic acid* – RA) wykazano wzrost ekspresji markerów specyficznych dla neuronów i komórek gleju oraz spadek ekspresji genów związanych z krwiotworzeniem [58]. Badania Bużyńskiej i wsp. [6] dowiodły po raz pierwszy, że komórki wszystkich trzech typów (astrocyty, neurony, oligodendrocyty) obecne w ludzkim mózgu można uzyskać *in vitro* z prekursorów otrzymanych z krwi pępowinowej. Komórki CD34⁺CD45⁺ krwi pępowinowej w obecności epidermalnego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor* – EGF) wykazywały ekspresję nestyny, markera prekursorów komórek układu nerwowego [46]. Nestynopoztywne klony wysiane na podłożu z RA i neurotropowym czynnikiem BDNF (ang. *brain-derived neurotrophic factor*) nabierały cech fenotypowych oraz morfologicznych komórek nerwowych. Efekt ten był zwielokrotniony po wysianiu ich na hodowlę szczurzego mózgu. Stwierdzono także bipotencjalność tych prekursorów. Komórki należące do tego samego klonu miały markery dwóch subpopulacji: neuronów i astrocytów oraz neuronów i oligodendrocytów. Podobne wyniki uzyskano hodując w obecności czynnika wzrostu fibroblastów bFGF (ang. *basic fibroblast growth factor*) i hEGF multipotentjalne komórki krwi pępowinowej CD45⁻, niemające potencjału krwiotworzenia. Ekspresja markerów na powierzchni tych komórek potwierdziła bipotencjalność prekursorów, które miały wspólny fenotyp komórek glejowych i neuronów [4]. Podobną koekspresję markerów stwierdzono po hodowli ludzkich, nieukierunkowanych, somatycznych komórek macierzystych krwi pępowinowej, tzw. populacji USSC (ang. *Unrestricted Somatic Stem Cells*) o fenotypie CD45⁻HLAII⁻ [38]. Hodowla *in vitro* tych komórek nie dała pełnofunkcjonalnych neuronów, aczkolwiek wykazano ekspresję specyficznych markerów. Prawdopodobnie przyczyną tego była niedoskonała mimikra mikrośrodowiska hodowli do warunków panujących *in vivo*. Przeszczepione komórki USSC do mózgu dorosłego szczura wykazywały wysoki potencjał migracyjny, ponadto w niektórych rejonach mózgu znaleziono ludzkie komórki o prawidłowej i dojrzałej morfologii komórek neuronopodobnych [38]. Inne badania dowiodły, że jednojądrzaste komórki krwi pępowinowej człowieka po przeszczepieniu do rozwijającego się mózgu szczura wykazywały 20% przeżycie bez immunosupresji. Przynajmniej niektóre z nich nabywały fenotypu komórek glejowych lub neuronów po ekspozycji na działanie sygnałów od dojrzewającej tkanki mózgowej szczura [71]. Dożylnie podane szczurom komórki krwi pępowinowej osiedlały się w okolicy mózgu dotkniętej udarem, a dokładniejsze badania pokazały, że niektóre ze wszczepionych komórek wykazywały ekspresję markerów astrocytowych i neuronowych oraz były zaangażowane w odbudowę uszkodzonej tkanki. W warunkach *in vitro* komórki te

wykazywały powinowactwo do uszkodzonej tkanki mózgowej, podczas gdy nie obserwowano tego w przypadku zdrowej tkanki [7]. Wielu z przytoczonych tutaj badaczy zanotowało regenerację uszkodzonej tkanki mózgowej po podaniu zwierzętom komórek macierzystych krwi pępowinowej. Taguchi i wsp. [63] proponują hipotetyczne wyjaśnienie procesów za to odpowiedzialnych. Po podaniu komórek macierzystych ludzkiej krwi pępowinowej zanotowano wzrost intensywności procesów angiogenezy, neurogenezy, regeneracji morfologicznej i funkcjonalnej mózgu szczura po udarze. Takie same obserwacje zanotowano również w czasie innych doświadczeń [7,59]. Ciągłe zagadkowa była mała liczba wszczepionych komórek przy znacznej regeneracji funkcji mózgu zwierzęcia doświadczalnego. Taguchi i wsp. [63] pokazali, że komórki CD34⁺ mają wprawdzie niski potencjał inkorporacji do tkanki mózgowej szczura, lecz prawdopodobnie stymulują odtworzenie unaczynienia zniszczonego obszaru oraz znoszą efekt supresji neurogenezy. Neurogeneza była stymulowana przez procesy neowaskularyzacji obszaru kory mózgowej szczura i zachodziła dzięki migracji neuroblastów, które w miejscu uszkodzenia dojrzywały i były odpowiedzialne za odtworzenie funkcji mózgu. Badania na mysim modelu choroby Parkinsona dowiodły, że wszczepione komórki krwi pępowinowej istotnie opóźniły pojawienie się objawów choroby oraz śmierć zwierzęcia [13].

We krwi pępowinowej zidentyfikowano również populację pozytywną pod względem obecności markerów mezenchymalnych komórek macierzystych o immunofenotypie SH2⁺CD13⁺CD29⁺ASMA⁺, która pod wpływem odpowiednich czynników neurogennych gwałtownie różnicowała się w wielopolarne neurony [35]. Inna grupa badaczy na zasadzie negatywnej selekcji immunomagnetycznej wyizolowała z krwi pępowinowej komórki Lin⁻, stanowiące prawdopodobnie prymitywną populację komórek macierzystych, która ma potencjał różnicowania się zarówno w komórki krwi, jak i komórki tkanki nerwowej. Zaobserwowano wczesną transdiferencjację tych komórek do prekursorów neurogleju. Rozwijające się komórki wydzielają do podłoża endogenne czynniki neuropoezy, tj. TGFβ1, GDNF – neurotropowy czynnik produkowany przez komórki glejowe, (ang. *glial cell line-derived neurotrophic factor*) czy NGF stymulujące dalsze etapy różnicowania [49].

Wydaje się, że rzeczywście krew pępowinowa może być źródłem komórek macierzystych o właściwościach neurogennych. Niestety dotychczasowych wyników nie można traktować jako ostatecznych dowodów, ponieważ dotyczą one populacji o zbyt odmiennych fenotypach, hodowanych w różnych warunkach.

Komórki mezenchymalne krwi pępowinowej

Od dawna wiadomo, że krew pępowinowa zawiera krwiotwórcze komórki macierzyste [22], natomiast wciąż kontrowersyjną kwestią pozostaje obecność mezenchymalnych komórek macierzystych (MKM), które miałyby potencjał różnicowania się w komórki kości, chrząstki, tkanki tłuszczowej czy mięśniowej. Chociaż Friedenstein i wsp. [17] już w 1970 roku opisali obecność komórek o takim potencjale oraz pokazali, że długoterminowa hodowla komórek szpikowych sprzyjała powstawaniu komórek zrębu (CFU-F), to stosunkowo niedawno skojarzono te komórki z funkcją

multipotencjalnych komórek, nazwanych mezenchymatycznymi komórkami macierzystymi i stwierdzono, że są one zdolne do różnicowania się w komórki kości, chrząstki, mięśni, śródbłonna i tkanki tłuszczowej [53]. Procedura ich pozyskania jest jednak bardzo niekorzystna dla dawcy, dodatkowo udowodniono, że ich liczba i potencjał różnicowania spadają wraz z wiekiem [12]. Dlatego właśnie we krwi pępowinowej jest pokładana nadzieja na pozyskanie alternatywnego źródła komórek o aktywności MKM, o większym potencjale proliferacyjnym, o dłuższych telomerach oraz mniejszych wymaganiach co do warunków hodowli [51]. Przy tym w literaturze znaleźć można prace o wręcz przeciwnych wynikach, co wskazuje jak trudne zadanie stoi przed badaczami.

Mareschi i wsp. [48] wykazali, że możliwe jest otrzymanie MKM z adherentnych komórek szpikowych, podczas gdy dla krwi pępowinowej w takich samych warunkach hodowli procedura ta nie powiodła się. Poza tym w przeciwieństwie do wyników badań Gutierrez i wsp. [26], którzy pokazali co najmniej 60-procentowy udział komórek dendrytycznych CD1a⁺ w warstwie przylegającej, to zespół Mareschi [48] nie znalazł dowodów na istnienie tej populacji. Różnica ta prawdopodobnie wynika z warunków hodowli jednojądrzastych komórek krwi pępowinowej. Wyniki badań Erices i wsp. [14] pokazują zaś, że jednojądrzaste komórki krwi pępowinowej zawierają mezenchymalne prekursorzy o morfologii podobnej do fibroblastów oraz ekspresji specyficznych antygenów. Ponadto obecność komórek wielojądrzastych wykazujących aktywność fosfatazy TRAP (ang. *tetrates-resistant acid phosphatase*) we frakcji przylegającej, sugeruje spontaniczną dyferencjację monocytów w osteoklasty. Również spośród homogennej przylegającej frakcji jednojądrzastych komórek z zamrożonej krwi pępowinowej otrzymano populację o profilu ekspresji genów oraz fenotypie mezenchymalnych komórek macierzystych. Miały one potencjał formowania komórek tkanki kostnej, chrzęstnej i tłuszczowej [44]. Szeroki potencjał adherentnych komórek krwi pępowinowej potwierdziły badania Ganga i wsp. [20], gdzie pod wpływem określonych warunków komórki te dały osteoblasty, chondrocyty, adipocyty oraz mioblasty mięśni szkieletowych. Do przeciwnych wniosków doszedł zespół Wexlera [69], który spośród jednojądrzastych komórek krwi pępowinowej nie zidentyfikował mezenchymalnych komórek macierzystych. Frakcja komórek krwi pępowinowej w odróżnieniu od populacji szpikowej nie dawała homogennej przylegającej frakcji, nie poddawała się pasażom oraz nie różnicowała się w komórki linii mezenchymalnej.

W swojej pracy Goodwin i wsp. [25] stwierdzili, że komórki krwi pępowinowej mają wysoki potencjał różnicowania, przy czym potomne komórki były pozytywne pod względem markerów komórek kości, tkanki tłuszczowej i nerwowej (pochodzenia ektodermalnego). Poza tym wydaje się, że komórki macierzyste krwi pępowinowej są bardziej prymitywną populacją w porównaniu z analogiczną populacją szpiku kostnego. Lee i wsp. [45] opracowali metodę izolacji MKM z krwi pępowinowej niewykazujących ekspresji markerów dojrzałych komórek, ale mających markery mezenchymalnych komórek macierzystych. W odpowiednich warunkach różnicowały się one w komórki tkanki tłuszczowej, kostnej i chrzęstnej. Dodatkowo te izolowane komórki różnicowały się w komórki o fenotypie neurogleju i hepatocytów. Wyniki tych badań dowiodły, że

MKM mogą być czymś więcej niż tylko mezenchymalnymi prekursorami, gdyż mogą różnicować się w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych. W związku z powyższym sugeruje się zmianę nomenklatury na „niekrwiotwórcze prekursorzy” w odniesieniu do komórek krwi pępowinowej o wieloliniowym potencjale [25].

W literaturze znajdują się także prace opisujące subpopulacje CD34⁺ lub/i CD45⁻ krwi pępowinowej bogate w mezenchymalne komórki macierzyste. Hodowla ludzkich komórek krwi pępowinowej o fenotypie CD34⁺CD45⁻Lin⁻ z komórkami mysich zawiązków kończyn stwarza odpowiednie warunki dla różnicowania się i dojrzewania ludzkich chondrocytów. Ta subpopulacja ma wprawdzie również potencjał krwiotwórczej komórki macierzystej, jednak wydaje się, że nie jest to jej dominująca ścieżka rozwojowa. Lokalizacja komórki we krwi pępowinowej nie musi determinować jej losu jako krwiotwórczej komórki macierzystej. Zdolność do różnicowania się w chondrocyty prawdopodobnie nie jest także ich funkcją fizjologiczną, a tylko zjawiskiem odnotowanym *ex vivo* [33]. Immunohistochemiczne badania na myszach z dystrofią mięśni po wszczepieniu im komórek CD34^{+/}-Lin⁻ ludzkiej krwi pępowinowej dowiodły, że krew pępowinowa może być źródłem prekursorów włókien mięśni szkieletowych produkujących ludzką dystrofinę, nawet 12 tygodni po przeszczepie [39]. Obecność komórek o podobnym potencjale we krwi pępowinowej stwierdzono także w innej pracy, gdzie warstwa przylegających komórek krwi pępowinowej nabierała fenotypu MKM, by w wyniku odpowiedniej stymulacji różnicować się wzdłuż ścieżki miogenezy [19]. Wspomniana wcześniej populacja komórek krwi pępowinowej USSC ma potencjał tworzenia klonów prekursorów linii dwóch listków zarodkowych: mezodermy oraz ektodermy [38]. Na podstawie analizy ekspresji genów, immunofenotypu oraz morfologii stwierdzono różnicowanie się komórek USSC w komórki hematopoezy, osteoblastów, chondroblastów, adipocytów, komórek tkanki nerwowej. Różnicowanie się *in vivo* komórek USSC potwierdziły wyniki badań wykonanych w warunkach *in vitro*. Populacja USSC [38] ma znacznie szerszy potencjał niż mezenchymalne komórki macierzyste ze szpiku kostnego, różnią je także cechy fenotypowe i molekularne [10]. Ludzkie komórki USSC wykazywały potencjał migracyjny w stronę ścian przedsionków, komór i przegrody serca oraz systemu włókien Purkiniego po przeszczepieniu *in utero* do serca owcy. Zarówno komórki gospodarza-owcy, jak i przeszczepione – ludzkie wykazywały prawidłową lokalizację dystrofiny i były nierozróżnialne. Wszczepione ludzkie komórki miały cechy normalnego kardiomiocyty i mogły prawdopodobnie również normalnie funkcjonować [38]. W przypadku MKM ze szpiku kostnego obserwowano wyłącznie dojrzewanie ludzkich komórek Purkiniego w sercu owcy [1]. Znaczyć to może, że komórki USSC są mniej zróżnicowane niż MKM, prawdopodobnie będąc jednocześnie prekursorami MKM. Jeśli wyniki te się potwierdzą, to populacja ta w przyszłości może stać się uniwersalnym źródłem komórek do przeszczepów komórkowych [38]. Podobne badania przeprowadzono na szczurach, u których wywołano sztucznie zawał mięśnia sercowego. Przeszczepione komórki CD34⁺ lokalizowały się w śródserdzu powodując zwiększenie wydajności pracy serca [28].

Badania *in vitro* na komórkach krwi pępowinowej dowiodły również ich wysokiego potencjału do formowania tkanki mięśniowej serca charakteryzującej się prawidłowymi właściwościami mechanicznymi [36].

Wszystkie te prace nie przedstawiły jednak wiarygodnych dowodów na obecność MKM we krwi pępowinowej, ponieważ scharakteryzowały one relatywnie odmienne populacje. Podobnie jak w przypadku linii endodermalnych potrzeba jeszcze wielu dodatkowych badań.

Komórki macierzyste krwi pępowinowej zdolne do różnicowania się w hepatocyty i komórki trzustki

Istnieją już literaturowe doniesienia stwierdzające obecność w szpiku kostnym i krwi obwodowej komórek macierzystych biorących udział w procesie regeneracji wątroby i trzustki [2,27,40]. Jednocześnie Wagers i wsp. [65] pokazali, że hematopoetyczne komórki macierzyste nie mają potencjału różnicowania się wzdłuż niekrwiotwórczych szlaków.

W związku z wciąż rosnącym znaczeniem przeszczepów komórkowych w „terapii regeneracyjnej” różnych tkanek i organów, poszukuje się nowych źródeł komórek macierzystych do tego celu. Wyniki badań Pessina i wsp. [51] po raz pierwszy dają dowód tego, że krew pępowinowa podobnie jak szpik kostny [27] zawiera populację o fenotypie oraz panelu markerów charakterystycznych dla prekursorów komórek β trzustki. Hodowla komórek krwi pępowinowej prowadzona była bez udziału jakichkolwiek cytokin i czynników wzrostowych. Komórki krwi pępowinowej wykazujące ekspresję nestyny oprócz tego, że mogą formować neurony, astrocyty i oligodendrocyty [6], mogą także regenerować hematopoezę u myszy po radioterapii [59] oraz prawdopodobnie są również prekursorami komórek wysp trzustkowych (Langerhansa) wydzielających insulinę [51].

Na modelu myszy z niedoborem odporności NOD/SCID (ang. *nonobese diabetic/severe combined immunodeficient*) pokazano, że krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM) krwi pępowinowej $CD34^+CD133^+c\text{-Kit}^+$ mogą migrować do wątroby i formować hepatocyty. Porównywalne wyniki otrzymano zarówno w przypadku obecności, jak i braku uszkodzenia wątroby zwierzęcia - gospodarza. Stwierdzono istotny spadek śmiertelności u myszy z uszkodzoną wątrobą. Na podstawie swoich wyników badacze doszli do wniosku, że ludzkie KKM krwi pępowinowej mają potencjał transdyferencji do hepatocytów, pomimo obserwowanych jakościowych i ilościowych różnic pomiędzy osobnikami [11]. Badania Tanabe i wsp. [64] dały podobne wyniki. Po przeszczepie do wątroby myszy z niedoborem NOD/SCID komórki $CD34^+$ krwi pępowinowej różnicowały się w albuminododatnie hepatocyty. Chociaż odnotowana częstość chimeryzmu była dosyć wysoka (75%), to stwierdzono, że również transdyferencjacja rzeczywiście zaszła. Transplantacja ludzkich komórek USSC o fenotypie $CD45\text{-HLAII}^-$ dała zaś bardzo małą liczbę fuzji w czasie integracji do owczej wątroby. Odróżnicowanie się do hepatocytów potwierdzał poziom ludzkiej albuminy w surowicy zwierzęcia [38]. Niską częstość występowania dojrzałych hepatocytów pochodzących od komórek macierzystych z krwi pępowinowej człowieka w mysiej wątrobie, niektórzy autorzy tłumaczą ksenogenicznym charakterem przeszczepu [37].

Również w warunkach *in vitro* udało się otrzymać populację komórek o fenotypie i funkcjach hepatocytów. Hodowla była prowadzona w pożywce z czynnikami wzrostu hepatocytów [37]. Podczas gdy komórki CD34⁺ krwi pępowinowej są uważane za prekursory mogące się różnicować w hepatocyty [11,64], to Kakinuma i wsp. odnotowali negatywny efekt transplantacji wyłącznie komórek CD34⁺. Zaobserwowano, że interakcje pomiędzy populacjami: CD34⁺ i CD34⁻ odgrywają kluczową rolę w procesie różnicowania się i dojrzewania hepatocytów [37].

Problem plastyczności nieembryonalnych komórek macierzystych wciąż budzi wiele kontrowersji. Część badaczy [41] uważa, że owa plastyczność stanowi wyłącznie artefakt związany z występowaniem heterogennej populacji komórek macierzystych o różnym potencjale różnicowania. Obecność antygeny CD34⁺ nie musi oznaczać, że mamy do czynienia z krwiotwórczą komórką macierzystą zarówno w odniesieniu do komórek szpikowych, jak i tych wyizolowanych z krwi obwodowej czy pępowinowej [31]. W związku z tym wyniki takich badań należy traktować ostrożnie, biorąc pod uwagę powyższe fakty.

BANKI KOMÓREK MACIERZYSTYCH KRWI PĘPOWINOWEJ

Od momentu, gdy odniesiono sukcesy w dziedzinie przeszczepiania komórek macierzystych krwi pępowinowej wcześniej zamrożonej i gdy okazało się, że te komórki po rozmrożeniu zachowują swój potencjał proliferacyjny oraz zdolność odtworzenia hematopoety [56], zbankowano już ponad 130 tysięcy porcji krwi pępowinowej na całym świecie [15].

W Polsce działa już wiele banków krwi pępowinowej. Pacjenci mają prawo wyboru pomiędzy bankiem komercyjnym a bankiem publicznym. Banki publiczne gromadzą porcje krwi pępowinowej dokładnie sklasyfikowane pod względem antygenów HLA do użytku dla przeszczepów allogenicznych. Bank publiczny ponosi wszystkie koszty związane z pobraniem, przebadaniem oraz zamrożeniem komórek macierzystych. Taka porcja krwi trafia do ogólnodostępnego rejestru dawców komórek macierzystych i może zostać wykorzystana przez dowolnego biorcę, który będzie miał odpowiedni stopień zgodności antygenów HLA. Ofertą banków komercyjnych jest zaś pobranie i zbankowanie krwi pępowinowej dla przeszczepu autologicznego lub allogenicznego członkom najbliższej rodziny dawcy. Komercyjne firmy starają się motywować rodziców do podjęcia decyzji o zachowaniu krwi pępowinowej swojego dziecka sugerując możliwość wykorzystania jej w czasie terapii chorób nowotworowych, hematologicznych czy dziedzicznych, jakie mogą dotknąć ich dziecko w przyszłości.

Europejski Komitet Zdrowia przy Radzie Europy [15] popiera bankowanie krwi pępowinowej w celu wykorzystania do transplantacji allogenicznych. Idea banków autologicznej krwi pępowinowej stanowi według opinii Francuskiego Komitetu Konsultacyjnego Do Spraw Etyki [15], wyłącznie merkantylny projekt wykorzystujący troskę rodziców o swoje dzieci, pozwalając wierzyć w nieograniczone lecznicze właściwości komórek macierzystych krwi pępowinowej. Narażanie na tak wysoki koszt

rodziców chcących zamrozić autologiczne komórki macierzyste krwi pępowinowej swojego dziecka zdaniem członków komisji jest nieetyczne, biorąc pod uwagę fakt znikomej przydatności terapeutycznej tych komórek wg obecnego stanu wiedzy. Prawdopodobieństwo użycia autologicznej krwi pępowinowej do przeszczepu zostało oszacowane na 1–20 tysięcy przez pierwsze 20 lat życia dawcy [15]. Do września 2004 roku przeprowadzono 71 zabiegów przeszczepiania komórek macierzystych z użyciem tych zamrożonych w bankach prywatnych [50]. Jednocześnie wzrastająca liczba banków komercyjnych powoduje, że spada liczba potencjalnych allogenicznych porcji krwi pępowinowej, które mogłyby zostać włączone do światowego rejestru [15]. Dodatkowo istnieje ryzyko zakończenia działalności lub bankructwo takiego prywatnego banku. W takich przypadkach, jeśli bank wcześniej nie podjął odpowiednich kroków, to zbankowane porcje krwi ulegną zniszczeniu. Ubezpieczenie powinno klientom gwarantować kontynuację przechowywania ich komórek macierzystych i przeniesienie do innego banku komercyjnego lub wypłatę odszkodowania [15].

Jednakże w sytuacji, gdy istnieje potencjalne ryzyko, że dziecko będzie potrzebowało komórek autologicznych lub rodzinę cechuje rzadki zestaw genów HLA, to rodzice powinni zdecydować się na zbankowanie krwi pępowinowej swojego dziecka w banku prywatnym. Innym argumentem jest wzrastająca wciąż liczba badań prowadzonych nad klinicznym zastosowaniem tych komórek w związku z tym wzrastające prawdopodobieństwo praktycznego ich użycia w terapii „regeneratywnej” w przyszłości. Krew pępowinowa ze względu na swoje właściwości stanowi bowiem lepsze źródło komórek macierzystych niż szpik kostny. Autologiczna, zbankowana krew pępowinowa daje większe szanse na wyleczenie chorób zdiagnozowanych później w ciągu życia [50].

PIŚMIENNICTWO

- [1] AIREY JA, ALMEIDA-PORADA G, COLLETTI EJ, PORADA CD, CHAMBERLAIN J, MOVSESIAN M, SUTKO JL, ZANJANI ED. Human mesenchymal stem cells from purkinje fibers in fetal sheep heart. *Circulation* 2004; **109**: 1401–1407.
- [2] ALISON MR, POULSOM R, JEFFERY R, DHILLON AP, QUAGLIA A, JACOB J, NOVELLI M, PRENTICE G, WILLIAMSON J, WRIGHT NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; **406**: 257.
- [3] BARKER JN, WEISDORF DJ, DEFOR TE, BLAZAR BR, MCGLAVE PB, MILLER JS, VERFAILLIE CM, WAGNER JE. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005; **105**: 1343–1347.
- [4] BICKNESE AR, GOODWIN HS, QUINN CO, HENDERSON VC, CHIEN SN, WALL DA. Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia. *Cell Transplant* 2002; **11**: 261–264.
- [5] BRAZELTON TR, ROSSI FM, KESHET GI, BLAU HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; **290**: 1775–1779.
- [6] BUŻAŃSKA L, MACHAJ EK, ZABŁOCKA B, POJDA Z, DOMAŃSKA-JANIK K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *J Cell Sci* 2002; **115**: 2131–2138.
- [7] CHEN J, SANBERG PR, LI Y, WANG L. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 2001; **32**: 2682–2688.
- [8] CHOPP M, ZHANG XH, LI Y, WANG L, CHEN J, LU D, LU M, ROSENBLUM M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 2000; **11**: 3001–3005.

- [9] COHEN Y, NAGLER A. Cord blood biology and transplantation. *Isr Med Assoc J* 2004; **6**: 39–46.
- [10] DEANS RJ, MOSELEY AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; **28**: 875–884.
- [11] DI CAMPLI C, PISCAGLIA AC, PIERELLI L, RUTELLA S, BONANNO G, ALISON MR, MARIOTTI A, VECCHIO FM, NESTOLA M, MONEGO G, MICHETTI F, MANCUSO S, POLA P, LEONE G, GASBARRINI G, GASBARRINI A. A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. *Digestive and Liver Disease* 2004; **36**: 603–613.
- [12] D'IPPOLITO G, SCHILLER PC, RICORDI C, ROOS BA, HOWARD GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *Bone Miner Res* 1999; **14**: 1115–1122.
- [13] ENDE N, CHEN R. Parkinson's disease mice and human umbilical cord blood. *J Med* 2002; **33**: 173–180.
- [14] ERICES A, CONGET P, MINGUELL JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; **109**: 235–242.
- [15] Ethical Aspects of Umbilical Cord Blood Banking. Opinion of The European Group on Ethics in Science and New Technologies to The European Commission. 16th March 2004.
- [16] FLAX JD, AURORA S, YANG C, SIMONIN C, WILLS AM, BILLINGHURST LL, JENDOUBI M, SIDMAN RL, WOLFE JH, KIM SU, SNYDER EY. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat Biotechnol* 1998; **16**: 1033–1034.
- [17] FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHJAN RK, LALYKINA KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; **3**: 393–403.
- [18] GALLACHER L, MURDOCH B, WU DM, KARANU FN, KEENEY M, BHATIA M. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 2000; **95**: 2813–2820.
- [19] GANG EJ, HONG SH, JEONG JA, HWANG SH, KIM SW, YANG IH, AHN C, HAN H, KIM H. *In vitro* mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **321**: 102–108.
- [20] GANG EJ, JEONG JA, HONG SH, HWANG SH, KIM SW, YANG IH, AHN C, HAN H, KIM H. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; **22**: 617–624.
- [21] GLUCKMAN E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2000; **28**: 1197–1205.
- [22] GLUCKMAN E, BROXMEYER HA, AUERBACH AD, FRIEDMAN HS. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; **321**: 1174–1178.
- [23] GLUCKMAN E, LOCATELLI F. Umbilical cord blood transplants. *Curr Opin Hematol* 2000; **7**: 353–357.
- [24] GLUCKMAN E, ROCHA V, CHEVRET S. Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Rev Clin Exp Hematol* 2001; **5**: 87–99.
- [25] GOODWIN HS, BICKNESE AR, CHIEN SN, BOGUCKI BD, QUINN CO, WALL DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; **7**: 581–588.
- [26] GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ M, REYES-MALDONADO E, MAYANI H. Characterization of the Adherent Cells Developed in Dexter-Type Long-Term Cultures from Human Umbilical Cord Blood. *Stem Cells* 2000; **18**: 46–52.
- [27] HESS D, LI L, MARTIN M, SAKANO S, HILL D, STRUTT B, THYSSEN S, GRAY DA, BHATIA M. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 2003; **21**: 763–770.
- [28] HIRATA Y, SATA M, MOTOMURA N, TAKANASHI M, SUEMATSU Y, ONO M, TAKAMOTO S. Human umbilical cord blood cells improve cardiac function after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **327**: 609–614.
- [29] HOGAN CJ, SHPALL EJ, KELLER G. Differential long-term and multilineage engraftment potential from subsfractions of human CD34+ cord blood cells transplanted into NOD/SCID mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 413–418.
- [30] HOWS JM. Status of umbilical cord blood transplantation in the year 2001. *J Clin Pathol* 2001; **54**: 428–434.
- [31] JANKOWSKI K, KUCIA M, WYSOCZYNSKI M, RECA R, ZHAO D, TRZYNA E, TRENT J, PEIPER S, ZEMBALA M, RATAJCZAK J, HOUGHTON P, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ. Both hepatocyte growth factor (HGF) and stromal-derived factor-1 regulate the metastatic behavior of human rhabdomyosarcoma cells, but only HGF enhances their resistance to radiochemotherapy. *Cancer Res* 2003; **63**: 7926–7935.

- [32] JANSEN J, HANKS S, THOMPSON JM, DUGAN MJ, AKARD LP. Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *J Cell Mol Med* 2005; **9**: 37–50.
- [33] JAY KE, ROULEAU A, UNDERHILL TM, BHATIA M. Identification of a novel population of human cord blood cells with hematopoietic and chondrocytic potential. *Cell Res* 2004; **14**: 268–282.
- [34] JĘDRZEJCZAK WW, URBANOWSKA E, ROKICKA M, KRÓL M, KRÓL M, TOROSJAN T, TOMASZEWSKA A, PALUSZEWSKA M, GRONKOWSKA A. Wstępna ocena możliwości wykorzystania krwiotwórczych komórek macierzystych pozyskanych z różnych dawców krwi pepowinowej do jednoczesnego przeszczepienia u biorców dorosłych. *Post Biol Kom* 2003; **30**; supl.21: 139–147.
- [35] JEONG JA, GANG EJ, HONG SH, HWANG SH, KIM SW, YANG IH, AHN C, HAN H, KIM H. Rapid neural differentiation of human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Neuroreport* 2004; **15**: 1731–1734.
- [36] KADNER A, HOERSTRUP SP, TRACY J, BREYMANN C, MAURUS CF, MELNITCHOUK S, KADNER G, ZUND G, TURINA M. Human umbilical cord cells: a new cell source for cardiovascular tissue engineering. *Ann Thorac Surg* 2002; **74**: 1422–1428.
- [37] KAKINUMA S, TANAKA Y, CHINZEI R, WATANABE M, SHIMIZU-SAITO K, HARA Y, TERAMOTO K, ARII S, SATO C, TAKASE K, YASUMIZU T, TERAOKA H. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 2003; **21**: 217–227.
- [38] KÖGLER G, SENSKEN S, AIREY JA, TRAPP T, MUSCHEN M, FELDHAHN N, LIEDTKE S, SORG RV, FISCHER J, ROSENBAUM C, GRESCHAT S, KNIPPER A, BENDER J, DEGISTRICI O, GAO J, CAPLAN AI, COLLETTI EJ, ALMEIDA-PORADA G, MULLER HW, ZANJANI E, WERNET P. A New Human Somatic Stem Cell from Placental Cord Blood with Intrinsic Pluripotent Differentiation Potential. *J Exp Med* 2004; **200**: 123–135.
- [39] KONG KY, REN J, KRAUS M, FINKLESTEIN SP, BROWN RH JR. Human umbilical cord blood cells differentiate into muscle in sjl muscular dystrophy mice. *Stem Cells* 2004; **22**: 981–993.
- [40] KORBLING M, KATZ RL, KHANNA A, RUIFROK AC, RONDON G, ALBITAR M, CHAMPLIN RE, ESTROV Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; **346**: 738–746.
- [41] KUCIA M, MAJKA M, RATAJCZAK MZ. Plastyczność nieembrionalnych komórek macierzystych: Fakt czy artefakt? *Post Biol Kom* 2003; **30**; supl.21: 139–147.
- [42] LAUGHLIN MJ, BARKER J, BAMBACH B, KOCON, RIZZIERIDA, WAGNER JE, GERSON SL, LAZARUS HM, CAIRO M, STEVENS CE, RUBINSTEIN P, KURTZBERG J. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med* 2001; **344**: 1815–1822.
- [43] LAUGHLIN MJ, EAPEN M, RUBINSTEIN P, WAGNER JE, ZHANG MJ, CHAMPLIN RE, STEVENS C, BARKER JN, GALE RP, LAZARUS HM, MARKS DI, VAN ROOD JJ, SCARADAVOU A, HOROWITZ MM. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2265–2275.
- [44] LEE MW, CHOI J, YANG MS, MOON YJ, PARK JS, KIM HC, KIM YJ. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **320**: 273–278.
- [45] LEE OK, KUO TK, CHEN WM, LEE KD, HSIEH SL, CHEN TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; **103**: 1669–1675.
- [46] LENDAHL U, ZIMMERMAN LB, McKAY RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990; **60**: 585–595.
- [47] de LIMA M, ST. JOHN LS, WIEDER ED, LEE MS, MCMANNIS J, KARANDISH S, GIRALT S, BERAN M, COURIEL D, KORBLING M, BIBAWI S, CHAMPLIN R, KOMANDURI KV. Double-chimaerism after transplantation of two human leucocyte antigen mismatched, unrelated cord blood units. *Br J Haematol* 2002; **119**: 773–776.
- [48] MARESCHI K, BIASIN E, PIACIBELLO W, AGLIETTA M, MADON E, FAGIOLI F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 2001; **86**: 1099–1100.
- [49] MCGUCKIN CP, FORRAZ N, ALLOUARD Q, PETTENGELL R. Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors *in vitro*. *Exp Cell Res* 2004; **295**: 350–359.
- [50] NIETFFELD JJ, VERTER F. Statistics of Autologous Cord Blood Storage and Use. 6th International Cord Blood Society Congress, October 1–3, 2004, Boston, USA.
- [51] PESSINA A, ELETTI B, CROERA C, SAVALLI N, DIODOVICH C, GRIBALDO L. Pancreas developing markers expressed on human mononucleated umbilical cord blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **323**: 315–322.

- [52] POJDA Z, MACHAJ EK, GAJKOWSKA A, OŁDAK T, JASTRZEWSKA M. Badanie potencjalnej przydatności klinicznej komórek macierzystych uzyskanych z krwi pępowinowej. *Post Biol Kom* 2003; **30**; supl.21: 127–137.
- [53] REYES M, LUND T, LENVIK T, AGUIAR D, KOODIE L, VERFAILLIE CM. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; **98**: 2615–2625.
- [54] ROCHA V, CORNISH J, SIEVERS EL, FILIPOVICH A, LOCATELLI F, PETERS C, REMBERGER M, MICHEL G, ARCESE W, DALLORSO S, TIEDEMANN K, BUSCA A, CHAN KW, KATO S, ORTEGA J, VOWELS M, ZANDER A, SOUILLET G, OAKILL A, WOOLFREY A, PAY AL, GREEN A, GARNIER F, IONESCU I, WERNET P, SIRCHIA G, RUBINSTEIN P, CHEVRET S, GLUCKMAN E. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001; **97**: 2962–2971.
- [55] ROCHA V, LABOPIN M, SANZ G, ARCESE W, SCHWERTFEGER R, BOSI A, JACOBSEN N, RUUTU T, DE LIMA M, FINKE J, FRASSONI F, GLUCKMAN E. Acute Leukemia Working Party of European Blood and Marrow Transplant Group; Eurocord-Netcord Registry. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2276–2285.
- [56] RUBINSTEIN P. Placental blood-derived hematopoietic stem cells for unrelated bone marrow reconstitution. *J Hematother* 1993; **2**: 207–210.
- [57] SANCHEZ-RAMOS J, SONG S, CARDOZO-PELAEZ F, HAZZI C, STEDEFORD T, WILLING A, FREEMAN TB, SAPORTA S, JANSEN W, PATEL N, COOPER DR, SANBERG PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol* 2000; **164**: 247–256.
- [58] SANCHEZ-RAMOS J, SONG S, KAMATH SG, ZIGOVA T, WILLING A, CARDOZO-PELAEZ F, STEDEFORD T, CHOPP M SANBERG PR. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 2001; **171**: 109–115.
- [59] SAPORTA S, KIM JJ, WILLING AE, FU ES, DAVIS CD, SANBERG PR. Human umbilical cord blood stem cells infusion in spinal cord injury: engraftment and beneficial influence on behavior. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; **12**: 271–278.
- [60] SHIH CC, WENG Y, MAMELAK A, LEBON T, HU MC, FORMAN SJ Identification of a candidate human neurohematopoietic stem-cell population. *Blood* 2001; **98**: 2412–2422.
- [61] STEC M, JAROCHA D, ZEMBALA M. Optymalizacja metod izolacji i ekspansji komórek CD34⁺ krwi pępowinowej. *Post Biol Kom* 2003; **30**; supl.21: 130–114.
- [62] STORMS RW, GOODELL MA, FISHER A, MULLIGAN RC, SMITH C. Hoechst dye efflux reveals a novel CD7(+)CD34(-) lymphoid progenitor in human umbilical cord blood. *Blood* 2000; **96**: 2125–2133.
- [63] TAGUCHI A, SOMA T, TANAKA H, KANDA T, NISHIMURA H, YOSHIKAWA H, TSUKAMOTO Y, ISO H, FUJIMORI Y, STERN DM, NARITOMI H, MATSUYAMA T. Administration of CD34⁺ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 2004; **114**: 330–338.
- [64] TANABE Y, TAJIMA F, NAKAMURA Y, SHIBASAKI E, WAKEJIMA M, SHIMOMURA T, MURAI R, MURAWAKI Y, HASHIGUCHI K, KANBE T, SAEKI T, ICHIBA M, YOSHIDA Y, MITSUNARI M, YOSHIDA S, MIAKE J, YAMAMOTO Y, NAGATA N, HARADA T, KURIMASA A, HISATOME I, TERAKAWA N, MURAWAKI Y, SHIOTA G. Analyses to clarify rich fractions in hepatic progenitor cells from human umbilical cord blood and cell fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **324**: 711–718.
- [65] WAGERS AJ, SHERWOOD RI, CHRISTENSEN JL, WEISSMAN IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; **297**: 2256–2259.
- [66] WAGNER JE, ROSENTHAL J, SWEETMAN R, SHU XO, DAVIES SM, RAMSAY NKC, MCGLAVE PB, SENDER L, CAIRO MS. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1996; **88**: 795–802.
- [67] WAGNER JE, BARKER JN, DEFOR TE, BAKER KS, BLAZAR BR, EIDE C, GOLDMAN A, KERSEY J, KRIVIT W, MACMILLAN ML, ORCHARD PJ, PETERS C, WEISDORF DJ, RAMSAY NK, DAVIES SM. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002; **100**: 1611–1618.
- [68] WANG J, KIMURA T, ASADA R, HARADA S, YOKOTA S, KAWAMOTO Y, FUJIMURA Y, TSUJI T, IKEHARA S, SONODA Y. SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34⁺ cells assured by intra-bone marrow injection. *Blood* 2003; **101**: 2924–2931.

- [69] WEXLER SA, DONALDSON C, DENNING-KENDALL P, RICE C, BRADLEY B, HOWS JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord blood and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; **121**: 368–374.
- [70] WOGNUM AW, EAVES AC, THOMAS TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 2003; **34**: 461–475.
- [71] ZIGOVA T, SONG S, WILLING AE, HUDSON JE, NEWMAN MB, SAPORTA S, SANCHEZ-RAMOS J, SANBERG PR. Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain. *Cell Transplant* 2002; **11**: 265–274.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 14.03.2005 r.

Przyjęto: 14.04.2005 r.

81-881 Sopot, ul. Kolberga 4c/31,

e-mail: anmys@amg.gda.pl

Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (TIF, JPG), albo pliki z Corela, wersja 9,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej. Rysunki, schematy, zdjęcia i wykresy w podpisach i w powołaniach w tekście powinny nosić nazwę rycina (Ryc.) i być numerowane kolejno. Na zdjęciach konieczne jest umieszczanie podziałki wskazującej powiększenie obiektów, a nie podawanie powiększeń w podpisach, gdyż zdjęcia ulegają zmniejszeniu do formatu B₅.

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

Cennik dla Autorów w 2005 r.

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

Zamówienie na odbitki musi być złożone wraz z przesłaną korektą pracy

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata roczna

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2005 pod adresem:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,

ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl

na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,

ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,

IV O/Warszawa 20124010531111000004409533.

Cena prenumeraty rocznika na rok 2005

dla instytucji (bibliotek) wynosi 150 zł

dla odbiorców indywidualnych 50 zł

Jesteśmy jedynym dystrybutorem „Postępów Biologii Komórki”.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2005

should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,

tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl:

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,

ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,

IV O/Warszawa, No 20124010531111000004409533.

Price per year 25 dollars USA or 21 euro.

WYKAZ RECENZENTÓW Z TOMU 31 Z ROKU 2004
REFEREES OF THE VOLUME 31, 2004

Prof.dr hab. Barbara Gabara
Prof.dr hab. Lilla Hryniewiecka
Prof.dr hab Anna Goździcka-Józefiak
Prof. dr hab Grzegorz Jakiel
Dr hab. Artur Jarmołowski
Prof.dr hab. Adam Jaworski
Prof.dr hab. Leszek Kaczmarek
Prof.dr hab Bożena Kamińska-Kaczmarek
Prof.dr hab Jerzy Kawiak
Prof.dr hab Wincenty Kilarski
Prof.dr hab Marek. Kowalski
Prof.dr hab Janusz Kubrakiewicz
Prof.dr hab. Jarosław Kuśmierek
Prof.dr hab. Stanisław Lewak
Prof.dr hab. Gabriela Lorenc-Plucińska
Prof.dr hab. Jerzy Łazarewicz
Dr hab. Marcin Majka
Prof.dr hab Małgorzata Manteuffel
Prof.dr hab Tomasz Motyl
Doc. dr hab. Barbara Nawrot
Prof.dr hab. Antoni Ogorzałek
Prof.dr hab. Ryszard Oliński
Prof.dr hab. Maria Olszewska
Prof.dr hab Barbara Płytycz
Prof.dr hab. Mariusz Ratajczak
Prof.dr hab. Janusz Siedlecki
Prof.dr hab Ewa Sikora
Prof.dr hab Ryszard Słomski
Prof.dr hab Kazimierz Strzałka
Dr Paweł Surowiak
Prof.dr hab Zofia Szczotka
Prof.dr hab Adam Szewczyk
Prof.dr hab. Janusz Szymaś
Prof.dr hab. Krzysztof Selmaj
Prof.dr hab Barbara Tomaszewska
Prof.dr hab Kazimierz Trębacz
Prof. dr hab. Wiesław Trzeciak
Prof.dr hab. Maciej Ugorski
Prof.dr hab Jacek Wachowiak
Prof.dr hab Krzysztof Wąsowicz
Dr hab. Małgorzata Wierzbicka
Dr hab. Henryk W. Witas
Prof.dr hab Przemysław Wojtaszek
Prof.dr hab. Lech Wojtczak
Prof.dr hab Maciej Zabel
Prof.dr hab. Krystyna Zawilska
Prof. dr hab. Jan Żeromski

INFORMACJE DLA AUTORÓW

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

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron druku i do 100 pozycji bibliograficznych 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. 391) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy; w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numrowane 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 następujące przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

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

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin	<i>tak nie</i>	Treść pracy nie była uprzednio publikowana, nie została wysłana do innej redakcji	<i>tak nie</i>
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę	<i>tak nie</i>	Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego	
Jest zgodność, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście	<i>tak nie</i>	z komputera IBM	<i>tak nie</i>

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	141
Wykaz recenzentów z tomu 31 z roku 2004 – Referees of the volume 31, 2004	142
CZAPLICKI D.: Fagowe biblioteki peptydowe przykład zastosowania w badaniach nad rakiem – Phage-displayed peptide libraries an application in cancer research	143
PERA J.: Tolerancja mózgu na niedokrwienie – Brain tolerance to ischemia	151
DLUGOŃSKA H., DZIADEK B., DZITKO K.: Pobieranie żelaza przez pasożytnicze pierwotniaki: receptory dla białek wiążących żelazo An iron uptake by parasitic protozoa: receptors for iron-binding proteins	169
WOLSKA-MITASZKO B., MOLESTAK E.: Metabolizm trehalozy u roślin Trehalose metabolism in plants	181
GAJ Z., LIPIŃSKA A.: Białka regulujące proces adhezji komórkowej w nowotworach tarczycy – Proteins regulating the cell adhesion mechanism in thyroid neoplasms	195
RICHTER M., MACHALIŃSKI B.: Indukcja tolerancji immunologicznej w transplantacji unaczynionych narządów allogenicznym Induction of immunological tolerance in vascularized organ transplantation	215
JAWORSKI A., SERWECIŃSKA L., STĄCZEK P.: Quorum sensing – komunikowanie się komórek w populacjach bakterii przy udziale chemicznych cząsteczek sygnałowych Quorum sensing – Bacterial cell - to - cell communication using chemical signal molecules	231
KMIEĆ Z., WYRZYKOWSKA M.: Ghrelina – nowy hormon regulujący nie tylko pobieranie pokarmu i wydzielanie hormonu wzrostu Ghrelin – regulation of feeding, growth hormone release and other actions of a new hormone	257
ROKICKA M., TOROSIAN T.: Badanie choroby resztkowej u chorych na szpiczaka mnogiego . Cz. I. Badanie za pomocą cytometrii przepływowej Minimal residual disease assessment in multiple myeloma patients. I. Flow cythometry method	273
ROKICKA M., TOROSIAN T.: Badanie choroby resztkowej u chorych na szpiczaka mnogiego. Cz. II. Analiza markerów molekularnych Minimal residual disease assessment in multiple myeloma patients. II. Molecular markers analysis	281
WOJEWÓDZKA U., GAJKOWSKA B., JURKIEWICZ J., GNIADECKI R.: Mikrodomeny (rafty) lipidowe w błonach komórkowych: Struktura, fizjologia i znaczenie w procesach patologicznych Lipid microdomain (lipid rafts) in cell membrane: Structure, physiology and it role in pathological processes	293
MAŁECKA A., TOMASZEWSKA B.: Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne Reactive oxygen species in plant cells and antioxidative defense systems	311
MAŁECKI M., RZOŃCA S.: Indukcja apoptozy jako cel terapii genowej nowotworów Induction of apoptosis as a target of cancer gene therapy	327
SOLECKA J., ADAMCZYK A., STROSZNAJDER J. B.: Alfa-synukleina w fizjologii i patologii mózgu Alpha-synuclein in physiology and pathology of the brain	343
MARCZAK A.: Apoptoza erytrocytów człowieka – Apoptosis In human erythrocytes	359
STOLAREK M., MYŚLIWSKI A.: Komórki macierzyste krwi pepowinowej Stem cells of cord blood	375
Wskazówki dla autorów i warunki prenumeraty	391