PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

Postępy Biologii Komórki

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 48, ISSUE 4/2021
(269–366)

www.pbkom.pl

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej
Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

Redaguje Kolegium – Editors:

Barbara CHWIROT – *biologia komórki, biologia nowotworów botanika bchwirot@umk.pl*

Agata FILIP – *genetyka medyczna, onkologia a.filip@umlub.pl*

Grażyna HOSER – *cytometria, komórki macierzyste graho@cmpk.edu.pl*

Lilla HRYNIEWIECKA – *energetyka komórki, mitochondria lillah@amu.edu.pl*

Bożena KAMIŃSKA-KACZMAREK – *neurobiologia, biologia molekularna bozenakk@nencki.gov.pl*

Jerzy KAWIAK – *immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów jkawiak@cmkp.edu.pl*

Wincenty KILARSKI – *mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek wincenty.kilarski@uj.edu.pl*

Andrzej K. KONONOWICZ – *komórki roślinne, regulacja ekspresji genów u Pro- i Eukaryota, inżynieria genetyczna akononow@biol.uni.lodz.pl*
Krzysztof LEWANDOWSKI – *hematologia, onkologia, komórki macierzyste krzysztof.lewandowski@sk1.am.poznan.pl*

Marek MALESZEWSKI – *biologia komórki, embriologia zwierząt maleszewski@biol.uw.edu.pl*

Janusz MASZEWSKI – *komórki roślinne, regulacja cyklu komórkowego, organizacja jądra komórkowego i struktura chromatyny jmasz@biol.uni.lodz.pl*

Michał NOWICKI – *hemopoeza, nefrologia, organizacja i rozwój naczyń krwiononośnych mnowicki@ump.edu.pl*

Barbara PŁYTYCZ – *immunologia barbara.plytycz@uj.edu.pl*

Zdzisław SMORĄG – *klonowanie zwierząt, zwierzęta transgeniczne, regulacja płci, hodowla gamet i zarodków in vitro, sterowan rozród zwierząt zdzislaw.smorag@izoo.krakow.pl*

Maciej ZABEL – *histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek mazab@amp.edu.pl*

Jan ŻEROMSKI – *patologia, immunologia, cytometria jzeromski@amp.edu.pl*

Rada Redakcyjna – Advisory Board:
Andrzej ŁUKASZYK – przewodniczący, Szczepan BILIŃSKI, Mieczysław CHORĄŻY, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office:
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań,
tel. 61 854 64 53, fax 61 854 64 40 *mnowicki@ump.edu.pl*
Redaktor techniczny – Zuzanna Podemska-Jedrzejczak *zpodemsk@ump.edu.pl*
@ Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – *Foundation for Cell Biology and Molecular Biology*
Indexed in: Biological Abstracts, Science Citation Index Expanded (SciSearch), Journal Citation Reports/Science Edition, BIOSIS Previews, Ulrich`s International Periodicals Directory, New Jersey, AGROS.

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.

Poznań, 2021-12-28

ROLE OF miRNA IN OVARIAN CANCER DIAGNOSIS, PROGNOSIS AND DEVELOPMENT OF DRUG RESISTANCE

ROLA miRNA W DIAGNOZOWANIU, PROGNOZOWANIU ORAZ ROZWOJU OPORNOŚCI W RAKU JAJNIKA

Dominika KAŹMIERCZAK[1], Karolina STERZYŃSKA[1], Radosław JANUCHOWSKI[2]

[1]Department of Histology and Embryology, Poznań University of Medical Sciences, Poland
[2]Department of Anatomy and Histology, Collegium Medicum, University of Zielona Góra, Poland

Summary: Epithelial Ovarian Cancer (EOC) is one of the most lethal cancers in the world. Although OC is not very common – high mortality and unspecific symptoms make ovarian cancer an unbeatable and very dangerous opponent in the fight for the life of women. The biggest obstacle in the treatment of ovarian cancer is the development of resistance to chemotherapy during treatment. The second problem is late diagnosis resulting from ineffective screening tools and a lack of sensitive and specific markers, especially in an early stage of the disease. Short non-coding RNA molecules designated as miRNA described for the first time over 20 years ago regulate over 50% of protein-coding genes responsible for nearly all cellular processes. Very interesting seems to be the participation of miRNAs in the process of resistance to chemotherapy. miRNA is also a new horizon in both the diagnostic and monitoring response to treatment in cancer. Available research showed the very promising potential of miRNA as a valuable marker in diagnosis, prognosis and monitoring of response to chemotherapy. Furthermore, circulating plasma miRNA profile reflects that observed in tumor making miRNAs easily available markers of cancers including ovarian cancer.

Keywords: ovarian cancer, miRNA, molecular markers, drug resistance

Streszczenie: Nabłonkowy rak jajnika (ang. EOC) jest jednym z najbardziej śmiertelnych nowotworów na świecie. Pomimo, że rak jajnika nie jest bardzo powszechną chorobą – wysoka śmiertelność i niespecyficzne objawy sprawiają, że nowotwor ten jest bezkonkurencyjnym i bardzo niebezpiecznym przeciwnikiem w walce o życie kobiet. Główną przyczyną nieskutecznego leczenia

raka jajnika jest rozwój oporności na chemioterapię w trakcie leczenia. Dodatkowym problemem jest późna diagnoza wynikająca z nieskutecznych narzędzi diagnostycznych oraz braku czułych i swoistych markerów, zwłaszcza we wczesnym stadium choroby. Krótkie niekodujące cząsteczki RNA, nazywane mikroRNA i opisane po raz pierwszy ponad 20 lat temu regulują ponad 50% genów kodujących białka odpowiedzialnych za prawie wszystkie procesy komórkowe. Bardzo interesujący wydaje się udział miRNA w procesie oporności na chemioterapię. miRNA to także nowy horyzont zarówno w diagnostyce, jak i monitorowaniu odpowiedzi na leczenie raka. Dostępne badania wykazały bardzo obiecujący potencjał mikroRNA jako wartościowego markera w diagnostyce, prognozowaniu i monitorowaniu odpowiedzi na chemioterapię. Co więcej, profil krążącego w osoczu miRNA odzwierciedla ten obserwowany w guzach, dzięki czemu miRNA mogą stanowić łatwo dostępne markery nowotworowe, w tym markery raka jajnika.

Słowa kluczowe: rak jajnika, mikroRNA, markery molekularne, oporność na leki

INTRODUCTION

Among gynecological cancers, epithelial ovarian cancer (EOC) is the most lethal cancer in Poland and the world scale. In Poland, only in the 2020 year, 4669 new cases of EOC were noted and 3131 women died [5]. Clinical and histopathological classification of EOC is based on the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) system (2014 year). FIGO divides EOC into three grades: the well differentiated (grade 1), moderately differentiated (grade 2), and (poorly differentiated (grade 3). EOC tumors involve the following histological types: serous (most common), endometrioid, mucinous, clear cell and others. According to FIGO, ovarian cancer divides into four clinical advancement stages: I, II, III and IV [13]. The high mortality is related to late diagnosis and the development of drug resistance during treatment. About 70 percent of cases are diagnosed at an advanced stage (III, IV) [13]. Delayed diagnosis is due to unspecific and often asymptomatic growth of ovarian cancer and a lack of effective screening tests and markers. The CA125 – a marker of choice used in clinical practice is characterized by low sensitivity and specificity as other condition and physiological state may be associated with increased CA125 levels [8]. Although most patients respond well to first-line chemotherapy composed of platinum derivatives (carboplatin or cisplatin-CIS) and taxanes (paclitaxel-PAC) about 80% will develop the drug resistant disease [13]. The resistance mechanisms to cytotoxic drugs can be divided into two main groups: cellular – specific for neoplastic cells, and tissue – related to neoplastic tissue. Both types of mechanisms co-occur and complement each other. Cellular mechanisms of resistance are mainly associated with the increased expression of ABC family membrane transporters responsible for multi-drug resistance (MDR) like P glycoprotein (P-gp), expression of DNA repair enzymes and drug inactivation [38]. Tissue mechanisms include the production of Extracellular Matrix Proteins (ECM) by cancer cells resulting in limited drug diffusion and induction of cell adhesion mediated drug resistance

(CAM-DR) [38]. Increased expression of MDR proteins and ECM molecules is also observed in drug resistant ovarian cancer cell lines [18, 19, 28, 29, 30].

miRNA is a short non-coding RNA (19-29 nucleotides) found in plants, animals and viruses. There are over 2000 miRNAs that have been discovered in humans so far. miRNAs affect the expression of a considerable portion of genes by targeting mRNAs for cleavage or translational suppression. In mammals, miRNA regulates over 50% of protein-coding genes connected with almost every cellular process, and there is evidence that miRNAs are involved in many human pathologies [3].

PROCESSING OF miRNA/PATHWAYS OF miRNA BIOGENESIS

miRNAs are transcribed from miRNA genes by RNA polymerase II into pri-miRNA (primary transcript miRNA). pri-miRNA have bulges structure called "hairpins", and their length can be more than 1,000 nt. In the nucleus, pri-miRNAs are cleaved by a microprocessor complex (composed of RNase III enzyme Drosha and DGCR8 protein) to a shorter product (70 nt) called pre-miRNA. Pre-miRNA is exported to the cytoplasm by an exportin 5 (EXP5) Ran-GTP complex, where pre-miRNA is released due to GTP hydrolysis Next, it is cleaved by the enzyme Dicer into a miRNA duplex (approximately 23 nucleotides). The miRNA duplex consists of the guide and passenger strands. It is loaded into RNA Induced Silencing Complex (RISC) with the Argonaute (Ago) proteins. Afterward, inside Ago protein follow unwinding miRNA duplex and selection of guide and passenger strand. Which strand will be incorporated in the complex and which strand will be left out to degradation is determined by the thermostability of the 5′ ends. As a result, it arises a mature miRNA of 22 nt in length, linked to the RISC protein complex [3].

SEED/miRNA FUNCTIONAL TARGETING

miRNAs regulate gene expression via nucleotide complementarity. The essential in this process is seed sequence – the conserved heptameric sequence, the most common situated in position 2-7 in miRNA from the miRNA 5′-end. The mechanism of miRNA-mediated gene silencing is based on complex miRNA-RISC work. Via a guide miRNA, the RISC complex binds to the target mRNA of protein-encoding genes in the 3'UTR. Depending on the degree of complementarity of the miRNA and the target mRNA cleavage or translation silencing occurs. The perfect pairing of the seed sequence with target mRNA (100% match) leads to mRNA degradation, whereas the incomplete match results in the inhibition of translation. In mammalian cells, mRNA cleavage is a more common process of gene silencing. The effect of miRNA regulation can be pleiotropic – one miRNA can affect many different genes and one gene can be a target of different miRNA [11]. The mechanism of miRNA biogenesis and mechanisms of genes silencing are summarized on **figure 1**.

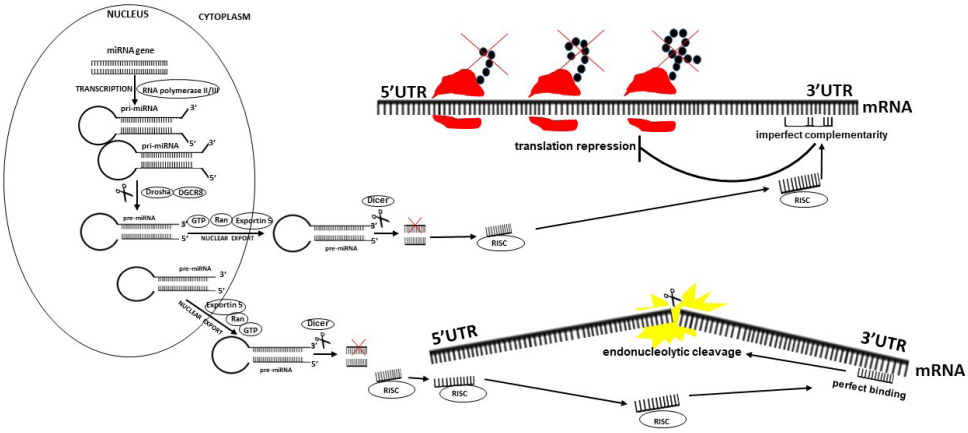


FIGURE 1. The schematic model of microRNA (miRNA) transcription by RNA polymerase II/III, nuclear processing by the Microprocessor complex – comprising Drosha and DGCR8 (Nucleus). The export of miRNA by exportin 5 in complex with RAN/GTP (Nucleus – Cytoplasm). The mechanisms of gene silencing via targeting 3'UTR of mRNAs by miRNA (Cytoplasm)

RYCINA 1. Schematyczny model transkrypcji mikroRNA (miRNA) przez polimerazę RNA II/III, proces dojrzewania w jądrze z udziałem kompleksu mikroprocesorowego składającego się z białek Drosha i DGCR8 (Jądro). Eksport mikroRNA przez eksportynę 5 przy udziale RAN/GTP (Jądro – Cytoplazma). Mechanizmy wyciszania genów poprzez oddziaływanie miRNA z rejonem 3'UTR mRNA (Cytoplazma)

ROLE miRNA IN OVARIAN CANCER (ONCOMIR RNAs AND SUPPRESSOR miRNAs)

Genes responsible for cancer pathogenesis are divided into two main classes: proto-oncogenes and tumor suppressor genes (TSGs). The balance between the expression of both types is crucial in maintaining cells homeostasis. Both classes of genes can be regulated by miRNA. The suppressor miRNAs are involved in the negative regulation of oncogenes and the expression of suppressor miRNA is often downregulated in cancers. In contrast, oncogenic miRNA (oncomirs) expression is frequently upregulated in cancers leading to a downregulation of tumor suppressor genes.

The examples of proto-oncogenes are cyclin-dependent kinases 4 and 6 (CDK4/6) and of tumor suppressor miRNA is miR-506. miR-506 as a tumor suppressor directly targets oncogenes such as *CDK4* and *CDK6*, leading to downregulation of their expression and inhibiting tumor development. However, miR-506 is downregulated in cancer, resulting in CDK 4 and 6 overexpression, cell cycle progression and uncontrolled cell division [10].

Decreased expression of TSGs or loss of TSGs functions leads to the progression of cancer or cancerogenesis itself. *BRCA1* (BReast CAncer gene) is an

example of a well-known cancer suppressor gene and miR-146 is an oncomir. Increased expression of the miR-146 family (miR-146a, miR-146b) mediates the downregulation of *BRCA1* and may induce the formation of breast cancer [26].

miRNA IN OVARIAN CANCER DRUG RESISTANCE

The expression of many miRNAs has been linked to drug resistance development in cancers including ovarian cancer. A study on a group of PAC-resistant/sensitive EOC patients showed that the overall survival (OS) was inversely correlated with the expression level of mi-663 and miR-622. The downregulation of both miRNAs has indicated a good prognosis in the PAC-resistant patient group. On the contrary, increased expression of miR-647 in the PAC-sensitive OC patient group related to better prognosis [17]. Tumors are heterogeneous cells, not only cancer-type, so the best model to study the role of miRNA in drug resistance is the cancer cell line. We have recently investigated miRNAs' participation in the resistance to drugs used in ovarian cancer therapy's 1st and 2nd line. We observed significant changes of 40 miRNAs, including downregulation of miR-29a in TOP-resistant (topotecan resistant) cell line and strong upregulation of its target gene *COL3A1,* which is responsible for TOP-resistance in this cell line [15, 16] (**Fig. 2, Fig. 3**). Similarly, downregulation of miR-29a/b/c in CIS-resistant cell lines has been observed. The inhibition of miR-29a expression in CP70, HeyC2,

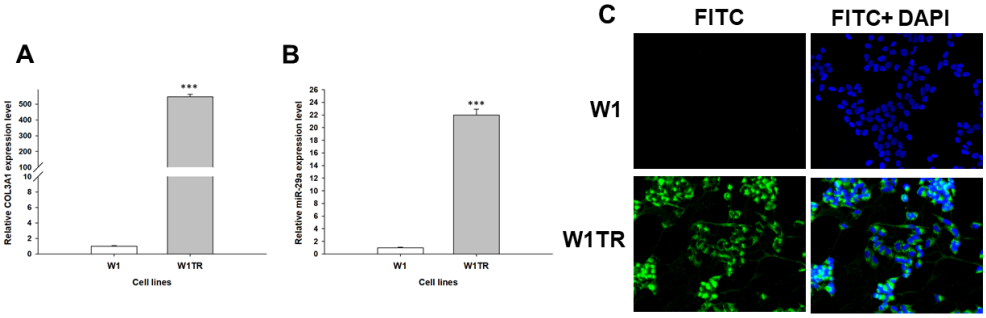


FIGURE 2. Expression analysis of *COL3A1* (A*) and miR-29a (B*) in drug sensitive – W1 and Topotecan resistant – W1TR cell lines (RNA microarray data). Immunofluorescence visualization of COL3A1 expression in W1, W1TR cell lines (C*). COL3A1 was detected using the anti-COL3A1 antibody and an MFP488-conjugated secondary antibody (green). Cell nuclei were stained with a DAPI-containing mounting medium (blue) (C*). *A and C adapted from reference 16 with changes; B* adopted from reference 15

RYCINA 2. Analiza ekspresji COL3A1 (A*) oraz miR-29a (B*) w lini komórkowej wrażliwej na lek – W1 oraz linii komórkowej opornej na topotekan – W1TR (dane z mikromacierzy RNA). Analiza immunofluorescencyjna ekspresji COL3A1 w liniach komórkowych W1 i W1TR (C*). Ekspresję COL3A1 badano przy użyciu przeciwciała anty-COL3A1 oraz drugorzędowego przeciwciała sprzężonego z MFP488 (kolor zielony). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (kolor niebieski) (C*). *A i C na podstawie pozycji nr 16 w bibliografii (ze zmianami); B* na podstawie pozycji nr 15 w bibliografii

SKOV3 and A2780 ovarian cancer cells confers CIS-resistance. In contrast overexpression of miR-29a restore sensitivity to cisplatin in CIS-resistant cell lines clearly indicating the role of miR-29a in the CIS-resistance [39]. In another study miR-152 and miR-185 were significantly downregulated in CIS- resistant ovarian cancer cell lines (SKOV3/DDP and A2780/DDP) and played a role in resistance *in vitro* and *in vivo* [35].

The opposite effect of the miR-363 expression on drug resistance was observed in ovarian cancer. Mohamed Z. and colleagues in the study on human ovarian serous cancer cell lines showed that miR-363 was significantly upregulated in PAC-resistant cells and inhibition of miR-363 restored the sensitivity to PAC [24].

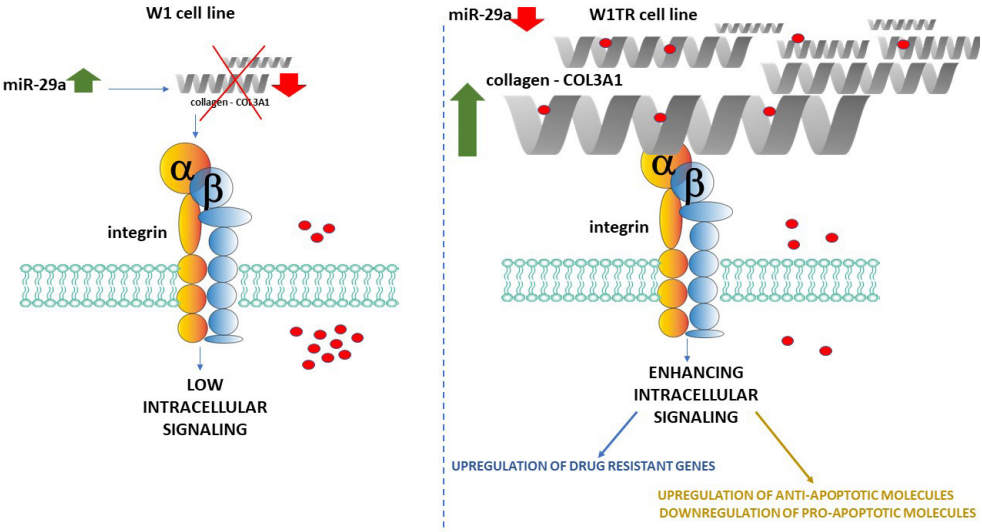


FIGURE 3. Schematic drawing of COL3A1 action in TOP resistance. In drug sensitive W1 cell line, a high level of miR-29a expression leads to the downregulation of its target COL3A1 and a lack of cell stimulation by integrin receptor. In the TOP-resistant W1TR cell line, the downregulation of miR-29a result in the upregulation of COL3A1. It binds to integrin receptors and stimulates intracellular signal transduction leading to downregulation of pro-apoptotic and upregulation of anti-apoptotic molecules and other drug resistant genes. Additionally, extracellular COL3A1 binds TOP molecules (red circles), limiting their availability to tumour cells

RYCINA 3. Schematyczny rysunek przedstawiający udział COL3A1 w oporności na topotekan. W linii komórkowej W1 - wrażliwej na cytostatyki, wysoki poziom ekspresji miR-29a prowadzi do obniżenia ekspresji docelowego genu kodującego COL3A1 i w efekcie do braku stymulacji komórki przez receptor integrynowy. W linii komórkowej opornej na topotekan – W1TR, obniżenie poziomu ekspresji miR-29a skutkuje podwyższeniem poziomu ekspresji COL3A1- wiąże się on z receptorami integrynowym i stymuluje transdukcję sygnału wewnątrzkomórkowego, co prowadzi do obniżenia ekspresji cząsteczek proapoptycznych i podwyższenia ekspresji cząsteczek antyapoptotycznych oraz innych genów oporności na leki. Dodatkowo zewnątrzkomórkowy COL3A1 wiąże cząsteczki topotekanu (czerwone kółka), ograniczając ich dostępność do komórek nowotworowych

Our previous study reported a reverse correlation in expression between downregulated miR-363 and upregulated *MDR1* gene encoding glycoprotein P (P-gp) in PAC-resistant cell lines [16].

Downregulation of miR-31 was observed in OC cell lines resistant to PAC and induced resistance via an increasing level of receptor tyrosine kinase MET. Overexpression of miR-31 sensitized ovarian cancer cells to PAC *in vitro* as well as *in vivo* [22]. We also observed the downregulation of miR-31 in two PAC-resistant ovarian cancer cell lines [16], confirming its role in the PAC-resistance. The overexpression of miR-199a in ovarian cancer-initiating cells (CICs) sensitized those cells to cisplatin, paclitaxel, and adriamycin and simultaneously reduced expression of ABCG2 drug transporter *in vitro* and *in vivo* [6]. Thus, changes in miRNA expression seem to play a significant role in drug resistance development in ovarian cancer.

miRNAs AS BIOMARKERS IN OVARIAN CANCER

The second reason of high mortality among EOC patients results from low diagnosis. The long-term survival of patients with stage I or II is 80-95%. However most patients with stage III or IV have low long-term survival rates only 10-30% [13]. Such low diagnosis index results from asymptomatic disease development and a lack of effective screening tools. The diagnosis of ovarian cancer is based mainly on inter-surgery histopathological examination and then classical histopathological test. Both OC serum biomarkers CA125 and HE4 have unsatisfactory sensitivity and specificity, especially in the early stages of OC [8]. Thus, non-invasive and fast diagnostic biomarkers seem urgent and necessary for quick diagnosis, prognosis, and predictions.

High hopes are put on miRNAs in the context of improving the diagnosis of ovarian cancer. miRNAs are found inside the cells and tissues, but the source can also be plasma, serum, breast milk, urine and saliva [34]. Plasma miRNAs are incorporated into macrovesicles in apoptotic bodies or bound to proteins, making them very stable and resistant to degradation [23]. Profile of circulating miRNAs reflects the miRNA profile in EOC tissue making them excellent biomarkers of ovarian cancers. Indeed, both tissue and circulating miRNAs have been investigated for ovarian cancer diagnosis, prognosis and prediction markers. Davidson B.'s studies seem to be critical in the context of the use of cellular miRNAs as biomarkers for ovarian cancer and shown differences in the pattern of cellular miRNA between high-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC), clear cell ovarian carcinoma (CCC), and ovarian surface epithelium (OSE). miR-205-5p was the most increased miRNA in HGSOC in comparison with OSE. The members of miR-200 family and miR-182-5p were the most upregulated in HGSOC and CCC compared with OSE and miR-383 was the most downregulated miRNA in HGSOC and CCC in comparison with OSE [32]. In another study low level of

miR-222-3p was associated with a higher tumor grade (lower in G3 vs. G1, G2) [9], indicating miRNA as a marker of tumor grading. The miRNA expression profile, both in tissue and in serum, can also determine the clinical advancement of the tumor. In the HGSOC study increased expression of miR-200c-3p in tumor tissue was observed in stage III/IV compared to stage I/II [1]. Serum miR-483-5p expression profile analysis showed significant elevation of miR-483-5p in stages III and IV compared with stages I and II [40]. Interestingly the profile of miR-483-5p in the plasma corresponded to that in tumor tissue. The tissue profile of miRNA also allows distinguishing between OC and normal tissue. Higher expression of miR-205-5p was observed in HGSOC tumors in comparison to OSE. Furthermore, elevated miR-205-5p plasma levels in patients compared to control correlated with tumor differentiation (higher in G3) [32]. A higher miR-200c level was observed both in cancer tissue and serum and the serum level was related to distinct metastasis [33]. An elevated level of miR-21 was observed in patients with normal CA-125 levels, suggesting that this miRNA may be used for the early diagnosis of OC [27]. Combining four miRs (miR-25 and miR-93, miR-7 and miR-429) allows discrimination between patients with EOC and healthy controls with a sensitivity of 93% and a specificity of 92% [20].

Besides the significant potential of miRNAs in the diagnostic field, miRNAs seem to be promising and reliable tools in the prognosis and predictions for ovarian cancer patients. Downregulation of miR-200b-429 cluster (miR-200a, miR-200b and miR-429) in the advanced ovarian cancer tissues significantly correlated with a high probability of recurrence and worse OS of patients [14]. The large-cohort studies using paraffin blocks from the primary ovarian tumors allowed identifying specific miRNA profiles of 35 unique miRNAs whose expression strongly correlated with the risk of disease progression. The upregulation of 16 miRNAs was associated with a better prognosis and overexpression of 19 miRNAs indicated a worse prognosis [2]. Serum miR-21 level in EOC patients strongly correlated with high tumor grade, advanced FIGO stage, and short OS, and its prognostic significance was independent of other clinicopathological factors [36]. The study of Zheng et al. showed that a low level of let-7f in plasma strongly correlates with EOC patients' poor prognoses in all clinical stages (I-IV) [40]. At the same time, decreased level of miR-1274A, miR-141 and miR-200b seems to be a prognostic marker in patients with HGSOC and correlate with patients' outcome [12]. The study on serum samples of 163 EOC patients, 20 patients with benign ovarian diseases and 32 healthy women showed expression of that the serum levels of miR-200b and miR-200c were significantly correlated with the CA125 value and indicated on shorter OS [21]. In HGSOC patients high miR-200c-3p expression was associated with poor PFS and OS [32]. In another study on EOC higher serum concentrations of exosomal miR-200 family members were associated with shorter PFS (miR-200c) and OS [21].

In the study on epithelial-mesenchymal transition in HGSOC, Parikh et al. showed that high expression of miR-181a was significantly correlated with shorter SPF and poor outcome [25]. Since EMT-mechanism may contribute to ovarian cancer therapy resistance [25], miR-181a seems a promising candidate for accurate and reliable ovarian cancer predictive biomarker. The study on miRNA identification related to chemotherapy response in ovarian cancer patients found that let-7i expression was strongly reduced in chemotherapy-resistant patients. Further investigation revealed that reduced let-7i expression enhances the resistance of ovarian cancer cell lines to cisplatin [37]. In the study on ovarian cancer drug resistance, Vecchione A. et al. reported a signature of 23 miRNAs associated with chemoresistance (198 samples extracted from patients treated carboplatin and Taxol) were tested. Among 23 described miRNAs, three miR-484, miR-642, and miR-217 allowed to predict chemoresistance of tested tumors efficiently [31]. All three selected miRNAs were upregulated in totally response patients and downregulated in progressive tumors [31].

In contrast, increased expression of miR-622 was associated with worse outcomes after platinum chemotherapy in BRCA1-inactivated tumors [7].

Single circulating miR-200c seems to be a predictive marker of good outcome after the combining bevacizumab and standard chemotherapy [12]. In the pilot study on recurrent platinum-resistant ovarian cancer patients treated with carboplatin with decitabine the miR-25-5p and miR-148b-5p appeared as potential chemotherapy response markers and the miR-148b-5p concentration correlated with progression-free (PFS) time. The groups of responders and non-responders revealed alterations in miRNA concentrations within-miR-25-3p and miR-148b-5p. In the group of non-responders both miRNAs were downregulated in comparison with the responders' group. In addition, it has been shown that miR-148b-5p predicts clinical outcomes – patients with a higher concentration of miR-148b-5p were characterized by longer PFS [4].

CONCLUSIONS

For 30 years, combined chemotherapy has been a standard procedure in EOC treatment. However, the development of chemotherapy resistance remains the main problem of ineffective therapy. On the other hand, despite the dynamic development of medicine, there is a lack of accurate and fast biomarkers (diagnostic, prognostic, and predictive), detecting disease at early stages and monitoring disease progression.

miRNAs have been shown considerable potential as powerful and universal tools in cancer diagnostic. Discovery that plasma miRNA profile often reflects miRNA profile in tumor tissue makes it a readily available marker. Many and

many more results indicate miRNAs as markers of OC. Some of them are conducted on different histological types, while others concern only one type. Some investigate a set of miRNAs while others only one. It often brings different conclusions. Thus, although very promising, the use of miRNAs as biomarkers of OC needs more comprehensive clinical study considering all clinical parameters of OC as histological type, grading, molecular type (I or II), FIGO stage and response to chemotherapy. This concise review aims to encourage investigators to study the role of miRNA as an ovarian cancer biomarker.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by Grant No. 2016/22/E/NZ5/00381 from the National Science Centre, Kraków, Poland.

REFERENCES

[1] ANKASHA SJ, SHAFIEE MN, ABDUL WAHAB N, RAJA ALI RAMOKHTAR NM. Oncogenic Role of miR-200c-3p in High-Grade Serous Ovarian Cancer Progression via Targeting the 3'-Untranslated Region of DLC1. *Int J Environ Res Public Health* 2021; **18**(11): 5741.

[2] BAGNOLI M, CANEVARI S, CALIFANO D, LOSITO S, MAIO MD, RASPAGLIESI F, et al. Development and validation of a microRNA-based signature (MiROvaR) to predict early relapse or progression of epithelial ovarian cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 2016; **17**(8): 1137-1146.

[3] BARTEL DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 2004; **116**(2): 281-297.

[4] BENSON EA, SKAAR TC, LIU Y, NEPHEW KPMATEI D. Carboplatin with Decitabine Therapy, in Recurrent Platinum Resistant Ovarian Cancer, Alters Circulating miRNAs Concentrations: A Pilot Study. *PLoS One* 2015; **10**(10): e0141279.

[5] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, SIEGEL RL, TORRE LAJEMAL A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2018; **68**(6): 394-424.

[6] CHENG W, LIU T, WAN X, GAO YWANG H. MicroRNA-199a targets CD44 to suppress the tumorigenicity and multidrug resistance of ovarian cancer-initiating cells. *Febs j* 2012; **279**(11): 2047-2059.

[7] CHOI YE, MEGHANI K, BRAULT ME, LECLERC L, HE YJ, DAY TA, et al. Platinum and PARP Inhibitor Resistance Due to Overexpression of MicroRNA-622 in BRCA1-Mutant Ovarian Cancer. *Cell Rep* 2016; **14**(3): 429-439.

[8] DOCHEZ V, CAILLON H, VAUCEL E, DIMET J, WINER NDUCARME G. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *J Ovarian Res* 2019; **12**(1): 28.

[9] FU X, LI Y, ALVERO A, LI J, WU Q, XIAO Q, et al. MicroRNA-222-3p/GNAI2/AKT axis inhibits epithelial ovarian cancer cell growth and associates with good overall survival. *Oncotarget* 2016; **7**(49): 80633-80654.

[10] GHAFOURI-FARD S, SHOOREI HTAHERI M. miRNA profile in ovarian cancer. *Experimental and Molecular Pathology* 2020; **113**: 104381.

[11] GRIMSON A, FARH KK, JOHNSTON WK, GARRETT-ENGELE P, LIM LPBARTEL DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 2007; **27**(1): 91-105.

[12] HALVORSEN AR, KRISTENSEN G, EMBLETON A, ADUSEI C, BARRETINA-GINESTA MP, BEALE P, et al. Evaluation of Prognostic and Predictive Significance of Circulating MicroRNAs in Ovarian Cancer Patients. *Dis Markers* 2017; **2017***:* 3098542.

[13] HENNESSY BT, COLEMAN RLMARKMAN M. Ovarian cancer. *Lancet* 2009; *374*(9698): 1371-1382.

[14] HU X, MACDONALD DM, HUETTNER PC, FENG Z, EL NAQA IM, SCHWARZ JK, et al. A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 2009; **114**(3): 457-464.

[15] JANUCHOWSKI R, ŚWIERCZEWSKA M, STERZYŃSKA K, WOJTOWICZ K, NOWICKI MZABEL M. Increased Expression of Several Collagen Genes is Associated with Drug Resistance in Ovarian Cancer Cell Lines. *J Cancer* 2016; **7**(10): 1295-1310.

[16] KAZMIERCZAK D, JOPEK K, STERZYNSKA K, GINTER-MATUSZEWSKA B, NOWICKI M, RUCINSKI M, et al. The Significance of MicroRNAs Expression in Regulation of Extracellular Matrix and Other Drug Resistant Genes in Drug Resistant Ovarian Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci* 2020; **21**(7): 2619.

[17] KIM YW, KIM EY, JEON D, LIU JL, KIM HS, CHOI JW, et al. Differential microRNA expression signatures and cell type-specific association with Taxol resistance in ovarian cancer cells. *Drug Des Devel Ther* 2014; *8*293-314.

[18] KLEJEWSKI A, STERZYŃSKA K, WOJTOWICZ K, ŚWIERCZEWSKA M, PARTYKA M, BRĄZERT M, et al. The significance of lumican expression in ovarian cancer drug-resistant cell lines. *Oncotarget* 2017; **8**(43): 74466-74478.

[19] KLEJEWSKI A, ŚWIERCZEWSKA M, ZAORSKA K, BRĄZERT M, NOWICKI M, ZABEL M, et al. New and Old Genes Associated with Topotecan Resistance Development in Ovarian Cancer Cell Lines. *Anticancer Res* 2017; 37(4): 1625-1636.

[20] MENG X, JOOSSE SA, MÜLLER V, TRILLSCH F, MILDE-LANGOSCH K, MAHNER S, et al. Diagnostic and prognostic potential of serum miR-7, miR-16, miR-25, miR-93, miR-182, miR-376a and miR-429 in ovarian cancer patients. *Br J Cancer* 2015; **113**(9): 1358-1366.

[21] MENG X, MÜLLER V, MILDE-LANGOSCH K, TRILLSCH F, PANTEL KSCHWARZENBACH H. Diagnostic and prognostic relevance of circulating exosomal miR-373, miR-200a, miR-200b and miR-200c in patients with epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* 2016; **7**(13): 16923-16935.

[22] MITAMURA T, WATARI H, WANG L, KANNO H, HASSAN MK, MIYAZAKI M, et al. Downregulation of miRNA-31 induces taxane resistance in ovarian cancer cells through increase of receptor tyrosine kinase MET. *Oncogenesis* 2013; **2**(3): e40.

[23] MITCHELL PS, PARKIN RK, KROH EM, FRITZ BR, WYMAN SK, POGOSOVA-AGADJANYAN EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**(30): 10513-10518.

[24] MOHAMED Z, HASSAN MK, OKASHA S, MITAMURA T, KESHK S, KONNO Y, et al. miR-363 confers taxane resistance in ovarian cancer by targeting the Hippo pathway member, LATS2. *Oncotarget* 2018; **9**(53): 30053-30065.

[25] PARIKH A, LEE C, JOSEPH P, MARCHINI S, BACCARINI A, KOLEV V, et al. microRNA-181a has a critical role in ovarian cancer progression through the regulation of the epithelial-mesenchymal transition. *Nat Commun* 2014; **5**: 2977.

[26] PETROVIC N, DAVIDOVIC R, BAJIC V, OBRADOVIC MISENOVIC RE. MicroRNA in breast cancer: The association with BRCA1/2. *Cancer Biomarkers* 2017; **19**: 119-128.

[27] RESNICK KE, ALDER H, HAGAN JP, RICHARDSON DL, CROCE CMCOHN DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real--time PCR platform. *Gynecol Oncol* 2009; **112**(1): 55-59.

[28] STERZYŃSKA K, KAŹMIERCZAK D, KLEJEWSKI A, ŚWIERCZEWSKA M, WOJTOWICZ K, NOWACKA M, et al. Expression of Osteoblast-Specific Factor 2 (OSF-2, Periostin) Is Associated with Drug Resistance in Ovarian Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci* 2019; **20**(16): 3927.
[29] STERZYŃSKA K, KLEJEWSKI A, WOJTOWICZ K, ŚWIERCZEWSKA M, ANDRZEJEWSKA M, RUSEK D, et al. The Role of Matrix Gla Protein (MGP) Expression in Paclitaxel and Topotecan Resistant Ovarian Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci* 2018; **19**(10): 2901.
[30] STERZYŃSKA K, KLEJEWSKI A, WOJTOWICZ K, ŚWIERCZEWSKA M, NOWACKA M, KAŹMIERCZAK D, et al. Mutual Expression of ALDH1A1, LOX, and Collagens in Ovarian Cancer Cell Lines as Combined CSCs- and ECM-Related Models of Drug Resistance Development. *Int J Mol Sci* 2018; **20**(1): 54.
[31] VECCHIONE A, BELLETTI B, LOVAT F, VOLINIA S, CHIAPPETTA G, GIGLIO S, et al. A microRNA signature defines chemoresistance in ovarian cancer through modulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**(24): 9845-9850.
[32] VILMING ELGAAEN B, OLSTAD OK, HAUG KB, BRUSLETTO B, SANDVIK L, STAFF AC, et al. Global miRNA expression analysis of serous and clear cell ovarian carcinomas identifies differentially expressed miRNAs including miR-200c-3p as a prognostic marker. *BMC Cancer* 2014; **14**: 80.
[33] WANG W, WU LR, LI C, ZHOU X, LIU P, JIA X, et al. Five serum microRNAs for detection and predicting of ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X* 2019; *3*100017.
[34] WEBER JA, BAXTER DH, ZHANG S, HUANG DY, HUANG KH, LEE MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010; **56**(11): 1733-1741.
[35] XIANG Y, MA N, WANG D, ZHANG Y, ZHOU J, WU G, et al. MiR-152 and miR-185 co-contribute to ovarian cancer cells cisplatin sensitivity by targeting DNMT1 directly: a novel epigenetic therapy independent of decitabine. *Oncogene* 2014; **33**(3): 378-386.
[36] XU YZ, XI QH, GE WLZHANG XQ. Identification of serum microRNA-21 as a biomarker for early detection and prognosis in human epithelial ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; **14**(2): 1057-1060.
[37] YANG N, KAUR S, VOLINIA S, GRESHOCK J, LASSUS H, HASEGAWA K, et al. MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2008; **68**(24): 10307-10314.
[38] YELDAG G, RICE ADEL RÍO HERNÁNDEZ A. Chemoresistance and the Self-Maintaining Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel) 2018;* **10**(12): 471.
[39] YU PN, YAN MD, LAI HC, HUANG RL, CHOU YC, LIN WC, et al. Downregulation of miR-29 contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 2014; *134*(3): 542-551.
[40] ZHENG H, ZHANG L, ZHAO Y, YANG D, SONG F, WEN Y, et al. Plasma miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer. *PLoS One* 2013; **8**(11): e77853.

Editor – Michał Nowicki

Received: 05.11.2021
Accepted: 01.12.2021
Dominika Kaźmierczak
Department of Histology and Embryology,
Poznań University of Medical Sciences
Święcickiego 6 Street, 60-781 Poznań, Poland
e-mail: dominika.ka.poznan@gmail.com

STRUKTURA I BIOSYNTEZA GHRELINY ORAZ JEJ RECEPTORA

STRUCTURE AND BIOSYNTHESIS OF GHRELIN AND ITS RECEPTOR

Małgorzata BLATKIEWICZ[1], Kacper KAMIŃSKI[1], Jakub OWOC[2], Izabela KORCZOWSKA-ŁĄCKA[2], TomaszWIELICH[3], AgnieszkaPLUTO-PRĄDZYŃSKA[4], Grażyna KASPRZAK[4]

[1]Zakład Histologii i Embriologii
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
[2]Zakład Immunologii,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
[3]Pracownia Zwierząt Doświadczalnych,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
[4]Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Ghrelina to wielofunkcyjny 28. aminokwasowy peptyd odkryty w 1999 roku jako pierwszy naturalny czynnik stymulujący uwalnianie hormonu wzrostu W procesie biosyntezy powstaje poprzez proteolityczne wycinanie z 117-aminokwasowego białka prekursorowego zwanego preproghreliną, kodowaną na genie *GHRL*. Sekwencja białkowa zarówno ghreliny jak i jej prekursora cechuje się wysokim stopniem homologii międzygatunkowej. Struktura genu *GHRL* pierwotnie wydawała się względnie prosta, jednakże dzięki zastosowaniu metody sekwencjonowania RNA wykazano, iż gen *GHRL* występuję we wielu alternatywnych wariantach transkrypcyjnych. Obecnie w bazie danych EMSEMBL jest zdeponowanych 16 wariantów transkrypcyjnych genu prekursora ghreliny.

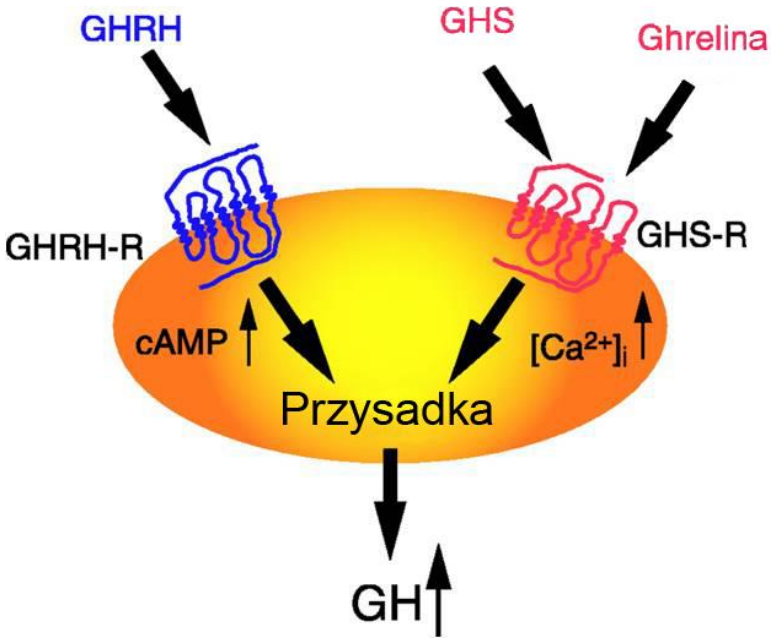
Słowa kluczowe: ghrelina, warianty transkrypcyjne, GHS-R

Summary: Ghrelin is a multifunctional 28 amino acid peptide discovered in 1999 as the first natural factor stimulating the release of growth hormone. During biosynthesis, it is derived by proteolytic cleavage of a 117-amino acid precursor protein called preproghrelin, encoded by the *GHRL* gene. The protein sequence of ghrelin and its precursor is characterized by a high interspecies homology. Originally, the structure of the GHRL gene appeared to be relatively simple; however, through the use of RNA sequencing method, it has been shown that the *GHRL* gene exists in many alternative transcript variants. Currently, 16 ghrelin precursor gene transcript variants are deposited in the EMSEMBL database.

Keywords: ghrelin, transcript variants, GHRL

GHRELINA – HISTORIA ODKRYCIA PEPTYDU

Ghrelina to wielofunkcyjny peptyd odkryty w 1999 roku jako pierwszy naturalny czynnik stymulujący uwalnianie hormonu wzrostu, jednak zdarzenia powiązane z jej odkryciem sięgają końca lat 70-tych. Wykazano wtedy, że niektóre pochodne peptydów opioidowych nie działają przeciwbólowo, natomiast powodują pobudzenie uwalniania hormonu wzrostu (GH). [8, 12]. Peptydy te określono jako GHS – związki uwalniające GH. W 1984 roku zsyntetyzowano heksapeptyd (GHRP-6), który w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* silnie stymulował uwalnianie GH. Podjęto próbę zbadania mechanizmu, w jakim GHS wywierają swoje biologiczne funkcje. W tym czasie dość dobrze scharakteryzowano mechanizm uwalniania GH przez GHRH. Wiadomym było, że GHRH działa poprzez wiązanie się z receptorem GHRHR, co prowadziło do wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP, a w konsekwencji do stymulacji uwalniania GH. Związki zaliczane do grupy GHS działały przez inny receptor niż GHRHR, ponieważ ich oddziaływanie na somatotropy przedniego płata przysadki mózgowej prowadziło do zwiększenia wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+}. Obserwowany efekt zachodził za pośrednictwem receptora GHS-R, który został zidentyfikowany w 1996 roku. Określono również sekwencję aminokwasową receptora GHS-R. Nalży on do rodziny receptorów siedmiotransbłonowych związanych z białkiem G – GPCR. Od czasu odkrycia receptora GHS-R podjęto usilne działania mające na celu określenie jego endogennego liganda. Z uwagi na wysoką ekspresję receptora w obrębie przysadki i podwzgórza, pierwotnie podjęto próby wykazania endogennego ligandu z ekstraktów różnych części mózgowia. Niespodziewanie okazało się, że to ekstrakty białkowe dna żołądka silnie pobudzały receptor GHS-R, zwiększając poziom Ca^{2+} w badanych komórkach (**Ryc. 1**) [24]. Za pomocą czteroetapowej chromatografii otrzymano oraz scharakteryzowano peptyd będący naturalnym ligandem receptora GHS-R. Otrzymany peptyd nazwano ghreliną. Nazwa ta pochodzi od słowa „ghre", co w języku Proto-Indo-Europejskim oznacza „wzrost", „gh" – hormon wzrostu, a „rel" – uwalnianie. Następnie określono sekwencję prekursora ghreliny oraz scharakteryzowano gen kodujący preproghrelinę. Analiza bioinformatyczna sekwencji preproghreliny sugerowała, że preproghrelina może być prekursorem dla drugiego aktywnego biologicznie peptydu. I rzeczywiście, w 2005 roku z żołądka szczura wyizolowano 23-aminokwasowy peptyd początkowo opisywany jako peptyd o działaniu przeciwstawnym do ghreliny [8]. Peptyd ten pochodził z C-końcowego fragmentu prekursora. Nazwano go obestatyną, ponieważ wykazywał hamujący wpływ na pobieranie pokarmu. Zakładano, że obestatyna działa poprzez receptor GPR39. W przeciwieństwie do ghreliny, obestatyna nie wpływała na sekrecję hormonu wzrostu [9]. Obecnie wiele prac podważa przeciwstawną funkcję obestatyny w stosunku do ghreliny oraz działanie obestatyny poprzez receptor GPR39 [31, 32].

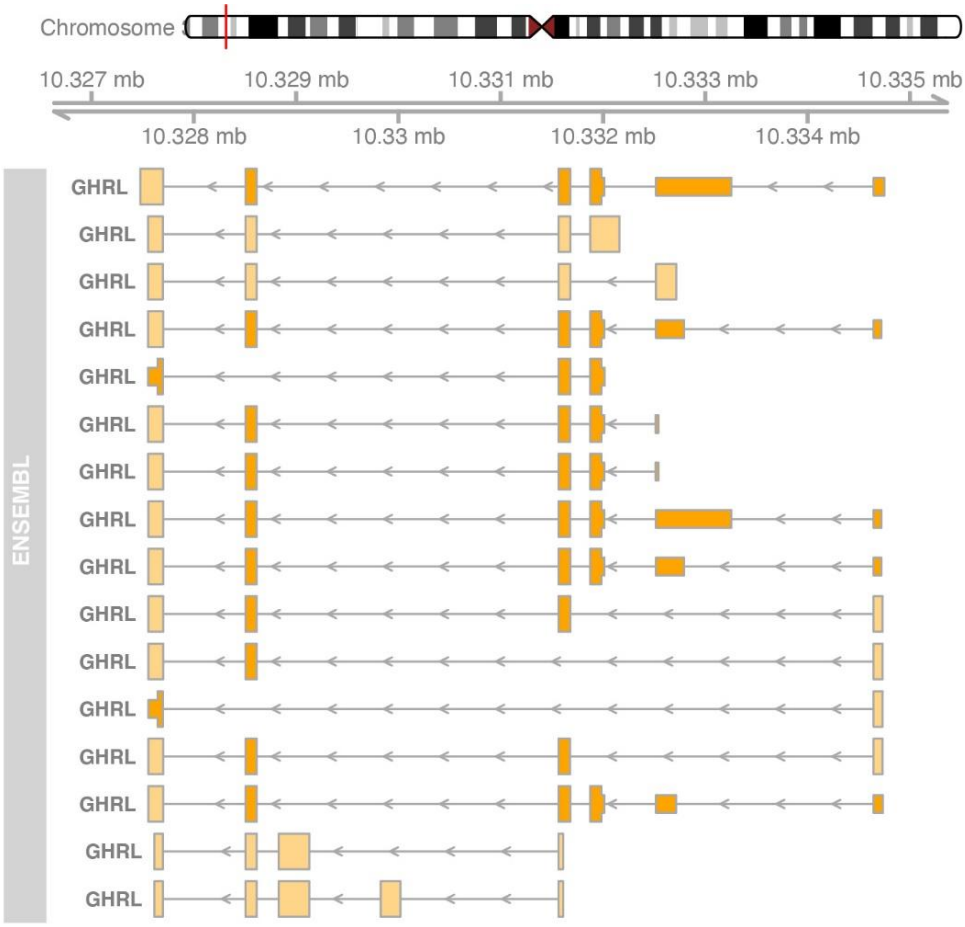


RYCINA 1. Regulacja wydzielania hormonu wzrostu w komórkach somatotropowych przedniego płata przysadki. GHGR stymuluje uwalnianie GH poprzez związanie się z receptorem GHRHR i podwyższając poziom wewnątrzkomórkowego cAMP. GHS oraz ghrelina stymulują natomiast uwalnianie GH poprzez oddziaływanie z GHS-R poprzez zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+}. Rycina według: [24].
FIGURE 1. Regulation of growth hormone secretion in the somatotropic cells of the anterior pituitary gland. GHGR stimulates the release of GH by binding to the GHRHR receptor and increasing the intracellular level of cAMP. GHS and Ghrelin stimulate GH release by interacting with GHS-R by increasing intracellular Ca2 + concentration. Figure according to [24]

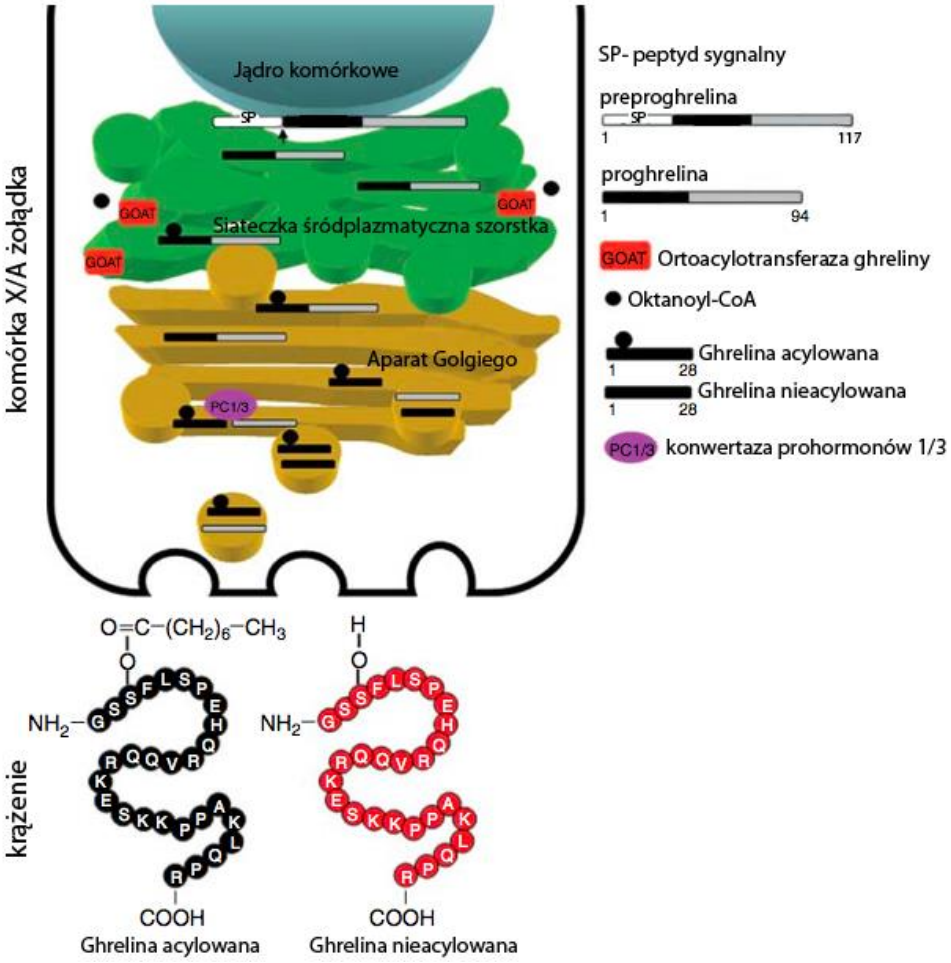
BIOSYNTEZA GHRELINY

Ghrelina jest peptydem składającym się z 28 aminokwasów, który powstaje poprzez proteolityczne wycinanie z 117-aminokwasowego białka prekursorowego zwanego preproghreliną, kodowaną na genie ghrl. W porównaniu do innych preprohormonów, pierwotnie struktura genu ghrl wydawała się być względnie prosta. Obecnie przyjmuję się, że *GHRL* zawiera 5 eksonów, które obejmują obszar 7,2 kpz leżący na chromosomie 3 w pozycji p25-26. Pierwotnie opisywana forma *GHRL* zawierała 20-nukleotydowy ekson znajdujący się na jej 5` końcu (ekson 0). 28-aminokwasowa sekwencja ghreliny jest kodowana częściowo na eksonie 1, która to sekwencja zawiera także peptyd sygnalny. Pozostała część ghreliny kodo-

wana jest na eksonie 2 (**Ryc. 2**). Dzięki zastosowaniu metody sekwencjonowania RNA wykazano, iż gen *GHRL* występuję we wielu alternatywnych wariantach transkrypcyjnych, i tak też analiza danych bazy EMSEMBL wykazała istnienie 16 wariantów transkrypcyjnych genu prekursora ghreliny (**Ryc. 2**). Wcześniejsze dane literaturowe opisywały alternatywne miejsce składania w obrębie 5' końca drugiego eksonu, co w rezultacie prowadziło do powstania ghreliny pozbawionej glutaminy w pozycji 14 (des-gln14-ghrelina), pełniącej taką samą aktywność biologiczną jak klasyczna ghrelina [20].



RYCINA 2. Alternatywne warianty genu *GHRL* otrzymane na podstawie analizy bazy ENSEMBL. Eksony zaznaczone za pomocą prostokątów.
FIGURE 2. Alternative variants of the GHRL gene were obtained based on the ENSEMBL database analysis. Exons marked with rectangles



RYCINA 3. Potranslacyjna obróbka oraz acylacja preproghreliny. Acylacja zachodzi zaraz po odcięciu peptydu sygnalnego. W obrębie aparatu Golgiego niespecyficzna konwertaza PC 1/3 transformuje proghrelinę do ghreliny, która jest wydzielana. Rycina według: [29]
FIGURE 3. Post-translational processing and acylation of preproghrelin. Acylation occurs immediately after cleavage of the signal peptide. Within the Golgi apparatus, nonspecific PC convertase 1/3 transforms proghrelin into secreted ghrelin. A figure according to [29]

Jak się okazało, proces alternatywnego składania mRNA genu preproghreliny jest skomplikowany i może prowadzić do powstawania wielu wariantów mRNA, a w konsekwencji ewentualnego białka. Na poziomie mRNA opisano formę prekursora ghreliny pozbawioną eksonu kodującego obestatynę. Następnie opisano również mysi wariant genu preproghreliny kodowany przez eksony pierwszy, czwarty

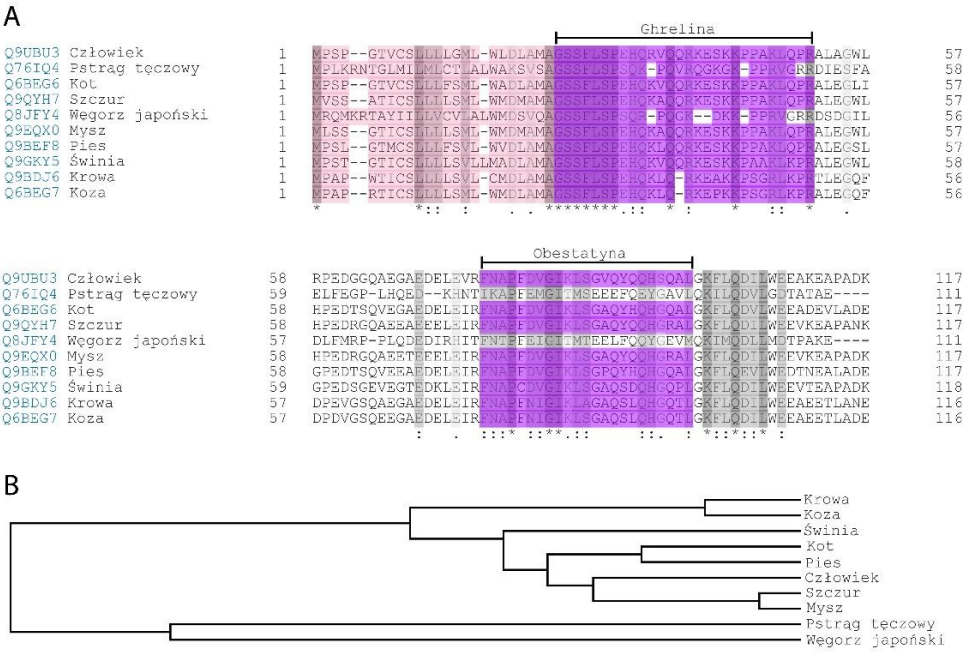
oraz piąty. Tak powstały transkrypt nie koduje jednak dojrzałej ghreliny. Istnieją również warianty preproghreliny, w których istnieje dodatkowy ekson-1, a jego rola mogłaby polegać na regulacji ekspresji przez inne czynniki transkrypcyjne.

Preproghrelina na N końcu posiada sekwencje peptydu sygnalnego, w obrębie siateczki śródplazmatycznej szorstkiej zostaje odcięty. W obrębie siateczki szorstkiej dochodzi także do acylacji trzeciej reszty seryny poprzez kowalencyjne związanie grupy kwasu tłuszczowego (najczęściej ośmiowęglowego – oktanylowego) co prowadzi do utworzenia aktywnej formy w kontekście pierwotnie opisywanych funkcji ghreliny, tj. regulacji pobierania pokarmu oraz sekrecji hormonu wzrostu. W roku 2008 dwa niezależne laboratoria wykazały, że związana z błoną O-acylotransferaza 4 (ang. *membrane bound O-acyltransferase 4*, MBOAT4) odpowiedzialną jest za acylację ghreliny (**Ryc. 3**). MBOAT4 została przemianowana na GOAT (ang. *Ghrelin O-acylotransferase*). Jak wykazały doświadczenia na myszach z nokautem GOAT, jest to jedyny enzym aktywujący ghrelinę [17, 22]. Sekwencja GOAT cechuje się wysokim stopniem konserwatywności, a jego aktywność została wykazana u człowieka, szczura, myszy oraz danio pręgowanego [17, 34]. GOAT posiada osiem domen wiążących błonę, prawdopodobnie zlokalizowany jest w siateczce śródplazmatycznej szorstkiej. Ghrelina głównie ulega acylacji kwasem oktanylowym (8C), jednakże opisano również formy ghreliny zmodyfikowane krótszym bądź dłuższym kwasem tłuszczowym. Grupa acylowa przyłączana do ghreliny odzwierciedla zawartość kwasów tłuszczowych w diecie [27]. Dieta bogata w kwas heptanowy powoduje, że ghrelina jest preferencyjnie acylowana kwasem heptanowym niż oktanylowym [22].

W kolejnym etapie biosyntezy, proghrelina ulega translokacji do aparatu Golgiego, gdzie niespecyficzna konwertaza prohormonów 1/3 odcina C końcowy fragment proghreliny, z którego może powstawać obestatyna (**Ryc. 3**). Po tym procesie powstałe peptydy mogą być wydzielane na zewnątrz komórki. We krwi może krążyć także końcowy odcinek proghreliny (C-ghrelina), a jego wysokie stężenie obserwowano u osób z chorobami serca [28]. 25% krążącej ghreliny to forma aktywna (acyl-ghrelina) [33]. Około 2/3 ghreliny ulega ekspresji w komórkach dokrewnych żołądka. Wykazano, że usunięcie żołądka powoduje spadek stężenia krążącej ghreliny o 65% [1].

SEKWENCJA GHRELINY ORAZ PREPROGHRELINY

Zarówno preproghrelina, jak i dojrzała ghrelina cechują się wysokim stopniem homologii międzygatunkowej. Jak wynika z **ryciny 4**, pierwszych 10 aminokwasów N- końca ghreliny człowieka, szczura, myszy, świni, wołu, owcy i psa jest identyczna (**Ryc. 4**). Wykazano, że cztery pierwsze aminokwasy ghreliny stanowią jej najkrótszą formę mogącą aktywować receptor ghreliny i dlatego też N końcowy fragment dojrzałego peptydu jest bardziej konserwatywny [6].



RYCINA 4. A) Porównanie sekwencji aminokwasowych preproghreliny ssaków. **B)** Drzewo filogenetyczne otrzymane na podstawie sekwencji preproghreliny
FIGURE 4. A) Comparison of mammalian preproghrelin amino acid sequences. **B)** Phylogenetic tree obtained from the sequence of preproghrelin

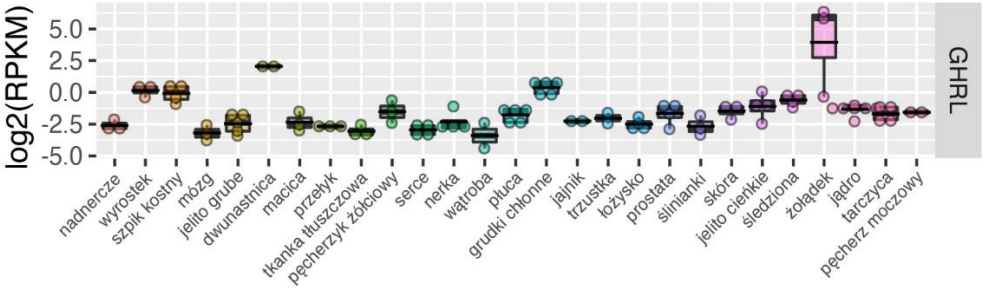
EKSPRESJA GHRELINY

U ssaków ghrelina jest produkowana głównie w komórkach dokrewnych śluzówki żołądka (**Ryc. 5**) [1]. Komórki zawierające ghrelinę są bardziej liczne w obrębie dna żołądka niż w odźwierniku. Immunoreaktywną ghrelinę wykazano także w dwunastnicy, jelicie cienkim, czczym oraz jelicie grubym [30]. Ekspresja ghreliny jest wysoka w początkowych odcinkach jelita (dwunastnica) i wraz z jego przebiegiem maleje (jelito grube). Trzustka stanowi kolejny ważny narząd produkujący ghrelinę. Badania z wykorzystaniem HPLC oraz RIA wykazały, że ghrelina oraz des-acyl ghrelina ulegają ekspresji w szczurzych trzustkach [11]. Jednakże typ komórek produkujących ghrelinę w trzustce przez długi czas był sprawą dyskusyjną. Obecnie przyjmuje się, że specyficzny typ komórek opisywanych jako komórki epsilon jest miejscem syntezy ghreliny wysp trzustki. Profil ekspresji ghreliny w obrębie trzustki ulega znacznym zmianom w czasie rozwoju płodowego [9]. Komórki wysp trzustkowych produkujące ghrelinę są najliczniejszą

sze od połowy czasu trwania ciąży do wczesnego okresu postnatalnego, po tym czasie liczba komórek produkujących ghrelinę w obrębie trzustki gwałtownie spada. Ekspresja mRNA genu ghrl oraz samej ghreliny jest około siedmiokrotnie wyższa w płodowej trzustce w porównaniu do płodowego żołądka. Jak już wcześniej wspomniano, poziom ghreliny w żołądku jest niski w okresie prenatalnym i wzrasta po urodzeniu, dlatego sugeruje się, że w okresie płodowym trzustka pełni rolę głównego rezerwuaru ghreliny w organizmie [19].

Ponieważ pierwotnie opisywana ekspresja GHS-R dotyczyła przysadki oraz podwzgórza przypuszczano, że endogenny ligand tego receptora może ulegać ekspresji również w tych obszarach. Założenie to było poparte faktem występowania GHRH, który ulega ekspresji w podwzgórzu i następnie jest wydzielany do układu wrotnego przysadki i stymuluje uwalnianie GH przez somatotropy przedniego płata przysadki. W przeciwieństwie do GHRH, ekspresja ghreliny w obrębie struktur mózgowia jest bardzo niska [23]. Ekspresję ghreliny wykazano w jądrze łukowatym oraz jądrze przykomorowym podwzgórza, w obrębie specyficznych neuronów nazwanych neuronami ghreliny [23]. Ostatnie badania wykazały obecność ghreliny we wcześniej niescharakteryzowanych jądrach podwzgórza przyległych do trzeciej komory, występujących pomiędzy jądrami przykomorowymi oraz jądrem łukowatym.

Ekspresję preproghreliny na poziomie mRNA opisano także w nerce, a szczególnie w obrębie ciałka nerkowego (**Ryc. 5**) [14]. Ponadto w obrębie ciałek nerkowych syntetyzowana jest zarówno acylowana jak i desacylowana forma ghreliny, co sugeruje, że również w nich ulega ekspresji GOAT. Stężenie ghreliny w surowicy jest ściśle skorelowane z poziomem kreatyniny i jest ponad 2,8 razy



RYCINA 5. Profil ekspresji genu GHRL otrzymanych na podstawie danych sekwencjonowania RNA, zdeponowanych w bazie NCBI. Dane przedstawiono jako wartość logarytmu przy podstawie 2 z odczytów RPKM (ang. *Reads Per Kilobase Million*) (źródło:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51738/?report=expression)

FIGURE 5. The expression profile of the GHRL gene was obtained from RNA sequencing data deposited in the NCBI database. Data presented as logarithm based on 2 of RPKM (Reads Per Kilobase Million) (Source: https: //www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51738/? Report = expression)

wyższe u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek w odniesieniu do zdrowych [35]. Powyższy wynik sugeruje, że nerki są ważnym miejscem usuwania i degradacji ghreliny.

Immunoreaktywną ghrelinę wykryto także w pierwszym trymestrze ciąży człowieka w obrębie cytotrofoblastu łożyska, jednakże nie była ona wykrywalna w trzecim trymestrze ciąży [15]. Komórki syntetyzujące ghrelinę występują w synz cytiotrofoblaście ludzkiego łożyska oraz w łożysku szczurzym. Ghrelinę wykazano także w komórkach Leydiga oraz komórkach Sertoliego jądra [5, 26], jednakże pok ziom ghreliny w komórkach Sertoliego był bardzo niski. Ponadto receptor ghreliny wykazano w komórkach płciowych, głównie w pachytenach spermatocytów, jak również w komórkach Sertoliego oraz Leydiga. Fakt ten może świadczyć o działaniu ghreliny na drodze auto- lub parakrynowej w obrębie gonady męskiej.

RECEPTOR GHRELINY

Receptor ghreliny GHS-R to typowy receptor z rodziny GPCR – receptorów sprzężonych z białkiem G i zawierających siedem domen transbłonowych [21]. GHS-R pierwotnie sklonowano przy wykorzystaniu biblioteki cDNA częśe ci gruczołowej przysadki świni [2]. Następnie GHS-R zidentyfikowano również w ludzkiej przysadce oraz w podwzgórzach innych gatunków [3]. Ludzki gen GHS-R jest zlokalizowany na 3. chromosomie w pozycji q26.2 i składa się on z trzech eksonów. Pierwszy ekson zawiera niekodującą sekwencję 5'UTR. Drugi ekson koduje N-końcową domenę złożoną z pięciu domen transbłonowych. Trzeci ekson koduje dwie dodatkowe domeny transbłonowe. Ludzka izoforma receptora GHS-R występuje w dwóch wariantach transkrypcyjnych, określanych jako GHS-R1a oraz GHS-R1b. Aktywną, posiadającą siedem domen transbłonowych jest forma receptora GHS-R1a. GHS-R1b jest formą krótszą o sekwencję kodowaną na trzecim eksonie i w rezultacie translacja tak powstałego mRNA prowadzi do powstania receptora o pięciu domenach transbłonowych. Ostatnie 24 aminokwasy izoformy GHS-R1b ulegają translacji z sekwencji fragmentu intronu genu receptora ghreliny. U gryzoni występuje tylko forma siedmio transbłonowego receptora, w literaturze określanego jako GHS-R1a lub GHS-R.

Ludzki *GHS-R1a* jest białkiem składającym się z 366 aminokwasów o masie cząsteczkowej wynoszącej około 41 (kDa).

GHS-R1a posiada cechy typowe dla receptorów GPCR, włączając w to występowanie konserwatywnych reszt cysteinowych na pierwszych dwóch zewnątrzkomórkowych pętlach, kilka potencjalnych miejsc dla modyfikacji potranslacyjnych (N- glikozylacji, fosforylacji). Bazując na porównaniu homologii sekwencji, GHS-R1a zaliczany jest do rodziny receptorów rodopsynowych. Receptor ghreliny wykazuje wysoką homologię z receptorem motyliny, z którą 52% aminokwasów

ma identycznych, ponadto ligandy tych receptorów, tj. ghrelina i motylina posiadają podobną sekwencję aminokwasową. Wstępne badania wykazały, że motylina może nieznacznie aktywować receptor ghreliny, podczas gdy ghrelina nie wywiera wpływu na receptor motyliny [10]. Przy pomocy autoradiografii wykazano wiązanie ghreliny do błony komórek 3T3-L1, jednakże metoda RT-PCR nie wykazała ekspresji receptora ghreliny w badanych komórkach [36]. Fakt ten pozwala sugerować występowanie innego, jeszcze niezidentyfikowanego receptora ghreliny. W innym przykładzie wykazano, iż obie formy acylowanej jak i nieacylowanej ghreliny wiążą się do powierzchni błony komórek linii kardiomiocytów H9c2, w których nie zachodzi ekspresja receptora ghreliny [4].

EKSPRESJA RECEPTORA GHRELINY

Receptor ghreliny ulega ekspresji głównie w jądrze łukowatym (ARC), jądrze brzuszno-przyśrodkowym (VMN) podwzgórza oraz w obrębie hipokampu [16]. GHS-R jest wysoce wrażliwy na hormon wzrostu i jego ekspresja jest wysoka u karłowatych szczurów dw/dw. Podawanie tym szczurom hormonu wzrostu powoduję obniżenie ekspresji receptora ghreliny [7]. GHS-R1a mRNA wykazano także w innych jądrach podwzgórza, w przysadce, zakręcie zębatym, regionach CA2, CA3 hipokampa oraz w innych elementach mózgowia, takich jak istota czarna oraz grzbietowe i środkowe jądra szwu rdzenia przedłużonego. Analiza przy użyciu metody RT-PCR wykazała także ekspresję receptora ghreliny w wielu narządach obwodowych, takich jak serce, płuca, wątroba, nerka, trzustka, żołądek, jelito cienkie, jelito grube, tkanka tłuszczowa oraz komórki układu immunologicznego [14, 16, 18, 25]. Receptor ghreliny ulega również ekspresji w komórkach jądra szczura (komórki Leydiga, komórki Sertoliego, spermatocyty w fazie pachytenu) i człowieka (komórki Leydiga) [13, 26]

Obecność ghreliny oraz jej receptorów w hipokampie [16], obszarze odpowiedzialnym za naukę oraz pamięć, pozwalają sugerować rolę ghreliny w zapamiętywaniu. W tym kontekście wykazano, iż dokomorowa infuzja ghreliny indukuje ekspresję czynnika c-Fos w regionach hipokampa C1, CA2, oraz C3.

GHS-R1b ulega ekspresji w większości tkanek obwodowych, m.in. w nadnerczu, sercu, układzie pokarmowym, nerce, wątrobie, skórze, tarczycy, trzustce, śledzionie, węźle chłonnym, jądrze, jajniku [14]. Przyjmuję się, że jest on formą nieaktywną receptora ghreliny.

LITERATURA

[1] ARIYASU H, TAKAYA K, TAGAMI T, OGAWA Y, HOSODA K, AKAMIZU T, et al. 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**(10): 4753-8.

[2] ARVAT E, DI VITO L, BROGLIO F, PAPOTTI M, MUCCIOLI G, DIEGUEZ C, et al. Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. J Endocrinol Invest. 2000; **23**(8): 493-5.

[3] ASAKAWA A, INUI A, KAGA T, YUZURIHA H, NAGATA T, UENO N, et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. Gastroenterology. 2001; **120**(2): 337-45.

[4] BALDANZI G, FILIGHEDDU N, CUTRUPI S, CATAPANO F, BONISSONI S, FUBINI A, et al. 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**(6): 1029-37.

[5] BARREIRO ML, GAYTAN F, CAMINOS JE, PINILLA L, CASANUEVA FF, AGUILAR E, et al. Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. Biol Reprod. 2002; **67**(6): 1768-76.

[6] BEDNAREK MA, FEIGHNER SD, PONG SS, MCKEE KK, HRENIUK DL, SILVA MV, et al. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. J Med Chem. 2000; **43**(23): 4370-6.

[7] BENNETT PA, THOMAS GB, HOWARD AD, FEIGHNER SD, VAN DER PLOEG LH, SMITH RG, et al. Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. Endocrinology. 1997; **138**(11): 4552-7.

[8] BOWERS CY, MOMANY F, REYNOLDS GA, CHANG D, HONG A, CHANG K. Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. Endocrinology. 1980; **106**(3): 663-7.

[9] CHANOINE JP, WONG AC. Ghrelin gene expression is markedly higher in fetal pancreas compared with fetal stomach: effect of maternal fasting. Endocrinology. 2004; **145**(8): 3813-20.

[10] DASS NB, HILL J, MUIR A, TESTA T, WISE A, SANGER GJ. The rabbit motilin receptor: molecular characterisation and pharmacology. Br J Pharmacol. 2003; **140**(5): 948-54.

[11] DATE Y, NAKAZATO M, HASHIGUCHI S, DEZAKI K, MONDAL MS, HOSODA H, et al. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. Diabetes. 2002; **51**(1): 124-9.

[12] DEGHENGHI R. The development of 'impervious peptides' as growth hormone secretagogues. Acta Paediatr Suppl. 1997; **423**: 85-7.

[13] GAYTAN F, BARREIRO ML, CAMINOS JE, CHOPIN LK, HERINGTON AC, MORALES C, et al. 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**(1): 400-9.

[14] GNANAPAVAN S, KOLA B, BUSTIN SA, MORRIS DG, MCGEE P, FAIRCLOUGH P, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. J Clin Endocrinol Metab. 2002; **87**(6): 2988.

[15] GUALILLO O, CAMINOS J, BLANCO M, GARCIA-CABALLERO T, KOJIMA M, KANGAWA K, et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. Endocrinology. 2001; **142**(2): 788-94.

[16] GUAN XM, YU H, PALYHA OC, MCKEE KK, FEIGHNER SD, SIRINATHSINGHJI DJ, et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. Brain Res Mol Brain Res. 1997; **48**(1): 23-9.

[17] GUTIERREZ JA, SOLENBERG PJ, PERKINS DR, WILLENCY JA, KNIERMAN MD, JIN Z, et al. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; **105**(17): 6320-5.

[18] HATTORI N, SAITO T, YAGYU T, JIANG BH, KITAGAWA K, INAGAKI C. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. J Clin Endocrinol Metab. 2001; **86**(9): 4284-91.

[19] HAYASHIDA T, NAKAHARA K, MONDAL MS, DATE Y, NAKAZATO M, KOJIMA M, et al. Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. J Endocrinol. 2002; **173**(2): 239-45.

[20] HOSODA H, KOJIMA M, MATSUO H, KANGAWA K. Purification and characterization of rat des--Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. J Biol Chem. 2000; **275**(29): 21995-2000.

[21] HOWARD AD, FEIGHNER SD, CULLY DF, ARENA JP, LIBERATOR PA, ROSENBLUM CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. Science. 1996; **273**(5277): 974-7.
[22] KIRCHNER H, GUTIERREZ JA, SOLENBERG PJ, PFLUGER PT, CZYZYK TA, WILLENCY JA, et al. GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. Nat Med. 2009; **15**(7): 741-5.
[23] 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**(6762): 656-60.
[24] KOJIMA M, KANGAWA K. Ghrelin: structure and function. Physiol Rev. 2005; **85**(2): 495-522.
[25] KOJIMA M, KANGAWA K. [Structure of ghrelin]. Nihon Rinsho. 2004; **62 Suppl 9**: 324-7.
[26] LUKASZYK A, RAFINSKA L, SAWINSKI P, KASPRZAK A, OLEJNICZAK K, RUCINSKI M, et al. Immunohistochemical and hybridocytochemical study on ghrelin signalling in the rat seminiferous epithelium. Folia Histochem Cytobiol. 2009; **47**(3): 415-23.
[27] NISHI Y, HIEJIMA H, HOSODA H, KAIYA H, MORI K, FUKUE Y, et al. Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. Endocrinology. 2005; **146**(5): 2255-64.
[28] PEMBERTON C, WIMALASENA P, YANDLE T, SOULE S, RICHARDS M. C-terminal pro-ghrelin peptides are present in the human circulation. Biochem Biophys Res Commun. 2003; **310**(2): 567-73.
[29] ROMERO A, KIRCHNER H, HEPPNER K, PFLUGER PT, TSCHOP MH, NOGUEIRAS R. GOAT: the master switch for the ghrelin system? Eur J Endocrinol. 2010;**1 63**(1):1-8.
[30] SAKATA I, NAKAMURA K, YAMAZAKI M, MATSUBARA M, HAYASHI Y, KANGAWA K, et al. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. Peptides. 2002; **23**(3): 531-6.
[31] SCHELLEKENS H, DINAN TG, CRYAN JF. Lean mean fat reducing "ghrelin" machine: hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. Neuropharmacology. 2010; **58**(1): 2-16.
[32] SEIM I, COLLET C, HERINGTON AC, CHOPIN LK. Revised genomic structure of the human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and natural antisense transcripts. BMC Genomics. 2007; **8**: 298.
[33] STENGEL A, KEIRE D, GOEBEL M, EVILEVITCH L, WIGGINS B, TACHE Y, et al. The RAPID method for blood processing yields new insight in plasma concentrations and molecular forms of circulating gut peptides. Endocrinology. 2009; **150**(11): 5113-8.
[34] YANG J, BROWN MS, LIANG G, GRISHIN NV, GOLDSTEIN JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. Cell. 2008; **132**(3):387-96.
[35] YOSHIMOTO A, MORI K, SUGAWARA A, MUKOYAMA M, YAHATA K, SUGANAMI T, et al. Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. J Am Soc Nephrol. 2002; **13**(11): 2748-52.
[36] ZHANG W, ZHAO L, LIN TR, CHAI B, FAN Y, GANTZ I, et al. Inhibition of adipogenesis by ghrelin. Mol Biol Cell. 2004; **15**(5): 2484-91.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 01.12.2021
Przyjęto: 15.12.2021
Małgorzata Blatkiewicz
Zakład Histologii i Embriologii
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
Ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań
e-mail: mblatkiewicz@ump.edu.pl

FIZIOLOGICZNE FUNKCJE GHRELINY – AKTUALNY STAN WIEDZY

PHYSIOLOGICAL FUNCTION OF GHRELIN – THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Małgorzata BLATKIEWICZ[1], Anna OLECHNOWICZ[1], Jerzy WÓJTOWICZ[2], Alicja KORNACKA[3], Joanna KRASOWSKA[4], Adam MALINGER[5], Agnieszka PLUTO-PRĄDZYŃSKA[6]

[1]Zakład Histologii i Embriologii
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
[2]Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
[3]Klinika Zakażeń Noworodków,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
[4]Katedra i Zakład Medycyny Rodzinnej,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
[5]Klinika Zdrowia Matki i Dziecka,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
[6]Zakład Immunologii,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Ghrelina jest obecnie intensywnie badanym hormonem peptydowym. Została pierwotnie opisana jako peptyd regulujący wydzielanie hormonu wzrostu, gdzie mechanizm jej działania został dość dobrze poznany. Drugą klasyczną już funkcją ghreliny jest stymulacja pobierania pokarmu. Istnieje szereg doniesień opisujących, że poza wcześniej wspominanymi funkcjami ghreliny uczestniczy ona w regulacji wielu innych procesów biologicznych, a szeroka dystrybucja receptora oraz samej ghreliny pozwala przypuszczać, iż ghrelina – obok klasycznego działania dokrewnego – może działać lokalnie na drodze auto- lub parakrynowej poprzez aktywacje ścieżek sygnalizacyjnych, specyficznych dla komórek/narządów docelowych.

Słowa kluczowe: ghrelina, pobieranie pokarmu, GHS-R

Summary: Ghrelin is currently an intensively studied peptide hormone. It was originally described as a growth hormone secretagogue peptide, where its molecular mechanism is well understood. The second classic function of ghrelin is the stimulation of food intake. There are a number of reports showing that apart from the previously mentioned functions, ghrelin participates in the regulation of many other biological processes. Wide distribution of the receptor and ghrelin itself suggests that ghrelin – apart from the classic endocrine action – may act locally via auto- or paracrine way through the activation of signaling pathways, specific for target cells/organs.

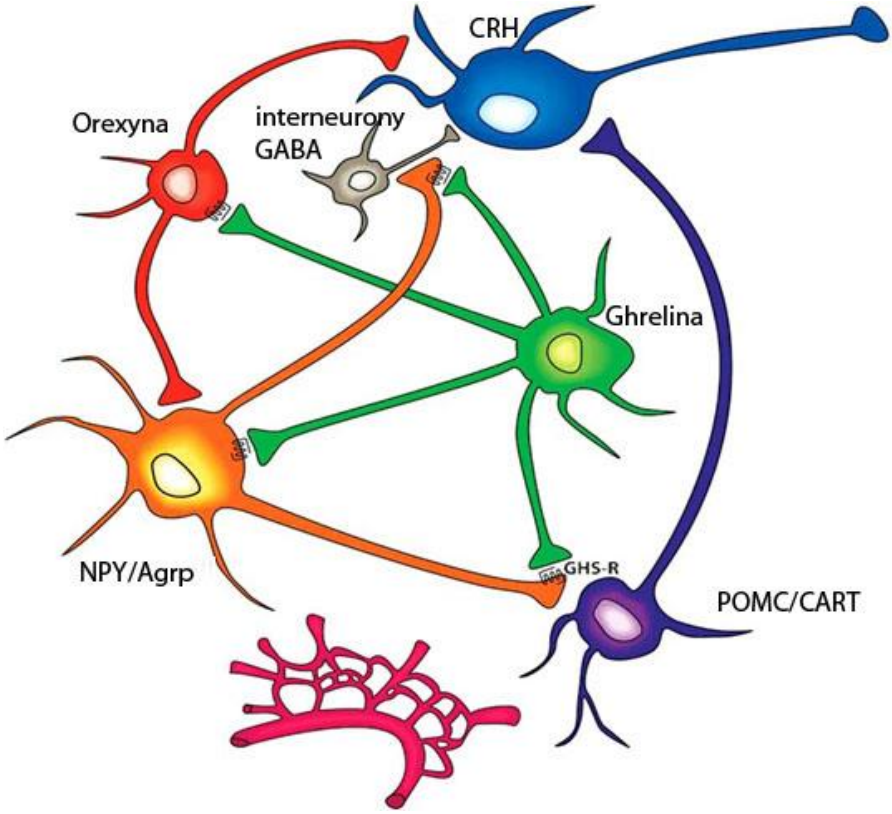
Keywords: ghrelin, food intake, GHS-R

MECHANIZM DZIAŁANIA GHRELINY

Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania ghreliny pozostaje nadal przedmiotem licznych badań. W kontekście sygnalizacji wewnątrzkomórkowej dość dobrze poznano mechanizm działania ghreliny na somatotropy przedniego płata przysadki mózgowej. W tym przypadku oddziaływanie ghreliny z receptorem błonowym GHS-R1a prowadzi do aktywacji fosfolipazy C [31]. Aktywna fosfolipaza C przekształca fosfatydyloinozytol do diacyloglicerolu oraz trifosforanu inozytolu. Trifosforan inozytolu prowadzi do uwolnienia jonów wapnia, a diacyloglicerol aktywuje kinazę białkową C. Jak już wcześniej wspominano, opisany powyżej mechanizm działania ghreliny na somatotropy przysadki różni się od mechanizmu stymulacji wydzielania GH za pośrednictwem GHRH, gdzie stymulacja receptora GHRHR prowadzi do aktywacji cyklazy adenylowej i w konsekwencji zwiększa wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP, aktywując kinazę białkową A (**Ryc. 1**). W odniesieniu do komórek somatotropowych wykazano również dodatni wpływ ghreliny na ekspresję czynnika transkrypcyjnego Pit1. Czynnik ten jest odpowiedzialny za ekspresję genu kodującego hormon wzrostu w komórkach somatotropowych [22].

Ścieżki sygnalne regulowane przez ghrelinę zostały również przebadane przy wykorzystaniu komórek HepG2 [42]. Okazało się, że związanie ghreliny z receptorem prowadzi do aktywacji kilku ważnych przekaźników wewnątrzkomórkowych, włączając w to fosforylację reszty tyrozynowej substratu receptora insuliny-1 (IRS-1) oraz stymulację kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (MAPK). Obserwowany efekt działania ghreliny był podobny do efektu wywieranego przez insulinę, jednakże w przeciwieństwie do insuliny ghrelina hamowała aktywność kinazy Akt oraz częściowo znosiła hamujący wpływ insuliny na ekspresję karboksylazy fosfoenolopirogronianowej – enzymu regulatorowego procesu glukoneogenezy.

Jedną z głównych funkcji wywieraną przez ghrelinę jest regulacja homeostazy energetycznej organizmu. Oddziałując z receptorami neuronów NPY/AgR-P-pozytywnych, ghrelina stymuluje ośrodki podwzgórza odpowiedzialne za



RYCINA 1. Połączenie neuronów ghreliny w obrębie podwzgórza. Ghrelina działając na receptory GHS-R presynaptycznych zakończeń neuronów NPY łączących się z neuronami POMC w obrębie jądra ARC. W tym układzie ghrelina stymuluje uwalnianie GABA i w konsekwencji hamuje aktywność anoreksygennych neuronów POMC. Wpływ ghreliny na neurony CRH w obrębie PVN jest bardziej skomplikowany. W tym przypadku aktywacja presynaptycznych receptorów GHS-R neuronów NPY powoduje stymulację wydzielania NPY, co w konsekwencji prowadzi do zahamowywania wydzielania GABA z interneuronów GABA, a to z kolei znosi hamujący efekt GABA i powoduje stymulację np. neuronów CRH, prowadząc do uwalniania ACTH oraz kortyzolu. Neurony ghreliny także łączą się z neuronami oreksyny w obrębie pola podwzgórzowo bocznego i stymulują aktywność tych neuronów. Rycina według: [40]

FIGURE 1. The connection of ghrelin neurons within the hypothalamus. Ghrelin acts on the GHS-R receptors of the presynaptic terminals of NPY neurons connecting with POMC neurons within the ARC nucleus. In this system, ghrelin stimulates the release of GABA and consequently inhibits the activity of anorexigenic POMC neurons. The effect of ghrelin on CRH neurons within PVN is more complicated. In this case, the activation of presynaptic GHS-R receptors of NPY neurons causes the stimulation of NPY secretion, which in turn leads to inhibition of GABA secretion from GABA interneurons, which in favor abolishes the inhibitory effect of GA-BA and causes stimulation of, e.g., CRH neurons, leading to ACTH and cortisol release. Ghrelin neurons also bind to Orexin neurons in the lateral hypothalamus and stimulate the activity of these neurons. A figure according to [40]

pobieranie pokarmu [24]. W tym układzie sygnalizacja wewnątrzkomórkowa zachodzi również przez GHS-R1a, jednakże przypuszcza się, że w neuronach NPY/AgRP sygnał do wydzielania NPY zachodzi za pośrednictwem cAMP oraz kinazy białkowej A. Ten kolejny rodzaj sygnalizacji pozwala sugerować, że wewnątrzkomórkowa sygnalizacja wynikająca z oddziaływania ghrelina – GHS-R1a jest komórkowo specyficzna [35], i może zachodzić w odmienny sposób, zależny od komórek, na które ghrelina działa [35].

Mechanizm działania ghreliny za pośrednictwem cAMP potwierdzono również na linii komórkowej COS-7 oraz linii HEK 293 z nadekspresją receptora ghreliny. Inkubacja tych komórek z ghreliną zwiększała aktywność transkrypcyjną elementów CRE oddziałujących z cAMP [27, 28].

Ciekawych spostrzeżeń dostarczyły badania dotyczące wpływu ghreliny na aktywność ludzkich chondrocytów, gdzie potwierdzono pobudzający wpływ ghreliny na powstawanie wewnątrzkomórkowego cAMP, lecz towarzyszyło temu obniżenie aktywności metabolicznej badanych komórek (test MTT). W tym aspekcie należy podkreślić, że w chondrocytach nie wykazano ekspresji receptora ghreliny. Fakt ten pozwala sugerować, że w mediowanym ghreliną wzroście stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP uczestniczy prawdopodobnie jakiś inny receptor [9]. Najnowsze badania jeszcze bardziej komplikują mechanizm oddziaływania wewnątrzkomórkowego ghreliny, ponieważ wykazano, że podczas przekazywania sygnału do wnętrza komórki, GHS-1Ra może ulegać homo- lub heterodimeryzacji [46]. Opisano również możliwość powstania heterodimerów GHS-R1a oraz receptora dopaminy [29]. Przypuszcza się, że heterodimeryzacja indukuje translokację białek G oddziałujących z GHS-R1a. Zjawisko to może być tkankowo specyficzne, zależne od kombinatorycznej ekspresji receptorów na powierzchni różnych typów komórek.

WYDZIELANIE HORMONU WZROSTU

Ghrelina jest peptydem wywierającym szereg funkcji biologicznych, a szeroka dystrybucja receptora oraz samej ghreliny pozwala przypuszczać, iż ghrelina – obok klasycznego działania dokrewnego – może lokalnie oddziaływać również na drodze auto- lub parakrynowej. Z uwagi na fakt, że ghrelina została opisana pierwotnie jako peptyd regulujący wydzielanie hormonu wzrostu, mechanizm jej działania w tym kontekście został dość dobrze poznany. Ghrelina działając na receptor GHSR w obrębie somatotropów przysadki na drodze IP3 prowadzi do zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} i w konsekwencji prowadzi do stymulacji wydzielania hormonu wzrostu. Aktywność uwalniania hormonu wzrostu przez ghrelinę jest podobna do działania GHRH w modelu podania do-

komorowego szczurom [36], jednakże maksymalna stymulacja wywierana przez ghrelinę jest dwa do trzech razy wyższa niż w przypadku GHRH [3]. Ghrelina stymuluję uwalnianie hormonu wzrostu w sposób dawkowo specyficzny [36]. Dożylna iniekcja ghreliny indukuje silne uwalnianie GH badanego w surowicy zarówno u człowieka, jak i szczura. U szczurów podanie dożylne ghreliny powoduje największy pik wydzielania GH w 5-15 min. po podaniu i wraca ono do punktu wyjściowego po godzinie od podania. Pojedyncze dokomorowe podanie ghreliny także powoduje wzrost stężenia wydzielania GH w sposób zależny od dawki. Wykazano również, że ghrelina indukuje wydzielanie GH u niższych kręgowców, włączając kury, ryby, żaby. Ghrelina stymuluje również uwalnianie GH z hodowli pierwotnej komórek przysadki, co świadczy o bezpośredniej roli ghreliny w regulacji tego procesu [36]. Udział podwzgórza w uwalnianiu GH mediowanym ghreliną jest również brany pod uwagę. Pacjenci z organicznymi uszkodzeniami podwzgórza charakteryzują się zmniejszeniem wydzielania GH, nawet po podaniu ghreliny [44]. Ponadto w pierwotnej hodowli komórek przysadki ghrelina zwiększa uwalnianie GH tylko dwu-, trzykrotnie powyżej podstawowego poziomu [36], co stanowi znacznie niższy poziom zmian w porównaniu do indukcji wydzielania GH w doświadczeniach *in vivo*. Powyższe fakty pozwalają sugerować, iż inne czynniki są również zaangażowane w mechanizm uwalniania GH stymulowany przez ghrelinę. Obserwowano również, że po przecięciu nerwu błędnego, wpływ ghreliny na wydzielanie GH znacząco maleje [17, 61]. Obserwacja ta wspiera hipotezę, że maksymalnie wywierany efekt stymulacji wydzielania GH przez ghrelinę może zachodzić za pośrednictwem nerwu błędnego. Inną próbą wyjaśnienia obniżonej aktywności ghreliny działającej bezpośrednio na komórki przysadki jest brak ekspresji w tych komórkach GHRH. W tym rozumieniu współwystępowanie ghreliny oraz GHRH charakteryzuje się efektem synergistycznym w kontekście wydzielania GH [4, 25]. Dane te mogą sugerować, że GHRH jest potrzebne do osiągnięcia maksymalnej wydajności wydzielania GH przez ghrelinę.

REGULACJA POBIERANIA POKARMU

Przyjmuje się, że pobieranie pokarmu jest regulowane głównie w obrębie ośrodków głodu i sytości podwzgórza. Za pomocą metod immunohistochemicznych wykazano, że neurony podwzgórza zawierające ghrelinę występują między innymi w jądrze łukowatym [36]. Jądro łukowate (ARC) stanowi główne miejsce aktywności ghreliny w obrębie centralnego układu nerwowego. ARC jest także celem dla leptyny – obwodowego peptydu hamującego pobieranie pokarmu produkowanego głównie przez adipocyty. W obrębie ARC mieszczą się neurony produkujące NPY (neuropeptyd Y) jak i AgRP (białko podobne do Aguti). Przynaj-

mniej częściowo oreksygenny efekt wywierany przez ghrelinę może zachodzić za pośrednictwem stymulacji ekspresji NPY oraz AgRP. Zgodnie z dystrybucją neuronów ghreliny w obrębie podwzgórza wykazano, że dokomorowa infuzja ghreliny powoduje zwiększenie ekspresji podwzgórzowego AgRP [37]. Stymulujący efekt ghreliny na pobieranie pokarmu jest zniesiony po podaniu antagonisty receptora pierwszego NPY. Również dokomorowe podanie inhibitora AgRP, czy też przeciwciał anty-NPY powoduje zniesienie stymulującego efektu wywieranego przez ghrelinę na pobieranie pokarmu. Dożylne podanie ghreliny również prowadzi do pobudzenia neuronów NPY/AgRP [14]. Przedstawione wyniki wskazują, że ghrelina reguluje pobieranie pokarmu poprzez stymulację neuronów NPY/AgRP podwzgórza. Ghrelina może stymulować neurony NPY/AgRP poprzez szlaki sygnalizacyjne AMPK. Badania na myszach z nokautem genów NPY i/lub AgRP potwierdzają rolę NPY/AgRP w efekcie wywieranym przez ghrelinę, jednakże wyciszenie tylko jednego genu powoduje słabe zahamowanie efektu wywieranego przez ghrelinę. Dopiero nokaut zarówno NPY oraz AgRP znacznie znosi działanie ghreliny na pobieranie pokarmu. Poza stymulacją wydzielania oreksygennych peptydów, ghrelina również wzmacnia swój efekt poprzez zahamowanie działających anoreksygennie neuronów zawierających proopiomelanokortynę (POMC) oraz transkryptu regulowanego kokainą i amfetaminą (CART) [12].

Kolejne badania wykazały również, że centralne podanie ghreliny prowadzi do stymulacji wychwytu triacyloglicerydów oraz lipogenezy, z jednoczesną inhibicją oksydacji lipidów w obrębie żółtej tkanki tłuszczowej [52]. Obwodowe podawanie ghreliny przez okres dwóch tygodni powoduje znaczny wzrost masy tkanki tłuszczowej [55]. Zgodnie z powyższymi obserwacjami przyrost masy tkanki tłuszczowej nie zachodzi u myszy z nokautem genowym ghreliny [63].

Dokomorowe oraz obwodowe chroniczne podawanie ghreliny powoduje rozwój hiperfagii, prowadzi do podwyższenia masy ciała oraz stymuluje rozwój adipocytów [43, 55]

Obwodowo podana ghrelina powoduje również stymulację neuronów NPY/AgRP podwzgórza i na tej drodze wzmaga pobieranie pokarmu [26, 60]. Ghrelina, jak i większość peptydów podanych obwodowo, nie przechodzi łatwo przez barierę krew-mózg, stąd też obwodowa ghrelina musi aktywować odpowiednie regiony podwzgórza poprzez ścieżki pośrednie. Wykazanie ekspresji receptora ghreliny w obrębie aferentych neuronów nerwu błędnego sugeruje, że sygnał ghreliny jest transmitowany do układu nerwowego właśnie za pośrednictwem nerwu błędnego [17, 45]. Ponadto wykazano, że dokomorowe podanie ghreliny indukuje ekspresję c-Fos w motoneuronach nerwu błędnego i stymuluje sekrecję kwasu solnego w żołądku, co potwierdza udział nerwu błędnego w mechanizmie działania wywieranym przez ghrelinę [18]. Istnieją także dowody, że wagotomia znosi zdolność obwodowo podanej ghreliny do stymulacji pobierania pokarmu oraz wydzielania GH [1, 17]. Pobieranie pokarmu obniża poziom ghreliny zarówno

no u wagotomizowanych, jak i kontrolnych zwierząt, jednakże wagotomia obniża indukowany głodem wzrost stężenia ghreliny [61].

Ghrelina działa również za pośrednictwem neuronów oreksynowych. Dokomorowe podanie ghreliny indukuje ekspresję Fos w neuronach oreksynowych [53]. Stymulująca pobieranie pokarmu aktywność ghreliny jest zredukowana u myszy z nokautem genu oreksyny.

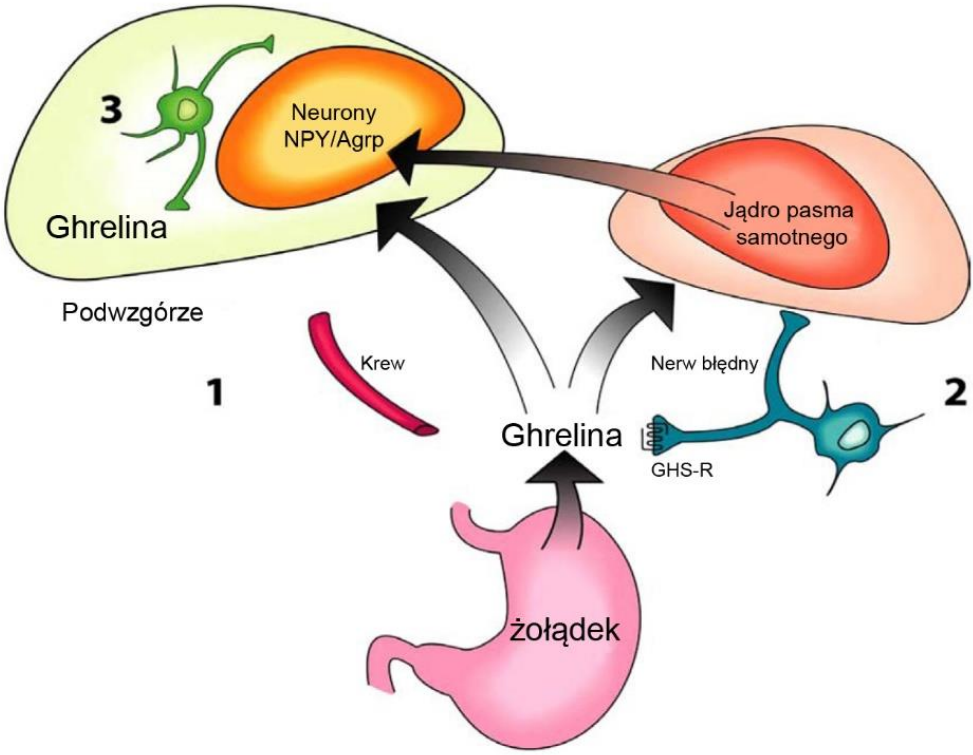
Poziom ghreliny w surowicy jest wysoki w okresie przedposiłkowym i obniża się do poziomu wyjściowego w przeciągu godziny od pobrania pokarmu [16, 56]. Fakt ten wspiera hipotezę o tym, że ghrelina może pełnić rolę czynnika inicjującego pobieranie pokarmu. Przedposiłkowy wzrost stężenia ghreliny w surowicy obserwowano również podczas dobrowolnego pobierania pokarmu nie spowodowanego głodem [15]. Ghrelina może być także uważana za sygnał głodu, gdyż istnieje pozytywna korelacja pomiędzy poziomem ghreliny w surowicy a stopniem odczuwania głodu. Poza tym, poposiłkowe obniżenie stężenia ghreliny w surowicy jest proporcjonalne do ilości pobranego pokarmu [8], co dodatkowo wzmacnia rolę ghreliny jako sygnału głodu.

Poziom ghreliny zmienia się w czasie dnia, szczególnie przed pobieraniem pokarmu oraz w nocy. Wysoki poziom ghreliny zostaje gwałtownie obniżony po pobraniu pokarmu co sugeruje, że ghrelina jest istotnym czynnikiem inicjującym pobieranie pokarmu [2, 16, 19, 47]. Wysoki poziom ghreliny u głodzonych zwierząt ulega obniżeniu w żołądku po wypełnieniu 50% roztworem glukozy, lecz nie zmienia się po wypełnieniu tą samą objętością wody, co również sugeruje, iż bodźcem hamującym wydzielanie ghreliny nie jest samo fizyczne rozciągnięcie ściany żołądka [55].

Ekspresja genu ghreliny w żołądku jest podwyższona podczas głodzenia i spada po podaniu leptyny oraz interleukiny 1B (IL-1B) [5, 33]. Ghrelina przyczynia się do utrzymania dodatniego bilansu energetycznego poprzez stymulację pobierania pokarmu, obniżenie wydatku energetycznego oraz hamowania anoreksji indukowanej IL-1B. Fakty te pozwalają sugerować potencjalne kliniczne wykorzystanie ghreliny w leczeniu anoreksji powstałej jako efekt uboczny zażywania niektórych leków, operacji chirurgicznych oraz jako symptom choroby nowotworowej lub AIDS.

Poziom krążącej ghreliny jest negatywnie skorelowany z BMI. Poziom ghreliny podczas głodzenia jest niższy u osób otyłych niż o osób o prawidłowym BMI, podczas gdy osoby z niskim BMI mają wysoki poziom ghreliny we krwi [55]. Sekrecja ghreliny jest wysoka w anoreksji i kacheksji, a jest obniżona w otyłości [15, 57]. Szczególnym wyjątkiem tej negatywnej korelacji pomiędzy BMI a ghreliną jest zespół Pradera-Williego, gdzie otyłość współwystępuje z wysokim poziomem ghreliny [23].

Obecnie opisywane są trzy różne ścieżki indukujące pobieranie pokarmu przez ghrelinę (**Ryc. 2**):



RYCINA 2. Trzy ścieżki oddziaływania ghreliny na regulację pobierania pokarmu. Rycina według: [40]
FIGURE 2. The three pathways of ghrelin's influence on food intake regulation. A figure according to [40]

1 Krążąca ghrelina osiąga i aktywuje oreksygenne neurony NPY/AgRP w obrębie jądra łukowatego podwzgórza oraz hamuje anoreksygenne neurony POMC i CART.

2 Krążąca lub produkowana lokalnie w żołądku ghrelina działa za pośrednictwem nerwu błędnego oraz jądra pasma samotnego, skąd sygnał przenoszony jest do podwzgórzowych jąder regulujących pobieranie pokarmu.

3 Ghrelina produkowana jest lokalnie w podwzgórzu [14], stymulując neurony NPY/AgRP jądra łukowatego oraz neurony okresyny w polu bocznym podwzgórza.

Ghrelina charakteryzuje się także właściwościami prokinetycznymi w obrębie przewodu pokarmowego. Obwodowe podanie ghreliny przyśpiesza opróżnianie żołądka u szczurów [54] oraz myszy [34], a także u człowieka [41].

GHRELINA W REGULACJI HOMEOSTAZY GLUKOZY

Ghrelina oraz jej receptor zostały także wykazane, zarówno na poziomie mRNA jak i białka, w obrębie trzustki, sugerując jej lokalną fizjologiczną rolę w kontekście aktywności tego gruczołu. Zaproponowano kilka mechanizmów regulacji tej aktywności przez ghrelinę i obecnie zgodnie przyjmuje się, że ghrelina reguluje sekrecję insuliny. Pomimo kilku sprzecznych doniesień, większość badań wykazuje hamujący wpływ ghreliny na sekrecję insuliny, w konsekwencji prowadząc do zwiększonego poziomu krążącej glukozy. Badania te wskazują zatem na istotną rolę ghreliny w regulacji homeostazy glukozy.

W tym kontekście, u zdrowych ludzi obserwowano odwrotną zależność pomiędzy poziomem krążącej ghreliny a insuliną [16], sugerującą hamujące sprzężenie zwrotne występujące między ghreliną a insuliną. I rzeczywiście, insulina obniża osoczowe stężenie krążącej ghreliny niezależnie od zmian stężenia glukozy [20]. Bezpośredni wpływ insuliny na wydzielanie ghreliny wykazano na izolowanych żołądkach szczura poddanych perfuzji [30]. Hamujący efekt insuliny jest natomiast sprawą dyskusyjną, ale rozbieżności mogą wynikać z różnych warunków eksperymentalnych [7].

Inne badania wykazały, że nokaut genowy ghreliny lub jej receptora nie zapobiega powstawaniu otyłości indukowanej dietą, lecz zwiększa insulinowrażliwość [17]. Myszy z nokautem ghreliny lub jej receptora poddane ubogokalorycznej diecie posiadają niski poziom glukozy we krwi w odniesieniu do myszy typu dzikiego, ten sam efekt obserwowano ostatnio u myszy z nokautem genu GOAT [62].

GHRELINA W UKŁADZIE ROZRODCZYM

Dostępna literatura wskazuje, że ghrelina reguluje kilka aspektów fizjologii rozrodu, częściowo poprzez odziaływania para- lub też autokrynowe. Najczęściej ghrelina wywiera hamujący wpływ na aktywność biologiczną gonad. W tym kontekście wykazano, że dokomorowa infuzja ghreliny hamuje częstotliwość pulsacyjnego uwalniania LH z przysadek owariektomizowanych szczurów oraz prowadzi do obniżenia stężenia LH w surowicy krwi [21]. Natomiast obwodowe podanie ghreliny nie wywołuje zmian w poziomie uwalniania LH i FSH u ludzi [48].

Obserwowano również zależny od dawki spadek sekrecji progesteronu i estradiolu indukowany ghreliną w hodowli ludzkich komórek ziarnistych [58]. Dodanie ghreliny do medium hamuje rozwój blastocysty, w ten sposób regulując

przedimplantacyjny rozwój zarodka [32]. Ghrelina nie wpływa na podstawowe wydzielanie testosteronu przez skrawki jądra szczura, jednakże hamuje stymulowane gonadotropiną kosmówkową (hCG) oraz cAMP sekrecję testosteronu [50]. Hamowanie sekrecji testosteronu koreluje z obniżeniem ekspresji kluczowych genów steroidogenezy, takich jak StAR, P450scc, 3beta-HSD, 17beta-HSD. Ghrelina wpływa również na sekrecję prolaktyny, z tym, że hamuje ona sekrecję prolaktyny u niedojrzałych płciowo samców szczura, a pobudza sekrecję prolaktyny u dojrzałych samców szczura oraz dorosłych ludzi [4, 49].

INNE FUNKCJE FIZJOLOGICZNE GHRELINY

W prezentowanej pracy skupiono się tylko na podstawowych funkcjach biologicznych wywieranych przez ghrelinę jednakże poznana rola fizjologiczna ghreliny jest znacznie szersza. I tak, ghrelina odgrywa też istotną rolę w regulacji układu sercowo-naczyniowego [51]. Prowadzi ona do wzrostu frakcji wyrzutowej serca, co powoduje zwiększenie wydolności mięśnia sercowego. Ghrelina obniża stopień apoptozy kardiomiocytów oraz powoduje spadek ciśnienia tętniczego krwi. Ghrelina uczestniczy w metabolizmie kości, pośrednio poprzez uwalnianie GH, ale też działając bezpośrednio na chondrocyty prowadzi do zwiększenia syntezy proteoglikanów oraz kwasu hialuronowego [11]. Reguluje ona również proliferację oraz apoptozę wielu typów komórek, w tym również pochodzenia nowotworowego. Zahamowanie proliferacji komórkowej pod wpływem ghreliny obserwowano w drobnokomórkowym raku płuc [10] oraz w nowotworach złośliwych tarczycy [59]. Ghrelina może wpływać hamująco na proces nowotworzenia, poprzez regulację czynników angiogenezy i spowolnienie proliferacji komórek śródbłonka [6, 13].Z drugiej strony istnieją doniesienia sugerujące o stymulującej roli ghreliny na proliferację linii komórkowej wywodzącej się z nowotworów nadnercza [38, 39].

LITERATURA

[1] ANDREWS PL, SANGER GJ. Abdominal vagal afferent neurones: an important target for the treatment of gastrointestinal dysfunction. *Curr Opin Pharmacol*. 2002; **2**(6): 650-6.

[2] ARIYASU H, TAKAYA K, TAGAMI T, OGAWA Y, HOSODA K, AKAMIZU T, et al. 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**(10): 4753-8.

[3] ARVAT E, DI VITO L, BROGLIO F, PAPOTTI M, MUCCIOLI G, DIEGUEZ C, et al. Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *J Endocrinol Invest*. 2000; **23**(8): 493-5.

[4] ARVAT E, MACCARIO M, DI VITO L, BROGLIO F, BENSO A, GOTTERO C, et al. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and in-

teractions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; **86**(3): 1169-74.

[5] ASAKAWA A, INUI A, KAGA T, YUZURIHA H, NAGATA T, UENO N, et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*. 2001; **120**(2): 337-45.

[6] BAIGUERA S, CONCONI MT, GUIDOLIN D, MAZZOCCHI G, MALENDOWICZ LK, PARNIGOTTO PP, et al. Ghrelin inhibits in vitro angiogenic activity of rat brain microvascular endothelial cells. *Int J Mol Med*. 2004; **14**(5): 849-54.

[7] CAIXAS A, BASHORE C, NASH W, PI-SUNYER F, LAFERRERE B. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; **87**(4): 1902.

[8] CALLAHAN HS, CUMMINGS DE, PEPE MS, BREEN PA, MATTHYS CC, WEIGLE DS. Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; **89**(3): 1319-24.

[9] CAMINOS JE, GUALILLO O, LAGO F, OTERO M, BLANCO M, GALLEGO R, et al. The endogenous growth hormone secretagogue (ghrelin) is synthesized and secreted by chondrocytes. *Endocrinology*. 2005; **146**(3): 1285-92.

[10] CASSONI P, ALLIA E, MARROCCO T, GHE C, GHIGO E, MUCCIOLI G, et al. Ghrelin and cortistatin in lung cancer: expression of peptides and related receptors in human primary tumors and in vitro effect on the H345 small cell carcinoma cell line. *J Endocrinol Invest*. 2006; **29**(9): 781-90.

[11] CASTANEDA TR, TONG J, DATTA R, CULLER M, TSCHOP MH. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol*. 2010; **31**(1): 44-60.

[12] CHEN HY, TRUMBAUER ME, CHEN AS, WEINGARTH DT, ADAMS JR, FRAZIER EG, et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology*. 2004; **145**(6): 2607-12.

[13] CONCONI MT, NICO B, GUIDOLIN D, BAIGUERA S, SPINAZZI R, REBUFFAT P, et al. Ghrelin inhibits FGF-2-mediated angiogenesis in vitro and in vivo. *Peptides*. 2004; **25**(12): 2179-85.

[14] COWLEY MA, SMITH RG, DIANO S, TSCHOP M, PRONCHUK N, GROVE KL, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 2003; **37**(4): 649-61.

[15] CUMMINGS DE, FRAYO RS, MARMONIER C, AUBERT R, CHAPELOT D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004; **287**(2): E297-304.

[16] 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**(8): 1714-9.

[17] DATE Y, NAKAZATO M, HASHIGUCHI S, DEZAKI K, MONDAL MS, HOSODA H, et al. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*. 2002; **51**(1): 124-9.

[18] DATE Y, NAKAZATO M, MURAKAMI N, KOJIMA M, KANGAWA K, MATSUKURA S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; **280**(3): 904-7.

[19] FAULCONBRIDGE LF, CUMMINGS DE, KAPLAN JM, GRILL HJ. Hyperphagic effects of brainstem ghrelin administration. *Diabetes*. 2003; **52**(9): 2260-5.

[20] FLANAGAN DE, EVANS ML, MONSOD TP, RIFE F, HEPTULLA RA, TAMBORLANE WV, et al. The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; **284**(2): E313-6.

[21] FURUTA M, FUNABASHI T, KIMURA F. Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; **288**(4): 780-5.

[22] GARCIA A, ALVAREZ CV, SMITH RG, DIEGUEZ C. Regulation of Pit-1 expression by ghrelin and GHRP-6 through the GH secretagogue receptor. *Mol Endocrinol*. 2001; **15**(9): 1484-95.

[23] GOLDSTONE AP. Prader-Willi syndrome: advances in genetics, pathophysiology and treatment. *Trends Endocrinol Metab*. 2004; **15**(1): 12-20.
[24] GOTO M, ARIMA H, WATANABE M, HAYASHI M, BANNO R, SATO I, et al. Ghrelin increases neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression in the arcuate nucleus in rat hypothalamic organotypic cultures. *Endocrinology*. 2006; **147**(11): 5102-9.
[25] HATAYA Y, AKAMIZU T, TAKAYA K, KANAMOTO N, ARIYASU H, SAIJO M, et al. A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; **86**(9): 4552.
[26] HEWSON AK, DICKSON SL. Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol*. 2000; **12**(11): 1047-9.
[27] HOLST B, BRANDT E, BACH A, HEDING A, SCHWARTZ TW. Nonpeptide and peptide growth hormone secretagogues act both as ghrelin receptor agonist and as positive or negative allosteric modulators of ghrelin signaling. *Mol Endocrinol*. 2005; **19**(9): 2400-11.
[28] HOLST B, CYGANKIEWICZ A, JENSEN TH, ANKERSEN M, SCHWARTZ TW. High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol*. 2003; **17**(11): 2201-10.
[29] JIANG H, BETANCOURT L, SMITH RG. Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Mol Endocrinol*. 2006; **20**(8): 1772-85.
[30] 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**(1-2): 77-81.
[31] KAMEGAI J, TAMURA H, SHIMIZU T, ISHII S, TATSUGUCHI A, SUGIHARA H, et al. 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**(8): 3731-8.
[32] KAWAMURA K, SATO N, FUKUDA J, KODAMA H, KUMAGAI J, TANIKAWA H, et al. Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology*. 2003; **144**(6): 2623-33.
[33] KIM MS, YOON CY, PARK KH, SHIN CS, PARK KS, KIM SY, et al. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *Neuroreport*. 2003; **14**(10): 1317-20.
[34] KITAZAWA T, DE SMET B, VERBEKE K, DEPOORTERE I, PEETERS TL. Gastric motor effects of peptide and non-peptide ghrelin agonists in mice in vivo and in vitro. *Gut*. 2005; **54**(8): 1078-84.
[35] 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**(4): 948-56.
[36] 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**(6762): 656-60.
[37] KOJIMA M, KANGAWA K. [Structure of ghrelin]. *Nihon Rinsho*. 2004; **62 Suppl 9**: 324-7.
[38] KOMAROWSKA H, RUCINSKI M, FICHNA M, BROMINSKA B, IZYCKI D, CZARNYWOJTEK A, et al. Changes in total and acylated ghrelin levels during mitotane treatment in patients with adrenocortical carcinoma. *Pol Arch Intern Med*. 2019; **129**(7-8): 469-75.
[39] KOMAROWSKA H, RUCINSKI M, TYCZEWSKA M, SAWICKA-GUTAJ N, SZYSZKA M, HERNIK A, et al. Ghrelin as a potential molecular marker of adrenal carcinogenesis: In vivo and in vitro evidence. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018; **89**(1): 36-45.
[40] KORBONITS M, GOLDSTONE AP, GUEORGUIEV M, GROSSMAN AB. Ghrelin--a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol*. 2004; **25**(1): 27-68.

[41] LEVIN F, EDHOLM T, SCHMIDT PT, GRYBACK P, JACOBSSON H, DEGERBLAD M, et al. Ghrelin stimulates gastric emptying and hunger in normal-weight humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; **91**(9): 3296-302.
[42] MURATA M, OKIMURA Y, IIDA K, MATSUMOTO M, SOWA H, KAJI H, et al. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem*. 2002; **277**(7): 5667-74.
[43] NAKAZATO M, MURAKAMI N, DATE Y, KOJIMA M, MATSUO H, KANGAWA K, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 2001; **409**(6817): 194-8.
[44] POPOVIC V, MILJIC D, MICIC D, DAMJANOVIC S, ARVAT E, GHIGO E, et al. Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; **88**(7): 3450-3.
[45] SAKATA I, YAMAZAKI M, INOUE K, HAYASHI Y, KANGAWA K, SAKAI T. Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion. *Neurosci Lett*. 2003; **342**(3): 183-6.
[46] SCHELLEKENS H, DINAN TG, CRYAN JF. Lean mean fat reducing "ghrelin" machine: hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. *Neuropharmacology*. 2010; **58**(1): 2-16.
[47] SHIIYA T, NAKAZATO M, MIZUTA M, DATE Y, MONDAL MS, TANAKA M, et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; **87**(1): 240-4.
[48] TAKAYA K, ARIYASU H, KANAMOTO N, IWAKURA H, YOSHIMOTO A, HARADA M, et al. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; **85**(12): 4908-11.
[49] TENA-SEMPERE M, AGUILAR E, FERNANDEZ-FERNANDEZ R, PINILLA L. Ghrelin inhibits prolactin secretion in prepubertal rats. *Neuroendocrinology*. 2004; **79**(3): 133-41.
[50] TENA-SEMPERE M, BARREIRO ML, GONZALEZ LC, GAYTAN F, ZHANG FP, CAMINOS JE, et al. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology*. 2002; **143**(2): 717-25.
[51] TESAURO M, SCHINZARI F, CARAMANTI M, LAURO R, CARDILLO C. Metabolic and cardiovascular effects of ghrelin. *Int J Pept*. 2010; **2010**.
[52] THEANDER-CARRILLO C, WIEDMER P, CETTOUR-ROSE P, NOGUEIRAS R, PEREZ-TILVE D, PFLUGER P, et al. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest*. 2006; **116**(7): 1983-93.
[53] TOSHINAI K, DATE Y, MURAKAMI N, SHIMADA M, MONDAL MS, SHIMBARA T, et al. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology*. 2003; **144**(4): 1506-12.
[54] TRUDEL L, TOMASETTO C, RIO MC, BOUIN M, PLOURDE V, EBERLING P, et al. Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002; **282**(6): G948-52.
[55] TSCHOP M, SMILEY DL, HEIMAN ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000; **407**(6806): 908-13.
[56] TSCHOP M, WAWARTA R, RIEPL RL, FRIEDRICH S, BIDLINGMAIER M, LANDGRAF R, et al. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*. 2001; **24**(6): RC19-21.
[57] VAN DER LELY AJ, TSCHOP M, HEIMAN ML, GHIGO E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev*. 2004; **25**(3): 426-57.
[58] VIANI I, VOTTERO A, TASSI F, CREMONINI G, SARTORI C, BERNASCONI S, et al. Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; **93**(4): 1476-81.

[59] VOLANTE M, ALLIA E, FULCHERI E, CASSONI P, GHIGO E, MUCCIOLI G, et al. Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor growth. *Am J Pathol*. 2003; **162**(2): 645-54.
[60] WANG L, SAINT-PIERRE DH, TACHE Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett*. 2002; **325**(1): 47-51.
[61] WILLIAMS DL, GRILL HJ, CUMMINGS DE, KAPLAN JM. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology*. 2003; **144**(12): 5184-7.
[62] ZHAO TJ, LIANG G, LI RL, XIE X, SLEEMAN MW, MURPHY AJ, et al. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; **107**(16): 7467-72.
[63] ZIGMAN JM, NAKANO Y, COPPARI R, BALTHASAR N, MARCUS JN, LEE CE, et al. Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest*. 2005; **115**(12): 3564-72.

Redaktor prowadzący − Michał Nowicki

Otrzymano: 03.12.2021
Przyjęto: 20.12.2021
Małgorzata Blatkiewicz
Zakład Histologii i Embriologii
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
Ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań
e-mail: mblatkiewicz@ump.edu.pl

REGULACJA SPLICINGU PRZEZ WYBRANE ELEMENTY CHROMATYNY

REGULATION OF SPLICING BY SELECTED COMPONENTS OF CHROMATIN

Helena KOSSOWSKA

Zakład Biologii Systemów, Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: Istotnym etapem ekspresji genów eukariotycznych jest ich składanie – inaczej splicing. Proces składania genów polega na usunięciu z prekursorowego mRNA intronów i połączeniu eksonów w dojrzały mRNA, który będzie stanowić matrycę do syntezy białka. Alternatywny splicing prowadzi do włączenia lub wyłączenia różnych fragmentów z pierwotnego transkryptu i powstania wielu izoform mRNA a w konsekwencji rożnych białek, więc jest głównym czynnikiem wpływającym na zróżnicowanie proteomu. Precyzyjna regulacja splicingu wymaga współdziałania elementów sekwencji prekursorowego mRNA oraz licznych czynników regulatorowych. Ponieważ proces składania genów zachodzi głównie kotranskrypcyjnie, duży wpływ na przebieg splicingu ma struktura chromatyny.
W niniejszej pracy zebrano informacje na temat roli podstawowych elementów struktury chromatyny w regulacji splicingu. Omówiono wpływ rozmieszczenia nukleosomów, wariantów histonów oraz modyfikacji potranslacyjnych na tempo elongacji polimerazy RNA II czy rekrutację czynników splicingowych.

Słowa kluczowe: splicing, chromatyna, modyfikacje histonów, nukleosomy, polimeraza RNA II

Summary: Splicing is an essential step in eukaryotic gene expression. It consists of removing introns from the precursor mRNA and connecting exons into mature mRNA, which will constitute the template for protein synthesis. Alternative splicing leads to the inclusion or exclusion of different fragments from the primary transcript and the formation of multiple mRNA isoforms resulting in different proteins, so it is a major factor in proteome diversity.
Precise regulation of splicing requires the interplay of precursor mRNA sequence elements and numerous regulatory factors. Since splicing occurs mainly co-transcriptionally, chromatin structure strongly affects this process.
This study presents the role of basic chromatin structure elements in the regulation of splicing. The influence of nucleosome positioning, histone variants and posttranslational modifications on the RNA polymerase II elongation rate or splicing factors recruitment is also reviewed.

Keywords: splicing, chromatin, histone modifications, nucleosomes, RNA polymerase II

WSTĘP

Geny eukariontów są nieciągłe: eksony, czyli sekwencje kodujące, mogą być rozdzielone intronami – sekwencjami niekodującymi, dlatego etap składania genów, inaczej splicing – jest kluczowy w procesie w ekspresji genów eukariotycznych. W czasie tego etapu z prekursorowego m+RNA (pre-mRNA) usuwane są fragmenty niekodujące a eksony są łączone w jedną nić, która będzie stanowić matrycę do syntezy białka. Proces składania genów jest głównym czynnikiem wpływającym na zróżnicowanie proteomu, ponieważ często prowadzi do powstania różnych cząsteczek mRNA z pojedynczego pre-mRNA mówimy wtedy o alternatywnym splicingu. Każda z izoform mRNA może być przepisywana na białka o odmiennej roli dla funkcjonowania komórki, tkanki i organizmu. W wyniku alternatywnego splicingu z około 20 000 genów człowieka powstaje ponad 100 000 różnych białek [86]. Regulacja splicingu musi być więc jednocześnie elastyczna i bardzo precyzyjna, aby zapewnić specyficzną dla tkanek różnorodność izoform mRNA oraz dynamiczną zmianę wzoru splicingu w odpowiedzi na bodźce. Aby doszło do poprawnego zdefiniowania, jaka sekwencja, w danych warunkach, powinna zostać włączona do dojrzałego mRNA, niezbędne jest współdziałanie czynników cis zawartych w sekwencji pre-mRNA oraz licznych czynników regulatorowych działających w układzie trans.

W komórkach eukariotycznych materiał genetyczny jest silnie upakowany w jądrze w postaci kompleksu nukleoproteinowego zwanego chromatyną. Wiele badań dowodzi, że proces składania genów zachodzi ko-transkrypcyjnie [63] i podobnie jak dla regulacji transkrypcji, tak i dla właściwego zarządzania splicingiem kluczowym elementem jest właśnie struktura chromatyny.

STRUKTURA CHROMATYNY

Podstawową, powtarzającą się jednostką chromatyny jest nukleosom, którego rdzeń stanowi osiem białek histonowych niemal dwukrotnie owiniętych przez helisę DNA o długości 146 par zasad [52]. Można wyróżnić pięć klas białek histonowych, cztery histony rdzeniowe (H2A, H2B, H3 i H4) oraz histon łącznikowy (H1/H5). Oktameryczna struktura rdzenia nukleosomu zbudowana jest z tetrameru utworzonego z dwóch dimerów H3-H4 i przyłączonych do nich dwóch dimerów H2A-H2B [52]. Sąsiadujące nukleosomy łączy odcinek DNA, który może mieć długość między 20, a 90 pz. zależnie od miejsca w genomie, typu komórki czy organizmu [81]. Z nukleosomem, poza jego rdzeniem, oddziałuje wspomniany już histon łącznikowy H1, tworząc chromatosom konieczny do powstawania in vivo wyższych struktur chromatyny [2]. Podstawowym zadaniem, jakie spełniają białka histonowe, jest tworzenie rusztowania, które zapewnia organizację,

kondensację DNA oraz odpowiednią regulację procesów związanych z jądrowym DNA wewnątrz jądra komórkowego.

Histony rdzeniowe zbudowane są z centralnej domeny globularnej zwanej zwinięciem histonowym (ang. *histone fold*), dzięki której mogą ze sobą oddziaływać, oraz nieustrukturyzowanej domeny końcowej, zwanej ogonem histonowym (ang. *histone tail*) zlokalizowanej na aminowym końcu białka. Histon H2A dodatkowo posiada taką domenę na końcu karboksylowym [9]. Histony są białkami silnie zasadowymi i bogate w grupy o dodatnim ładunku, które niekowalencyjnie oddziałują z ujemnie naładowanymi resztami fosforanowymi w DNA, co stabilizuje nukleosom. Ogony histonowe są wysunięte poza nukleosom i dzięki dużej zawartości glicyny są elastyczne, dlatego łatwo zmieniają ułożenie przestrzenne, przez co wpływają na oddziaływania histonów z DNA i innymi białkami [8].

Ogony histonów rdzeniowych mogą być modyfikowane poprzez kowalencyjne przyłączenie różnego typu grup chemicznych, jak np. grupa acetylowa, metylowa i fosforanowa, co prowadzi do zmian właściwości fizykochemicznych białek histonowych [3]. Modyfikacje potranslacyjne histonów wpływają na strukturę chromatyny, dlatego są jednym z kluczowych mechanizmów regulujących wiele procesów zależnych od jądrowego DNA. Odpowiadają między innymi za rekrutację wybranych białek niehistonowych do chromatyny, które z kolei pełnią rolę w regulacji licznych procesów biologicznych. Poznano wiele tego typu białek efektorowych, które rozpoznają modyfikacje histonowe zależnie od typu modyfikacji, miejsca wprowadzenia w białku histonowym oraz liczby modyfikacji [6, 51, 64]. Czasami modyfikacje potranslacyjne histonów mają odwrotny skutek – konkretne wzory modyfikacji mogą uniemożliwić białkom przyłączenie się [45]. Te obserwacje przyczyniły się do stworzenia, obecnie już dość dobrze udokumentowanej, hipotezy „kodu histonowego" [77], która mówi, że kombinacje modyfikacji histonów mogą nieść informacje umożliwiające precyzyjną regulację DNA-zależnych procesów. Modyfikacje te są nanoszone i usuwane przez szereg wyspecjalizowanych enzymów określanych odpowiednio jako „writers" i „erasers", natomiast interpretacją kodu histonowego zajmują się białka lub kompleksy białek efektorowych zwane „readers" [26, 77]. Kod histonowy jest częścią kodu epigenetycznego jednak nie jest jednoznaczny ani konserwowany między gatunkami. Jak do tej pory poznano ponad 20 rodzajów potranslacyjnych modyfikacji histonów [47], a liczba miejsc w ludzkich histonach, które mogą podlegać modyfikacjom, jest szacowana na ponad 130 [66], stąd liczba możliwych kombinacji tego typu modyfikacji daje potencjalnie ogromną „pojemność" kodu histonowego. Dodatkowo, niektóre modyfikacje mogą być wprowadzane lub usuwane bardzo szybko. Te wszystkie cechy utrudniają jednoznaczne określenie funkcji konkretnych modyfikacji lub ich kombinacji, co powoduje, że nasza wiedza na temat roli potranslacyjnych modyfikacji histonowych jest nadal zdecydowanie niepełna. Mimo to, bazując na dotychczasowych danych, można stwierdzić, że modyfikacje histonów regulują niemal wszystkie procesy zależne od jądrowego DNA.

SKŁADANIE GENÓW – SPLICING

Kluczowym dla funkcjonowania komórki procesem zachodzącym w środowisku chromatyny jest transkrypcja i bezpośrednio z nią związany etap składania mRNA. W większości przypadków splicing przeprowadzany jest przez duży kompleks rybonukleoproteinowy, zwany spliceosomem [50], który w trakcie obróbki pre-mRNA bardzo dynamicznie zmienia swoją konformację i skład podjednostkowy. W komórkach większości eukariontów współistnieją dwa kompleksy spliceosomowe, główny U2-zależny, który odpowiada za katalizę intronów typu U2 oraz zdecydowanie mniej liczny U12-zależny, kluczowy dla usuwania intronów typu U12, które stanowią mniej niż 0,5% wszystkich intronów w danym genomie [80]. Podstawowe składniki klasycznego spliceosomu to pięć kompleksów nukleoproteidowych tzw. małych jądrowych nukleoprotein (ang. *small nuclear ribonucleoproteins*, snRNPs): U1, U2, U4, U5 oraz U6 powstających z połączenia małych jądrowych RNA (ang. *small nuclear RN*A, snRNA) z białkami Sm lub LSm. Dodatkowo na różnych etapach składania genów w skład spliceosomu wchodzą liczne towarzyszące czynniki białkowe [89]. Skład białkowy spliceosomu bardzo dynamicznie się zmienia, u człowieka zidentyfikowano ponad 200 różnych białek budujących ten skomplikowany kompleks na różnych etapach jego aktywności [18].

Dokładne miejsce, w którym ma zajść cięcie pre-mRNA, jest wyznaczone przez sekwencje na obu końcach intronów zwane miejscami splicingowymi (ang. *Splicing Sites*). W przeważającej większości intronów na końcu 5' znajduje się sekwencja GU, a na końcu 3' – sekwencja AG, rzadziej występują introny z sekwencjami AU i AC, a poznanych jest więcej kombinacji [65]. Oprócz miejsc splicingowych do elementów ważnych dla przebiegu wycinania intronów należą także tzw. miejsce rozgałęzienia oraz trakt polipirymidynowy, oba znajdujące się niedaleko końca 3' intronu.

Na każdy cykl wycinania intronu składają się cztery kolejne etapy: złożenie spliceosomu, jego aktywacja, przeprowadzenie reakcji i rozpad kompleksu. Dekady badań biochemicznych, genetycznych a ostatnio także strukturalnych z wykorzystaniem mikroskopii krioelektronowej pozwoliły szczegółowo opisać konformacje, jakie w tym czasie przyjmuje kompleks spliceosomu [24, 84, 88, 89]. W uproszczeniu proces ten można opisać następująco. Splicing rozpoczyna się od utworzenia kompleksu spliceosomalnego E. W jego skład wchodzą: U1 snRNP, który łączy się do miejsca splicingowego 5' intronu, dwa czynniki pomocnicze U2AF65 i U2AF35 (ang. *U2 Auxiliary factor*), które wiążą się odpowiednio z traktem polipirymidynowym i miejscem splicingowym 3' a także czynnik splicingowy 1 (ang. *Splicing Factor* 1, SF1) przyłączający się do miejsca rozgałęzienia intronu. W wyniku zastąpienia SF1 przez U2 snRNP powstaje kompleks A. Kolejna zmiana konformacji, prowadząca do powstania kompleksu B, polega na przyłączeniu wcześniej uformowanej podjednostki składającej się trzech snRNP

U4/U6.U5. Ostatnim etapem jest odłączenie się U1 i U4, dzięki czemu U2 i U6 snRNP uzyskują aktywność katalityczną.

Ten cykl zmian konformacyjnych ma na celu zbliżenie do siebie miejsc splicingowych i umożliwienie aktywnym katalitycznie podjednostkom przeprowadzenie usunięcia intronu i kowalencyjnego połączenia eksonów. Dzieje się to w wyniku dwóch, następujących po sobie reakcji tarnsestryfikacji, po których następuje demontaż kompleksu. [24, 84, 88, 89].

Oprócz wymienianych wyżej podstawowych elementów, do prawidłowego formowania się kolejnych kompleksów spliceosomowych niezbędna jest energia pochodząca z hydrolizy ATP oraz zaangażowanie ogromnej liczby dodatkowych białek [18, 89]. Dla każdego intronu, który ma zostać wycięty, spliceosom musi zostać złożony od nowa z podstawowych elementów, co czyni ze splicingu bardzo skomplikowany i kosztowny energetycznie proces.

ALTERNATYWNY SPLICING

Dojrzałe transkrypty jednego genu mogą się od siebie znacząco różnić, jeśli na etapie splicingu dojdzie do wyboru różnych kombinacji miejsc splicingowych. Prowadzi to do włączenia lub wyłączenia różnych fragmentów z pierwotnego transkryptu i powstania wielu izoform mRNA, a następnie różnych białek. Ten proces zwany alternatywnym splicingiem umożliwia osiągnięcie ogromnej różnorodności proteomu przy ograniczonej liczbie genów.

Alternatywnemu składaniu ulega około 95% wieloeksonowych genów u człowieka [62] i ponad 60% u A. thaliana [53]. Proces ten odgrywa kluczową rolę na etapie różnicowania się komórek, kiedy na różnych poziomach rozwoju organizmu ekspresji ulegają inne izoformy mRNA a także w zapewnieniu specyficznego dla tkanek zestawu transkryptów a dalej białek.

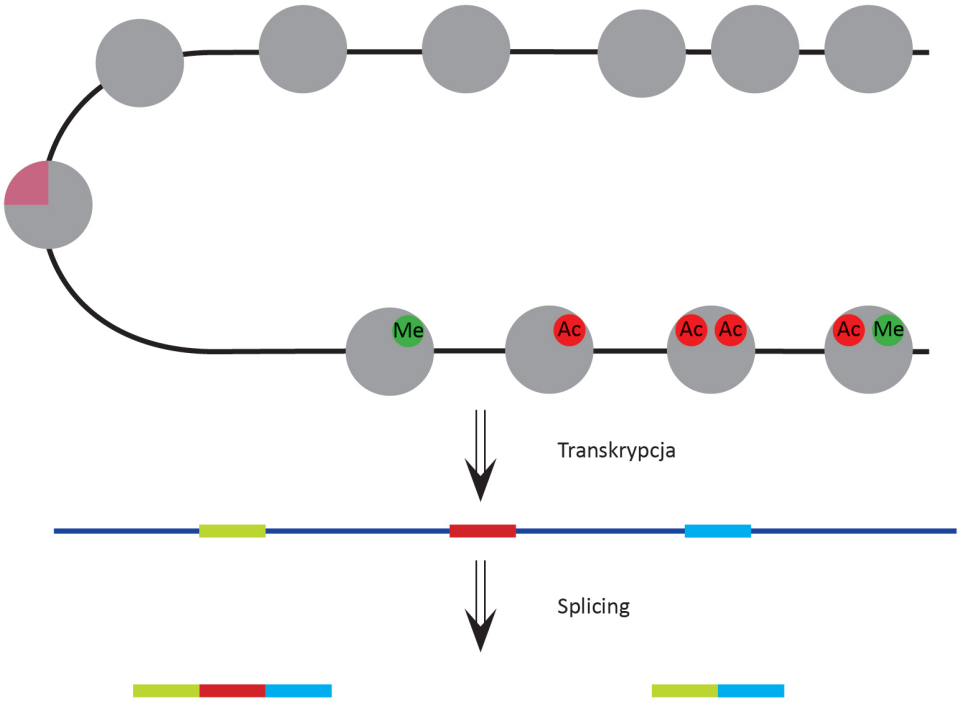
REGULACJA SPLICINGU

Regulacja splicingu odbywa się na wielu poziomach. Jednym z najlepiej zbadanych jest regulacja przez białka, które przyłączają się do różnych sekwencji w pre-mRNA i działają, jako represory lub aktywatory formowania się spliceosomu lub determinują wybór miejsc splicingowych [21]. Ogólnie można wyróżnić trzy główne grupy czynników splicingowych: białka SR (ang. *serine- and arginine-rich proteins*), zazwyczaj działające, jako aktywatory splicingu poprzez rekrutację spliceosomu do miejsc splicingowych; białka hnRNP – represory splicingu, które uniemożliwiają rozpoznanie miejsc splicingowych, oraz tkankowo-specyficzne czynniki splicingowe [15, 21]. Motywy rozpoznawane przez białka regulatorowe działające w układzie trans zwane są rejonami regulującymi splicing SRE (ang. *splicing regulatory elements*) i występują zarówno w intronach jak i eksonach. Czynniki splicingowe wiążące się do SRE mogą oddziaływać m. in z snRNP i promować lub hamować wybór miejsca splicingowego przez kompleks spliceosomu [13].

REGULACJA SPLICINGU PRZEZ ŚRODOWISKO CHROMATYNY

Pre-mRNA może podlegać dojrzewaniu po zakończeniu transkrypcji w tzw. skupiskach jądrowych [28], jednak w większości przypadków splicing zachodzi równolegle z syntezą pre-mRNA czyli ko-transkrypcyjnie (ang. *co-transcriptional splicing*) [63]. Kompleks spliceosomu łączy się z pre-mRNA i wybiera miejsca splicingowe jeszcze gdy transkrypt jest związany z polimerazą RNA II (RNA Pol II). Uznano więc, że kompleks polimerazy II RNA także może wpływać na przebieg splicingu.

W jądrze komórki eukariotycznej kompleks polimerazy RNA II odpowiada za syntezę mRNA i niektórych niekodujących RNA. Wiadomo, że struktura chromatyny jest jednym z podstawowych elementów wpływających na aktywność kompleksu Pol II RNA, który poza transkrypcją zaangażowany jest w regulację kolejnego ważnego etapu ekspresji genów – składania genów. Opisano dwa mo-



RYCINA 1. Schemat przedstawia wpływ modyfikacji epigenetycznych: różnego rozmieszczenia nukleosomów na DNA, wariantów histonów, acetylacji i metylacji histonów na przebieg splicingu
FIGURE 1. The scheme illustrates the effect of epigenetic modifications: different distribution of nucleosomes on DNA, histone variants, histones acetylation and methylation on splicing

dele wyjaśniające wpływ tej polimerazy na przebieg splicingu: rekrutacyjny (ang. *recruitment coupling*), oraz kinetyczny (ang. *kinetic coupling*) [30]. Pierwszy zakłada, że C-końcowa domena RNA Pol II – domena CTD stanowi platformę rekrutującą czynniki splicingowe, które odpowiadają za wybór miejsc splicingowych [19]. W modelu kinetycznym, kluczowym czynnikiem decydującym o wykorzystaniu konkurujących ze sobą miejsc splicingowych jest tempo elongacji transkrypcji. Ogólnie rzecz biorąc, wolniejsze tempo elongacji RNAPII zwiększa efektywność w rozpoznawaniu słabych miejsc splicingowych, co prowadzi do włączenia do mRNA alternatywnych eksonów [30, 55]. Z drugiej strony, dłużej trwająca elongacja umożliwia przyłączenie się negatywnych czynników splicingowych i w ten sposób pominięcie pewnych miejsc splicingowych [20].

Wiadomo też, że zmniejszenie tempa elongacji RNA Pol II jest istotnym czynnikiem determinującym splicing, szczególnie w przypadku wycinania intronów o niekanonicznej sekwencji miejsc splicingowych [5]. Zmiany w ogólnym tempie transkrypcji mają szeroki wpływ na wydajność splicingu, wskazując na ścisły związek i wzajemne zależności między syntezą mRNA i składaniem genów [11].

Aktywność polimerazy RNA II jest bez wątpienia kluczowa dla przebiegu procesu dojrzewania RNA, a czynniki, które na nią wpływają stanowią kolejny ważny poziom regulujący przebieg splicingu. Do takich czynników z pewnością zaliczają się histony budujące podstawowe elementy struktury chromatyny – nukleosomy (**Ryc. 1.**), których rola została opisana poniżej oraz metylacja DNA. Omówienie wpływu tej ostatniej modyfikacji epigenetycznej na ekspresję genów i dojrzewania mRNA wymagałoby osobnej pracy przeglądowej.

WPŁYW NUKLEOSOMÓW NA SPLICING

Nukleosomy nie są rozłożone równomiernie w genomie i choć zajmują jego większą część, istnieją regiony, w których nukleosomy występują mniej licznie lub wręcz wcale [78]. Nie są też rozmieszczone losowo. Ponieważ nukleososmy stanowią przeszkodę dla innych białek wiążących się do DNA, ich zubożenie w miejscach odpowiadającym regulatorowym sekwencjom DNA (promotory, enhancery i terminatory genów) umożliwia wiązanie się rozmaitym białkom regulatorowym z miejscami docelowymi [78].

O tym, jak na nici genomowego DNA rozłożone są nukleosomy, decyduje kilka czynników. Jednym z nich jest podatność helisy na owijanie się wokół oktameu histonowego, o czym w dużej mierze decyduje sekwencja DNA. Na pozycję nukleosomów na nici DNA ma wpływ także obecność wariantów histonowych oraz ich modyfikacje, metylacja DNA, a także przyłączenie się białek niehistonowych [16]. Do tej grupy należą ATP-zależne kompleksy remodelujące chromatynę, których rolą jest składanie i wymiana elementów rdzenia nukleosomu oraz przesuwanie nukleosomów wzdłuż nici DNA.

Definiowanie eksonów przez nukleosomy

Powstanie dojrzałego transkryptu zależy w dużej mierze od poprawnego rozpoznania przez spliceosom, który fragment pre-mRNA ma zostać do niego włączony. Jednym z elementów chromatyny odgrywających rolę w definiowaniu eksonów są nukleosomy, które znacznie częściej zlokalizowane są w obszarach eksonów niż intronów [70, 79]. To zjawisko, podobnie jak struktura oktameru histonowego budującego nukleosom, jest konserwowane ewolucyjnie [58].

Wykazano także, że zwiększona częstość występowania nukleosomów w eksonach, których sekwencje miejsc splicingowych są klasyfikowane jako słabe, prowadzi do częstszego ich włączania do mRNA [79]. Co więcej, nukleosomy częściej znajdują się na eksonach konstytutywnych – czyli takich, które występują we wszystkich izoformach mRNA powstałych z jednego genu, niż na alternatywnych. Stąd wniosek, że specyficzne pozycjonowanie nukleosomów w eksonach definiuje je i pomaga w rozpoznaniu przez spleceosom [70, 79].

Zaobserwowano, że w komórkach różnych organizmów w odpowiedzi na rozmaite bodźce następują zmiany w rozmieszczeniu nukleosomów, które korelują nie tylko ze zmianami w intensywności ekspresji genów, ale także z odmiennym wzorem splicingu [14, 39, 40, 96]. Taki efekt zauważono np. po stymulacji komórek raka piersi progesteronem, który powodował zmianę gęstości nukleosomów wokół alternatywnych eksonów oraz modyfikację splicingu prawie 250 eksonów [39]. Indukowany hormonalnie wzrost gęstości nukleosomów w eksonie korelował z jego częstszym włączaniem do mRNA. Natomiast eksony, które częściej były pomijane po stymulacji, charakteryzowały się małą gęstością nukleosomów nawet przed zastosowaniem hormonu [39].

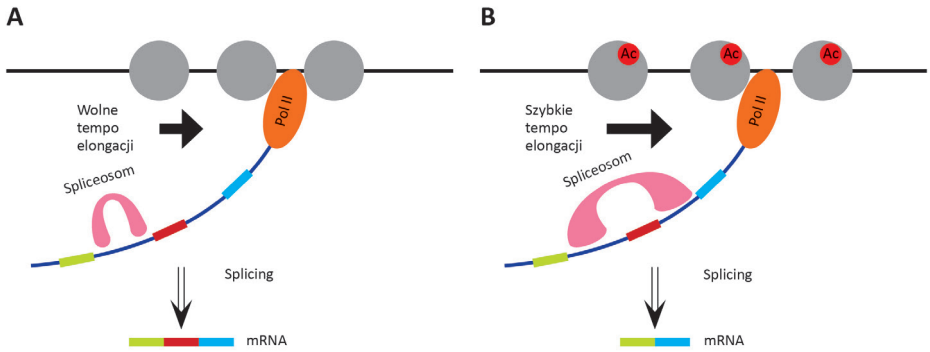
Zmiany w rozmieszczeniu nukleosomów stanowią bardzo istotny element regulacyjny splicingu, także w komórkach roślinnych, czego dowodem mogą być wyniki badań prowadzonych na Arabidopsis, które wskazują, że obserwowane w odpowiedzi na działanie chłodu zmiany rozmieszczenia nukleosomów modyfikują wzór splicingu różnych genów, w tym regulujących odpowiedź na chłód [14, 40].

Powyższe przykłady dowodzą, że przesunięcie nukleosomów może zmieniać układ granic intron/ekson i stanowi dodatkowy poziom kontroli nad tym, jaki zestaw miejsc splicingowych zostanie wykorzystany w określonych warunkach, a w efekcie jakie powstaną izoformy mRNA i białka umożliwiające komórkom właściwą reakcję na bodźce.

Wpływ nukleosomów na procesywność polimerazy RNA II

Rola nukleosomów w regulacji splicingu może wynikać z faktu, że stanowią one barierę dla polimerazy RNA II, więc ich rozmieszczenie wpływa na tempo elongacji [34] (**Ryc. 2**).

Opisane wyżej znakowanie eksonów przez nukleosomy, może tłumaczyć zaobserwowane w komórkach ludzkich niejednorodne tempo elongacji RNA Pol II wzdłuż genów, szybsze w obrębie intronów i wolniejsze wzdłuż eksonów [82].



RYCINA 2. Schemat przedstawia wpływ rozmieszczenia nukleosomów na DNA oraz acetylacji histonów rdzeniowych na tempo transkrypcji polimerazy RNA II i splicing. **A.** Deacetylowane histony rdzeniowe oraz gęściej rozmieszczone nukleosomy sprzyjają bardziej zwartej strukturze chromatyny co przyczynia się do wolniejszego tempa elongacji transkrypcji. Wynikiem tego spowolnienia polimerazy RNA II jest czas na rozpoznanie przez spliceosom słabiej zdefiniowanych miejsc splicingowych i włączenie alternatywnego eksonu 2 do mRNA. **B.** Rzadziej rozmieszczone nukleosomy oraz acetylacja histonów rdzeniowych charakteryzują otwartą chromatynę, która pozwala na szybsze tempo elongacji transkrypcji. spliceosom rozpoznaje wtedy przede wszystkim konsensusowe sekwencje miejsc splicingowych, skutkiem tego jest wykluczenie alternatywnego eksonu 2

FIGURE 2. The scheme illustrates the effect of nucleosome positioning on DNA and acetylation of core histones on RNA polymerase II transcription rate and splicing. **A.** Deacetylated core histones and more densely positioned nucleosomes contributes to more compact chromatin structure which causes a slower rate of transcription elongation. As a result of slowing down RNA polymerase II, the spliceosome has more time to recognize weak splicing sites and incorporate alternative exon 2 into the mRNA. **B.** Less frequently positioned nucleosomes and acetylation of core histones are typical for open chromatin, which allows for a higher rate of transcription elongation. The spliceosome then primarily recognizes consensus sequences of splicing sites, resulting in the exclusion of alternative exon 2

Nukleosomy wiążą czynniki zaangażowane w splicing

Ko-transkrypcyjny przebieg splicingu sprawia, że spliceosom składany jest i działa w bliskim sąsiedztwie chromatyny. Niektóre składniki spliceosomu są silnie wiązane przez nukleosomy, dzięki temu są łatwo dostępne, gdy zachodzi potrzeba przeprowadzenia wycięcia intronu [43].

Oddziaływanie czynników splicingowych i elementów podjednostek spliceosomu z chromatyną [73] i w wyniku tego ich obecność w bezpośredniej bliskości miejsca powstawania pre-mRNA ułatwia im szybkie przemieszczenie i oddziaływanie z nowo syntetyzowaną cząsteczką RNA i niemal natychmiastowy splicing. Przykładem takiego działania może być czynnik splicingowy SF3B1, istotny element kompleksu U2 snRNP, który wiąże się z nukleosomami zlokalizowanymi zwłaszcza w krótkich eksonach, otoczonych długimi intronami. A zaburzenie tego oddziaływania ma podobny wpływ na splicing krótkich eksonów, co utrata samego czynnika splicingowego [43]. Stąd wniosek, że specyficzne wiązanie SF3B1- nukleosom stanowi nie tylko informację ważną dla rozpoznania miejsc splicingowych, ale także umożliwia efektywne przeprowadzenia splicingu.

WPŁYW HISTONÓW NA SPLICING

Rolę regulacyjną można przypisać nie tylko pozycji nukleosomów na nici DNA ale także temu, z jakich wariantów histonowych zbudowana jest ta podstawowa jednostka chromatyny oraz czy histony zostały poddane modyfikacjom potranslacyjnym.

Warianty histonowe

W skład nukleosomu zazwyczaj wchodzą histony nazywane kanonicznymi, które powstają podczas fazy S cyklu komórkowego i łączą się do DNA po jego replikacji. Natomiast histony niekanoniczne, zwane też wariantami histonów rdzeniowych, syntetyzowane są w dowolnej fazie cyklu, niezależnie od replikacji i mogą zastępować kanoniczne białka. Warianty histonów różnią się od ich kanonicznych form pod względem sekwencji aminokwasowej. Wykorzystanie różnorodnych elementów do budowy chromatyny daje możliwość nadania specyficznych właściwości wybranym obszarom i wpływa na jej dynamikę [10]. Wiadomo już, że modyfikowanie własności chromatyny przez włączenie odpowiedniego wariantu histonowego do nukleosomu może regulować procesy zachodzące w środowisku chromatyny, w tym przebiegający kotranskrypcyjnie splicing (**Ryc. 1**). Do tej pory wykazano związek wariantów rdzeniowego histonu H2A, oraz histonu łącznikowego H1 z regulacją tego procesu.

Największa liczba wariantów histonowych należy do klasy H2A, a rola kilku z nich w regulacji przebiegu składania genów została dobrze udokumentowana.

Badania z wykorzystaniem drożdży wskazują, że obecność wariantu H2A.Z jest wymagana do efektywnego składania mRNA, szczególnie dla wycinania intronów z niekonsensusową sekwencją miejsc splicingowych i miejsca rozgałęzienia [59]. Histon H2A.Z promuje reorganizacje spliceosomu z udziałem podjednostki U2 snRNP. Jego utrata powoduje trwalsze wiązanie U2 snRNP i hamuje rekrutację kolejnych snRNPs do powstającego RNA, co zaburza splicing [57, 59].

Wyniki innych badań dowodzą, że w regulacji splicingu istotną rolę spełniają także warianty H2A pozbawione ogona na C-końcu, zwane krótkimi wariantami H2A (sH2A), takie jak H2A.B, H2A.L, H2A.P i H2A.Q [41, 75]. Te warianty pojawiły się późno w ewolucji i występują wyłącznie u ssaków łożyskowych, u których biorą udział przede wszystkim w spermatogenezie. Histon H2A.B ulega ekspresji na znacznym poziomie w jądrach i mózgu ssaków, gdzie może zastępować histon H2A.Z w obrębie aktywnych genów. H2A.B może wiązać liczne czynniki białkowe zaangażowane w syntezę i dojrzewanie RNA (np. czynniki splicingowe, składniki spliceosomu i RNA Pol II) albo konkurujące z nimi RNA [75]. Model opisujący rolę tego wariantu histonowego w splicingu zakłada, że po wprowadzeniu do nukleosomu H2A.B rozpoczyna się bezpośrednia rekrutacja czynników związanych z obróbką RNA, a następnie, gdy zajdzie synteza pre-mRNA, H2A.B wiąże transkrypt co uwalnia czynniki splicingowe i ułatwia właściwe składanie

genu [41]. Ponadto ten wariant histonu może wiązać się na granicach intron-ekson i zwiększać częstość włączania danego eksonu do mRNA [75]. Brak H2A.B u myszy powodował zmiany w lokalizacji RNA Pol II w jadrze komórkowym. W nieobecności tego wariantu histonowego rozmieszczenie RNA Pol II było rozproszone, a nie skoncentrowane w ciałkach jądrowych odpowiedzialnych za splicing. Obserwowano także znaczące zmiany we wzorze splicingu oraz obniżoną płodność zwierząt [4]. Być może więc wariant H2A.B odpowiada za rekrutację RNA Pol II w obszary aktywnej transkrypcji i składania genów.

Zauważono także że zwiększenie występowania wariantów sH2A w chromatynie powoduje destabilizację nukleosomów i zmiany we wzorze splicingu w licznych nowotworach, dlatego też niektórzy autorzy nazywają te niekanoniczne histony onkohistonami [17].

Także warianty histonu łącznikowego mogą zmieniać przebieg zdarzeń splicingowych. Z badań prowadzonych na ludzkich fibroblastach wynika, że obecność somatycznego wariantu H1.5 syntetyzowanego zależnie od replikacji w obrębie krótkich eksonów spowalnia polimerazę RNA II co sprzyja włączaniu tych alternatywnych eksonów do mRNA [29]. Także jeden z wariantów niezależnych od replikacji – H1X wydaje się mieć związek z regulacją splicingu, ponieważ, jak zaobserwowano w ludzkich komórkach nowotworu sutka, występuje częściej w rejonach włączanych do mRNA to jest w konstytutywnych eksonach lub alternatywnie włączonych eksonach i zachowanych intronach [56].

Wykazano także, że inny wariant histonu łącznikowego H1.0 oddziałuje z licznymi czynnikami regulującymi splicing w tym białkami SR i hnRNPs, co wskakuje na zaangażowanie tego histonu w splicing pre-mRNA [42].

Modyfikacje potranslacyjne histonów

Modyfikacje potranslacyjne histonów zmieniają fizykochemiczne własności chromatyny, przez co są ważnymi czynnikami regulującymi jej strukturę i wpływającymi na przebieg procesów zachodzących na matrycy DNA. Jak dotąd najwięcej wiemy o metylacji i acetylacji histonów i być może dlatego im przypisujemy największa rolę. Histony są metylowane przez metylotransferazy histonowe, które katalizują dodanie od jednej do trzech grup metylowych do reszt lizyny i jednej lub dwóch do argininy [71]. Reakcję usunięcia tej modyfikacji katalizują demetylazy histonowe [60]. Acetylacja natomiast jest chemiczną modyfikacją polegającą na przyłączeniu grupy acetylowej do lizyny znajdującej się w obrębie domeny globularnej lub ogona histonu. Acetylacja histonów jest regulowana przez acetylotransferazy i deacetylotransferazy histonowe.

Znaczenie obu modyfikacji w regulacji splicingu potwierdzają liczne publikacje, w których zaprezentowano wpływ zmian aktywności usuwających je enzymów na procesy regulacji ekspresji genów. I tak zmniejszenie aktywności enzymu KDM5B, który katalizuje demetylację H3K4me3, prowadziło do zmian we

wzorze splicingu prawie 600 alternatywnych eksonów [32]. Z kolei inhibicja deacetylazy histonów skutkowała zmianą wzorca splicingu około 700 genów [33].

Wiadomo już, że zarówno metylacja, jak i acetylacja histonów są ważne dla przebiegu składania mRNA u ssaków w czasie różnicowania komórek macierzystych [91] i rozwoju tkankowym [36], w prawidłowej odpowiedzi komórek na bodźce czy starzenia się tkanek [95]. Przybliżono także, rolę tych modyfikacji w splicingu w chorobach serca [27, 48, 95] i w komórkach nowotworowych [31, 54, 47].

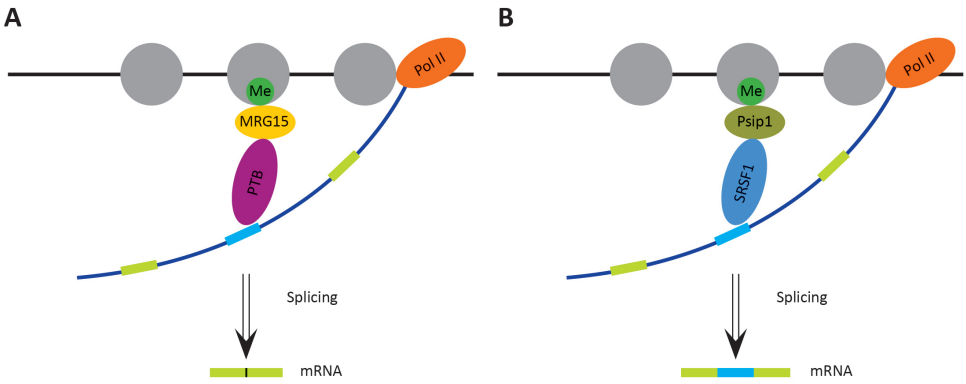
Związek modyfikacji histonów ze zmianami we wzorze splicingu został także zaobserwowany u wielu innych organizmów eukariotycznych, zarówno u jednokomórkowych drożdży [76], jak i złożonych organizmów, w tym roślin [61].

Analiza wyników obejmujących całogenomowe badania lokalizacji modyfikacji histonowych w chromatynie różnych ssaczych linii komórkowych wskazała, że rejony zawierające alternatywne eksony częściej włączane do mRNA były wzbogacone w H3K36me3, H3K9me3, H4K20me1 i H3K27me3 [22, 38, 44, 49, 72].

W innym badaniu stwierdzono, że zwiększona częstość występowania w chromatynie H3K4me3, H2BK12ac, H4K5ac wokół granicy intron-ekson silnie korelowała z procesem pomijania eksonów [72]. Jednak badania skoncentrowane na analizie dojrzewania transkryptów wybranego genu, przynoszą nierzadko odmienne wnioski. Takim przykładem może być składanie genu FGFR2, w którym zaobserwowano korelację występowania H3K36me3 i H3K4me1 z rzadszą inkorporacją do mRNA wzbogaconych w te modyfikacje eksonów[51]. Badacze powiązali natomiast zwiększoną ilość H3K4me3 z częstszym włączaniem alternatywnych eksonów genu FGFR2 [51].

Przedstawione powyżej przykłady wpływu modyfikacji histonowych na proces składania genów nie są jednoznaczne i nie wyczerpują tematu definiowania eksonów. Wydaje się, że to jak dana modyfikacja będzie interpretowana zależy od kontekstu, jakim może być np. typ komórki lub tkanki czy rodzaj bodźca wymuszający zmiany. Ponadto badania prowadzone w ostatnich latach z wykorzystaniem nowoczesnych technik bioinformatycznych wskazują, że analiza pojedynczych modyfikacji nie jest wystarczająca, by przewidzieć wzór splicingu. To raczej kombinacje kilku modyfikacji definiują eksony i wskazują, jak często dany fragment pre-mRNA powinien zostać włączony do dojrzałego transkryptu.

Pomimo przytoczonych niezgodności można już teraz powiedzieć, że wyniki badań nad kombinatorycznymi wzorcami modyfikacji histonów rdzeniowych wskazują, że na ich podstawie można z dużą dokładnością przyporządkować każdy z eksonów do grup nie tylko o niskim lub wysokim poziomie ekspresji [22], ale także do grup pośrednich [1]. Obecnie zdecydowanie uznaje się zaangażowanie modyfikacji histonowych w regulację splicingu pre-mRNA, choć ich rola nadal nie jest do końca wyjaśniona. Zaproponowano dwa modele tłumaczące, jak modyfikacje histonowe wpływają na maszynerię splicingową [94]. Oba zakładają, że modyfikacje histonów są odczytywane przez odpowiednie białko, które dalej, pośrednio lub



RYCINA 3. Wpływ trimetylacji lizyny 36 histonu H3 na przebieg alternatywnego splicingu. **A.** Białko MRG15 wiąże się z H3K36me3 i rekrutuje białko PTB hamujące splicing, promując w ten sposób pomijanie alternatywnego eksonu 2. **B.** Białko Psip1 wiążące się z H3K36me3 odpowiada za rekrutację czynnika splicingowego SRSF1, co skutkuje włączeniem alternatywnego eksonu 2
FIGURE 3. Effect of histone H3 trimethylation at lysine 36 on alternative splicing. **A.** The MRG15 protein binds to H3K36me3 and recruits the splicing-inhibiting PTB protein, thereby promoting alternative exon 2 exclusion. **B.** The Psip1 protein binding to H3K36me3 is responsible for recruiting the splicing factor SRSF1, resulting in the inclusion of the alternative exon 2

bezpośrednio, zmienia przebieg splicingu albo poprzez zmianę tempa transkrypcji albo przez rekrutację odpowiednich czynników splicingowych (**Ryc. 3**).

Poniżej przedstawiono kilka przykładów wpływu modyfikacji potranslacyjnych histonów na przebieg splicingu.

Metylacja histonów

Przykładem regulacji splicingu przez zmianę tempa elongacji polimerazy RNA II jest oddziaływanie trimetylowanej lizyny 9 histonu H3 (H3K9me3) z białkiem HP-1 (ang. *Heterochromatin protein 1*) [6], które poprzez modyfikację struktury chromatyny spowalniają enzym. W przypadku genu CD44 skutkuje to łatwiejszą rekrutacją czynników splicingowych, (m. in U2AF65 i PRP8) do alternatywnych eksonów, i ich włączeniem do mRNA [67, 92]. Warto wspomnieć o roli metylacji w procesie różnicowania neuronów, gdzie H3K9me2 i H3K27me3 regulują splicing genu NCAM (ang. *neural cell adhesion molecule*). Obecność tych modyfikacji jest odpowiedzialna za utrzymywaniu wzorców splicingu NCAM typowych dla dojrzałych neuronów i koreluje z niższym tempem elongacji polimerazy II w regionie alternatywnego eksonu 18 i włączeniem go do dojrzałego transkryptu [69].

Związanie HP-1 do metylowanych histonów w okolicy alternatywnych eksonów może mieć także odwrotny efekt do przedstawionego wyżej, jeśli promuje rekrutację czynnika splicingowego SRSF3 (ang. *serine/argininę-rich splicing factor 3*), który w tym przypadku działa negatywnie i hamuje włączenie alterna-

tywnych eksonów przez oddziaływanie z sekwencją wyciszającą splicing [92]. U ludzi białko HP-1 ma 3 izoformy, każda z nich może rekrutować różne czynniki splicingowe, stąd różnice we wzorze splicingu, który jest obserwowany mimo, że regulacja dotyczy tej samej modyfikacji histonowej.

Jako przykład regulacji splicingu przez zmianę w wiązaniu się białek do chromatyny należy wymienić trimetylację lizyny 3 histonu H3 (H3K36me3), która w dużej ilości występuje w ciałach aktywnie transkrybowanych genów. Zaobserwowano, że zmiana aktywności metylotransferazy, odpowiedzialnej za nanoszenie tej modyfikacji skutkowała zmianą niemal 200 zdarzeń splicingowych [93]. Poznano sposoby regulacji splicingu przez H3K36me3.

W rekrutacji czynników splicingowych w okolice dojrzewającego transkryptu pośredniczą białka bezpośrednio oddziałujące właśnie z H3K36me3. I tak białko MRG15 (ang. *MORF-related gene on chromosome 15*) odczytujące metylację lizyny 36 histonu H3 rekrutuje regulator splicingu, jakim jest białko wiążące się do traktu polipirymidynowego (ang. *polypyrimidine tract-binding*, PTB) w intronie pre-mRNA. Utworzenie się oddziaływań H3K36me3-MRG15-PTB promuje pominięcie alternatywnych eksonów [51] (**Ryc. 3A**). Jednym z genów, których składanie zależne jest od opisanego mechanizmu, jest FGFR2, ludzki gen, który podlega tkankowo-specyficznemu alternatywnemu splicingowy [12,87] i jest istotny dla wzrostu i inwazyjności nowotworów [38].

Innym czynnikiem splicingowym, który jest rekrutowany przez H3K36me3, jest SRSF1, a pośredniczy w tym czynnik białkowy Psip1 (ang. *PC4 and SF2 interacting protein* 1), który bezpośrednio wiąże się do trimetylowanej lizyny 36 histonu H3 [64]. Krótsza izoforma Psip/p52 oddziałuje i reguluje aktywność właśnie SRSF1, przez co moduluje przebieg splicingu (**Ryc. 3B**). Taki mechanizm został zaobserwowany zarówno w mysich fibroblastach [64], jak i ludzkich komórkach macierzystych [91].

Acetylacja histonów

Silny wpływ acetylacji histonów na splicing może wynikać z faktu, że modyfikacja ta prowadzi do rozluźnienia struktury chromatyny i wzrostu tempa elongacji prowadzonej przez polimerazę RNA II [83], co w konsekwencji sprzyja pominięciu alternatywnych eksonów (**Ryc. 2B**). Jest to szczególny przykład bezpośredniego wpływu modyfikacji histonów na tempo transkrypcji, bez zaangażowania dodatkowego białka odczytującego acetylację.

Taki mechanizm regulacji ekspresji wybranych izoform mRNA można zaobserwować dla wspomnianego już genu NCAM (ang. *Neural Cell Adhesion Molecule*). Istnieje prawie trzydzieści znanych wariantów splicingowych NCAM, jednak dwie główne izoformy obecnością alternatywnego eksonu 18. Depolaryzacja komórek neuronalnych indukuje hiperacetylację H3K9 wokół alternatywnego

eksonu. Powoduje to otwarcie struktury chromatyny, wzrost szybkości elongacji RNAPII i pominięcie tego eksonu [68].

Podobne badania przeprowadzono na genie kodującym neurofibrominę 1 (NF1), który jest supresorem nowotworów, zawierającym alternatywny ekson 23a. Zaobserwowano, że lokalna hiperacetylacja histonów wokół alternatywnych eksonów jest szczególnie wysoka w komórkach neuronalnych i prowadzi do zwiększenia szybkości transkrypcji i zmniejszonej częstości włączania alternatywnego eksonu [97].

Choć przykładów regulacji splicingu przez potranslacyjne modyfikacje histonów jest więcej niż te przytoczone powyżej, nasza wiedza na temat ich roli w składaniu genów jest wciąż daleka od ostatecznej. Z pewnością najbliższe lata przyniosą nowe odkrycia dotyczące ich funkcji w tym kluczowym etapie regulacji genów.

PODSUMOWANIE

Badania dowodzą, że epigenetyczne znaczniki nie tylko determinują który gen i z jaką intensywnością ma być transkrybowany, ale także określają sposób składania transkryptu (**Ryc. 1**)

Jednak wciąż w wielu przypadkach mechanizm, w którym czynniki związane z chromatyną wpływają na maszynerię przetwarzania mRNA pozostaje niejasny.

Aby elementy struktury chromatyny mogły wpływać na przebieg splicingu, konieczne jest zaangażowanie licznych białek takich jak polimeraza RNA II, czynniki wiążące DNA i RNA czy składniki spliceosomu, których współdziałanie prowadzi do zmian w tempie transkrypcji lub rekrutacji czynników splicingowych. Ta skomplikowana sieć czynników odpowiada za właściwą regulację splicingu w przebiegu wzrostu i rozwoju roślin [85] i zwierząt [36, 91] ale także w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne. Chromatyna bierze udział w integracji różnego rodzaju sygnałów z regulacją transkrypcji i splicingu. Odpowiednie modyfikacje struktury chromatyny prowadzące do ekspresji odmiennych izoform mRNA są istotnym elementem umożliwiającym prawidłową odpowiedź na bodźce fizjologiczne jak depolaryzacja błon neuronów [68].

Wiele danych potwierdza istotną rolę chromatyny w regulacji genów u roślin na poziomie dojrzewania mRNA w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne. Rośliny ze względu na osiadły tryb życia, muszą ciągle i dynamicznie dostosowywać się do warunków środowiskowych. Okazuje się, że istotnym elementem tolerancji roślin na zmieniające się warunki, jest właśnie regulacja genów na etapie alternatywnego splicingu, który z kolei regulowany jest przez epigenetyczne modyfikacje, wprowadzane do chromatyny w odpowiedzi na stresy biotyczne i abiotyczne [14, 25, 40, 46].

Obiecująca wydaje się możliwość wpływania na alternatywny splicing tak by sprzyjał poprawie wydajności i jakości plonów roślin użytkowych co ma kluczowe znaczenie dla światowego bezpieczeństwa żywnościowego [25].

Szeroko omawiane jest także znaczenie alternatywnego splicingu w chorobach, zwłaszcza nowotworach [74]. Wiadomo, że komórki nowotworowe charakteryzują się oprócz rozregulowanego splicingu także zmianami w strukturze chromatyny a zaburzenia epigenetyczne mogą stanowić cele terapeutyczne w leczeniu nowotworów [7]. Znane są już terapie łączące różne leki przeciwnowotworowe z inhibitorami deacetylaz histonowych [35]. Zaawansowane są także badania nad wykorzystaniem metylotransferaz i demetylaz histonowych w leczeniu nowotworów [47, 90]. Coraz więcej też wiadomo o związkach, które wpływają na odczytywanie modyfikacji histonowych przez białka efektorowe [98]. Być może w niedalekiej przyszłości możliwe będzie zastosowanie tego typu związków jako leków w nowoczesnych terapiach przeciwnowotworowych [98]. Należy także zaznaczyć, że także składniki samego spliceosomu, są obecnie rozpatrywane jako potencjalne cele terapeutyczne [23].

Chromatyna jest bardzo dynamiczną strukturą, w której w odpowiedzi na różne bodźce niezwykle szybko zachodzi przebudowa nukleosomów czy nanoszenie modyfikacji histonów. Ta cecha chromatyny jest kluczowa dla regulacji splicingu, gdy konieczne jest niezwłoczne wytworzenie innej izoformy białka w odpowiedzi na szybko zmieniające się warunki. Jednak związek pomiędzy architekturą chromatyny a przebiegiem splicingu wciąż pozostaje nie do końca poznanym zagadnieniem.

Szczegółowe zrozumienie wszystkich elementów zaangażowanych w regulację składania genów za pośrednictwem chromatyny jest zatem konieczne aby w pełni wykorzystać potencjał epigenetyki w medycynie czy rolnictwie.

LITERATURA

[1] Agirre E, Oldfield AJ, Bellora N, Segelle A, Luco RF. Splicing-associated chromatin signatures: a combinatorial and position-dependent role for histone marks in splicing definition. *Nat. Commun.*, 2021; **12**: 682.

[2] Allan J, Cowling GJ, Harborne N, Cattini P, Craigie R, Gould H. Regulation of the higher-order structure of chromatin by histones H1 and H5. *J. Cell Biol.*, 1981; **90**: 279-288.

[3] Andreoli F, Del Rio A. Physicochemical modifications of histones and their impact on epigenomics. *Drug Discov. Today*, 2014; **19**: 1372-1379.

[4] Anuar ND, Kurscheid S, Field M, Zhang L, Rebar E, Gregory P, Buchou T, Bowles J, Koopman P, Tremethick DJ, Soboleva TA. Gene editing of the multi-copy H2A.B gene and its importance for fertility. *Genome Biol.*, 2019; **20**: 23.

[5] Aslanzadeh V, Huang Y, Sanguinetti G, Beggs JD. Transcription rate strongly affects splicing fidelity and cotranscriptionality in budding yeast. *Genome Res.*, 2018; **28**: 203-213.

[6] Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 2001; **410**: 120-124.
[7] Bates SE. Epigenetic Therapies for Cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2020; **383**: 650-663.
[8] Bendandi A, Patelli AS, Diaspro A, Rocchia W. The role of histone tails in nucleosome stability: An electrostatic perspective. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 2020; **18**: 2799-2809.
[9] Biswas M, Voltz K, Smith JC, Langowski J. Role of Histone Tails in Structural Stability of the Nucleosome. *PLoS Comput. Biol.*, 2011; **7**: e1002279.
[10] Buschbeck M, Hake SB. Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2017; **18**: 299-314.
[11] Carrillo Oesterreich F, Herzel L, Straube K, Hujer K, Howard J, Neugebauer KM. Splicing of Nascent RNA Coincides with Intron Exit from RNA Polymerase II. *Cell*, 2016; **165**: 372-381.
[12] Carstens RP, Wagner EJ, Garcia-Blanco MA. An intronic splicing silencer causes skipping of the IIIb exon of fibroblast growth factor receptor 2 through involvement of polypyrimidine tract binding protein. *Mol. Cell. Biol.*, 2000; **20**: 7388-7400.
[13] Chasin LA. Searching for Splicing Motifs. W: Alternative Splicing in the Postgenomic Era. red.: B.J. Blencowe, B.R. Graveley. Springer New York, New York, NY 2007, 85-106.
[14] Chaudhary S, Jabre I, Syed NH. Epigenetic differences in an identical genetic background modulate alternative splicing in A. thaliana. *Genomics*, 2021; **113**: 3476-3486.
[15] Chen M, Manley JL. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009; **10**: 741-754.
[16] Chereji RV, Clark DJ. Major Determinants of Nucleosome Positioning. *Biophys. J.*, 2018; **114**: 2279-2289.
[17] Chew GL, Bleakley M, Bradley RK, Malik HS, Henikoff S, Molaro A, Sarthy J. Short H2A histone variants are expressed in cancer. *Nat. Commun.*, 2021; **12**: 490.
[18] Cvitkovic I, Jurica MS. Spliceosome Database: a tool for tracking components of the spliceosome. *Nucleic Acids Res.*, 2013; **41**: D132-D141.
[19] Das R, Yu J, Zhang Z, Gygi MP, Krainer AR, Gygi SP, Reed R. SR Proteins Function in Coupling RNAP II Transcription to Pre-mRNA Splicing. *Mol. Cell*, 2007; **26**: 867-881.
[20] Dujardin G, Lafaille C, de la Mata M, Marasco LE, Muñoz MJ, Le Jossic-Corcos C, Corcos L, Kornblihtt AR. How Slow RNA Polymerase II Elongation Favors Alternative Exon Skipping. *Mol. Cell*, 2014; **54**: 683-690.
[21] Dvinge H. Regulation of alternative mRNA splicing: old players and new perspectives. *FEBS Lett.*, 2018; **592**: 2987-3006.
[22] Enroth S, Bornelöv S, Wadelius C, Komorowski J. Combinations of Histone Modifications Mark Exon Inclusion Levels. *PLoS ONE*, 2012; **7**: e29911.
[23] Eymin B. Targeting the spliceosome machinery: A new therapeutic axis in cancer? *Biochem. Pharmacol.*, 2021; **189**: 114039.
[24] Galej WP, Nguyen THD, Newman AJ, Nagai K. Structural studies of the spliceosome: zooming into the heart of the machine. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2014; **25**: 57-66.
[25] Ganie SA, Reddy ASN. Stress-Induced Changes in Alternative Splicing Landscape in Rice: Functional Significance of Splice Isoforms in Stress Tolerance. *Biology*, 2021; **10**: 309.
[26] Gardner KE, Allis CD, Strahl BD. OPERating ON Chromatin, a Colorful Language where Context Matters. *J. Mol. Biol.*, 2011; **409**: 36-46.
[27] Gilsbach R, Schwaderer M, Preissl S, Grüning BA, Kranzhöfer D, Schneider P, Nührenberg TG, Mulero-Navarro S, Weichenhan D, Braun C, Dressen M, Jacobs AR, Lahm H, Doenst T, Backofen R, i wsp. Distinct epigenetic programs regulate cardiac myocyte development and disease in the human heart in vivo. *Nat. Commun.*, 2018; **9**: 391.

[28] Girard C, Will CL, Peng J, Makarov EM, Kastner B, Lemm I, Urlaub H, Hartmuth K, Lührmann R. Post-transcriptional spliceosomes are retained in nuclear speckles until splicing completion. *Nat. Commun.*, 2012; **3**: 994.
[29] Glaich O, Leader Y, Lev Maor G, Ast G. Histone H1.5 binds over splice sites in chromatin and regulates alternative splicing. *Nucleic Acids Res.*, 2019; **47**: 6145-6159.
[30] Godoy Herz MA, Kornblihtt AR. Alternative Splicing and Transcription Elongation in Plants. *Front. Plant Sci.*, 2019; **10**: 309.
[31] Guo T, Zambo KDA, Zamuner FT, Ou T, Hopkins C, Kelley DZ, Wulf HA, Winkler E, Erbe R, Danilova L, Considine M, Sidransky D, Favorov A, Florea L, Fertig EJ, i wsp. Chromatin structure regulates cancer-specific alternative splicing events in primary HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Epigenetics*, 2020; **15**: 959-971.
[32] He R, Kidder BL. H3K4 demethylase KDM5B regulates global dynamics of transcription elongation and alternative splicing in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.*, 2017; **45**: 6427-6441.
[33] Hnilicová J, Hozeifi S, Dušková E, Icha J, Tománková T, Staněk D. Histone Deacetylase Activity Modulates Alternative Splicing. *PLoS ONE*, 2011; **6**: e16727.
[34] Hodges C, Bintu L, Lubkowska L, Kashlev M, Bustamante C. Nucleosomal Fluctuations Govern the Transcription Dynamics of RNA Polymerase II. *Science*, 2009; **325**: 626-628.
[35] Hontecillas-Prieto L, Flores-Campos R, Silver A, de Álava E, Hajji N, García-Domínguez DJ. Synergistic Enhancement of Cancer Therapy Using HDAC Inhibitors: Opportunity for Clinical Trials. *Front. Genet.*, 2020; **11**: 578011.
[36] Hu Q, Greene CS, Heller EA. Specific histone modifications associate with alternative exon selection during mammalian development. *Nucleic Acids Res.*, 2020; **48**: 4709-4724.
[37] Hu Q, Kim EJ, Feng J, Grant GR, Heller EA. Histone posttranslational modifications predict specific alternative exon subtypes in mammalian brain. *PLOS Comput. Biol.*, 2017; **13**: e1005602.
[38] Huang T, Liu D, Wang Y, Li P, Sun L, Xiong H, Dai Y, Zou M, Yuan X, Qiu H. FGFR2 Promotes Gastric Cancer Progression by Inhibiting the Expression of Thrombospondin4 via PI3K-Akt-Mtor Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2018; **50**: 1332-1345.
[39] Iannone C, Pohl A, Papasaikas P, Soronellas D, Vicent GP, Beato M, ValcáRcel J. Relationship between nucleosome positioning and progesterone-induced alternative splicing in breast cancer cells. *RNA*, 2015; **21**: 360-374.
[40] Jabre I, Chaudhary S, Guo W, Kalyna M, Reddy ASN, Chen W, Zhang R, Wilson C, Syed NH. Differential nucleosome occupancy modulates alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, 2021; **229**: 1937-1945.
[41] Jiang X, Soboleva TA, Tremethick DJ. Short Histone H2A Variants: Small in Stature but not in Function. *Cells*, 2020; **9**: 867.
[42] Kalashnikova AA, Winkler DD, McBryant SJ, Henderson RK, Herman JA, DeLuca JG, Luger K, Prenni JE, Hansen JC. Linker histone H1.0 interacts with an extensive network of proteins found in the nucleolus. *Nucleic Acids Res.*, 2013; **41**: 4026-4035.
[43] Kfir N, Lev-Maor G, Glaich O, Alajem A, Datta A, Sze SK, Meshorer E, Ast G. SF3B1 Association with Chromatin Determines Splicing Outcomes. *Cell Rep.*, 2015; **11**: 618-629.
[44] Kolasinska-Zwierz P, Down T, Latorre I, Liu T, Liu XS, Ahringer J. Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nat. Genet.*, 2009; **41**: 376-381.
[45] Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 2007; **128**: 693-705.
[46] [46] Lämke J, Bäurle I. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biol.*, 2017; **18**: 124.
[47] Li W, Wu H, Sui S, Wang Q, Xu S, Pang D. Targeting Histone Modifications in Breast Cancer: A Precise Weapon on the Way. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021; **9**: 736935.
[48] Liu CF, Tang WHW. Epigenetics in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *JACC Basic Transl. Sci.*, 2019; **4**: 976-993.

[49] Liu H, Jin T, Guan J, Zhou S. Histone modifications involved in cassette exon inclusions: a quantitative and interpretable analysis. *BMC Genomics*, 2014; **15**: 1148.
[50] Lorković ZJ, Wieczorek Kirk DA, Lambermon MH, Filipowicz W. Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends Plant Sci.*, 2000; **5**: 160-167.
[51] Luco RF, Pan Q, Tominaga K, Blencowe BJ, Pereira-Smith OM, Misteli T. Regulation of Alternative Splicing by Histone Modifications. *Science*, 2010; **327**: 996-1000.
[52] Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 1997; **389**: 251-260.
[53] Marquez Y, Brown JWS, Simpson C, Barta A, Kalyna M. Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis*. *Genome Res.*, 2012; **22**: 1184-1195.
[54] Marsh DJ, Shah JS, Cole AJ. Histones and Their Modifications in Ovarian Cancer â€“ Drivers of Disease and Therapeutic Targets. *Front. Oncol.*, 2014; **4**.
[55] de la Mata M, Alonso CR, Kadener S, Fededa JP, Blaustein M, Pelisch F, Cramer P, Bentley D, Kornblihtt AR. A Slow RNA Polymerase II Affects Alternative Splicing In Vivo. *Mol. Cell*, 2003; **12**: 525-532.
[56] Mayor R, Izquierdo-Bouldstridge A, Millán-Ariño L, Bustillos A, Sampaio C, Luque N, Jordan A. Genome Distribution of Replication-independent Histone H1 Variants Shows H1.0 Associated with Nucleolar Domains and H1X Associated with RNA Polymerase II-enriched Regions. *J. Biol. Chem.*, 2015; **290**: 7474-7491.
[57] Neves LT, Douglass S, Spreafico R, Venkataramanan S, Kress TL, Johnson TL. The histone variant H2A.Z promotes efficient cotranscriptional splicing in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.*, 2017; **31**: 702-717.
[58] Nishida H. Nucleosome Positioning. *ISRN Mol. Biol.*, 2012; **2012**: 1-5.
[59] Nissen KE, Homer CM, Ryan CJ, Shales M, Krogan NJ, Patrick KL, Guthrie C. The histone variant H2A.Z promotes splicing of weak introns. *Genes Dev.*, 2017; **31**: 688-701.
[60] Niu Y, Bai J, Zheng S. The Regulation and Function of Histone Methylation. *J. Plant Biol.*, 2018; **61**: 347-357.
[61] Pajoro A, Severing E, Angenent GC, Immink RGH. Histone H3 lysine 36 methylation affects temperature-induced alternative splicing and flowering in plants. *Genome Biol.*, 2017; **18**: 102.
[62] Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.*, 2008; **40**: 1413-1415.
[63] Pandya-Jones A, Black DL. Co-transcriptional splicing of constitutive and alternative exons. *RNA*, 2009; **15**: 1896-1908.
[64] Pradeepa MM, Sutherland HG, Ule J, Grimes GR, Bickmore WA. Psip1/Ledgf p52 Binds Methylated Histone H3K36 and Splicing Factors and Contributes to the Regulation of Alternative Splicing. *PLoS Genet.*, 2012; **8**: e1002717.
[65] Qu W, Cingolani P, Zeeberg BR, Ruden DM. A Bioinformatics-Based Alternative mRNA Splicing Code that May Explain Some Disease Mutations Is Conserved in Animals. *Front. Genet.*, 2017; **8**.
[66] Rahhal R, Seto E. Emerging roles of histone modifications and HDACs in RNA splicing. *Nucleic Acids Res.*, 2019; **47**: 4911-4926.
[67] Saint-André V, Batsché E, Rachez C, Muchardt C. Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1γ favor inclusion of alternative exons. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2011; **18**: 337-344.
[68] Schor IE, Rascovan N, Pelisch F, Allo M, Kornblihtt AR. Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2009; **106**: 4325-4330.
[69] Schor IE, Fiszbein A, Petrillo E, Kornblihtt AR. Intragenic epigenetic changes modulate NCAM alternative splicing in neuronal differentiation. *EMBO J.*, 2013; **32**: 2264-2274.
[70] Schwartz S, Meshorer E, Ast G. Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009; **16**: 990-995.

[71] Shilatifard A. Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression. *Annu. Rev. Biochem.*, 2006; **75**: 243-269.
[72] Shindo Y, Nozaki T, Saito R, Tomita M. Computational analysis of associations between alternative splicing and histone modifications. *FEBS Lett.*, 2013; **587**: 516-521.
[73] [73] Sims RJ, Millhouse S, Chen CF, Lewis BA, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Manley JL, Reinberg D. Recognition of Trimethylated Histone H3 Lysine 4 Facilitates the Recruitment of Transcription Postinitiation Factors and Pre-mRNA Splicing. *Mol. Cell*, 2007; **28**: 665-676.
[74] Singh B, Eyras E. The role of alternative splicing in cancer. *Transcription*, 2017; **8**: 91-98.
[75] Soboleva TA, Parker BJ, Nekrasov M, Hart-Smith G, Tay YJ, Tng WQ, Wilkins M, Ryan D, Tremethick DJ. A new link between transcriptional initiation and pre-mRNA splicing: The RNA binding histone variant H2A.B. *PLOS Genet.*, 2017; **13**: e1006633.
[76]] Sorenson MR, Jha DK, Ucles SA, Flood DM, Strahl BD, Stevens SW, Kress TL. Histone H3K36 methylation regulates pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Biol.*, 2016; **13**: 412-426.
[77] Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000; **403**: 41-45.
[78] Struhl K, Segal E. Determinants of nucleosome positioning. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2013; **20**: 267-273.
[79] Tilgner H, Nikolaou C, Althammer S, Sammeth M, Beato M, Valcárcel J, Guigó R. Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009; **16**: 996-1001.
[80] Turunen JJ, Niemelä EH, Verma B, Frilander MJ. The significant other: splicing by the minor spliceosome. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 2013; **4**: 61-76.
[81] Van Holde KE. Chromatin. Springer, New York Heidelberg 1989.
[82] Veloso A, Kirkconnell KS, Magnuson B, Biewen B, Paulsen MT, Wilson TE, Ljungman M. Rate of elongation by RNA polymerase II is associated with specific gene features and epigenetic modifications. *Genome Res.*, 2014; **24**: 896-905.
[83] Verdin E, Ott M. 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2015; **16**: 258-264.
[84] Wan R, Bai R, Zhan X, Shi Y. How Is Precursor Messenger RNA Spliced by the Spliceosome? *Annu. Rev. Biochem.*, 2020; **89**: 333-358.
[85] Wang YY, Xiong F, Ren QP, Wang XL. Regulation of flowering transition by alternative splicing: the role of the U2 auxiliary factor. *J. Exp. Bot.*, 2019; erz416.
[86] Wang Z, Burge CB. Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*, 2008; **14**: 802-813.
[87] Warzecha CC, Sato TK, Nabet B, Hogenesch JB, Carstens RP. ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell-type-specific regulators of FGFR2 splicing. *Mol. Cell*, 2009; **33**: 591-601.
[88] Wilkinson ME, Charenton C, Nagai K. RNA Splicing by the Spliceosome. *Annu. Rev. Biochem.*, 2020; **89**: 359-388.
[89] Will CL, Luhrmann R. Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2011; **3**: a003707-a003707.
[90] Xiao C, Fan T, Tian H, Zheng Y, Zhou Z, Li S, Li C, He J. H3K36 trimethylation-mediated biological functions in cancer. *Clin. Epigenetics*, 2021; **13**: 199.
[91] Xu Y, Zhao W, Olson SD, Prabhakara KS, Zhou X. Alternative splicing links histone modifications to stem cell fate decision. *Genome Biol.*, 2018; **19**: 133.
[92] Yearim A, Gelfman S, Shayevitch R, Melcer S, Glaich O, Mallm JP, Nissim-Rafinia M, Cohen AHS, Rippe K, Meshorer E, Ast G. HP1 is involved in regulating the global impact of DNA methylation on alternative splicing. *Cell Rep.*, 2015; **10**: 1122-1134.
[93] Yuan H, Li N, Fu D, Ren J, Hui J, Peng J, Liu Y, Qiu T, Jiang M, Pan Q, Han Y, Wang X, Li Q, Qin J. Histone methyltransferase SETD2 modulates alternative splicing to inhibit intestinal tumorigenesis. *J. Clin. Invest.*, 2017; **127**: 3375-3391.

[94] Zhang J, Zhang YZ, Jiang J, Duan CG. The Crosstalk Between Epigenetic Mechanisms and Alternative RNA Processing Regulation. *Front. Genet.*, 2020; **11**: 998.
[95] Zhang W, Song M, Qu J, Liu GH. Epigenetic Modifications in Cardiovascular Aging and Diseases. *Circ. Res.*, 2018; **123**: 773-786.
[96] Zhao Z, Dammert MA, Hoppe S, Bierhoff H, Grummt I. Heat shock represses rRNA synthesis by inactivation of TIF-IA and lncRNA-dependent changes in nucleosome positioning. *Nucleic Acids Res.*, 2016; **44**: 8144-8152.
[97] Zhou HL, Hinman MN, Barron VA, Geng C, Zhou G, Luo G, Siegel RE, Lou H. Hu proteins regulate alternative splicing by inducing localized histone hyperacetylation in an RNA-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011; **108**: E627-E635.
[98] Zhu H, Wei T, Cai Y, Jin J. Small Molecules Targeting the Specific Domains of Histone-Mark Readers in Cancer Therapy. *Molecules*, 2020; **25**: 578.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 02.12.2021
Przyjęto: 21.12.2021
Helena Kossowska
Zakład Biologii Systemów
Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski
ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa
e-mail: h.kossowska@uw.edu.pl
tel.: 48 22 592 24 12

WPŁYW WIRUSÓW NA PATOGENEZĘ WYBRANYCH CHORÓB AUTOIMMUNOLOGICZNYCH SKÓRY – SYSTEMATYCZNY PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

THE INFLUENCE OF VIRUSES ON PATHOGENESIS OF AUTOIMMUNE SKIN DISEASES – SYSTEMATIC REVIEW

Aleksandra STĘPIEŃ[1,2], Anna MALICKA-DURCZAK[1,2], Magdalena TOMALA[1,2], Andrzej MARSZAŁEK[1,2]

[1]Katedra i Zakład Patologii i Profilaktyki Nowotworów, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu
[2]Zakład Patologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii

Streszczenie: Choroby autoimmunologiczne to grupa schorzeń, w których dochodzi do uszkodzenia tkanek własnych organizmu przez autoreaktywne komórki lub przeciwciała. Zapadalność na choroby autoimmunologiczne stale rośnie i coraz częściej dotyczą one młodych dorosłych oraz dzieci. Schorzenia autoimmunologiczne mogą być układowe lub ograniczone narządowo, część z nich może powodować objawy skórne. Patogeneza tych chorób nie została w pełni wyjaśniona. Często wśród potencjalnych czynników wywołujących reakcje autoimmunizacji wymienia się infekcje wirusowe. Brak możliwości leczenia przyczynowego, przewlekłość chorób oraz ich negatywny wpływ na jakość życia chorych sprawia, że intensywnie poszukiwane są czynniki patogenetyczne, z nadzieją na usprawnienie terapii lub zapobieganie rozwojowi tych schorzeń. W artykule przeanalizowano piśmiennictwo dotyczące związku zakażeń wirusowych z powstawaniem i przebiegiem wybranych chorób autoimmunologicznych o manifestacji skórnej.

Słowa kluczowe: choroby autoimmunologiczne, choroby skóry, zakażenia wirusowe

Summary: In autoimmune diseases the tissues are destroyed by autoreactive cells and antibodies. The morbidity in autoimmune diseases is increasing and they affect more and more young adults and children. Autoimmune diseases may be systemic or limited to one organ, some of them may cause skin symptoms. The pathogenesis of autoimmune diseases has not been completely elucidated. Among possible causes of autoimmune reactions, viral infections are often noted. Lack of causal treatment, chronicity of autoimmune diseases and their negative impact on patients' lives make scientist search for pathogenetic factors, with hope for finding better treatment options or ways of preventing those diseases. In this article we analized literature regarding the connection of viral infections with development and natural course of selected autoimmune skin diseases.

Keywords: autoimmune diseases, skin diseases, viral infections

WPROWADZENIE

Choroby autoimmunologiczne dotyczą kilku procent populacji i często są istotną przyczyną pogorszenia stanu zdrowia oraz skrócenia oczekiwanej długości życia chorych. Uznanie choroby jako związanej z zaburzeniami autoimmunologicznymi wymaga stwierdzenia, że jest ona konsekwencją odpowiedzi wywołanej przez przeciwciała lub komórki T, skierowanej przeciwko tkankom gospodarza [66].

Zapoczątkowanie choroby autoimmunologicznej można uznać za trójstopniowy proces, na który składają się: powstanie autoreaktywnych komórek w organizmie, aktywacja komórek układu immunologicznego w odpowiedzi na obecność docelowego dla nich antygenu oraz niezdolność układu immunologicznego do zahamowania lub eliminacji reakcji autoimmunologicznej. Od dłuższego czasu uważa się, że infekcje wirusowe mogą sprzyjać reakcjom autoimmunologicznym, głównie poprzez mimikrę molekularną, przypadkową aktywację (ang. *bystander activation*) oraz ciągłą przedłużającą się stymulację antygenową. Ponadto uważa się, że wirusy odgrywają rolę w reaktywacji i przewlekłości procesów autoimmunologicznych [48].

Autorem terminu „mimikra molekularna" jest R.T. Damian, który chciał w ten sposób określić istnienie podobnych antygenów w mikroorganizmach i w komórkach gospodarza. Podobieństwa te miały umożliwiać mikroorganizmom unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza [19]. Mimikra molekularna ma miejsce wówczas, gdy podobieństwa między obcymi i własnymi peptydami powodują aktywację autoreaktywnych limfocytów T lub B. Można wyróżnić 4 typy mimikry molekularnej: 1) całkowita zgodność na poziomie białkowym między mikroorganizmem a gospodarzem (białko gospodarza jest prezentowane przez wirus), 2) homologia na poziomie białkowym między białkiem kodowanym przez mikroorganizm a gospodarzem, 3) podobne sekwencje aminokwasów i/lub podobne epitopy u mikroorganizmu i u gospodarza, 4) strukturalne podobieństwo między mikroorganizmem a gospodarzem [65].

W ciągu ostatnich lat wykazano związek między infekcjami a chorobami autoimmunologicznymi, takimi jak: cukrzyca typu 1, stwardnienie rozsiane, zesztywniające zapalenie stawów kręgosłupa, miastenia, toczeń rumieniowaty układowy, autoimmunologiczne zapalenie mięśnia sercowego [13, 14].

W niniejszej publikacji skupiono się na analizie piśmiennictwa dotyczącego potencjalnych związków między infekcjami wirusowymi a powstawaniem wybranych chorób autoimmunologicznych dotyczących skóry.

BIELACTWO

Bielactwo jest schorzeniem charakteryzującym się występowaniem na skórze dobrze odgraniczonych jasnych plam, co jest skutkiem przewlekłej utraty funkcji melanocytów [44]. Częstość występowania bielactwa na świecie szacuje się na

0,5-2% [51]. Mimo, że choroba sama w sobie nie stanowi bezpośredniego zagrożenia życia pacjenta, to jej negatywny wpływ na psychikę chorych jest bardzo istotny, ponieważ schorzenie wiąże się z defektem kosmetycznym oraz potencjalną stygmatyzacją przez społeczeństwo i pogorszeniem jakości życia.

W obrazie histopatologicznym skóry z bielactwem widoczny jest brak funkcjonujących melanocytów, co można potwierdzić barwieniem Fontana-Massona, specyficznym dla melaniny. Głównie we wczesnych stadiach choroby widoczne są także zmiany zapalne z naciekami złożonymi z limfocytów CD4+ lub CD8+ [50].

Podobnie jak w przypadku innych chorób autoimmunologicznych, dokładna przyczyna rozwoju bielactwa nie jest znana. Podejrzewa się, że infekcja wirusowa może odgrywać rolę wyzwalającą to schorzenie u osoby genetycznie podatnej [37]. Uważa się, że limfocyty T indukowane obecnością wirusa mogą atakować melanocyty gospodarza. W naskórku chorych na bielactwo wykrywano m.in. wirusy, takie jak CMV i EBV [42, 43]. U pacjentów z bielactwem segmentowym stwierdzano obecność wirusa Herpes Zoster [35].

Podejrzewano także zależność między bielactwem a przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B i C, ale wyniki badań przeciwciał anty-HCV i anty-HBV oraz antygenów HBs u chorych z bielactwem nie są jednoznaczne [1, 4, 78].

Wykazano natomiast związek między infekcją wirusem HIV u chorych z AIDS a rozwojem bielactwa. Pojawianie się zmian skórnych we wczesnej fazie choroby i ich późniejsze ustępowanie wskazywać może na indukcję bielactwa przez wirusa HIV. Wczesna faza infekcji HIV wiąże się z różnego typu zaburzeniami immunologicznymi, takimi jak limfadenopatia, poliklonalna aktywacja limfocytów B z towarzyszącą hipergammaglobulinemią oraz aktywacja supresorowych limfocytów T. Być może dochodzi wówczas do produkcji autoprzeciwciał przeciwko melanocytom lub indukcji odpowiedzi komórkowej skierowanej przeciwko nim [73]. Opisywano pojedyncze przypadki pacjentów zakażonych HIV, chorujących na bielactwo, u których zmiany uległy repigmentacji po wprowadzeniu wysoce aktywnej terapii antyretrowirusowej (HAART). Zjawisko to można prawdopodobnie tłumaczyć immunosupresją związaną z działaniem wirusa HIV lub wpływem leczenie antyretrowirusowego [3, 70].

ŁUSZCZYCA

Łuszczyca jest przewlekłą chorobą zapalną przebiegającą z obecnością charakterystycznych zmian na skórze w postaci srebrzystych łusek. Jej częstość występowania szacuje się na około 0,91-8,50% w światowej populacji. Za możliwe przyczyny rozwoju łuszczycy uznaje się infekcje, spożywanie alkoholu, leki, urazy, zaburzenia związane z chorobami o podłożu endokrynologicznym [11]. Obraz histopatologiczny zmian łuszczycowych może być różny, w zależności od ich stopnia zaawansowania. W późnych stadiach w badaniu mikroskopowym wycinka skórne-

go widoczna jest akantoza, czyli pogrubienie warstwy kolczystej, zanik warstwy ziarnistej naskórka, wydłużenie „sopli" naskórkowych, tworzenie mikroropni Munro i krost Kogoja. W skórze widoczny jest obfity naciek zapalny złożony głównie z limfocytów T, niewielkiej liczby komórek Langerhansa i neutrofili [24].

Jednym z wirusów, które mogą wpływać na patogenezę łuszczycy jest wirus HIV. Infekcja HIV zwiększa ekspresję HLA-DR w keratynocytach, poprzez wydzielanie IFN-γ, co powoduje migrację leukocytów do tkanek skóry i promuje ich reakcję na superantygeny bakteryjne, prowadząc do powstawania łuszczycowych zmian skórnych [6, 72]. Ponadto, niektóre białka wirusowe, takie jak GP120 działają jak superantygeny podczas infekcji HIV, co zwiększa ryzyko wystąpienia łuszczycy [74]. Zauważono również, że u pacjentów z współistniejącą infekcją HIV łuszczyca trudniej poddaje się leczeniu, a rzuty występują częściej, niż u osób niezainfekowanych wirusem [33].

Infekcje wirusowe odgrywają rolę nie tylko w powstaniu choroby, ale mogą także indukować kolejne rzuty i zaostrzenia łuszczycy. Sbidian i wsp. badali związek między infekcjami górnych dróg oddechowych a następującymi po nich zaostrzeniami łuszczycy. U większości z przebadanych pacjentów z zaostrzeniem łuszczycy wkrótce po infekcji wynik PCR w kierunku Rhinovirusa i Coronavirusa był dodatni [68].

De Koning i wsp. badali związek łuszczycy i wirusa brodawczaka ludzkiego. Porównywali oni pacjentów z łuszczycą i atopowym zapaleniem skóry. Badano obecność DNA β-HPV oraz przeciwciał przeciwko białku L1 wirusa. DNA wirusa wykryto u 100% pacjentów z łuszczycą i 81% pacjentów z atopowym zapaleniem skóry. Przeciwciała przeciwko białku L1 wirusa były natomiast obecne u 88% pacjentów z atopowym zapaleniem skóry i 56% pacjentów z łuszczycą [22].

TWARDZINA UKŁADOWA

Twardzina układowa jest rzadką chorobą autoimmunologiczną, w przebiegu której występuje włóknienie skóry oraz narządów wewnętrznych, takich jak serce, płuca, przełyk, nerki. Do rozwoju twardziny dochodzi wskutek nieprawidłowej funkcji układu immunologicznego, nadprodukcji kolagenu i zaburzeń naczyniowych. W obrazie histopatologicznym stwierdza się pogrubienie i hialinizację głębokich warstw skóry, podskórnej tkanki tłuszczowej i powięzi mięśniowej. Może dochodzić do zaniku przydatków, pogrubienia naczyń krwionośnych i zwężenia ich światła. Obecne są okołonaczyniowe nacieki zapalne złożone z limfocytów T CD4+ [76].

Przyczyna powstawania tej choroby ciągle pozostaje nieznana, mimo prowadzenia wielu analiz. Podejrzewa się wpływ czynników genetycznych i środowiskowych, ale w jednym z badań wykazano bardzo niską zgodność występowania

twardziny układowej u homozygotycznych bliźniąt, co sugeruje, że czynniki środowiskowe odgrywają tu bardziej istotną rolę [32].

Wśród potencjalnych czynników infekcyjnych podejrzewanych o związek z powstawaniem twardziny układowej można wyróżnić m.in: herpeswirusy, retrowirusy i CMV. Białka retrowirusowe oraz antygen topoizomerazy I (antygen będący celem autoprzeciwciał u chorych z twardziną układową) wykazują homologię niektórych sekwencji, co może sugerować związek przyczynowo-skutkowy między infekcją tymi patogenami a twardziną układową [49]. Wykazano także obecność przeciwciał przeciwko białkom retrowirusowym u chorych na twardzinę układową [20].

Niektóre badania sugerują z kolei związek infekcji wirusem CMV z zapoczątkowaniem rozwoju twardziny układowej. Wykazano częstsze występowanie przeciwciał IgA przeciwko CMV u pacjentów z twardziną układową. Przeciwciała te mają zdolność indukowania apoptozy w komórkach śródbłonka [59]. Opisywane przypadki występowania twardziny układowej wkrótce po infekcji wirusem CMV również mogą wskazywać na prawdziwość tej teorii [34].

Altschuler i wsp. podejrzewali istnienie związku między infekcją parwowirusem B19 a twardziną układową. W surowicy pacjentów z twardziną układową często wykrywano obecność przeciwciał przeciwko białku NS-1 parwowirusa B19, ale DNA wirusa wykrywano w surowicy tylko u niewielkiego odsetka chorych. Wykazano natomiast obecność DNA wirusa w szpiku kostnym chorych na twardzinę, czego nie obserwowano w grupie kontrolnej [2].

Wirus EBV również jest brany pod uwagę jako jeden z prawdopodobnych czynników, który może wpływać na rozwój twardziny układowej. Efthymiou i wsp. badali surowicę pacjentów chorych na twardzinę układową pod kątem obecności przeciwciał przeciwko wirusowym antygenom VCA, EA i EBNA. Wykazano, że przeciwciała te występują częściej u chorych na twardzinę, niż u populacji zdrowej, co może wskazywać na istnienie związku między infekcją EBV a powstawaniem twardziny układowej [29].

LISZAJ PŁASKI

Liszaj płaski jest chorobą zapalną o etiologii najprawdopodobniej autoimmunologicznej, charakteryzuje się występowaniem na skórze swędzących czerwonych zmian grudkowych z prążkami Wickhama, deformacją paznokci oraz obecnością białych plam na śluzówkach [25]. W obrazie histopatologicznym liszaja płaskiego można zauważyć zwyrodnienie, apoptozę i martwicę keratynocytów warstwy podstawnej naskórka. Na granicy skórno-naskórkowej obecny jest obfity naciek z limfocytów i makrofagów. Głównym patomechanizmem w liszaju pła-

skim jest zwiększenie apoptozy keratynocytów i hamowanie apoptozy limfocytów T [40, 52]. Przyczyny powstawania liszaja płaskiego nie są znane, wiąże się go m.in. z różnymi innymi chorobami autoimmunologicznymi, nowotworowymi i infekcjami wirusowymi, głównie wirusem HCV [38].

W 1991 Mokni i wsp. opisali przypadek pacjenta z potwierdzonym zakażeniem HCV i współistniejącym liszajem płaskim [58]. Wkrótce potem opisano także pierwszy przypadek pacjenta zakażonego HCV, u którego rozpoznano liszaj płaski jamy ustnej [36]. W późniejszych badaniach epidemiologicznych związek między liszajem płaskim a zakażeniem HCV potwierdzał się [67, 23, 5]. Opracowano kilka hipotez, które miałyby wyjaśnić tę zależność. W jednej z nich zakłada się, że wirus HCV zapoczątkowuje proces autoimmunologiczny, co może potwierdzać wykrywanie autoprzeciwciał w surowicy pacjentów z liszajem płaskim i infekcją HCV [53]. Jednakże w badaniach Carrozzo i wsp. wykazano, że chorzy na liszaj płaski zakażeni wirusem HCV nie wykazują wyższych stężeń autoprzeciwciał, niż osoby niezakażone tym wirusem [9]. Współistnienie liszaja płaskiego i zakażenia HCV niesie za sobą implikacje kliniczne, ponieważ wiele osób zakażonych tym wirusem nie jest tego świadomych. Jeśli pacjenci z liszajem płaskim byliby rutynowo badani pod kątem zakażenia HCV, być może udałoby się uniknąć u części z nich potencjalnych odległych skutków zakażenia, takich jak marskość czy rozwój raka wątrobowokomórkowego [54].

Innym wirusem, który może mieć związek z patogenezą liszaja płaskiego jest wirus HHV-7. De Vries i wsp. badali próbki skóry chorych z liszajem płaskim, pod kątem obecności wirusa HHV-7. Badania immunohistochemiczne wykazały, że w naskórku chorych z liszajem płaskim było zdecydowanie więcej komórek HHV-7 dodatnich, niż w naskórku osób zdrowych. Ponadto, skóra chorych na liszaj płaski zawierała więcej plazmacytoidnych komórek dendrytycznych, które występują w schorzeniach indukowanych przez wirusy [26].

W badaniu Danielsson i wsp. analizowano możliwy związek między infekcją EBV a powstawaniem liszaja płaskiego jamy ustnej i wykazano brak takiej zależności [21].

PĘCHERZYCA ZWYKŁA

Pęcherzyca zwykła jest przewlekłą chorobą autoimmunologiczną, w której powstają wiotkie pęcherze w skórze i błonach śluzowych. Zwykle zmiany na śluzówkach poprzedzają zmiany w obrębie skóry. W przebiegu pęcherzycy dochodzi do produkcji autoprzeciwciał przeciwko desmogleinie, co powoduje powstawanie akantolitycznych pęcherzy śródnaskórkowych. Jednym z czynników, które mogą brać udział w powstawaniu pęcherzycy zwykłej są infekcje wirusowe, zwłaszcza wywołane przez herpeswirusy, a także CMV i EBV [56]. W badaniu histopato-

logicznym widoczne są pęcherze z akantolizą powyżej warstwy podstawnej naskórka, co oznacza, że warstwa podstawna komórek nabłonka pozostaje na błonie podstawnej, a oddzielają się warstwy wyższe. W skórze właściwej może być obecny naciek zapalny [62].

Esmaili i wsp. analizowali związek między infekcją wirusami HSV-1, HSV-2 oraz HHV-8 a rozwojem pęcherzycy zwykłej. W badanych przez nich próbkach nie wykazano DNA wirusów HSV i HHV-8, co według nich sugeruje, że infekcje tymi wirusami mogą tylko okazjonalnie współistnieć z pęcherzycą zwykłą [30]. Machado i wsp. badali obecność przeciwciał przeciwko HSV-1 i CMV u chorych na pęcherzycę zwykłą. Wykazali, że stężenie IgM i IgG przeciwko HSV-1 oraz CMV było wyższe u chorych na pęcherzycę zwykłą niż u osób zdrowych [56]. W badaniu Vega-Memíje i wsp. oceniono 15 preparatów histopatologicznych pochodzących od chorych na pęcherzycę zwykłą, pod kątem reakcji immunohistochemicznej z przeciwciałem anty-HSV-1. We wszystkich badanych przypadkach uzyskali reakcję negatywną [77]. Badania Chiu i wsp. oraz Marzano i wsp. sugerują z kolei, że terapia immunosupresyjna oraz same zmiany w skórze i błonach śluzowych obecne u chorych na pęcherzycę mogą sprzyjać wtórnej infekcji wirusowej [12, 57].

Demirci i wsp. analizowali związek między pęcherzycą a infekcją HCV i HBV. Zbadano próbki od 57 pacjentów z pęcherzycą; u wszystkich z nich badanie na obecność przeciwciał anty-HCV w surowicy krwi wyszło negatywnie. Zbadano także surowicę pod kątem obecności HBsAg, wynik był dodatni u dwóch pacjentów z pęcherzycą, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między populacją chorych a grupą kontrolną [27].

Podejrzewa się także związek infekcji EBV z rozwojem pęcherzycy zwykłej, co potwierdzają badania. Porównanie poziomu przeciwciał IgG anty-EBV wykazało, że jest on istotnie wyższy u chorych na pęcherzycę w porównaniu z osobami zdrowymi [7]. Tufano i wsp. wykryli DNA EBV w rozmazach krwi obwodowej oraz biopsjach skóry chorych na pęcherzycę [75].

Ghalayani i wsp. przeprowadzili badanie mające na celu porównanie poziomu przeciwciał IgG przeciwko HSV-1, HSV-2, CMV i EBV u pacjentów z pęcherzycą zwykłą oraz osób zdrowych. Pobrano próbki od 25 osób chorych i 27 zdrowych. Różnice w stężeniach IgG między badanymi grupami były istotne dla przeciwciał anty-HSV-2, anty-CMV i anty-EBV, ale nie dla anty-HSV-1 [39].

ZAPALENIE SKÓRNO-MIĘŚNIOWE

Zapalenie skórno-mięśniowe jest chorobą autoimmunologiczną należącą do tzw. idiopatycznych miopatii zapalnych. Klinicznie w przebiegu tego schorzenia obserwuje się zmiany skórne, takie jak grudki Gottrona i objaw Gottrona oraz

objawy zapalenia mięśni. W obrazie histopatologicznym zapalenia skórno-mięśniowego można obserwować zanik naskórka, wakuolizację komórek na granicy skórno-naskórkowej, poszerzenie naczyń krwionośnych oraz skąpy naciek limfocytarny [69].

Patogeneza choroby pozostaje nieznana, podejrzewa się wpływ leków, infekcji, promieniowania ultrafioletowego, zanieczyszczeń środowiska. Spośród wirusów, które mogą mieć związek z indukowaniem zapalenia skórno-mięśniowego należy wymienić: parwowirus B19, wirusy Coxsackie, poliomawirus, EBV, HIV, wirusy zapalenia wątroby [8].

Parwowirus B19, typowo wywołujący u dzieci rumień zakaźny, wymienia się jako potencjalny czynnik biorący udział w patogenezie zapalenia skórno-mięśniowego, ale jak do tej pory liczba badań na ten temat jest niewielka [17]. Christensen i wsp. badali, czy odpowiedź organizmu na infekcję wirusem Coxsackie B może mieć związek z patogenezą zapalenia skórno-mięśniowego. Przeciwciała wiążące dopełniacz, skierowane przeciwko wirusom Coxsackie B1, B2 i B4 były wykrywane zdecydowanie częściej u chorych na młodzieńcze zapalenie skórno-mięśniowe niż u osób chorych na młodzieńcze reumatoidalne zapalenie stawów [15]. Peravali wsp. opisali przypadek chorej, u której zapalenie skórno-mięśniowe rozwinęło się po infekcji wirusem EBV oraz antybiotykoterapii. Nie można było jednak jednoznacznie stwierdzić, czy u tej pacjentki wirus EBV miał znaczenie w patomechanizmie zapalenia skórno-mięśniowego, czy też czynnikiem sprawczym była antybiotykoterapia [61]. Zheng i wsp. badali pacjentów z młodzieńczym zapaleniem skórno-mięśniowym, wykazując wyższy odsetek przeciwciał IgG przeciwko antygenom jądrowym wirusa EBV (ang. *Epstein-Barr nuclear antygen*, EBNA) oraz przeciwciał IgG przeciwko antygenom kapsydowym (ang. *viral capside antygen*, VCA) [79].

Han i wsp. analizowali przypadek pacjenta, z rakiem wątrobowokomórkowym na tle wieloletniego zakażenia wirusem HBV, u którego rozwinęło się zapalenie skórno-mięśniowe. Pacjent od 40 lat miał dodatnie wyniki testu na obecność HBsAg i pojawiło się u niego osłabienie mięśni. Zdiagnozowano zapalenie skórno-mięśniowe, zastosowano sterydy, a następnie leczenie przeciwwirusowe, po którym nieoczekiwanie poprawiła się siła mięśniowa. Nie udało im się natomiast wykryć HBsAg ani HBcAg w narządach innych niż wątroba [47]. Opisywano przypadki zakażeń wirusem HBV sporadycznie współistniejące ze schorzeniami, takimi jak: zapalenie skórno-mięśniowe, zapalenie wielomięśniowe, zapalenie stawów, neuropatia, zapalenie naczyń [63]. Wśród możliwych przyczyn tego zjawiska wymienia się: powstawanie depozytów krążących kompleksów antygen HBV-przeciwciało, pozawątrobową replikację wirusa HBV, powstawanie autoprzeciwciał w reakcji na obecność wirusa HBV oraz indukcję powstawania miejscowych kompleksów immunologicznych [46, 71, 41].

TOCZEŃ RUMIENIOWATY UKŁADOWY

Toczeń rumieniowaty układowy jest przewlekłą chorobą autoimmunologiczną, obejmującą zmiany rozwijające się w skórze, stawach, nerkach, płucach i układzie nerwowym. Na skórze twarzy może pojawić się typowy rumień w kształcie motyla, często w związku z ekspozycją na światło słoneczne. Schorzenie przebiega z okresami zaostrzeń i remisji. Przyczyna powstawania tocznia nie jest znana, najprawdopodobniej w patogenezie tego schorzenia biorą udział czynniki genetyczne i środowiskowe, takie jak: promieniowanie ultrafioletowe, tytoń, zanieczyszczenie środowiska, infekcje.

W obrazie histologicznym widoczna jest atrofia naskórka, pogrubienie błony podstawnej, zwyrodnienie wodniczkowe i apoptoza keratynocytów warstwy podstawnej. W skórze widoczny jest obrzęk oraz okołonaczyniowe nacieki z komórek zapalnych [16].

Jednym z wirusów podejrzewanych o związek z rozwojem tocznia rumieniowatego układowego jest EBV. Wirus EBV powoduje mononukleozę zakaźną i duża część populacji ogólnej ma we krwi przeciwciała przeciwko temu wirusowi. Wykazano, że występowanie przeciwciał przeciwko EBV częściej dotyczy chorych na toczeń rumieniowaty układowy niż osób zdrowych [28, 18]. Możliwe, że wirus EBV aktywuje autoreaktywne limfocyty B, wytwarzające przeciwciała wykazujące powinowactwo do tkanek gospodarza. Prawdopodobnie wirus działa także jako superantygen w stosunku do limfocytów T oraz reaguje z cząsteczkami MHC klasy II. Dochodzi do aktywacji licznych limfocytów T i przewlekłego stanu zapalnego [60].

Innym potencjalnym czynnikiem infekcyjnym wyzwalającym toczeń rumieniowaty układowy jest wirus CMV. W badaniach wykazywano obecność DNA wirusa CMV oraz wysokie stężenia przeciwciał anty-CMV w klasie IgM u pacjentów ze świeżym rozpoznaniem lub zaostrzeniem tocznia rumieniowatego układowego [60, 31]. Guo i wsp. przeprowadzili badanie, które oceniało wpływ białka US31 wirusa CMV na rozwój tocznia rumieniowatego układowego. Badano ekspresję genów CMV w komórkach jednojądrowych krwi obwodowej. Wykryto, że gen US31 ulegał silnej ekspresji w komórkach pochodzących od chorych na toczeń rumieniowaty układowy, w porównaniu z osobami zdrowymi. Ustalono, że białko US31 pobudza zapalenie mediowane przez NF-κB, z udziałem monocytów i makrofagów. Zapalenie to jest odpowiedzialne za rozwój tocznia rumieniowatego układowego [45].

Wirus HIV-1 może sprzyjać rozwojowi tocznia rumieniowatego układowego, poprzez zaburzenie procesów apoptozy oraz funkcjonowania limfocytów T pomocniczych. Niektórzy badacze uważają jednak, że przypadki jednoczesnego wystąpienia zakażenia HIV i tocznia rumieniowatego mają związek z wpływem terapii antyretrowirusowej na odzyskanie funkcji układu immunologicznego [10].

Infekcja parwowirusem B19 prowadzi do produkcji cytokin i autoprzeciwciał, które są obecne również we krwi chorych na toczeń rumieniowaty układowy (np. czynnik reumatoidalny, przeciwciała przeciwjądrowe i antyfosfolipidowe). Prawdopodobnie autoprzeciwciała te powstają w mechanizmie mimikry molekularnej [55].

PODSUMOWANIE

Schorzenia autoimmunologiczne dotykają coraz większej ilości osób na całym świecie, ale niestety wciąż nie znamy ich konkretnych przyczyn. Od dawna podejrzewano wpływ czynników genetycznych oraz egzogennych, między innymi infekcyjnych, na rozwój mechanizmów autoimmunizacji. Na przykład, ludzkie endogenne retrowirusy to wirusy endogenne, które są obecne w genomie kręgowców od milionów lat. Układ immunologiczny uznaje je za autoantygeny. Uważa się, że mogą brać udział w patogenezie niektórych chorób autoimmunologicznych, poprzez infekowanie limfocytów T CD4+ i przełamywanie autotolerancji [31, 64].

Część chorób autoimmunologicznych objawia się zmianami skórnymi, które mimo że najczęściej nie stanowią zagrożenia dla życia pacjenta, to jednak znacznie obniżają jakość życia i mają bardzo negatywny wpływ na psychikę i samoocenę. W leczeniu wielu chorób autoimmunologicznych niestety wciąż często jedyną skuteczną metodą okazują się duże dawki sterydów i brak jest możliwości leczenia przyczynowego. Wśród potencjalnych przyczyn powstawania chorób autoimmunologicznych często wymienia się infekcje wirusowe, które miałyby działać na zasadzie mimikry molekularnej. W niektórych przypadkach wpływ infekcji na patogenezę choroby udało się potwierdzić, np. w przypadku wirusa CMV i tocznia rumieniowatego układowego. W innych przypadkach związek przyczynowo-skutkowy wciąż pozostaje hipotezą, a wyniki badań są niejednomyślne. Ważnym aspektem tych badań jest także fakt, że niektóre choroby autoimmunologiczne skóry mogą naprowadzić nas na współistniejące u pacjenta zakażenie. Tak jest np. w przypadku zakażenia wirusem HCV i liszaja płaskiego, tak więc jeśli pacjenta ze schorzeniem dermatologicznym zbadamy pod kątem infekcji wirusem HCV, może uda nam się zapobiec odległym powikłaniom, takim jak marskość wątroby, czy rak. Mimo przeprowadzenia wielu badań dotyczących autoimmunologicznych chorób skóry i ich związku z infekcjami wirusowymi, wciąż wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi.

LITERATURA

[1] AKBAYIR N, GÖKDEMIR G, MANSUR T, SÖKMEN M, GÜNDÜZ S, ALKIM C i in. Is there any relationship between hepatitis C virus and vitiligo? *J Clin Gastroenterol* 2004; **38**: 815-817.

[2] ALTSCHULER EL. The historical record is consistent with the recent finding of parvovirus B19 infection of bone marrow in systemic sclerosis patients. *Clin Exp Rheumatol* 2001; **19**: 228.

[3] ANTONY FC. MARSDEN RA. Vitiligo in association with human immunodeficiency virus infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003; **17**: 456-458.
[4] ARICAN O, SASMAZ S, KOKOGLU OF. Role of Hepatitis B and C Viruses in the Etiopathogenesis of Vitiligo. *J Dermatol* 2004; **31**: 506-507.
[5] ASAAD T, SAMDANI AJ. Association of lichen planus with hepatitis C virus infection. *Ann Saudi Med* 2005; **25**: 243-246.
[6] BAKER BS, POWLES AV, VALDIMARSSON H, FRY L. An altered response by psoriatic keratinocytes to gamma interferon. *Scand J Immunol* 2006; **28**: 735-740.
[7] BARZILAI O, SHERER Y, RAM M, IZHAKY D, ANAYA JM, SHOENFELD Y. Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in autoimmune diseases: are they truly notorious? A preliminary report. *Ann N Y Acad Sci* 2007; **1108**: 567-577.
[8] BAX CE, MADDUKURI S, RAVISHANKAR A, PAPPAS-TAFFER L, WERTH VP. Environmental triggers of dermatomyositis: a narrative review. *Ann Transl Med* 2021; **9**: 434.
[9] CARROZZO M, GANDOLFO S, LODI G, CARBONE M, GARZINO-DEMO P, CARBONERO C i in. Oral lichen planus in patients infected or noninfected with hepatitis C virus: The role of autoimamunity. *J Oral Pathol Med* 1999; **28**: 16-19.
[10] CARUGATI M, FRANZETTI M, TORRE A, GIORGI R, GENDERINI A, STRAMBIO DE CASTILLA F i in. Systemic lupus erythematosus and HIV infection: a whimsical relationship. Reports of two cases and review of the literature. *Clin Rheumatol* 2013; **32**: 1399–1405.
[11] CHANDRAN V, RAYCHAUDHURI SP. Geoepidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis. *J Autoimmun* 2010; **34**: 314-321.
[12] CHIU HY, CHANG CY, HSIAO CH, WANG LF. Concurrent cytomegalovirus and herpes simplex virus infection in pemphigus vulgaris treated with rituximab and prednisolone. *Acta Derm Venereol* 2013; **93**: 200–201.
[13] CHRISTEN U, VON HERRATH MG. Initiation of autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2004; **16**: 759–767.
[14] CHRISTEN U, VON HERRATH MG. Infections and autoimmunity--good or bad? *J Immunol* 2005; **174**: 7481–7486.
[15] CHRISTENSEN ML, PACHMAN LM, SCHNEIDERMAN R, PATEL DC, FRIEDMAN JM. Prevalence of Coxsackie B virus antibodies in patients with juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 1986; **29**: 1365-1370.
[16] CLARK WH, REED RJ, MIHM MC. Lupus erythematosus. Histopathology of cutaneous lesions. *Hum Pathol* 1973; **4**: 157-163.
[17] CROWSON AN, MAGRO CM, DAWOOD MR. A causal role for parvovirus B19 infection in adult dermatomyositis and other autoimmune syndromes. *J Cutan Pathol* 2000; **27**: 505-515.
[18] CUI J, YAN W, XU S, WANG Q, ZHANG W, LIU W. i in. Anti-Epstein–Barr virus antibodies in Beijing during 2013–2017: What we have found in the different patients. *PLoS ONE* 2018; **13**: e0193171.
[19] DAMIAN RT. Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am Nat* 1964; **98**: 129–149.
[20] DANG H, DAUPHINÉE MJ, TALAL N, GARRY RF, SEIBOLD JR. MEDSGER TA JR i in. Serum antibody to retroviral gag proteins in systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1991; **34**: 1336-1337.
[21] DANIELSSON K, NYLANDER E, SJÖSTRÖM M, EBRAHIMI M. Epstein-Barr virus is not detected in mucosal lichen planus. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2018; **23**: 560-563.
[22] DE KONING MN, POLDERMAN MC, WATERBOER T, TER SCHEGGET J, FELTKAMP MC, PAWLITA M i in. Marked differences in Betapapillomavirus DNA and antibody prevalence between patients with psoriasis and those with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2011; **164**: 771-775.
[23] DE MATTOS CAMARGO GROSSMANN S, DE AGUIAR MC, TEIXEIRA R, DO CARMO MA. Oral lichen planus and chronic hepatitis C: A controversial association. *Am J Clin Pathol* 2007; **127**: 800-804.
[24] DE ROSA G, MIGNOGNA C. The histopathology of psoriasis. *Reumatismo* 2007; **59**: 46-48.
[25] DE VRIES HJC, TANK B, HOEKSEMA R. Lichen planus and graft-vs. host disease. [w:] BOS J.D. (red.) *Skin immune system.* Boca Raton: CRC, 2005; 527–543.

[26] DE VRIES HJC, VAN MARLE J, TEUNISSEN MB, PICAVET DI. Lichen planus is associated with human herpesvirus type 7 replication and infiltration of plasmacytoid dendritic cells. *Br J Dermatol* 2006; **154**: 361-364.
[27] DEMIRCI GT, AYDINGOZ IE, MANSUR AT, ATIS G, ALTUNAY IK. Hepatitis C and hepatitis B virus infections in the etiopathogenesis of pemphigus. *An Bras Dermatol* 2014; **89**: 423-426.
[28] DRABORG AH, SANDHU N, LARSEN N, LISANDER LARSEN J, JACOBSEN S, HOUEN G. Impaired cytokine responses to Epstein–Barr virus antigens in systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol Res* 2016; **2016**: 6473204.
[29] EFTHYMIOU G, LIASKOS C, MAROU E, DARDIOTIS E, TSIMOURTOU V, SCHEPER T i in. AB0751 The epstein-barr virus infection in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2018; **77** (Supl. 2): 1513.
[30] ESMAILI N, HALLAJI Z, ABEDINI R, SOORI T, MORTAZAVI H, CHAMS-DAVATCHI C. Pemphigus vulgaris and herpesviruses: is there any relationship? Int J Dermatol 2010; **49**: 1261-1265.
[31] ESPOSITO S, BOSIS S, SEMINO M, RIGANTE D. Infections and systemic lupus erythematosus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; **33**: 1467–1475.
[32] FEGHALI BOSTWICK C, MEDSGER TA JR, WRIGHT TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; **48**: 1956-1963.
[33] FERNANDES S, PINTO GM, CARDOSO J. Particular clinical presentations of psoriasis in HIV patients. *Int J STD AIDS* 2011; **22**: 653-654.
[34] FERRI C, CAZZATO M, GIUGGIOLI D, SEBASTIANI M, MAGRO CM. Systemic sclerosis folloG wing human cytomegalovirus infection. *Ann Rheum Dis* 2002; **61**: 937-938.
[35] GAMBHIR ML, PANDEY K, KAUR T. Herpes zoster on segmental vitiligo: Wolf's isotopic response? *Our Dermatol Online* 2014; **5**: 155-156.
[36] GANDOLFO S, CARBONE M, CARROZZO M, GALLO V. Oral lichen planus and hepatitis C virus (HCV) infection: Is there a relationship? A report of 10 cases. *J Oral Pathol Med* 1994; **23**: 119-122.
[37] GAURKAR SP, PARMAR KS, SHAH BJ. Letters to the Editor-Sequential development of psoriasis, alopecia universalis, and vitiligo vulgaris in a human immunodeficiency virus seropositive patient: A unique case report. *Indian J Sex Trans Dis* 2014; **35**: 167-169.
[38] GEORGESCU SR, ENE CD, NICOLAE IL, MITRAN M, MUSETESCU A, MATEI C i in. Reflectometric analysis for identification of various pathological conditions associated with lichen planus. *Rev Chim* 2017; **68**: 1103-1108.
[39] GHALAYANI P, RASHIDI F, SABERI Z. Assessment of IgG Antibodies Against HSV1, HSV2, CMV and EBV in Patients with Pemphigus Vulgaris Versus Healthy People. *J Dent* 2015; **12**: 835-840.
[40] GOROUHI F, DAVARI P, FAZEL N. Cutaneous and mucosal lichen planus: A comprehensive review of clinical subtypes, risk factors, diagnosis, and prognosis. *Sci World J* 2014; **2014**: 1-22.
[41] GREGORIO GV, CHOUDHURI K, MA Y, VEGNENTE A, MIELI-VERGANI G, VERGANI D. Mimicry between the hepatitis B virus DNA polymerase and the antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1999; **162**: 1802-1810.
[42] GRIMES PE, ELKADI T, SANDERS J. Epstein-Barr virus infection in patients with vitiligo. *J Invest Dermatol* 1999; **112**: 604.
[43] GRIMES PE, SEVALL JS, VOJDANI A. Cytomegalovirus DNA identified in skin biopsy specimens of patients with vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 1996; **35**: 21-26.
[44] GUERRA L, DELLAMBRA E, BRESCIA S, RASKOVIC D. Vitiligo: pathogenetic hypotheses and targets for current therapies. *Curr Drug Metab* 2010; **11**: 451-467.
[45] GUO G, YE S, XIE S, YE L, LIN C, YANG M i in. The cytomegalovirus protein US31 induces inflammation through mono-macrophages in systemic lupus erythematosus by promoting NF-κB2 activation. *Cell Death Dis* 2018; **9**: 104.
[46] HAMMERMANN R, WARSKULAT U, HAUSSINGER D. Anisoosmotic regulation of the Mi-2 autoantigen mRNA in H4IIE rat hepatoma cells and primary hepatocytes. *FEBS Lett* 1998; **435**: 21–24.

[47] HAN J, WANG S, KWONG TNY, LIU J. Dermatomyositis as an extrahepatic manifestation of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Medicine 2018*; **97**: e11586.
[48] HORWITZ MS, SARVETNICK N. Viruses, host responses, and autoimmunity. *Immunol Rev* 1999; **169**: 241-253.
[49] JIMENEZ SA, DIAZ A, KHALILI K. Retroviruses and the pathogenesis of systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 1995; **12**: 159-175.
[50] KIM YC, KIM YJ, KANG HY, SOHN S, LEE ES. Histopathologic features in vitiligo. *Am J Dermatopathol* 2008; **30**: 112-116.
[51] KRUGER C, SCHALLREUTER KU. A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults. *Int J Dermatol* 2012; **51**: 1206-1212.
[52] LE CLEACH L, CHOSIDOW O. Clinical practice. Lichen planus. *N Engl J Med* 2012; **366**: 723-732.
[53] LODI G, OLSEN I, PIATTELLI A, D'AMICO E, ARTESE L, PORTER SR: Antibodies to epithelial components in oral lichen planus (OLP) associated with hepatitis C virus (HCV) infection. *J Oral Pathol Med* 1997; **26**: 36-39.
[54] LODI G, PELLICANO R, CARROZZO M. Hepatitis C virus infection and lichen planus: a systematic review with meta-analysis. *Oral Dis* 2010; **16**: 601–612.
[55] LUNARDI C, TINAZZI E, BASON C, DOLCINO M, CORROCHER R, PUCCETTI A. Human parvovirus B19 infection and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2008; **8**: 116-120.
[56] MACHADO ARSR, LA SERRA L, TURATTI A, MACHADO AM, ROSELINO AM. Herpes simplex virus 1 and cytomegalovirus are associated with pemphigus vulgaris but not with pemphigus foliaceus disease. *Exp Dermatol* 2017; **26**: 966-968.
[57] MARZANO AY, TOURLAKI A, MERLO Y, SPINELLI D, VENEGONI L, CROSTI C. Herpes simplex virus infection and pemphigus. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009; **22**: 781-786.
[58] MOKNI M., RYBOJAD M., PUPPIN D. JR, CATALA S., VENEZIA F., DJIAN R. i in. Lichen planus and hepatitis C virus. *J Am Acad Dermatol* 1991; **24**: 792.
[59] NEIDHART M, KUCHEN S, DISTLER O, BRÜHLMANN P, MICHEL B.A, GAY RE. i in. Increased serum levels of antibodies against human cytomegalovirus and prevalence of autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999; **42**: 389-392.
[60] NELSON P, RYLANCE P, RODEN D, TRELA M, TUGNET N. Viruses as potential pathogenic agents in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2014; **23**: 596–605.
[61] PERAVALI R, ACHARYA S, RAZA SH, PATTANAIK D, RANDALL MB. Dermatomyositis Developed After Exposure to Epstein-Barr Virus Infection and Antibiotics Use. *Am J Med Sci* 2020; **360**: 402–405.
[62] PORRO AM, SEQUE CA, FERREIRA MCC, ENOKIHARA MMSES. Pemphigus vulgaris. *An Bras Dermatol* 2019; **94**: 264-278.
[63] PYRSOPOULOS NT, REDDY KR. Extrahepatic manifestations of chronic viral hepatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 2001; **3**: 71–78.
[64] QUARESMA JAS., YOSHIKAWA GT, KOYAMA RVL., DIAS GAS, FUJIHARA S, FUZII HT. HTLV-1, immune response and autoimmunity. Viruses 2015; **8**: 5.
[65] ROJASA M, RESTREPO-JIMÉNEZA P, MONSALVEA DM, PACHECOA Y, ACOSTA-AMPUDIAA Y, RAMÍREZ-SANTANAA C. i inni: Molecular mimicry and autoimmunity. *J Autoimmun* 2018; **95**: 100–123.
[66] ROUSE BT, DESHPANDE S. Viruses and autoimmunity: an affair but not a marriage contract. *Rev Med Virol* 2002; **12**: 107–113.
[67] SÁNCHEZ-PÉREZ J, DE CASTRO M, BUEZO GF, FERNANDEZ-HERRERA J, BORQUE MJ, GARCÍA-DÍEZ A. Lichen planus and hepatitis C virus: Prevalence and clinical presentation of patients with lichen planus and hepatitis C virus infection. *Br J Dermatol* 1996; **134**: 715-719.
[68] SBIDIAN E, MADRANGE M, VIGUIER M, SALMONA M, DUCHATELET S, HOVNANIAN A. i in. Respiratory virus infection triggers acute psoriasis flares across different clinical subtypes and genetic backgrounds. *Br J Dermatol* 2019; **181**: 1304-1306.

[69] SENA P, GIANATTI A, GAMBINI D. Dermatomyositis: clinicopathological correlations. *G Ital Dermatol Venereol* 2018; **153**: 256-264.
[70] SEYEDALINAGHI SA, KARAMI N, HAJIABDOLBAGHI M, HOSSEINI M. Vitiligo in a patient associated with human immunodeficiency virus infection and repigmentation under antiretroviral therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; **23**: 840-841.
[71] STUBGEN JP. Neuromuscular disorders associated with Hepatitis B vaccination. *J Neurolo Sci* 2010; **1–4**: 29291-29292.
[72] TERUI T, AIBA S, KATO T, TANAKA T, TAGAMI H. HLA-DR antigen expression on keratinocytes in highly inflamed parts of psoriatic lesions. *Br J Dermatol* 1987; **116**: 87-93.
[73] TOJO N, YOSHIMURA N, YOSHIZAWA M, ICHIOKA M, CHIDA M, MIYAZATO I i in. Vitiligo and chronic photosensitivity in human immunodeficiency virus infection. *Jpn J Med* 1991; **30**: 255-259.
[74] TOWNSLEY-FUCHS J, NESHAT MS, MARGOLIN DH, BRAUN J, GOODGLICK L. HIV-1gp120: A novel viral B cell superantigen. *Int Rev Immunol* 1997; **14**: 325-338.
[75] TUFANO MA, BARONI A, BUOMMINO E, RUOCCO E, LOMBARDI ML, RUOCCO V. Detection of herpesvirus DNA in peripheral blood mononuclear cells and skin lesions of patients with pemphigus by polymerase chain reaction. *Br J Dermatol* 1999; **141**: 1033-1039.
[76] VAN PRAET JT, SMITH V, HASPESLAGH M, DEGRYSE N, ELEWAUT D, DE KEYSER F. Histopathological cutaneous alterations in systemic sclerosis: a clinicopathological study. *Arthritis Res Ther* 2011; **13**: R35.
[77] VEGA-MEMÍJE ME, GARCÍA-VÁZQUEZ FJ, CUEVAS-GONZÁLEZ JC, RODRÍGUEZ-LOBATO E, AGUILAR-URBANO MA. Is there a causal relationship between HSV-1 and pemphigus vulgaris? Springerplus 2015; **4**: 811.
[78] YAMAMOTO T., NISHIOKA K. Vitiligo vulgaris associated with Hepatitis C virus. *J Dermatol* 2000; **27**: 416-417.
[79] ZHENG Q, ZHU K, GAO CN, XU YP, LU MP. Prevalence of Epstein-Barr virus infection and characteristics of lymphocyte subsets in newly onset juvenile dermatomyoistis. *World J Pediatr* 2021; **17**: 205-209.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 16.09.2021
Przyjęto: 20.11.2021
Prof. dr hab. n. med. Andrzej Marszałek
Zakład Patologii Nowotworów,
Wielkopolskie Centrum Onkologii,
ul. Garbary 15, 61-866 Poznań
tel.: 618850810, fax: 618850809
e-mail: amars@ump.edu.pl

BIOGENEZA I ZNACZENIE EGZOSOMÓW W KOMUNIKACJI MIĘDZYKOMÓRKOWEJ, W WYBRANYCH PROCESACH FIZJOLOGICZNYCH, I W NOWOTWORZENIU

BIOGENESIS AND THE ROLE OF EXOSOMES IN INTERCELLULAR COMMUNICATION, IN SELECTED PHYSIOLOGICAL PROCESSES AND NEOPLASM

Paulina BORZDZIŁOWSKA, Ilona BEDNAREK

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Streszczenie: Egzosomy jako niewielkie cząsteczki o budowie pęcherzykowej odgrywają istotną rolę w mikrośrodowisku. Odpowiedzialne są między innymi za przenoszenie i dostarczanie informacji biologicznej do komórek. Poznanie ich budowy i całego procesu powstawania jest ważne między innymi dla znalezienia w przyszłości terapeutycznych punktów uchwytu potencjalnych leków. Proces powstawania egzosomów jest wieloetapowy i oparty na dwóch głównych mechanizmach, tzw. ESCRT-zależnym i ESCRT-niezależnym. Upakowanie białek, lipidów i kwasów nukleinowych w ich powstawaniu odpowiada na kolejnych etapach za ładunek biologiczny jaki przenoszą do komórek. Funkcje jakie pełnią egzosomy, zarówno fizjologiczne, jak i patologiczne są wciąż przedmiotem badań. Dokładne poznanie roli jaką pełnią egzosomy może pomóc w przyszłości tworzyć nowe leki lub lepiej dopasować terapię leczniczą.

Słowa kluczowe: egzosomy, biogeneza, mikrośrodowisko, nowotwory

Summary: Exosomes, as small molecules with a bubble structure, play an important role in the microenvironment. They are responsible for carrying and delivering biological information to cells. Getting to know their structure and the process of their formation is important, for example, for finding therapeutic points for potential drugs. The process of exosome formation is multi-stage and based on two main mechanisms, the so-called ESCRT-depended and ESCRT-independent. The packing of proteins, lipids and nucleic acids in their formation is responsible for the biological information which transfer to the cells in subsequent stages. Both physiological and pathological functions of exosomes are still under investigation. Getting to know the role they play can help to develop new drugs in the future or better match therapeutic therapy.

Keywords: exosomes, biogenesis, microenviroment, tumors

WSTĘP

Istotnym elementem mającym wpływ na komórki jest mikrośrodowisko komórek. Tworzone jest ono przez czynniki, które bezpośrednio wpływają na warunki wokół komórek zmieniając ich cechy fizyczne, biochemiczne i molekularne. W skład mikrośrodowiska wchodzą: macierz pozakomórkowa (ang. *extracellular matrix*, ECM); komórki tego samego lub innego rodzaju otaczające daną komórkę; hormony, cytokiny oraz inne bioaktywne cząsteczki, (uwalniane na drodze autokrynnej, endokrynnej lub parakrynnej), zmiany w nanostrukturach ECM oraz mechaniczne zmiany powodowane przez ruch organizmu lub płynów ustrojowych [7].

Specyficznym elementem mikrośrodowiska są egzosomy. Dokładna definicja tych struktur tworzyła się na przestrzeni wielu lat ale do dziś nie ma jednoznacznych kryteriów definiujących. Średnica egzosomu w dużej mierze zależy od jego pochodzenia. Minimalny rozmiar zależy od dwuwarstwy lipidowej, której grubość ocenia się na około 5nm. Błona lipidowa zapewnia egzosomom sztywność, a najmniejszy możliwy pęcherzyk musi mieć co najmniej 30nm. Obliczono, iż całkowity „ładunek" egzosomów prawdopodobnie nie może być większy niż 100 białek oraz 10 000 nukleotydów kwasu nukleinowego [50].

Do pełnej definicji egzosomu nie wystarczy wziąć pod uwagę jedynie jego rozmiaru. Ważnym elementem jest również unikatowy skład białek i lipidów. Pomimo różnic pomiędzy samymi egzosomami pochodzącymi z różnych źródeł ich cechą wspólną są charakterystyczne białka transportowe i fuzyjne (GTPazy, aneksyny, flotylina), tetraspaniny (CD9, CD63, CD81, CD82), białka szoku cieplnego (Hsc70, Hsp90), białka biorące udział w tworzeniu ciałek wielopęcherzykowych (ang. *multivesicular body,* MVB) (Alix (ang. *ALG-2-interacting protein X*), TSG101 (ang. *tumor susceptibility gene 101*)), a także białka i fosfolipazy związane z lipidami. Najczęstsze markery wykorzystywane do identyfikacji egzosomów to: tetraspanniny, Alix, flotylina, TSG101 i Rab5b [50].

BIOGENEZA

Powstawanie egzosomów jest skomplikowanym i kilkuetapowym procesem. Ważną rolę odgrywają lipidy, które prawdopodobnie napędzają cały mechanizm i biorą udział podczas sortowania ładunku wewnętrznego MVB [5]. Proces zaczyna się w układzie endosomalnym, kiedy to wczesne endosomy dojrzewają do późnych endosomów. W trakcie tej przemiany błona endosomalna ulega przekształceniom i pączkowaniu tworząc pęcherzyki w świetle, tzw. ILV (ang. *intraluminal vesicles*), wewnątrz MVB. Następnie MVB transportowane do błony komórkowej ostatecznie ulegają fuzji i uwalniają egzosomy. Za formowanie ILV odpowiadają zasadniczo dwa mechanizmy: ESCRT-zależny i ESCRT-niezależny, omówione w późniejszych punktach [21].

POWSTAWANIE MVB

Cała ścieżka endocytarna jest bardzo dynamicznym procesem, a jej głównym zadaniem jest utrzymanie równowagi między zewnątrzkomórkowymi lub komórkowymi ligandami, ich recyklingiem lub degradacją. Na poszczególnych etapach wyróżnia się różne struktury o budowie pęcherzyka: wczesne endosomy, późne endosomy oraz endosomy recyrkulujące [17]. Droga wczesnego endosomu może być różna. Po pierwsze, może dojść do fuzji z pęcherzykiem endocytarnym, gdy jego zawartość jest przeznaczona do wydzielenia lub degradacji. Jeśli zawartość endosomu przeznaczona jest do recyklingu wówczas po fuzji tworzą się tzw. endosomy recyklingu. Pozostałe endosomy wczesne przekształcają się w endosomy późne [1]. W trakcie dojrzewania późnych egzosomów w ich świetle gromadzą się ILV, które powstają na skutek pączkowania wewnętrznej błony endosomalnej. Późne endosomy zawierające wiele drobnych ILV to tzw. MVB [12].

Uważa się, iż głównym przeznaczeniem MVB jest degradacja lizosomalna, stąd MVB, których zawartość przeznaczona jest do degradacji łączą się z lizosomami. Należy jednak zwrócić uwagę na MVB, które nie wstępują na drogę lizosomalną. Takie pęcherzyki w wyniku połączenia z błoną komórkową i uwolnieniem do przestrzeni pozakomórkowej ILV, wydzielają drobne pęcherzyki zwane egzosomami [1, 21].

Powstawanie ILV wymaga dwóch odrębnych procesów. Pierwszy to rearanżacja błony endosomalnej, tak aby wzbogaciła się o tetraspaniny, wśród nich najważniejsze to CD9 oraz CD63. Drugi proces to aktywacja kompleksu białek ESCRT, który pomaga utworzyć i uwolnić egzosomy do przestrzeni pozakomórkowej [1]. Podczas formowania ILV dochodzi do sortowania białek transbłonowych oraz lipidów wewnątrz pęcherzyków MVB. Proces sortowania ładunku zachodzi dzięki aktywnemu procesowi ubikwitynacji, w którym małe białko ubikwityny „naznacza" cząstkę, która ma znaleźć się wewnątrz ILV. Oznaczony ładunek jest rozpoznawany przez kompleks ESCRT i rozpoczyna się proces sortowania i tworzenia pęcherzyków ILV [5].

Formowanie ILV z MVB – mechanizm ESCRT-zależny

Endosomalny kompleks sortujący, czyli ESCRT (ang. *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) to kompleks białek zaangażowanych w powstawanie ILV wewnątrz MVB. Kompleks ten składa się z czterech kompleksów białkowych oraz białek towarzyszących. Zadania poszczególnych kompleksów białkowych przedstawiono w **tabeli 1**. Białka pomocnicze, a w szczególności VPS4 ATPaza oraz białko Alix, odpowiadają za dysocjację oraz recykling całego kompleksu ESCRT [26]. Kompleks ESCRT 0 składa się z dwóch białek HRS (substrat kinazy tyrozynowej regulowany czynnikiem hepatocytów, ang. *hepatocyte growth factor–regulated tyrosine kinase substrate*) oraz STAM1 (cząsteczka adaptera transdukującego sygnał, ang. *signal transducing adaptor molecule*). HRS rozpoznaje monoubikwitynowany ładunek białkowy i wiąże się z białkiem

STAM1 oraz dwoma białkami pomocniczymi: Eps15 i klatryną [12]. HRS jest białkiem cytoplazmatycznym, stąd obecność klatryny pomaga odnaleźć ładunek. W kolejnych etapach ESCRT-I oraz ESCRT-II dołączają do ESCRT-0, tworząc duży kompleks białkowy o wysokim powinowactwie do różnych substratów po stronie endosomalnej [29]. HRS wiąże się z białkiem TSG101, będącego częścią ESCRT-I. Związanie ESCRT-III zachodzi za pośrednictwem ESCRT-II lub białka Alix [12]. Białko Alix pośredniczy w połączeniu TSG101 z białkiem CHMP4A tym samym ułatwia połączenie dwóch kompleksów ESCRT-I z ESCRT-III [1]. Dodatkowo białko Alix wspomaga kompleks ESCRT-III zwiększając ilość pączkujących egzosomów, a sama aktywność kompleksu ESCRT-III zależna jest od napięcia błony endosomalnej [26, 48]. Gdy dojdzie do przyłączenia ESCRT-III cały kompleks przybliża się do błony i tworząc pęcherzyki uwalnia egzosomy do środowiska zewnątrzkomórkowego [29]. Aby doszło do uwolnienia i oddysocjowania wszystkich składowych systemu ESCRT niezbędna jest aktywność kompleksu VPS4, w skład którego wchodzi ATPaza [12].

Rola białka pomocniczego Alix w powstawaniu egzosomów opiera się na mechanizmie syndekan – syntenina – ALIX. Syndekan to transbłonowe białko składające się między innymi z trzech do pięciu łańcuchów siarczanu heparanu i siarczanu chondroityny. Pełni funkcję głównie koreceptora. Syntenina, jest rozpuszczalnym białkiem, które dzięki zdolności przekazywania sygnałów odpowiada za organizację błony komórkowej, adhezję komórek, czy aktywację czynników transkrypcyjnych. Syntenina odgrywa ważną rolę podczas powstawania

TABELA 1. Zadania poszczególnych kompleksów białkowych w formowaniu ILV z MVB w mechanizmie ESCRT-zależnym [5, 26]
TABLE 1. The role of protein complexes in the formation of ILV from MVB in the ESCRT-dependent mechanism [5, 26]

Nazwa kompleksu	Białka w obrębie kompleksu	Funkcja
ESCRT-0	Hrs TSG101	• Powstawanie endosomalnego ładunku, • Rozpoznawanie zubikwitynowanego białka • Rozpoznawanie i upakowanie ładunku zależnie od ubikwityny
ESCRT-I	STATM1	• Oddziaływanie i rozpoznawanie kompleksu ESCRT-0 • Indukcja tworzenia pęcherzyków
ESCRT-II		• Aktywacja kompleksu ESCRT IIII • Indukcja tworzenia pęcherzyków
ESCRT-III	CHMP4C VPS4B VTA1 ALIX	• Tworzenie bariery zatrzymującej ładunek oraz zapobieganie deformacji błony • Promocja pękania pęcherzyków

egzosomów. Z jednej strony oddziałuje z białkiem Alix, składową układu ESCRT i białkiem CD63, z drugiej z syndekanem [49]. Ważnym elementem tego układu jest jeszcze heparanaza, która przecinając boczne łańcuchy siarczanu heparanu w syndekanach ułatwia wiązanie się synteniny. Dowiedziono, iż działanie tego mechanizmu znacząco zwiększa ilość uwalnianych egzosomów [21, 41].

Formowanie ILV z MVB – mechanizm ESCRT-niezależny

Mówiąc o mechanizmie ESCRT- niezależnym podczas tworzenia ILV bierze się pod uwagę kilka oddzielnych mechanizmów. Są to procesy, w które zaangażowane są lipidy, tetraspaniny lub białka szoku cieplnego [26].

Lipidy – udział w formowaniu ILV

Jednym z mechanizmów ESCRT-niezależnym jest mechanizm zależny od sfingomielinazy. Naukowcy zwrócili uwagę, na fakt, iż egzosomy, które w swojej strukturze posiadają białko proteolipidowe (ang. *proteolipid protein,* PLP), po wyciszeniu mechanizmu ESCRT, są ciągle wydzielane do przestrzeni pozakomórkowej [26]. Białko proteolipidowe gromadzące się w dużych ilościach wewnątrz późnych endosomów warunkuje uwalnianie się egzosomów do przestrzeni pozakomórkowej. Zależność ta wynika z faktu, że egzosomy bogate w PLP lokalizują się w przestrzeniach endosomalnych bogatych w flotylinę oraz glikozylofosfatydyloinozytol. Jednym ze szlaków warunkujących ich wydzielanie jest szlak wymagający aktywności sfingomielinazy typu II (nSMase2), która hydrolizuje sfingomielinę do ceramidu. Wysokie stężenie ceramidu powoduje spontaniczne zakrzywienie błony endosomalnej, a tym samym wspomaga proces pączkowania. Wykazano, iż wyciszenie ekspresji sfingomielinazy, prowadzi do upośledzenia biogenezy ceramidowej i zmniejszenia wydzielanej ilości egzosomowego białka PLP [11, 26, 46, 49].

Innym lipidem, który wspomaga wydzielanie egzosomów jest cholesterol. Akumulacja cholesterolu w późnych endosomach sprzyja zwiększonemu uwalnianiu egzosomów w końcowym etapie ich formowania [26].

Opisano również udział fosfolipazy D2 (PLD2) jako czynnika niezbędnego w powstawaniu egzosomów. PLD2 odpowiada za hydrolizę fosfatydylocholiny do kwasu fosfatydowego i choliny. PLD2 działa jako efektor małego czynnika rybozylacji ADP GTPazy 6 (ARF6), który został zidentyfikowany jako regulator tworzenia ILV i biogenezy egzosomów [21]. PLD2 pośredniczy również w produkcji kwasu lizofosfatydowego (LBPA), poprzez produkcję jego prekursora, fosfatydyloglicerolu (PG), w reakcji transfosfatydylacji. MVB oraz ILV zawierają duże ilości LBPA. Dodatkowo kwas ten promuje wewnętrzne budowanie pęcherzyków i tworzenie ILV. Ponadto LBPA jest zdolny do oddziaływania z białkiem Alix i hsp70 [49]. Mechanizm działania PLD2 jest prawdopodobnie podobny do opisanego dla ceramidu. Powstanie kwasu fosfatydylowego w wewnętrznej błonie MVB indukuje krzywiznę w błonie, a tym samym powstawanie ILV [26].

Kluczową rolę w tworzeniu MVB odgrywa również fosforan-1-sfingozyny (S1P). Badania dowodzą, że receptory S1P są w stanie ciągłej aktywacji na błonach endosomalnych, dzięki markerom MVB. Wyciszenie receptorów kinazy sfingozynowej (Sphk2) lub fosforanu-1-sfingozyny upośledza powstawanie CD63, CD81 i egzosomów [49]. Innym lipidem biorącym udział w powstawaniu egzosomów może być diacyloglicerol (DAG). Jest on przekaźnikiem lipidowym, który metabolizowany jest do kwasu fosfatydowego przez kinazę diacyloglicerolową α (DGKα). Zahamowanie aktywności DGKα prowadzi do spadku powstawania CD63 i uwalniania egzosomów [45].

Tetraspaniny – udział w formowaniu ILV

Formowanie ILV oraz egzosomów jest również zależne od tetraspanin, które występują w egzosomach w dużych ilościach [38]. Same tetraspaniny są integralnymi białkami błonowymi. Tetraspaniny organizują błony w tzw. domeny wzbogacone w tetraspaninę (TEM) poprzez interakcje z białkami przezbłonowymi, białkami cytozolowymi i lipidami [49]. Najbardziej powszechne tetraspaniny, występujące w całym organizmie to CD9, CD63, CD81, CD82 i CD151. Pozostałe w większości mają ograniczone występowanie do określonych tkanek. Tetraspaniny biorą udział w różnych procesach biologicznych, tj: adhezja komórek, ruchliwość, inwazja lub fuzja błony, a także sygnalizacja i kierowanie białkami [4].

Jedną z ważniejszych tetraspanin, jako mechanizm ESCRT-niezależny jest udział białka CD63. Udowodniono, że komórki z całkowicie wyciszoną ekspresją białek układu ESCRT zdolne są do produkcji egzosomów CD63-pozytywnych [4]. Białko CD63 odpowiada za kierowanie białka błonowego LMP1 (ang. *latent membrane proteins type 1*) kodowanego przez EBV, do ILV, a następnie umożliwia jego uwolnienie w egzosomach [12].

Inny mechanizm to proces zależny od nadekspresji CD9 lub CD82, które to z kolei indukują wydzielanie egzosomalnej β-kateniny z komórek [12]. Co ciekawe, nokaut genu dla CD9 w komórkach dendrytycznych szpiku kostnego myszy prowadzi do upośledzenia wydzielania egzosomów [4].

Wykazano również udział białka CD81, które wspomaga sortowanie białek egzogennych i proces sortowania ładunku egzosomu niezależny od ESCRT [12]. Odgrywa również fundamentalną rolę w organizacji mikrodomen w błonie egzosmalnej [49].

Białka – udział w formowaniu ILV

Białkiem, które odgrywa rolę w mechanizmie ESCRT-niezależnym jest między innymi niewielkie białko SIMPLE. Jest to małe integralne białko błonowe lizosomu/późnego endosomu. Obecność tego białka zwiększa wydzielanie egzosomów z komórki [21].

Badania wskazują również na udział białka chaperonowego (opiekuńczego) HSC70, które odpowiada za umieszczenie receptora transferryny w egzosomach [26].

SORTOWANIE ŁADUNKU EGZOSOMÓW

Egzosomy zawierają białka, lipidy oraz kwasy nukleinowe. Skład ten w dużym stopniu zależy od typu komórki, z której są uwalniane egzosomy, a także zależy od czynników środowiskowych, jak np. podawanie leków. Ciekawym, lecz wciąż mało zbadanym procesem jest sposób w jaki sposób ładunek biologiczny jest sortowany do wnętrza egzosomu. Mechanizm sortowania w dużej mierze zależy od rodzaju cząsteczki jaką chcemy umieścić w egzosomie [21].

Upakowanie białek

Upakowanie białek wewnątrz egzosomów w dużej mierze zależy od białek układu ESCRT. Wiadomo również, że działa wiele selektywnych mechanizmów, ESCRT- niezależnych. Do najczęstszych mechanizmów należą: ubikwitynacja, SUMOylacja, ISGylacja, fosforylacja, glikozylacja i cytrulinacja. Do pozostałych procesów, o mniejszym znaczeniu w upakowaniu białek do egzosomów, zalicza się: mirystylację oraz utlenianie [5, 49].

Upakowanie lipidów

Obecnie jest mało informacji na temat mechanizmów sortowania lipidów. Zaobserowowano jednak, że strukturalne lipidy błony plazmatycznej, w tym fosfatydylocholina, fosfatydyloinozytol, fosfatydyloglikol i fosfatydyloetanoloamina są mniej obfite na błonach egzosomów w przeciwieństwie do fosfatydyloseryny, która występuje w zwiększonej ilości [3].

Warto zwrócić uwagę, że lipidy biorą udział w określeniu białek jakie znajdą się wewnątrz egzosomów. Błony egzosomalne zawierają tratwy lipidowe, które bogate są w cholesterol oraz glikosfingolipidy, odgrywające ważną rolę w sygnałizowaniu i sortowaniu ładunku egzosomalnego. Za sortowanie ładunku odpowiada między innymi sfingozyna-1-fosforanu, która oddziałuje poprzez receptory S1P sprzężone z białkiem G znajdującym się na błonie MVB [21].

Upakowanie RNA

Ładunek RNA i miRNA znajdujący się w egzosomach znacząco różni się od tego jaki znajduje się w cytoplazmie komórki. Niestety proces upakowania RNA do egzosomów również nie jest jeszcze bardzo dobrze poznany.

Wiadomo jednak, że proces SUMOylacji odgrywa istotną rolę podczas pakowania cząsteczek RNA. Jak dotąd udało się zidentyfikować motyw sekwencji (GAGAG w części 3' miRNA), który kontroluje pakowanie miRNA przez białkową heterogeniczną jądrową rybonukleoproteinę A2B1 (hnRNPA2B1). Naukowcy wskazali motyw sekwencji egzosomalnej, który wiąże się z SUMOilowanym fragment hnRNPA2B1 odpowiadając za wiązanie i pakowanie miRNA do wnętrza egzosomu [49].

Drugim uznanym czynnikiem odpowiedzialnym za sortowanie miRNA jest czynnik KRAS. Zmutowany czynnik KRAS odpowiada za zmniejszone wydzie-

lanie białka Argo2 w egzosomach. Zauważono również, że egzosomalne mRNA jest wzbogacone we fragmentach 3'UTR co może odgrywać ważną rolę podczas sortowania do egzosomów [8].

Istotną rolę odgrywają także same białka takie jak Argonaut 2 (Ago2). Ważny składnik kompleksu miRISC jest zaangażowany w sortowanie miRNA do egzosomów. Badania pokazują, że nokaut genu dla tego białka zmniejsza liczbę miRNA [18].

UWALNIANIE ILV

Powstawanie i uwalnianie ILV jest procesem skomplikowanym. Badania pokazują, że za sekrecję egzosomów w dużej mierze odpowiedzialne są białka z rodziny Rab. Jest to rodzina małych białek GTPaz. Ich rola obejmuje procesy wewnątrzkomórkowego przemieszczania się pęcherzyków, w tym ich pączkowanie, czy interakcje z cytoszkieletem, a także fuzje błon. Procesy te możliwe są dzięki odwracalnemu łączeniu się białek Rab z błoną plazmatyczną [26].

Sam transport MVB do błony cytoplazmatycznej opiera się na interakcji Rab z aktyną oraz mikrotubulami cytoszkieletu. Zwiększenie wiązania aktyny sprzyja zwiększonemu uwalnianiu egzosomów; jest to powiązane z aktywnością kortyny i jej nadekspresją w komórce. Kortyna odpowiada również za przyłączenie MVB do błony plazmatycznej. Wiązanie z aktyną i mikrotubulami, a w konsekwencji fuzję błon wspomagają także białka Rab [21]. Najważniejszą rolę na różnych etapach uwalniania egzosomów odgrywają białka: Rab4, Rab5, Rab11, Rab35, Rab27a i Rab27b. Białka Rab4 i Rab5 służą do oznaczenia wczesnych endosomów. Rab11 kieruje endosomy na drogę recyklingu. Białka Rab7 i Rab9 są markerami późnych endosomów. W procesie dojrzewania endosomów zmniejsza się ilość białka Rab5 na rzecz białka Rab7 [49]. Białka Rab27a i Rab27b odpowiadają za dokowanie na błonie cytoplazmatycznej, a ich wyciszenie skutkuje zmniejszonym wydzielaniem egzosomów [35, 38]. Wpływ białka Rab11 na egzosomy wiąże się z hamowaniem ich uwalniania. Rab11 ma zdolność wiązania FIP2 (białka 2 oddziałującego z rodziną Rab11) dzięki czemu ułatwia przyłączenie miozyny oraz może wiązać FIP3 umożliwiając przyłączenie dyneiny [49]. Ważną rolę aktyny jako miejsca dokowania MVB i wydzielania egzosomów wykazały badania, w których udowodniono, iż miejscami zwiększonego wiązania MVB są inwadopodia, bogate w aktynę struktury subkomórkowe, zdolne do degradacji macierzy pozakomórkowej [22]. Sam ruch MVB wzdłuż mikrotubul jest kontrolowany między innymi przez zawartość cholesterolu w błonie komórkowej. Innymi białkami, towarzyszącymi przy fuzji błon cytoplazmatycznej z MVB, są białka SNARE. Ich udział opiera się na połączeniu dwóch białek SNARE, jedno znajdujące się na błonie MVB (v-SNARE), drugie na błonie cytoplazmatycznej (t-SNARE) [9].

Uwalnianie egzosomów może być również zależne od wapnia. Zwiększony poziom wapnia w komórce sprzyja uwalnianiu większej ilości egzosomów [49].

Na podstawie Abels i wsp. można ogólnie przyjąć pięć mechanizmów, które odpowiadają za proces fuzji błony MVB z cytoplazmatyczną.

1. Główne białka zaangażowane w uwalnianie egzosomów to RAB11 i RAB35. Uwolnione egzosmy w tym procesie wzbogacone są w białka takie jak flotylina, Wnt, PLP oraz receptor dla transferyny (TfR).

2. Uwalnianie egzosomów bogatych w późne białka endosomalne (np. CD63, ALIX i TSG101) wiąże się z udziałem białek RAB27A/B.

3. GTPaza Rab7 bierze udział w uwalnianiu egzosomów bogatych w Alix i synteninę.

4. Uwalnianie egzosomów, może być też Rab-niezależne, wówczas za uwalnianie egzosomów jest odpowiedzialna kinaza diacyloglicerolowa, której nadekspresja hamuje uwalnianie egzosomów CD63-dodoatnich zawierających ligand Fas.

5. Ostatnim znanym mechanizmem uwalniania egzosomów jest mechanizm z udziałem białek SNARE. Są to białka odpowiedzialne za fuzję dwóch błon komórkowych [1].

FIZJOLOGICZNA ROLA I ZNACZENIE EGZOSOMÓW

Egzosomy pochodzące z różnych komórek wydzielane są do otaczającego środowiska. Ich fizjologiczna rola jest różna w zależności od płynu ustrojowego, w którym się znajdują. Egzosomy obecne są w moczu, ślinie, płynie maziowym, żółci, płynie mózgowo-rdzeniowym, płynie oskrzelowo-pęcherzykowym, płynie nosowym, płynie macicznym, płynie owodniowym, mleku matki, krwi, kale, czy nasieniu [31, 54]. Można spojrzeć szerzej na egzosomy zastanawiając się jaką rolę mogą pełnić w poszczególnych układach narządowych. Poniżej wybrano i opisano udział egzosomów w ważniejszych procesach fizjologicznych.

ROLA EGZOSOMÓW W PŁYNACH USTROJOWYCH

Ładunek egzosomów jaki do tej pory został zidentyfikowany i opisany w moczu to egzosomy wydzielane ze wszystkich komórek otaczających przestrzeń pęcherza moczowego. Egzosomy stanowią około 3% wszystkich białek moczu. Egzosomy w moczu pochodzą z tkanek nerki, z moczowodów, nabłonka przejściowego pęcherza moczowego, cewki moczowej, a także u mężczyzn z komórek nabłonka prostaty. Charakterystycznym markerem określającym pochodzenie egzosomów z układu moczowego jest białko CD24, które obecne jest na podocytach oraz komórkach kanalików. Jedną z możliwych funkcji egzosomów w drogach moczowych może być regulacja współdziałania różnych części nefronu poprzez wydzielanie i wychwyt zwrotny ich zawartości, przede wszystkim mRNA i mikroRNA, które mogą wpływać na funkcję komórki „biorcy" egzosomu [14, 34]. Inną rolą egzosomów układu moczowego jest udział w układzie renina-angioten-

syna. Ponadto egzosomy z moczu są wzbogacone w białka przeciwdrobnoustrojowe oraz receptory bakteryjne i wirusowe, co sugeruje ich udział we wrodzonych mechanizmach odpornościowych układu moczowego [53].

Pomimo, iż ślina składa się w 99% z wody, a tylko 1% stanowią białka, badania pokazują, iż także w niej zawarte są egzosomy. O obecności i roli egzosomów w ślinie świadczy ich aktywne działanie na keratynocyty oraz makrofagi w jamie ustnej. Na podstawie analizy specyficznych markerów pokazano, że komórki nabłonka gruczołu ślinowego uwalniają egzosomy, które następnie obecne są w ślinie [52]. Egzosomy izolowane ze śliny są powiązane z różnymi chorobami jamy ustnej i nie tylko. Sama diagnostyka śliny ma niewątpliwie ogromne zalety, głównie ze względu na nieinwazyjność oraz łatwość pobierania materiału. Niestety ma też wady, duża ilość amylazy może maskować białka o niewielkiej ekspresji. Egzosomy śliny mogą ułatwić przezwyciężyć tą trudność. Badania pokazują, iż wykrycie aberracji w stosunku do prawidłowych egzosomów izolowanych ze śliny może posłużyć jako potencjalny czynnik diagnostyczny i terapeutyczny [20].

Prawdopodobnie najbardziej „popularnym" miejscem pozyskiwania egzosomów i badania ich właściwości jest krew. Najczęściej izoluje się je z osocza, ponieważ uważa się, że podczas krzepnięcia krwi tuż po pobraniu, egzosomy mogą spontanicznie powstawać w surowicy [52]. Ciekawym aspektem badania egzosomów krwi jest sama ich ilość. Okazuje się, że stan patologiczny w organizmie skutkuje zwiększoną ilością egzosomów we krwi. Do fizjologicznych funkcji egzosomów pochodzących z osocza zaliczyć można udział w procesach koagulacji, równowagi naczyniowej, czy komunikację między matką, a płodem [52].

Spośród biologicznych płynów, w których naukowcy znaleźli i badają obecność egzosomów jest mleko matki. Jest ono złożonym płynem ustrojowym bogatym w składniki immunologiczne, tj.: laktoferyna, immunoglobulina A i cytokiny, które wspomagają odporność niemowlęcia. [52]. Szczególne znaczenie jakie mogą mieć egzosomy pochodzące z mleka matki rozpatruje się w kontekście ich wpływu na komórki przewodu pokarmowego. Egzosomy z mleka oporne na trawienie, ale endocytowane przez komórki nabłonka jelitowego niemowlęcia zdolne są zwiększać proliferację komórek jelitowych przez aktywację markera komórek macierzystych [15]. Ważną rolę egzosomów naukowcy potwierdzili również w badaniach mleka pochodzącego od matek, które urodziły przedwcześnie oraz terminowo. Okazało się, że egzosomy izolowane i podawane z mleka „przedwczesnego" cechował zwiększony wpływ na proliferację komórek związany z aktywacją laktotransferyny oraz laktoadheryny [15].

ROLA EGZOSOMÓW W HOMEOSTAZIE NACZYNIOWEJ

Jedną z lepiej poznanych fizjologicznych funkcji egzosomów jest ich udział w procesie krzepnięcia i homeostazy. Sam proces koagualacji jest inicjowany głównie przez czynnik tkankowy (ang. *tissue factor,* TF) oraz fosfolipidy. Są to

dwa elementy, które odpowiadają za zwiększone krzepnięcie. W błonie egzosomów krążących we krwi znajduje się zakotwiczona domena czynnika tkankowego oraz głównie fosfatydyloseryna (ang. *phosphatidylserine,* PS), co świadczy o prokoagulacyjnej funkcji egzosomów. Egzosomy krążące we krwi mogą mieć różne pochodzenie, zarówno fizjologiczne, jak i patologiczne, w tym także nowotworowe. Zwiększona pula egzosomów w obiegu, często związana jest z rozwijającą się chorobą nowotworową, co w następstwie przyczynia się do rozwoju choroby żylnej zakrzepowo-zatorowej [32]. Warto zwrócić uwagę na fakt, iż interakcje komórkowe oraz współdziałanie z subpopulacjami egzosomów (różnego pochodzenia) wykazują działanie na różnych poziomach całego procesu koagulacji. Prokoagulacyjne egzosomy, czyli bogate w TF oraz PS, produkowane są głównie przez płytki krwi, subpopulacje leukocytów, erytrocyty oraz megakariocyty. Badania pokazują, że egzosomy pozbawione domeny TF mają znacznie niższą aktywność prozakrzepową. Co ciekawe, w warunkach fizjologicznych egzosomy wydzielane przez komórki krwiotwórcze odgrywają ważną rolę w utrzymaniu homeostazy. Dopiero zwiększona ilość krążących komórek, a co za tym idzie uwalnianych przez nie egzosomów, prowadzi do jej zaburzenia [36].

ROLA EGZOSOMÓW W UKŁADZIE IMMUNOLOGICZNYM

Rola egzosomów w układzie immunologicznym jest wysoce istotna i szeroko opisana. Dotychczasowe badania pokazują, iż za pierwsze mechanizmy wrodzonej odpowiedzi immunologicznej odpowiadają egzosomy, stanowiąc prozapalny, parakrynny pośrednik. Zaobserwowano, iż u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi występuje podwyższona ilość egzosomów. Z drugiej strony silna terapia przeciwzapalna wcale nie wiąże się ze zmniejszoną ilością uwalnianych egzosomów. O prozapalnej aktywności egzosomów może świadczyć między innymi pobudzanie komórek do wydzielania zwiększonej ilości TGF-β. Różne rodzaje komórek układu immunologicznego wydzielają egzosomy, a ładunek oraz rodzaj komórki gospodarza determinuje ich funkcje [6, 52].

Funkcja jaką pełnią w układzie immunologicznym egzosomy to także pośrednia i bezpośrednia prezentacja antygenów. Bezpośrednia rola prezentacji antygenów wynika z podobieństwa topologicznego egzosomów z komórkami APC (komórka prezentująca antygen, ang. *antigen-presenting cell*) i prezentacją na swojej powierzchni cząsteczek MHC. Egzosomy uwalniane przez komórki APC, zawierają na swojej powierzchni cząsteczki MHC klasy I i II, które bezpośrednio oddziałują z limfocytami T, zarówno CD4, jak i CD8 [39]. Z kolei pośrednia rola egzosomów w prezentacji antygenów, to wykorzystanie komórki prezentującej antygen, głównie komórki dendrytyczne. Egzosomy posiadają na swojej powierzchni dużą ilość cząsteczek ICAM-1 wykazując tym samym powinowactwo do komórek dendrytycznych. Dojrzałe komórki dendrytyczne wzbogacają egzosomy w ładunek w postaci cząsteczek MHC klasy II, cząsteczki CD86 oraz

ICAM-1. Uwalniane egzosomy z komórek APC cechuje zwiększona aktywność aktywacji limfocytów T [39].

Nieco inne funkcje pełnią egzosomy uwalniane przez monocyty. Jedną z ich jest aktywacja i pobudzenie przejścia naiwnych monocytów w makrofagi, które są ważnym regulatorem proliferacji i różnicowania komórek mieloidalnych. Z drugiej strony egzosomy uwalniane przez monocyty biorą udział w zakażeniach mikrobiologicznych, poprzez symulację prozapalnej odpowiedzi [40].

Z kolei egzosomy uwalniane przez neutrofile zaangażowane są w pobudzenie sekrecji cytokin, tj. TGF-α, TGF-β, IL-8 oraz IL-6. Wspomagają także proces fagocytozy komórek skierowanych na proces apoptozy [52].

ROLA EGZOSOMÓW W RÓWNOWADZE WĄTROBOWEJ

Wątroba jako ważny narząd zaangażowana jest w różne przemiany zachodzące w organizmie człowieka. Główną masę komórek stanowią hepatocyty, poza tym występują komórki warunkujące komunikację, w tym komórki związane i niezwiązane z układem immunologicznym. Te pierwsze odpowiadają głównie za immunologiczną ochronę wątroby, natomiast te drugie warunkują równowagę procesów angiogenezy, fibrozy, czy procesów zapalnych. Ostatnie badania pokazują, że ważną rolę w tym mikrośrodowisku zapewniają egzosomy, jako istotny nośnik informacji [52].

Egzosomy pochodzące z hepatocytów bogate są w enzymy tj. cytochrom P450, urydyno 5'-difosfo–glukuronozylotransferaza (ang. *Uridinediphosphate Glucuronosyl Transferase,* UGT), czy transferaza S-glutationowa (ang. *Glutathione S-Transferase,* GST), co sugeruje ich udział w procesach metabolicznych np. ksenobiotyków. Obecność tych enzymów wewnątrz egzosomów oraz łatwość przemieszczania się tych cząstek między komórkowo może świadczyć o wsparciu rozkładu ksenobiotyków w innych komórkach organizmu [13]. Ponadto RNA, wyizolowane z egzosomów pochodzących z hepatocytów, ma zdolność aktywacji komórek i pośredniczy w naprawie komórek wątroby [42].

Egzosomy w wątrobie wydzielane są nie tylko przez hepatocyty, ale także cholangiocyty, przez co wykrywane są także w żółci. Pokazano, że mają one zdolność hamowania ścieżki sygnalizacyjnej związanej z kinazą ERK, a tym samym odpowiadają za proliferację choliangocytów [30].

REGENERACYJNE WŁAŚCIWOŚCI EGZOSOMÓW

Regeneracyjne właściwości egzosomów skupiają się głównie na zmianie fenotypu komórek oraz uwalnianiu czynników w tkankach regeneracyjnych. Ich działanie opiera się głównie na komunikacji z komórką oraz dostarczaniu specyficznego RNA w tzw. nisze komórek macierzystych. W procesie regeneracji duży udział ma transport międzykomórkowy egzosomów [37]. Jednym z opisanych procesów, gdzie udział mają egzosomy, jest regeneracja płuc. Zmiana fenotypu komórki szpiku kostnego poprzez zmianę ekspresji naskórkowego prosurfaktantu

B, przez egzosomy pochodzące z płuca, a następnie wszczepienie komórek szpiku do płuca, po urazie, pokazało nowy mechanizm regeneracji tkanki płuca [2]. Podobne wnioski wyciągnieto badając proces regeneracji wątroby, gdzie stwierdzono, że proces ten nie zachodzi jedynie dzięki oddziaływaniu komórek macierzystych, ale także poprzez uwalnianie egzosomów do mikrośrodowiska. Inne badania potwierdzające regeneracyjne właściwości egzosomów pochodzących z komórek MSC zauważano w przypadku uszkodzenia nerek oraz tkanek pozawałowych mięśnia serca [52].

ROLA EGZOSOMÓW W PROCESIE NOWOTWOROWYM

W części wstępnej opisano poszczególne składowe mikrośrodowiska wskazując jednocześnie, że termin ten nie odnosi się jedynie do komórek prawidłowych, ale także nowotworowych. W skład mikrośrodowiska nowotworowego wchodzą m.in. fibroblasty, komórki immunologiczne oraz komórki endotelialne. Zarówno same komórki, jak i otaczające je elementy mikrośrodowiska mogą wpływać na zmiany zachodzące w mikrośrodowisku nowotworowym (ang. *tumor microenvironment*, TME). Zmiany zachodzące w TME obejmują wszystkie stadia rozwoju nowotworu, od inicjacji, progresji, metastazji, po inwazję. Badania potwierdziły, iż elementem, który oddziałuje zarówno na same komórki nowotworowe, jak i elementy tworzące TME, są egzosomy [23, 25, 51].

Wang i wsp. [50] określili trzy zasadnicze mechanizmy działania egzosomów związane z rozwojem nowotworu.

1. Oddziaływanie egzosomów z komórkami układu odpornościowego.
2. Wpływ egzosomów poprzez dostarczanie ładunku molekularnego w postaci m.in. miRNA, mRNA, fragmentów DNA i białek
3. Udział egzosomów na etapach inwazji, przerzutowania i lekooporności, pełniąc funkcję sygnałów komunikacyjnych między komórkami [50].

Poniżej opisano i scharakteryzowano najważniejsze punkty, w których egzosomy odgrywają istotną rolę.

WZROST ZMIANY NOWOTWOROWEJ

Egzosomy wydzielane przez komórki nowotworowe mogą zmieniać i wpływać na lokalny rozwój komórek nowotworowych poprzez autokrynne sygnały zawarte w egzosomach. Efekt działania egzosomów na pobliskie komórki jest zależny od rodzaju komórek nowotworowych z jakich pochodzą. Autokrynne sygnały wysyłane przez egzosomy wpływają między innymi na przyspieszenie proliferacji komórek poprzez aktywację fosforylacji Akt [24]. Sam stres komórkowy często prowadzi do zwiększenia ilości białek szoku cieplnego oraz surwiwiny w egzosomach. Białka te mają silną zdolność pobudzania proliferacji komórek, przyczyniając się tym samym do szybszego rozwoju nowotworu [16].

ANGIOGENEZA I NEOANGIOGENEZA

Angiogeneza jest procesem nierozłącznym z rozwojem nowotworu. Jednym z ważnych elementów wspomagających proces neowaskularyzacji są egzosomy. Sam proces powstawania nowych naczyń w dużej mierze opiera się na interakcji pomiędzy komórkami endotelialnymi, a otaczającym je środowiskiem. Dotychczas pokazano, że egzosomy uwalniane z komórek endotelialnych bezpośrednio stymulują angiogenezę. Powyższe stwierdzenie potwierdzono w różnych nowotworach, m.in. białaczkach, raku jajnika, raku piersi, czy w glejaku wielopostaciowym [19]. Opisano różne mechanizmy molekularne, poprzez które egzosomy uczestniczą w angiogenezie. Jednym z nich jest inkorporacja i przeniesienie białka Delta4 (ang. *delta-like ligand 4 protein,* Dll4) do sąsiednich komórek śródbłonka. W konsekwencji prowadzi to do zahamowania sygnalizacji Notch i pobudzenia powstawania nowych naczyń. Dowodzi to, że proces waskularyzacji nie jest zależny od bezpośredniego kontaktu komórka-komórka, a jedynie pobudzenia całego procesu przez odpowiednie mediatory [43].

Dotychczasowe badania wskazują, iż pobudzenie angiogenezy przez egzosomy nowotworowe w dużej mierze zależne jest od „komórki-matki". Komórki różnych nowotworów uwalniają egzosomy bogate w różne białka o działaniu proangiogennym. I tak egzosomy pochodzące z glejaka wielopostaciowego zawierają angiogeninę, VEGF, TGFβ, IL-6, IL-8, TIMP-1 i TIMP-2, a ponadto przenoszą enzymy proteolityczne (MMP2 i MMP9) oraz receptor chemokiny CXCR4. Egzosomy uwalniane przez komórki szpiczaka mnogiego bogate są w VEGF, βFGF, MMP9 i HGF. Egzosomy pochodzące z czerniaka zawierają białka takie jak IL-6, VEGF i MMP2. Z kolei w gruczolakoraku płuca egzosomy bogate są w sortylinę, która odpowiada za wzrost ekspresji endoteliny-1, IL-8, TSP-2, μPA i VEGF. W egzosomach z raka piersi białkiem proangiogennym jest aneksyna II, a w raku pęcherza moczowego EDIL-3 (ang. *EGF-like repeats anddiscoidin I-like domain-3*) [28].

Nieco innym zagadnieniem jest działanie proangiogenne microRNA i miRNA zawartego w egzosomach. Wydaje się, że odpowiednie cząsteczki RNA zawarte w egzosomach mogą działać jako czynniki parakrynne lub autokrynne, pobudzając proces waskularyzacji. Jako jeden z przykładów może posłużyć badanie egzosomów izolowanych z komórek przewlekłej białaczki szpikowej (ang. *chronic myeloid leukemia*, CML). Naukowcy odkryli, że nadekspresja miR-92a w egzosomach pochodzących z komórek CML skutkuje zwiększoną aktywnością w stosunku do komórek śródbłonka, do których dostały się egzosomy. W konsekwencji następowała zwiększona migracja komórek i powstawanie nowych naczyń włosowatych [47]. Osobnym zagadnieniem jest również uwalnianie egzosomów w warunkach niedotlenienia. Jako przykład posłużyć mogą badania na komórkach raka nerki, gdzie w warunkach niedotlenienia komórki te wydzielają egzosomy z CA9 (anhydraza węglanowa 9, ang. *carbonic anhydrase 9*). W konsekwencji dochodzi

do wzmożenia procesu angiogenezy w mikrośrodowisku tych komórek i progresji nowotworowej. W innych badaniach pokazano, iż w warunkach hipoksji miR-21-5p uwalniane przez egzosomy pochodzenia nowotworowego bezpośrednio hamuje m.in. TGF-β aktywując proces powstawania nowych naczyń krwionośnych. Innym przykładem są egzosomy pochodzące z mezenhymalnych komórek macierzystych (MSC), które aktywują angiogenezę, m.in. w komórkach śródbłonka, czy poprzez wpływ na ekspresję VEGF w komórkach raka piersi. [27].

INWAZJA I METASTAZJA

Matastazja jest wieloetapowym procesem, który rozpoczyna się od inwazji i migracji komórek pierwotnych guza do nowego środowiska. Egzosomy wydzielane przez komórki nowotworowe niosą ze sobą istotny sygnał wspomagający, a czasem inicjujący proces metastazji [51].

miR-10b jest cząsteczką odpowiadającą za wspomaganie procesu inwazji w raku piersi. Egzosomy wydzielane przez komórki raka piersi bogate w miR-10b rozpoczynały proces przemiany prawidłowych komórek nabłonka piersi [52]. Podobne obserwacje poczyniono w stosunku do komórek raka płaskonabłonkowego jamy ustnej. Egzosomy wydzielane przez te komórki bogate są w miR-1246. Cząsteczka ta pobudza migracyjne i inwazyjne właściwości prawidłowych komórek w mikrośrodowisku [33]. Dotychczas poczyniono ciekawą obserwację w badaniach profili mRNA i miRNA egzosomów pochodzenia nowotworowego. Zaobserwowano, iż komórki nowotworowe rozwinęły selektywne mechanizmy upakowania ładunku molekularnego wybierając jedynie onkogenne mRNA i miRNA. Tym samym, jest to kolejny dowód na ważną rolę jaką pełnią egzosomy w procesie nowotworowym [44].

Innym przykładem są egzosomy pochodzące z komórek raka trzustki. Wykazano, że zdolne są do modyfikacji ECM fibroblastów płuca, komórek epitelialnych aorty oraz podścieliska węzłów chłonnych. Ich główna rola opiera się na degradacji elementów ECM: kolagenów, laminiy i fibronektyny dzięki proteinazowemu ładunkowi w jaki wzbogaciła je komórka-matka. Możliwość zmiany ECM przez egzosomy wskazuje, że wspomagają one cały proces nowotworzenia jednocześnie przyczyniając się do zwiększonej migracji komórek nowotworowych [52].

Powstawanie przerzutów opiera się głównie na degradacji i przebudowie ECM oraz na powstawaniu nowych naczyń krwionośnych. Udział egzosomów w kształtowaniu niszy nowotworowej opiera się na transporcie biologicznie aktywnych cząstek, promujących ten proces. Egzosomy pochodzenia nowotworowego często bogate są w białka takie jak MMP, VEGF, czy tetraspaniny, które pobudzają migrację komórek i ich rozprzestrzenianie się. Dodatkowo egzosomy dostarczają do nowo powstających komórek nowotworowych białek takich jak VEGF, FGF, TGF-β oraz odpowiednich cząsteczek RNA, które wspomagają angiogenezę w nowo powstających ogniskach przerzutowych [51].

LEKOOPORNOŚĆ I TRANSFER LEKÓW

Lekooporność jest obecnie bardzo dużym wyzwaniem dla terapii nowotworowej. Potwierdzono, że egzosomy są zaangażowane w zmianę fenotypową oporności komórkowej. Egzosomalny transfer miR-433 warunkuje oporność na palitaksel w raku jajnika. Z kolei w raku piersi egzosomalne lncRNA UCA1 (ang. *urothelial cancerassociated-1*) warunkuje oporność na tamoksifen w komórkach z receptorem estrogenowym. Również w raku piersi potwierdzono, iż egzosomy bogate w EGF2 o pełnej długości obniżają skuteczność terapeutyczną trastuzumabu poprzez jego wiązanie.

Warto zauważyć, że egzosomy można wykorzystać jako nośnik leków przeciwnowotworowych. Możliwość ich wykorzystania jest związana głównie z ich nietoksycznością oraz brakiem nadmiernej reakcji immunologicznej. Jako przykład posłużyć może podanie adriamycyny i palitakselu z zastosowaniem egzosomów co skutkowało niewielką immunogennością oraz toksycznością [29].

Badania pokazały, że nowotworowe komórki wykazujące lekooporność uwalniają dużą dawkę egzosomów bogatych w podawany lek. Jako przykład opisano komórki raka jajnika oporne na cisplatynę, które wydzielają egzosomy znacznie bogatsze w ten lek w stosunku do komórek raka jajnika wrażliwych na cisplatynę. Połączenie w przyszłości dwóch cech egzosomowych, możliwości transportu leków oraz modyfikacji fenotypowej komórki docelowej, może skutkować wykorzystaniem egzosomów w terapii przeciwnowotworowej [10, 53].

Inną zaletą wykorzystania egzosomów jako nośników leków jest fakt, iż mogą one dużo szybciej, niż liposomy, przenikać przez błony komórek nowotworowych. Z drugiej strony, poprzez dobór odpowiednich egzosomów, tj. z określonymi białkami powierzchniowymi, istnieje możliwość celowanego wykorzystania egzosomów jako nośników leków. Niewielki rozmiar egzosomów daje również możliwość wykorzystania ich jako nośników leków, które wymagają przekroczenia bariery np. krew-mózg.

Jednym z ciekawszych podejść wykorzystania egzosomów jako nośników leków jest ich zaprojektowanie, tak aby celowały w komórki CSC. Opisano konkretne markery komórek CSC, takie jak: CD44, CD24, CD133 i CD200, które pomogą w zaprojektowaniu celowanych egzosomów [29].

Wykorzystanie egzosomów w celach terapeutycznych związane jest również z możliwością dostarczania cząsteczek RNA, np. siRNA lub miRNA. Liczne dotychczasowe badania potwierdziły już ten fakt. I tak, miRNA-122, obecne w egzosomach pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych indukują chemiowrażliwość w raku wątrobowokomórkowym. Z kolei egzosomy z siRNA przeciwko PKL-1 (serynowo/treoninowa kinaza białkowa ang. *polo-like kinase 1*), w komórkach pęcherza moczowego skutkuje spadkiem ekspresji PLK-1 [29].

PODSUMOWANIE

Poznanie i zrozumienie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw biogenezy i funkcji egzosomów, stosownie do przebiegu procesów fizjologicznych czy stanów patologicznych w organizmie, ma szereg znaczeń, w tym ważne znaczenie poznawcze. Nie mniej jednak, z uwagi na „wielozadaniowość" egzosomów jako nośników informacji i modulatorów interakcji miedzy komórkami zdobycie nowej wiedzy w omawianym zakresie staje się podstawą do opracowania nowych strategii leczenia, w tym omijania lekooporności nowotworów. Prowadzone badania nad biogenezą i znaczeniem egzosomów pozwolą na opracowanie nowych strategii, które będą istotne z punktu widzenia klinicznego dla leczenia pacjentów, w tym pacjentów onkologicznych.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana ze środków projektu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, grant nr: PCN-1-174/N/0/I.

LITERATURA

[1] ABELS E, BREAKEFIELD X. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. Cell Mol Neurobiol 2016; **36**: 301-312.

[2] ALIOTTA J.M, SANCHEZ-GUIJO F.M, DOONER G.J, JOHNSON K.W, DOONER M.S, GREER K.A, GREER D, PIMENTEL J, KOLANKIEWICZ L.M, PUENTE N, FARADYAN S, FERLAND P, BEARER E.L, PASSERO M.A, ADEDI M. Alteration of Marrow Cell Gene Expression, Protein Production, and Engraftment into Lung by Lung-Derived Microvesicles: A Novel Mechanism for Phenotype Modulation. Stem Cells 2007; **25**: 2245-2256.

[3] ANAND S, SAMUELA M, KUMARB S, MATHIVANAN S. Ticket to a bubble ride: Cargo sorting into exosomes and extracellular vesicles. Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics 2019; **1867** (12): 1-10.

[4] ANDREU Z, YÁÑEZ-MÓ M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. Front. Immunol 2014; **5:** 1-12.

[5] BABST M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. Current Opinion in Cell Biology 2011; **23** (4): 452-457.

[6] BARROS FM, CARNEIRO F, MACHADO JC, MELO SA. Exosomes and Immune Response in Cancer: Friends or Foes? Front. Immunol 2018; **0**: 730.

[7] BARTHES J, OZCELIK H, HINDIE M, HASAN A, ENGIN N, CELL V, ÖZÇELIK H, HINDIÉ M., NDREU-HALILI A, VRANA NE. Cell Microenvironment Engineering and Monitoring for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. The Recent Advances. Biomed Res. Int. 2014; **2014**: 0-18.

[8] BATAGOV A.O, KUROCHKIN I.V. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3′-untranslated regions. Biol. Direct 2013; **8**: 1-8.

[9] BONIFACINO J.S, GLICK B.S. The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. Cell 2004; **116**: 153-166.
[10] BRINTON LT, KESTER M, KELLY KA. Formation and role of exosomes in cancer. Cell Mol Life Sci 2015;**72**(4): 659-71.
[11] COLOMBO M, MOITA C, VAN NIEL G, KOWAL J, VIGNERON J, BENAROCH P, MANEL N, MOITA L.F, THÉ RY C, RAPOSO G. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. J. Cell Sci 2013; **126**: 5553-5565.
[12] COLOMBO M, RAPOSO G, THÉRY C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2014; **30**: 255-289.
[13] CONDE-VANCELLS J, RODRIGUEZ-SUAREZ E, EMBADE N, GIL D, MATTHIESEN R, VALLE M, ELORTZA F, LU S.C, MATO J.M, FALCON-PEREZ J.M. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. J. Proteome Res. 2008; **7**: 5157-5166.
[14] DIMOV I, VELICKOVIC LJ, STEFANOVIC V. Urinary Exosomes. TheScientificWorld JOURNAL 2009; **9**: 1107-1118.
[15] GALLEY JD, BESNER GE. The Therapeutic Potential of Breast Milk-Derived Extracellular Vesicles. Nutrients 2020; **12**: 745.
[16] GRANER MW, CUMMING RI, BIGNER DD. Neurobiology of Disease The Heat Shock Response and Chaperones/Heat Shock Proteins in Brain Tumors: Surface Expression, Release, and Possible Immune Consequences. Journal of Neuroscience 2007; **27 (42)**: 11214-11227.
[17] GRANT BD, DONALDSON JG. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. Nat Rev Mol Cell Biol 2009; **10(9)**: 597-608.
[18] GUDURIC-FUCHS J, O'CONNOR A, CAMP B, O'NEILL CL, MEDINA RJ, SIMPSON DA.: Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. BMC Genomics 2012; **13**: 357.
[19] GUO W, GAO Y, LI N, SHAO F, WANG C, WANG P, YANG Z, LI R, HE J. Exosomes: New players in cancer (Review). Oncol. Rep. 2017; **38**: 665-675.
[20] HAN Y, JIA L, ZHENG Y, WEIRAN L. Salivary Exosomes: Emerging Roles in Systemic Disease. Int. J. Biol. Sci 2018; **14**: 633-643.
[21] HESSVIK NP, LLORENTE A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. Cell. Mol. Life Sci. 2018; **75**: 193-208.
[22] HOSHINO D, KIRKBRIDE KC, COSTELLO K, CLARK ES, SINHA S, GREGA-LARSON N, TYSKA MJ, WEAVER AM. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. Cell Rep. 2013; **5**: 1159-1168.
[23] KAHLERT C, KALLURI R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. J. Mol. Med. 2013; **91**: 431-437.
[24] KHALYFA A, ALMENDROS I, GILELES-HILLEL A, AKBARPOUR M, TRZEPIZUR W, MOKHLESI B, HUANG L, ANDRADE J, FARRÉ R, GOZAL D. Circulating exosomes potentiate tumor malignant properties in a mouse model of chronic sleep fragmentation. Oncotarget 2016; **7(34)**: 54676-54690.
[25] KOK VC, YU CC. Cancer-Derived Exosomes: Their Role in Cancer Biology and Biomarker Development. Int J Nanomedycyna 2020; **15**: 8019-8036.
[26] KOWAL J, TKACH M, THÉ RY C. Biogenesis and secretion of exosomes Introduction: the discovery of exosomes. Curr. Opin. Cell Biol. 2014; **29**: 116-125.
[27] LIU J, REN L, LI S, LI W, ZHENG X, YANG Y, FU W, YI J, WANG J, DU G. The biology, function, and applications of exosomes in cancer. Acta Pharmaceutica Sinica B 2021;**11**(9): 2783-2797.
[28] LUDWIG N, WHITESIDE TL. Potential roles of tumor-derived exosomes inangiogenesis. Expert Opin Ther Targets. 2018; **22(5)**: 409-417.

[29] MASHOURI L, YOUSEFI H, REZA AREF A, MOHAMMAD AHADI A, MOLAEI F, ALAHARI SK. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. Mol Cancer 2019; **75**: 1-14.
[30] MASYUK AI, HUANG BQ, WARD CJ, GRADILONE SA, BANALES JM, MASYUK TV, RADTKE B, SPLINTER PL, LARUSSO NF. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. Am. J. Physiol. – Gastrointest. Liver Physiol. 2010; **299**: 990-999.
[31] MITTELBRUNN M, DESDÍN-MICÓ G. Role of exosomes in the protection of cellular homeostasis. Cell Adh Migr. 2017; **11(2)**: 127-134.
[32] NIELSEN T, KRISTENSEN AF, PEDERSEN S, CHRISTIANSEN G, KRISTENSEN SR. Investigation of procoagulant activity in extracellular vesicles isolated by differential ultracentrifugation. J. Extracell. Vesicles 2018; **7(1)**: 1-12.
[33] OSAKI M, OKADA F. Exosomes and Their Role in Cancer Progression. Yonago Acta Med. 2019; **62(2)**: 182-190.
[34] OSHIKAWA S, SONODA H, IKEDA M. Aquaporins in Urinary Extracellular Vesicles (Exosomes). Int J Mol Sci. 2016; **17(6)**: 957.
[35] OSTROWSKI M, CARMO NB, KRUMEICH S, FANGET I, RAPOSO G, SAVINA A, MOITA CF, SCHAUER K, HUME AN, FREITAS RP, GOUD B, BENAROCH P, HACOHEN N, FUKUDA M, DESNOS C. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. Nat. Cell Biol. 2010; **12**: 19-30.
[36] OWENS A, MACKMAN N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. Circ Res. 2011; **108(10)**: 1284-97.
[37] QUESENBERRY P, ALIOTTA J. The paradoxical dynamism of marrow stem cells: Considerations of stem cells, niches, and microvesicles. Stem Cell Rev 2008; **4(3)**:137-47.
[38] RAPOSO G, STOORVOGEL W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. J. Cell Biol 2013; **200**: 373-383.
[39] ROBBINS P, MORELLI A. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. Nat Rev Immunol 2014; **14(3)**:195-208.
[40] ROIG-ARCOS J, LÓPEZ-MALO D, DÍAZ-LLOPIS M, ROMERO FJ. Exosomes derived from stimulated monocytes promote endothelial dysfunction and inflammation in vitro Monocyte exosomes induce adhesion molecules and cytokines via activation of NF-κB in endothelial cells. Ann Transl Med 2017; **5**: 3097-106.
[41] ROUCOURT B, MEEUSSEN S, BAO J, ZIMMERMANN P, DAVID G. Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALIX exosome pathway. Cell Res. 2015; **25**: 412-428.
[42] ROYO F, SCHLANGEN K, PALOMO L, GONZALEZ E, CONDE-VANCELLS J, BERISA A, ARANSAY AM, FALCON-PEREZ JM. Transcriptome of Extracellular Vesicles Released by Hepatocytes. PLoS One 2013; **8(7)**: 1-11.
[43] SHELDON H, HEIKAMP E, TURLEY H, DRAGOVIC R, THOMAS P, OON CE, LEEK R, EDELMANN M, KESSLER B, SAINSON RCA, SARGENT I, LI JL, HARRIS AL. New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by delta-like 4 incorporation into exosomes. Blood 2010; **116**: 2385-2394.
[44] SOUNG YH, NGUYEN T, CAO H, LEE J, CHUNG J. Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis. BMB Rep 2016; **49(1)**: 18-25.
[45] TRAJKOVIC K, HSU C, CHIANTIA S, RAJENDRAN L, WENZEL D, WIELAND F, SCHWILLE P, BRÜGGER B, SIMONS M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. Science 2008; **319**: 1244-1247.
[46] UMEZU T, OHYASHIKI K, KURODA M, OHYASHIKI JH. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. Oncogene 2013; **32**: 2747-2755.

[47] VINCENT M, LARIOS J, MOLINARD G, GOUJÓN A, MATILE S, GRUENBERG J, ROUX A. Endosomal membrane tension regulates ESCRT-III-dependent intra-lumenal vesicle formation. Nat. Cell Biol. 2020; **22**: 947-959.
[48] VILLARROYA-BELTRI C, BAIXAULI F, GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ C, SÁNCHEZ-MADRID F, MITTELBRUNN M. Sorting it out: regulation of exosome loading. Semin Cancer Biol 2014; **28**: 3-13.
[49] VLASSOV AV, MAGDALENO S, SETTERQUIST R, CONRAD R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj. 2012; **1820**: 940-948.
[50] WANG Z, CHEN JQ, LIU JL, TIAN L. Exosomes in tumor microenvironment: novel transporters and biomarkers. J. Transl. Med. 2016; **14**: 297-306.
[51] WEIDLE UH, BIRZELE F, KOLLMORGEN G, RÜGER R. The Multiple Roles of Exosomes in Metastasis. Cancer Genomics Proteomics 2017; **14(1)**: 1-15.
[52] YÁÑEZ-MÓ M, SILJANDER PRM, ANDREU Z, ZAVEC AB, BORRÀS FE, BUZAS EI, BUZAS K, CASAL E, CAPPELLO F, CARVALHO J, COLÁS E, CORDEIRO-DA SILVA A, FAIS S, FALCON-PEREZ JM, GHOBRIAL IM. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. J. Extracell. Vesicles 2015; **4**: 1-60.
[53] YANG E, WANG X, GONG Z, YU M, WU H, ZHANG D. Exosome-mediated metabolic reprogramming: the emerging role in tumor microenvironment remodeling and its influence on cancer progression. Signal Transduction and Targeted Therapy 2020; **5**: 242.

Redaktor prowadzący − Maciej Zabel

Otrzymano: 12.11.2021
Przyjęto: 06.12.2021
Paulina Borzdziłowska
Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec
e-mail: paulina.borzdzilowska@med.sum.edu.pl
tel.: (32) 364-12-74
fax: (32) 364-12-76

INFORMACJE

INFORMACJA o dostępności pełnych artykułów publikowanych w PBK oraz publikacji elektronicznej

Pełne wersje artykułów opublikowanych w „Postępach Biologii Komórki” po 2008 roku są dostępne bezpłatnie pod adresem: http://www.pbkom.eu/pl/pbk-publikacje.

Warunki otrzymywania czasopisma

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

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej w Poznaniu
Nr konta w BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209
– po otrzymaniu wpłaty wystawiamy fakturę VAT.

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

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata roczna
Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty na rok 2021 pod adresem:
FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań; tel. (61) 854-64-58, fax. (61) 854-64-40
email: zpodemsk@ump.edu.pl
na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań; BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209

Cena prenumeraty rocznika wynosi	na rok 2021
dla instytucji (bibliotek)	230 zł + 8% VAT
dla odbiorców indywidualnych	83 zł + 8% VAT

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2021
should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Swiecickiego str. 6, 60-781 Poznan/Poland
+48 61 854-64-58, fax. +48 61 854-64-40, email: zpodemsk@ump.edu.pl
On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
Swiecickiego str. 6, 60-781 Poznan/Poland, BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209
Price per year 50 dollars USA or 30 euro

Cennik dla Autorów rycin i druku w 2021 r.

	publikacja pracy	str. druku (ponad 15) 1 str.
Cena zł	1500,00	50,00

Do ceny należy doliczyć 8% VAT.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI (PBK) drukują artykuły przeglądowe w języku polskim lub angielskim 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 oraz Słownikiem Biologii Komórki PAU 2008. Artykuły drukowane w PBK bez zgody redakcji nie mogą być publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 5000 słów (do sumy tej nie wlicza się strony tytułowej, streszczenia, podziękowań, tabel wraz z opisami, opisów rycin oraz literatury) i do 100 pozycji bibliograficznych ze szczególnym uwzględnieniem ostatnich 5 lat;
2) doniesienia z ostatniej chwili nie przekraczające 1500 słów z maksymalnie 10 pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);
3) listy do redakcji (do 350 słów).

Wszystkie artykuły, wyłącznie w wersji elektronicznej, należy kierować na adres mailowy mnowicki@ump.edu.pl

Sposób przygotowania artykułów:

1. list przewodni – kierowany przez autora prowadzącego korespondencję do kolegium redakcyjnego Postępów Biologii Komórki musi zawierać
   i. informację, że artykuł, jak dotąd, nie został opublikowany w innym czasopiśmie (z wyjątkiem streszczenia), jak i nie został wysłany do innego czasopisma celem rozważenia możliwości jego publikacji
   ii. oświadczenie autora zajmującego się korespondencją, że wszyscy współautorzy zapoznali się z treścią artykułu i zaakceptowali jego treść
   iii. oświadczenie o występowaniu lub braku konfliktu interesów autora/autorów artykułu
   iv. przedstawienie zakresu pracy (ang. contribution) włożonego przez każdego z autorów artykułu w przygotowanie manuskryptu
   v. oświadczenie, że artykuł po przyjęciu do druku w PBK przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji
2. strona tytułowa musi zawierać tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona i nazwiska autorów z afiliacją, liczbę słów znajdujących się w artykule (z zastrzeżeniami podanymi wyżej), liczbę tabel i rycin, słowa kluczowe (3-5 słów zgodnych z Medical Subject Headings), skrót tytułu pracy (maks. 40 znaków), informację o finansowaniu artykułu oraz dane autora prowadzącego korespondencję (adres pocztowy, e-mail, numer telefonu oraz numer faxu)
3. streszczenie artykułu w języku polskim i angielskim – maksymalnie 300 słów
4. w tytule i streszczeniu można wprowadzać jedynie powszechnie przyjęte skróty (np. DNA)
5. zasadniczy tekst (Times New Roman 12 pkt., odstęp 1,5 wiersza) należy podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały (należy przyjąć następujący sposób numeracji rozdziałów i podrozdziałów: 1, 1.1, 1.1.1, 1.1.2 itd.)
6. ostateczna wersja tekstu powinna być zapisane w formacie doc. lub docx.
7. tabele wraz z opisami należy umieszczać na końcu artykułu; jednostki miar muszą być zgodne z układem SI;
8. ryciny i schematy należy zapamiętywać w formacie tiff. lub jpg. w jakości minimum 300 dpi; w przypadku publikowania mikrofotografii należy zamieszczać na nich podziałkę (scale bar); wartość podziałki należy podać w opisie mikrofotografii; jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, a zamieszcza się je w niezmienionej formie, należy podać skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na ich reprodukcję;
9. objaśnienia i podpisy rycin, zdjęć i w tabelach powinny być podane w j. polskim i angielskim
10. sposób przygotowania literatury: skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus; cytowanie literatury w tekście – z zastosowaniem nawiasu kwadratowego (np. [5]); spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

    [1] BEN-CHETRIT E, CHAN EK, SULLIVAN KF, TAN EM. A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. J Exp Med 1988; **167**: 1560-1571.

    [2] BEUTLER B. Toll-like receptors and their place in immunology. Nature 2004; **430**: 498-518.

    [3] ELSTON CW. Grading of invasive carcinoma of the breast. In Page DL and Anderson TJ eds. Diagnostic histopathology of the breast. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987;300-311.

Odpłatność (kwoty brutto)

1. opłata za wydrukowanie artykułu nieprzekraczającego 15 stron druku – 1500 zł
2. strona druku (powyżej 15) – dodatkowo 50 zł za jedną stronę

Skierowanie pracy do PBK celem rozważenia możliwości jej publikacji jest tożsame z akceptacją przez autorów pracy regulaminu przyjmowania, oceny i publikowania artykułów naukowych w tym czasopiśmie.

Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji maksymalnie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni od chwili otrzymania recenzji nie odpowiedzą na list redaktora.

Autor zobowiązany jest do wykonywania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 48 godzin do redakcji. Koszty spowodowane większymi zmianami tekstu, wprowadzanymi w korekcie autorskiej poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów i zmian w manuskrypcie.

Po zaksięgowaniu kwoty związanej z publikacją artykułu w Postępach Biologii Komórki na koncie fundacji wszyscy autorzy otrzymują 1 egzemplarz zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz plik PDF zawierający opracowany przez redakcję manuskrypt (wydrukowane zeszyty oraz plik PDF są wysyłane odpowiednio na adres pocztowy oraz e-mail autora zajmującego się korespondencją). Autorzy mogą również zamówić większą liczbę wydrukowanych reprintów swojej pracy, a ich koszt będzie podany do wiadomości autorów na stosownym druku zamówienia.

TREŚĆ – CONTENTS

KAŹMIERCZAK D., STERZYŃSKA K., JANUCHOWSKI R.: 271
Role of miRNA in ovarian cancer diagnosis, prognosis and development of drug resistance
Rola miRNA w diagnozowaniu, prognozowaniu oraz rozwoju oporności w raku jajnika

BLATKIEWICZ M., KAMIŃSKI K., OWOC J., KORCZOWSKA-ŁĄCKA I., WIELICH T., PLUTO-PRĄDZYŃSKA A., KASPRZAK G.: 283
Struktura i biosynteza ghreliny oraz jej receptora
Structure and biosynthesis of ghrelin and its receptor

BLATKIEWICZ M., OLECHNOWICZ A., WÓJTOWICZ J., KORNACKA A., KRASOWSKA J., MALINGER A., PLUTO-PRĄDZYŃSKA A.: 295
Fiziologiczne funkcje ghreliny − aktualny stan wiedzy
Physiological function of ghrelin – the current state of knowledge

KOSSOWSKA H.: 309
Regulacja splicingu przez wybrane elementy chromatyny
Regulation of splicing by selected components of chromatin

STĘPIEŃ A., MALICKA-DURCZAK A., TOMALA M., MARSZAŁEK A.: 331
Wpływ wirusów na patogenezę wybranych chorób autoimmunologicznych skóry – systematyczny przegląd piśmiennictwa
The influence of viruses on pathogenesis of autoimmune skin diseases – systematic review

BORZDZIŁOWSKA P., BEDNAREK I.: 345
Biogeneza i znaczenie egzosomów w komunikacji międzykomórkowej, w wybranych procesach fizjologicznych, i w nowotworzeniu
Biogenesis and the role of exosomes in intercellular communication, in selected physiological processes and neoplasm

Informacje 365

Indeks 369705