

ACTA MYGENICA

nr 3 2013



Zeszyt Koła Naukowego Studentów
Biotechnologii Mygen

Kraków, kwiecień 2013

ACTA MYGENICA

nr 3 2013

Zeszyt Koła Naukowego Studentów Biotechnologii Mygen

Redakcja:

Rafał Gumienny

Wojciech Senkowski

Jarosław Surkont

Barbara Zięba

Maciej Bąk

Projekt Okładki:

Rafał Gumienny

Skład:

Jarosław Surkont

Jagna Witek

Korekta:

Zespół redakcyjny

Wydawca: AT Wydawnictwo / AT Group Adrian Gorgosz,

ul. G. Zapolskiej 38/405, 30-126 Kraków

Nakład:

50 egzemplarzy

Kontakt: bakmaciej@wp.pl

ISSN: 1899-5535

Spis treści

Wstęp	5
Od redakcji	5
Aktualności	6
Science Mine	
Ewa Piskadlo, Barbara Zięba	6
I Studencka Konferencja „Liczby-Komputery-Życie”	
Barbara Zięba	9
Felieton	11
Echo milczenia	
Paweł Nowak	11
Artykuły	15
Oblędne datowanie	
Paweł Jedynak	15
Rola peptydaz bakteryjnych w rozwoju paradontozy	
Mirosław Książek	25
Terapia komórkowa – rola komórek macierzystych, najnowsze odkrycia, leczenie chorób układu krążenia	
Ewa Rojczyk-Gołębiewska	34
Kiedy płacimy cenę za obronę organizmu – udział receptorów TLR w patogenezie miażdżycy	
Anna Nogieć	42
Rola białka c-Myc w reprogramowaniu komórek somatycznych	
Maciej Bąk	58

OD REDAKCJI

Drodzy Czytelnicy,

po stosunkowo długim czasie mamy przyjemność zaprezentować Wam kolejny, trzeci numer Acta Mygenica. Mam nadzieję, że każdy (lub każda) z Was znajdzie w nim coś interesującego dla siebie. Czytanie polecam rozpocząć od lekko filozoficznego felietonu Pawła Nowaka, „Echo Milczenia”. Tych zainteresowanych chemią i roślinami odsyłam do tekstu Pawła Jedynaka – „Oblędne datowanie”. Mikrobiologów i stomatologów na pewno zainteresuje artykuł Mirosława Książka o roli peptydaz bakteryjnych w rozwoju paradontozy. Umiarkowanie optymistyczny tekst Ewy Rojczyk o najnowszych odkryciach na polu zastosowania komórek macierzystych w terapii różnego rodzaju chorób może stanowić dobre wprowadzenie nawet dla tych nieobeznanych z tematem. W artykule Anny Nogieć możemy przeczytać o jednej z mniej „popularnych” ról receptorów TLR. Maciej Bąk natomiast podjął innowacyjny temat indukowanych komórek macierzystych.

Celem tego czasopisma było i jest dostarczenie Wam możliwości opublikowania wyników swojej pracy w środowisku Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii. Dla wielu z Was może to być pierwsza publikacja – po raz pierwszy możecie spotkać się z recenzją swojej pracy. Chciałbym, żeby więcej osób miało odwagę opowiedzieć innym o swoich naukowych zainteresowaniach i uwierzyć, że mogą być one ciekawe także dla innych. Publikacja artykułu w Acta Mygenica jest również świetnym ćwiczeniem pisania w naukowym stylu i dokonywania zazwyczaj niezbędnego przeredagowania swojego tekstu. Piszę to wszystko z myślą o kolejnym, czwartym numerze Acta Mygenica, do którego materiały możecie już nadsyłać. Na razie jednak życzę wszystkim przyjemnej lektury numeru trzeciego.

Wojciech Senkowski

SCIENCE MINE

W dniach 27-28 lutego 2011 roku odbyła się First Polish-French Student Conference „Science Mine”, która była wstępem do Szkoły Polsko-Francuskiej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. Za organizację wydarzenia odpowiadało Koło Naukowe Studentów Biotechnologii „Mygen” przy współpracy z Kołem Naukowym Chemików UJ oraz Kołem Neuronaukowców Neuronus. Pomysłodawcami integracji studentów były dr hab. Joanna Bereta oraz prof. Claudine Kieda. Za nazwą „Science Mine” kryje się wyjątkowa lokalizacja konferencji – Kopalni Soli w Bochni w pobliżu Krakowa.

Późnym niedzielnym popołudniem 27 lutego 46 uczestników konferencji, w tym 10 gości z Francji, zagłębiło się w czeluście bocheńskiej kopalni poprzez szyb Campi, by zjechać 176 m poniżej poziomu gruntu. Pierwszym elementem wizyty w kopalni było zwiedzanie. Podczas podróży kolejką oraz przemierzaniu labiryntu korytarzy i unikalnych komór na własnych nogach pod opieką przewodniczki, zapoznaliśmy się nie tylko z historią i funkcjonowaniem obiektu, lecz również z aspektami kulturowymi i ekonomicznymi, jakie „białe złoto” z Bochni miało dla rozwoju regionu krakowskiego. Wiele osób skusiło się nawet na wypowiedzenie życzenia do mitycznego Skarbnika podczas kosztowania soli bezpośrednio ze ścian kopalni.

Po zwiedzaniu uczestnicy konferencji zostali zaprowadzeni do Komory Ważyn. Tam, 248 m pod ziemią, spędziliśmy resztę wieczoru i nocy. Do dyspozycji otrzymaliśmy boisko, restaurację, sypialnię i salę dyskotekową, lecz niezaprzeczalnie największą atrakcją cieszyła się 140 – metrowa zjeżdżalnia (niegdyś służąca do transportu soli), z której można było skorzystać pod opieką personelu. Pomimo stosunkowo niskiej temperatury (około 16°C) panującej w Komorze, wszyscy byli zachwyceni nietypowym miejscem noclegu. Dodatkowym atutem Kopalni był specyficzny leczniczy mikroklimat, przez co konferencja stała się nieomal pobytem zdrowotnym.

Rano uczestnicy opuścili Komorę Ważyn i wydostali się na powierzchnię szymbem Sutoris w centrum miasta, gdzie miał miejsce naukowy element konferencji. Prezentacje odbyły się w sali konferencyjne Uzdrawiska Kopalni Soli w Bochni.

Podczas prezentacji mieliśmy zaszczyt gościć dr hab. Joannę Beretę oraz prof. Claudine Kieda. Prezentację wygłosili zarówno studenci biotechnologii, biologii i chemii, a także dwójka zaproszonych gości z Université d'Orléans – Fabien Bastaert i Masnsen Cherief, studentów IV roku biologii.

Zarówno polscy studenci jak i francuscy byli bardzo zadowoleni z konferencji i wspólnie spędzonego czasu. Pozostaje nam czekać aż spotkamy się następnym razem, być może znów w Krakowie. W imieniu Koła chcemy podziękować za wsparcie ze strony Wydziału oraz pomoc dr Agnieszki Łobody i dr Agnieszki Jańczyk z Wydziału Chemii.

Ewa Piskadło & Barbara Zięba

Lista prezentacji:

1. Bartosz Pilecki (Jagiellonian University – Biotechnology) – Cocksackievirus and adenovirus receptor (CAR) and its influence on neuron-targeted gene therapy.
2. Fabien Bastaert (Université d'Orléans) – The NLRP3 inflammasome in the recognition of pathogenic dust.
3. Masnsen Cherief (Université d'Orléans) – Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model.
4. Patryk Mizia (Jagiellonian University – Biology) – Somaclonal Variation.
5. Mateusz Wasylewski (Jagiellonian University – Biology) – The use of telemetry in modern neurobiology.
6. Magdalena Mac, Danuta Majewska (Jagiellonian University – Chemistry) – Porphyrins as modifiers of titanium dioxide surface.
7. Monika Maciuszek, Katarzyna Magiera (Jagiellonian University – Chemistry) – Ruthenium Complexes In Medical Applications: Current Uses and Future Prospects.

8. Olga Mazuryk (Jagiellonian University – Chemistry) – Interaction of ruthenium complex with apotransferrin.
9. Anna Regiel (Jagiellonian University – Chemistry) – Chitostan as a new agent in bacteria biofilm control.
10. Patrycja Styłska, Joanna Ciałoń (Jagiellonian University – Chemistry) – Trace and Toxic Elements in Biological Materials as Important Markers for Clinical and Toxicological Tests.
11. Sabina Smusz (Jagiellonian University – Chemistry) – Active or inactive: that is the question. An application of machine learning methods in virtual screening.



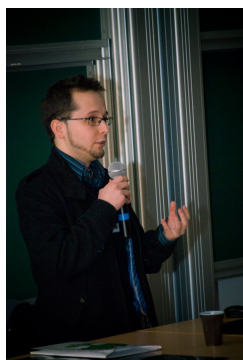
Fot 1: Uczestnicy konferencji (fot. Jarosław Surkont)

I STUDENCKA KONFERENCJA „LICZBY-KOMPUTERY-ŻYCIE”

Po raz pierwszy wspólnie z Kołem Matematyków Studentów UJ oraz Kołem Studentów Informatyki zorganizowaliśmy konferencję poświęconą zagadnieniom związanymi z bioinformatyką, biomatematyką i modelowaniem molekularnym. I Studencka Konferencja Matematyczno-Informatyczno-Biologiczna „Liczby-Komputery-Życie” (zwana potocznie LKŻ) odbyła się 18-20 marca 2011 roku na Wydziale Matematyki i Informatyki Uniwersytetu Jagiellońskiego – jednym z najnowszych budynków Kampusu 600-lecia UJ.



Fot 1: Prof. Janusz Bujnicki (fot. Jan Majta)



Fot 2: mgr Adam Górka (fot. Jan Majta)

Trzydniowa konferencja organizowana wspólnie z matematykami i informatyki okazała się dla nas dużym wyzwaniem. Konferencja przyciągnęła ponad 200 studentów z całej Polski – biotechnologii, biologii, matematyki czy informatyki. Pierwszego dnia konferencję otworzyła prof. dr hab. Marta Pasenkiewicz-Gierula, opiekun naukowy naszego wydarzenia, z której pomocą udało nam się zaprosić czołowych bioinformatyków z całej Polski. Największym zainteresowaniem cieszyły się prezentacje m.in. prof. Janusza Bujnickiego z International Institute of Molecular and Cell Biology w Warszawie (najmłodszy Polski profesor zwyczajny), prof. Andrzeja Kolińskiego (laureat Nagrody z Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej), prof. Bogdana Lesynga i prof. Wiesława Nowaka. Również z naszego macierzystego Uniwersytetu zaproszenie przyjęli prof. Irena Roterman-Konieczna z Collegium Medicum, dr Krzysztof Murzyn z WBBiB oraz dr hab. Andrzej Bielecki i dr Jacek Śmietański z WMiI. Nie obyło się również bez prezentacji studenckich, z których jedną wygłosił Adam Górka – doktorant Zakładu Biochemii Fizycznej i były członek Koła.

Konferencja spotkała się z życzliwym przyjęciem, o czym świadczy duże zainteresowanie drugą edycją „Liczby-Komputery-Życie”. Była to również okazja do nawiązania bliższej współpracy z naszymi sąsiadami z Kampusu, która w przyszłości może zaowocować przygotowaniem podobnych projektów i wspólnych wyjazdów.

Więcej informacji o konferencji znajduje się na stronie utworzonej wspólnie z Kołem Studentów Informatyki – www.lkz.ksi.ii.uj.edu.pl.

Barbara Zięba

ECHO MILCZENIA

Każdy z nas zapewne niejednokrotnie stawiał sobie pytania, na które nie potrafił znaleźć właściwej odpowiedzi. Część z tych pytań zapewne dotyczyła sytuacji życiowych, w jakich to przyszło nam się odnaleźć, jak w danym momencie powinniśmy postąpić, czym się kierować. Inna część pytań zapewne dotyczyła świata, w którym żyjemy, a inne jeszcze sięgały jeszcze głębiej, do praprzyczyny naszego istnienia. To właśnie te dotyczące sensu naszego życia, tego czym ono naprawdę jest, z natury swojej są niejako skazane na pozostanie na zawsze otwartymi. To tak, jakbyśmy stojąc nad przepaścią wysyłali pytania do pustki przed nami i nasłuchiwali, czy przypadkowo nie spłynie na nas pożądane olśnienie.

Każda próba sprostania odwiecznym problemom filozoficznym to swego rodzaju wizyta nad przepaścią i wyrocznią w jednym. Moje osobiste próby znalezienia odpowiedzi i sensu zarazem kończyły się zwykle daremnym oczekiwaniem i nasłuchiowaniem ciszy. Od pewnego czasu jednak nauczyłem się, że z pozoru nic nie znaczące odgłosy szumu wiatru i echa słów wypowiedzianych przez samego siebie mogą nieść w sobie o wiele więcej, niż się na początku wydaje. Jednym słowem nauczyłem się wsłuchiwać w otoczenie i samego siebie. Jestem głęboko przekonany, że przy odrobinie wysiłku, dobrych chęciach i otwartym sercu jesteśmy w stanie znaleźć odpowiedź na pytania, na które nie istnieje odpowiedź. Ktoś spyta jak to możliwe? Otóż choć nasz pragnący ostatecznych wyjaśnień umysł nie doczeka się satysfakcjonującej odpowiedzi, gdyż to niemożliwe, to jednak możemy ją sobie sformułować jako pewną metaforę, czy też parafrazę tego, co dostępne dla naszych oczu. Tak właśnie działa sztuka, w której języku nie ma ostatecznej odpowiedzi, są tylko stany spełnienia wewnętrznych uczuć. Znaleźć choć częściowe odbicie samego siebie w dziele twórcy to prawie to samo, co nawiązać łączność z przyrodą i odnaleźć w szumie wiatru niespotykane dotąd melodie i wartości...

* * *

Prawda absolutna jest milczeniem. . .

Prawda absolutna, czy ona istnieje?
Czy to co się jawi, prawdziwie się dzieje?
A może świat jest tylko pozorem?
Zagadki te stoją odwiecznym otworem
Wielu drażyło powyższe pytania
Wysilano umysły, snuto rozważania
Chciano dociec prawdy, poznać nieznane
Lecz pewne tajemnice nie mogły być poznane
Prawda absolutna, absolutna wiedza
Także moje myśli wciąż mąci, nawiedza
Szukam słów dobrych by oddać sens życia
Lecz jak go mam poznać, wydobyć z ukrycia?
Gdy mówi, to milczy, przemawia przez ciszę
Języka ciszy nie znam, więc jego nie słyszę
Pozostaje milczeniem, pustką, niebytem
Gdy się zjawia usypiam, i znika przed świtem
Tak więc sensu i prawdy nigdy nie dostąpię
Prędzej słów mi zabraknie lub w rozum swój zwątpię
Wolę zasnąć w morskiej ciszy i niesiony przez fale
Nie dopłynąć do celu, lecz szukać go stale. . .

* * *

Świat jest jak fala, rzeczywistość to echo milczenia. . .

Na dowód tego, że świat jest jak fala
Że od źródła powstania wciąż się oddala
Zmieniając co chwilę cyklicznie swe fazy
Namaluję teraz słowem wybrane obrazy
W obiektów naszej Ziemi zagłębiając się masie
Materialnych, rozciągniętych w przestrzeni i czasie

Schodzimy do materii najniższych poziomów
Chemicznych molekuł, fizycznych atomów
Lecz niżej już dualna natura króluje
Każda cząstka materii zarazem fałuje
Materia to już tylko próżni fluktuacja
Zostaje energia i ciągła oscylacja
Więc istota nasza to pustki immanencja
Pustka to milczenie, stąd świata egzystencja
To tylko milcząca ekspansja cykliczności
Echa wybuchu lub powstania z nicości
Tworzywo prątworzywu, przyczyna praprzyczynie
Wtórjuje jako forma, jak wodzie naczynie
Tak kształtów i kolorów rodzi się wrażenie
Lecz wciąż to tylko fala, wielu fal złożenie
Kluczem złożenia jest proporcja złota
Zwie ją Vis Vitalis, gdyż siła żywota
Zaklęta jest w strukturze, w punkcie równowagi
Gdzie żadne z przeciwieństw nie dźwierży przewagi
Jak na dole, tak na górze, wszystko jedną ma naturę
Co upada już po chwili wznosi się na górę
Nie ma zła ani dobra, lecz chaos i harmonia
Z milczenia szum powstaje, a z szumu eufonia
Po nocy dzień przychodzi, a po zimie wiosna
Jedna twarz jest smutna, a druga radosna
Wszystko ma swe pływy, wszystko ma swe fale
Przypływy w odpływy zmieniają się stale
Ktoś spyta dlaczego, lecz nikt mu nie odpowie
Wtem serce w nadziei coś cicho podpowie
Nie będąc świadomym swych uczuć znaczenia
Usłyszy sam siebie, to echo milczenia?

* * *

**Vis Vitalis to melodia świata, żyć to znaczy słuchać
i komponować...**

Absolut jest niemy, słyszeć tylko życie
Melodia jest w fali, jej źródło w niebycie
Niesieni przez echo w nieznanym kierunku
Boimy się ciszy, szukamy ratunku

Pragniemy zostać echem, stronimy od zmiany
Lgniemy wciąż naprzód lękając się ściany
Która w końcu przyjdzie, jej nic nie przebije
Każda fala się zmieni, zawróci, odbije

Taka kolej jest rzeczy i melodia świata
Rozsądek jej przeczy, lecz trwa już przez lata
Zostaje dać się ponieść i wsłuchać się uważnie
Nie walczyć z nurtem rzeki, postąpić rozważnie

Rozum choć tak ludzki, to jednak zawodzi
Szukając odpowiedzi pytania wciąż rodzi
Zostaje jednak serce, sztuka, wartość ducha
Ta nie stara się zrozumieć, lecz po prostu słucha

Natchnieni melodią sami ją stworzymy
Wrota tajemnicy sercem otworzymy
Choć rozum nie zobaczy, bo uczuć nie rozumie
To serce mu podpowie, i dłoń swą wysunie

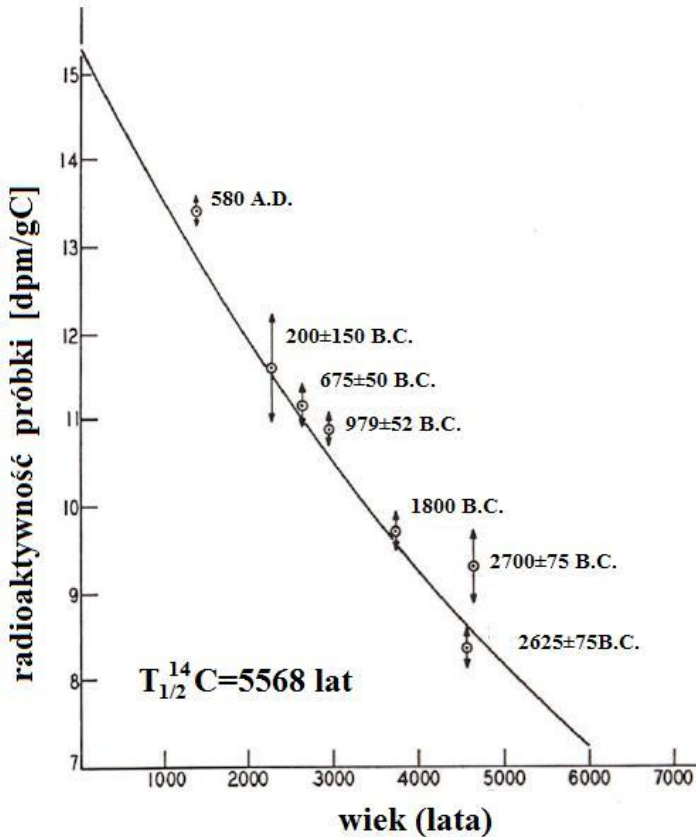
Nutami miłości zapiszmy swą drogę
Wsłuchajmy się w echo, zahamujmy trwogę
Nie lękajmy się zasnąć gdy czujemy zmęczenie
W harmonii z Vis Vitalis przemówi milczenie...

Paweł Nowak

OBŁĘDNE DATOWANIE

Podstawy datowania radiowęglowego

Datowanie metodą radiowęglową jest techniką cieszącą się uznaniem i zaufaniem naukowców, co czyni ją jedną ze standardowych metod określania wieku próbek pochodzenia organicznego. Początkowo datowanie polegało na określeniu zawartości radioaktywnego węgla-14 w próbce, obecnie jednak dużo precyzyjniejsze rezultaty osiąga się dzięki pomiarom stosunku izotopów $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$. Izotop węgla-14 jest niestabilny (ulega spontanicznemu rozpadowi do azotu-14, emitując jednocześnie cząstkę promieniowania beta), a jego zawartość maleje w przewidywalny sposób wraz z wiekiem próbki. Przy założeniu, że jego początkowa zawartość w tkankach jest znana i stała pozwala to na określenie czasu który upłynął od śmierci organizmu (por. rys. 1), ponieważ każdy organizm dopóki żyje zawiera odnawiający się zasób węgla, także tego radioaktywnego (70 kilogramowy człowiek zawiera około 16 kg węgla) [1]. Jednocześnie zawartość ^{14}C w atmosferze, czy organizmach jest ekstremalnie niska – zaledwie 1 ppt (part per trillion) atomów węgla, a jego całkowita światowa zawartość wynosi tylko około 80 ton [2]. Dlatego przez długi czas nie było nawet możliwości oszacowania jego zawartości, gdyż znajdowała się ona poza obszarem czułości dostępnej aparatury pomiarowej. Udało się to dopiero zespołowi kierowanemu przez W. F. Libby'ego w 1952 roku, a jego praca została osiem lat później uhonorowana Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii. Czas połowicznego rozpadu (czas po którym rozpadowi ulega połowa atomów izotopu) ^{14}C wynosi około 5730 ± 40 lat [3] (pierwotna ocena Libby'ego wynosiła 5768 lat, stąd rozbieżności w literaturze) [4], co przy zastosowaniu obecnej technologii pomiarowej wyznacza maksymalną granicę oszacowania na około 45 000 lat wstecz. Obiekty starsze niż 50 tys. lat zawierają zbyt mało radioaktywnego izotopu węgla, aby uzyskany wynik był wiarygodny [2] (stosuje się wtedy datowania oparte na innych radioaktywnych pierwiastkach np. ^{238}U lub ^{40}K) [5]. Jest to jednak zaledwie ułamek wieku geologicznego naszej planety, co natychmiast nasuwa pytanie o pochodzenie zasobów tego izotopu.



Rysunek 1: Krzywa kalibracyjna datowania radiowęglowego, przedstawiona w 1952 roku w oparciu o wiek znanych artefaktów lub szczątków drzew [2].

Pierwotnie proces datowania polegał na zliczaniu absolutnej promieniotwórczości próbki (jak w powyższym przypadku). Jednak bardzo stare próbki wykazują słabą promieniotwórczość, liczba emitowanych cząstek beta jest bardzo niska – nawet jedna na kilka minut. Tym samym ograniczało to maksymalną granicę datowania na kilka-kilkanaście tysięcy lat, a do analizy potrzebne było stosunkowo dużo badanej substancji. Dlatego obecnie stosuje się metodę akceleratorową (Accelerator Mass Spectroscopy, AMS), pozwalającą na precyzyjne określenie stosunku $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ przy użyciu bardzo niewielkiej ilości materiału – nawet kilkuset μg czystego węgla do analizy, otrzymywanego z kilku mg próbki. Wysoka czułość tej metody pozwoliła jednocześnie przesunąć granicę wiarygodności do około 50 tys. lat [np. 36].

Tajemnicę tę rozwikłał sam Libby już w 1946 roku, postulując, że radioaktywny izotop ^{14}C powstaje pod wpływem promieniowania kosmicznego ze stabilnego ^{14}N w górnych warstwach atmosfery [4]. Jednakże poziom docierającego do Ziemi promieniowania kosmicznego jest zmienny i ściśle skorelowany z aktywno-

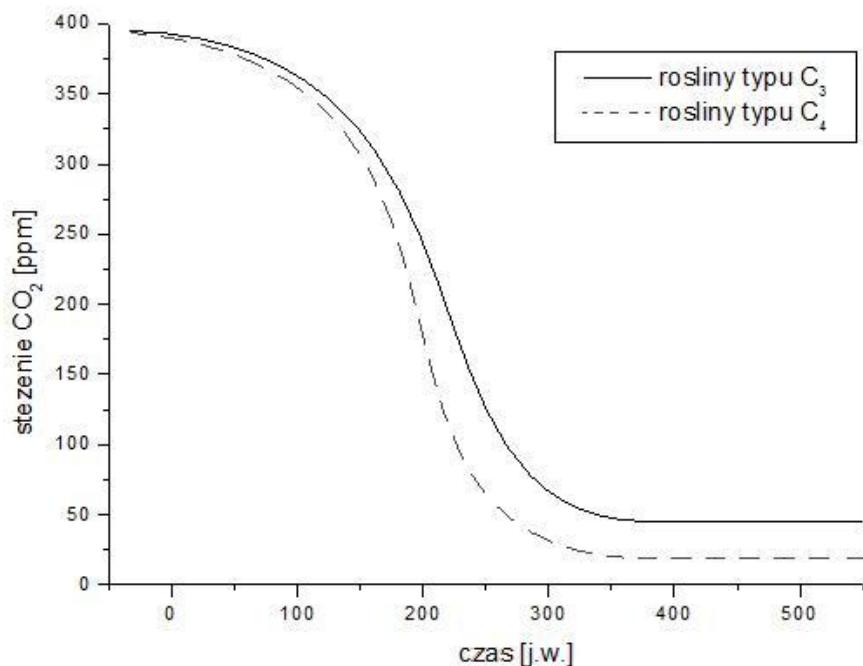
ścią Słońca. Stąd datowanie metodą radiowęglową wymaga dodatkowej kalibracji w oparciu o badania dendrochronologiczne (pomiaru zawartości izotopu ^{14}C konstytutywnie ułożonego w poszczególnych pierścieniach przyrostów rocznych długowiecznych drzew) dla pomiarów młodszych niż 12 tys. lat oraz badania profili sedymentacyjnych i przyrostu stalagmitów (CaCO_3) dla starszych próbek [6-8]. Odpowiednie przeliczenia wykonuje się stosując ogólnodostępny program OxCal, a powszechność jego użycia zapewnia zarazem ujednolicenie procedury kalibracji [9]. Jednocześnie źródłem ^{14}C może być także promieniowanie wyzwalane w trakcie eksplozji jądrowych. W latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku zawartość ^{14}C w atmosferze uległa podwojeniu [10], stąd oszacowanie poziomu tego izotopu jest obecnie wiarygodne tylko dla okazów, w których deponowanie ^{14}C zakończyło się przed 1950 rokiem. Dlatego wiek próbek liczony w latach przed czasami obecnymi (Before Present, BP) określany jest w istocie dla lat pięćdziesiątych ubiegłego wieku [7]. Oczywiście im dany okaz jest starszy, tym większy błąd oszacowania jego wieku (nawet ± 2000 lat w przypadku najstarszych próbek [11]), wyrażany jako odchylenie standardowe uzyskanego średniego wyniku. Zwykle stosuje się dwa poziomy wiarygodności 1σ – 68,2% i 2σ – 95% [12]. Nowopowstałe powstałe atomy węgla są wysoce reaktywne i ulegają szybkiemu utlenieniu do dwutlenku węgla, który następnie dyfunduje w obrębie atmosfery. Większość jest pochłaniana przez oceany [13, 14], a część – dzięki organizmom fotosyntetyzującym – jest włączana w łańcuch pokarmowy [np. 15], gdyż praktycznie cały węgiel, który buduje organizmy, w tym i nasze ciała pochodzi bezpośrednio lub pośrednio z roślin lub glonów. W szczególnych warunkach ma to jednak niezwykle konsekwencje – niektóre rośliny potrafią bowiem oszukać datowanie metodą radiowęglową.

Rośliny oszuści

Poszczególne izotopy węgla, choć nie różnią się właściwościami chemicznymi, wykazują pewne różnice właściwości fizycznych, co bezpośrednio rzutuje na ich właściwości fizjologiczne, m.in. łatwość z jaką włączane są w szlaki biochemiczne (np. fotosyntezę) [16]. Większość roślin spotykanych w naszej strefie klimatycznej wiąże dwutlenek węgla bezpośrednio w cyklu Calvina-Bensona, przyłączając go do rybulozo-1,5-bisfosforanu w reakcji katalizowanej przez Rubisco (EC 4.1.1.39), która z powodu niskiej wydajności jest prawdopodobnie najliczniej występującym

białkiem na Ziemi [17]. Ostatecznym produktem karboksylacji jest 3-fosfoglicerynian, związek 3-węglowy, dlatego rośliny te określa się mianem C_3 . Oprócz nich istnieją także rośliny typu C_4 (oraz CAM), które oprócz tradycyjnego cyklu C_3 posiadają także dodatkowy cykl C_4 (produktem karboksylacji jest zależnie od gatunku rośliny 4-węglowy jabłczan lub asparaginian), będący w istocie sprytnym sposobem na zagęszczanie CO_2 , oddawanego następnie Rubisco w cyklu C_3 w celu poprawy wydajności reakcji [15]. Ma to szczególne znaczenie w rejonach zwrotnikowych i tropikalnych, gdzie z powodu wysokiej temperatury zdolność Rubisco do przyłączania CO_2 obniża się jeszcze bardziej, a wymiana gazowa musi być ograniczana ze względu na ograniczanie strat wody. Cykl C_4 pozwala także na zmagazynowanie nadmiaru CO_2 , który nie może być natychmiast zużyty w cyklu C_3 . Oznacza to, że rośliny C_3 mogą pochłaniać CO_2 nawet wtedy, gdy cykl Calvina-Bensona jest już zupełnie wysycony, a zatem w warunkach kiedy rośliny C_3 już nie mogą go asymilować. Różnice w zdolności wiązania CO_2 obrazuje gazowy punkt kompensacyjny (stężenie CO_2 , przy którym natężenie oddychania i fotosyntezy są sobie równe, por. Rys. 1) [18]. Co ciekawe, cykl C_4 odkryto podczas badań nad fotosyntezą właśnie przy użyciu $^{14}CO_2$ jako znacznika [15].

Ponieważ typowy $^{12}CO_2$ jest lżejszy i dyfunduje znacznie łatwiej niż $^{14}CO_2$, dlatego będąc bardziej dostępnym jest preferencyjnie wykorzystywany przez rośliny C_3 . Natomiast rośliny C_4 (i CAM), które znacznie wydajniej korzystają z CO_2 , pochłaniają tym samym znacznie więcej radioaktywnego izotopu węgla-14. Wyższa początkowa zawartość ^{14}C w tkankach tych roślin sprawia, że podczas datowania radiowęglowego wydają się one znacznie młodsze, niż są w rzeczywistości, pomimo kalibracji [19]. Ale na tym nie koniec niespodzianek. Wiele roślin typu C_4 ma ogromne znaczenie gospodarcze – trzcina cukrowa (a właściwie Cukrowiec lekarski, *Saccharum officinarum*), proso (*Panicum sp.*), sorgo (*Sorghum moench*), kukurydza (*Zea mays*), czy szarłat (*Amaranthus sp.*), którego nasiona są popularnym prozdrowotnym dodatkiem do chleba. Dotyczy to zwłaszcza obszaru Ameryki Południowej i Afryki, gdzie już od zamierzchłych czasów rośliny C_4 stanowią podstawowe źródło pożywienia ludzi i zwierząt. Znaczny udział tych roślin w diecie może zmienić zawartość ^{14}C organizmu, zafałszowując wynik datowania radiowęglowego. Zjawisko to ma nieprzewidywalny charakter [20], pomimo że skład izotopowy nie zmienia się znacznie przy przechodzeniu na poszczególne



Rysunek 2: Uproszczony schemat zdolności pochłaniania dwutlenku węgla przez rośliny typu C₃ i C₄.

W przypadku ograniczenia wymiany gazowej z otoczeniem (zamknięcie większości aparatów szparkowych) pochłanianie dwutlenku węgla przez roślinę jest możliwe jedynie do pewnego poziomu (tzw. gazowego punktu kompensacyjnego), odpowiadającego krytycznemu stężeniu dwutlenku węgla wewnątrz komórki rośliny, koniecznemu do funkcjonowania Rubisco. Choć aktywność tego enzymu jest porównywalna dla roślin typu C₃ i C₄, to w przypadku tych ostatnich wartość punktu kompensacyjnego jest niższa (8-20 ppm, dla roślin C₃ 40-60 ppm), ponieważ karboksylaza fosfoenolopirogronianu w cyklu C₄ jest znacznie mniej wrażliwa na niedobór substratu niż Rubisco. Ponieważ podczas asymilacji cząsteczki CO₂ zawierające lżejsze izotopy zużywane są szybciej, niż posiadające cięższe atomy węgla. Zatem frakcja CO₂, która pozostaje w powietrzu w miarę zbliżania się do punktu kompensacyjnego jest sztucznie wzbogacona w cięższe cząstki. Niższa wartość punktu kompensacyjnego dla roślin typu C₄ oznacza, że pochłaniają one w takich warunkach więcej cięższych izotopów.

poziomy łańcucha pokarmowego [21]. Dzieje się tak dlatego, gdyż udział roślin C₃ i C₄ w diecie może być zmienny i zależny od wielu czynników (geograficznych, klimatycznych, bądź środowiskowych) [22]. Dlatego metoda radiowęglowa wymaga w takich przypadkach dodatkowej kalibracji, w oparciu o składniki, których za-

wartość jest również skorelowana z typem fotosyntezy, ale nie zmienia się w czasie. Idealnym rozwiązaniem są stabilne izotopy węgla – ^{13}C i ^{12}C (zawartość w atmosferze odpowiednio 1,1% i 98,9%) [23, 24]. Ponieważ różnią się one masą podlegają takim samym prawidłowościom jak ^{14}C , a ich wzajemny stosunek pozostaje stały niezależnie od wieku próbki. Aby zapewnić wyższą precyzję pomiarów, zwłaszcza dla materiałów nieznacznie różniących się składem izotopowym stosunek $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ porównuje się ze wzorcem (najczęściej standardem PeeDee Belemnite, PDB, stosunkiem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w wapiennym szkielecie wymarłego stworzenia z okresu Kredy) [25]), obliczając tzw. względną zawartość ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) [23]:

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{próbka}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{standard}}} - 1 \right] * 1000$$

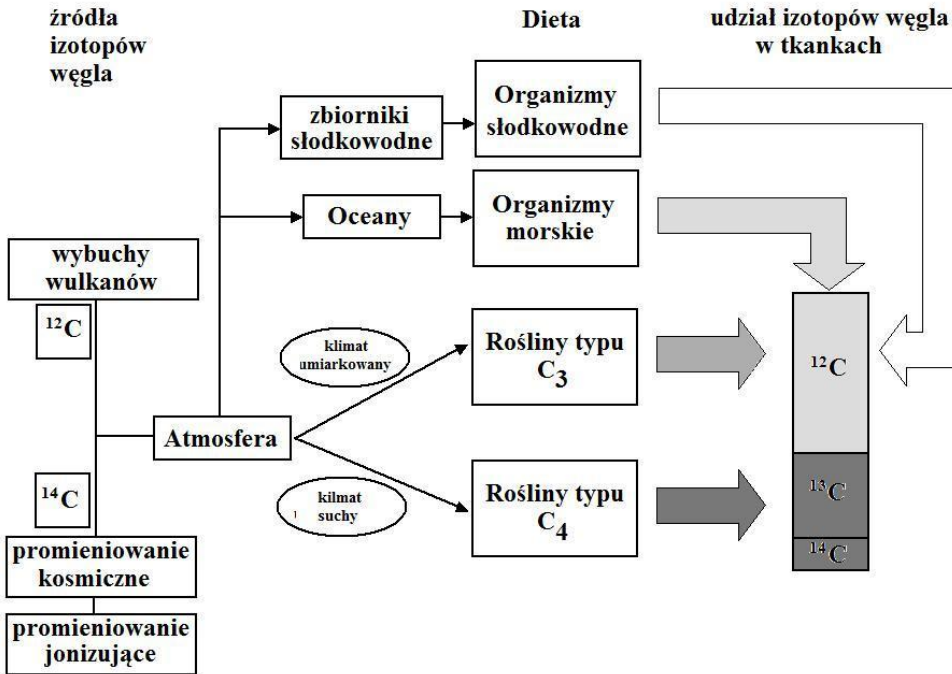
Przybiera ona wartości ujemne i wyraża jak dalece uzyskana wartość różni się od wartości standardowej – dla roślin typu C_3 dochodzi do dyskryminacji cięższego izotopu, stąd zakres przyjmowanych wartości wynosi od -22‰ do -38‰ (średnio $\delta^{13}\text{C} = -27‰$). W przypadku roślin typu C_4 waha się ona w zależności od gatunku od -8‰ do -15‰ (średnio $\delta^{13}\text{C} = -13‰$), jest zatem bliższa zawartości izotopów w atmosferze ($\delta^{13}\text{C} = -7‰$). [26, 27]. Pomiar $\delta^{13}\text{C}$ jest obecnie standardowo wykonywany w większości laboratoriów wykonujących datowanie metodą radiowęglową. Na podstawie otrzymanej wartości można ustalić jaki był początkowy poziom ^{14}C w próbce oraz oszacować procentowy udział roślin C_3/C_4 w diecie organizmu. Na tej podstawie udało się określić jak zmieniała się dieta ludzi zamieszkujących dolinę Renu od czasów neolitu do okresu średniowiecza [28]. Co więcej, znając obecny skład diety organizmu, a zatem obecną zawartość $\delta^{13}\text{C}$ w tkankach (np. dzięki badaniom żyjących przedstawicieli gatunku) można wnioskować jak zmieniał się udział tych roślin w pożywieniu badanej grupy na przestrzeni dziejów, co pośrednio pozwala wnioskować o zmianach klimatycznych na danym obszarze (liczba roślin typu C_4 wzrasta wraz z ociepleniem klimatu) [23, 29, 30]. Ponieważ określenie stosunku $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ nie jest ograniczone czasowo jak w przypadku analizy metodą ^{14}C i zależy jedynie od stanu próbki, pozwala to na dokonywanie analiz nawet bardzo starych okazów. Stąd wiadomo, że klimat plejstoceniński był znacznie cieplejszy niż obecny, o czym świadczy właśnie wysoka zawartość ^{13}C w kościach zwierząt z tego okresu [29]. Metoda ta pozwala także na ujawnienie

innych zaskakujące faktów. Analiza szczątków ponad 80 młodych mężczyzn (być może gladiatorów, o czym świadczą brutalne uszkodzenia typowe dla broni białej, lwich ugryzieniach oraz dekapitacja blisko połowy z nich), pochowanych na terenie istniejących obecnie ogrodów w pobliżu brytyjskiego miasta York wykazała w dwóch przypadkach zawartość $\delta^{13}\text{C}$ wskazującą na wysokie spożycie roślin typu C_4 , prawdopodobnie prosa. Nie byli to zatem rdzenni mieszkańcy tego obszaru, lecz przybysze pochodzący ze znacznie cieplejszych rejonów [31], ponieważ zmiana stosunku $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w kolagenie kości stosowanym do analizy izotopowej jest bardzo powolna, w przypadku dorosłych ludzi trwa nawet kilkanaście lat [32]. Datowanie trzema izotopami pozwala także określić pochodzenie zdeponowanej materii organicznej i tempo rekultywacji niektórych obszarów rolniczych (upraw roślin C_4) [33]. Różnice dystrybucji cięższych izotopów pomiędzy tkankami stwarzają możliwości potencjalnego wykorzystania węgla-13 w badaniach ekofizjologicznych, jako znacznika aktywności metabolicznej tkanek (im wyższe tempo metabolizmu, tym wyższa zawartość ^{13}C) [34, 35].

Nie tylko węgiel

Jednak w wielu przypadkach nawet kompleksowa analiza oparta jedynie na izotopach węgla nie jest wystarczająca. W rejonach nadmorskich skład izotopowy zostaje dodatkowo zaburzony przez obecność w diecie organizmów morskich, o odmiennym stosunku $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ niż w przypadku organizmów lądowych. Wiąże się to z wolniejszym obiegiem węgla w oceanach. Jednocześnie zawartość $\delta^{13}\text{C}$ bardzo silnie zależy od temperatury wody, która bezpośrednio wpływa na tempo fotosyntezy i skład fitoplanktonu. Dlatego coraz powszechniejsze jest pomocnicze datowanie w oparciu o inne pierwiastki stabilne (zawartość $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{34}\text{S}$). Czyni to analizę niezwykle skomplikowaną, lecz pozwala na jeszcze bardziej precyzyjne określenie trybu życia, składu pożywienia, obecności zbiorników słodko i słonowodnych, czy klimatu i ostatecznie korekcję wyniku datowania opartego na ^{14}C [23, 36]. Dzięki temu dokładnie określono wieku Otziego, słynnego alpejskiego człowieka lodu [36], szczątków mieszkańców Karaibów [37], czy poznano etapy kolonizacji wysp Pacyfiku [38].

Dzięki izotopom węgla milczące dotąd kości powoli odkrywają przed nami tajemnice zapomnianych wieków. Jakie przesłanie zainoszą naszym potomkom o nas?



Rysunek 3: Zależności pomiędzy czynnikami środowiskowymi i pokarmowymi, a wartością izotopów węgla w tkankach.

Intensywność koloru strzałek obrazuje szacunkowy wzrastający udział węgla-14 w pokarmach. Skład izotopowy tkanek zależy bezpośrednio od rodzaju spożywanego pokarmu. Wzorec żywieniowy utrwała się z czasem, stanowiąc izotopowe świadectwo życia i pochodzenia organizmu. Początkowo zmienny poziom węgla-14 stanowił utrudnienie w analizie wyników datowania, jednak obecnie kalibracja oparta na pomiarach zawartości stabilnych izotopów węgla-12 i węgla-13 sama w sobie stanowi cenne źródło informacji. Podwyższona zawartość węgla-14 pozwala wnioskować o ociepleniu klimatu. W przypadku, gdy jest ona obniżona świadczy to o obecności organizmów morskich lub słodkowodnych (jeszcze występuje większy spadek zawartości węgla-14) w diecie. Na tej podstawie można próbować dopasować miejsce życia organizmu. Dla współczesnego archeologa kości są skarbnicą informacji, choć jednocześnie właściwa interpretacja uzyskanego wyniku bywa niezwykle trudna.

Dendrologiczna kalibracja wciąż trwa, zatem w przyszłości będzie możliwa korekcja wyników datowania, nawet pomimo wahań poziomu ^{14}C w atmosferze [np. 24]. Sporadyczne posłodzenie herbaty brązowym cukrem, czy zjedzenie jednego plastra ananasa więcej niewiele zmienia, lecz skład izotopowy niezaprzeczalnie wpisany w nasze ciała przetrwa wieki, niosąc informacje o Twoim pochodzeniu, klimacie w którym przyszło Ci żyć, a nawet, czy przez większość swego życia mieszkałeś

nad morzem, czy w głębi lądu. To znacznie więcej niż można by oczekiwać po zwykłej kości, a fakt, iż nawet po tak długim czasie ktoś może mieć wgląd w nasze życie może być niepokojący.

Literatura

1. Wang Z M *et al.* Total body carbon and oxygen masses: evaluation of dual-energy x-ray absorptiometry estimation by in vivo neutron activation analysis. *Phys Med Biol* 2010, 55: 5953-5963
2. Libby W F Radiocarbon dating. Univ of Chicago Press, 1952.
3. Godwin H Half-life of radiocarbon. *Nature* 1962 195:984
4. Libby W F Atmospheric Helium-3 and Radiocarbon from cosmic radiation. *Phys Rev* 1946 69:671-672
5. Singer *et al.*, $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$, K-Ar and ^{230}Th - ^{238}U dating of the Laschamp excursion: a radioisotopic tie-point for ice core and climate chronologies. *Earth Planet Sci Lett* 2009, 286:80-88
6. Reimer P J *et al.* IntCal04 terrestrial radiocarbon age calibration, 0-26 cal kyr BP. *Radiocarbon* 2004 46:1029-1058.
7. Stuiver M *et al.* INTCAL98 radiocarbon age calibration 24,000-0 cal BP, *Radiocarbon* 1998, 40:1041-1083
8. Hughen K A *et al.* Deglacial changes in ocean circulation from an ed radiocarbon calibration. *Nature* 1998 391:65-68
9. Oxford Radiocarbon Accelerator Unit 15.03.2011
<http://c14.arch.ox.ac.uk/embed.php?File=oxcal.html>
10. Nydal R *et al.* Tracing bomb ^{14}C in the atmosphere 1962-1980. *J. Geophys Res* 1983, 88:3621-3642.
11. Lbova L V Chronology and paleoecology of the early upperpaleolithic in the transbaikal region (siberia), *Eurasian Prehistory* 2008, 5(2):109-114
12. JULL T Radiocarbon dating of scrolls and linen fragments from the judean desert. *Radiocarbon*, 1995, 37:11-19
13. Jain A K Distribution of radiocarbon as a test for carbon cycle models *Global Biogeochem Cy* 1995, 9:153-166
14. Guilderson T P *et al.* Radiocarbon as a diagnostic tracer in ocean and carbon cycle modeling. *Global Biogeochem Cy* 2000, 14:887-902
15. Hatch M D *et al.* Photosynthesis by sugarcane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochem J* 1966, 101:103-111
16. Park R *et al.* Carbon isotope fractionation during photosynthesis. *Geochim Cosmochim Acta* 1960, 21:110-126
17. Ellis R J The most abundant protein in the world. *Trends Biochem Sci* 1979, 4:241-244
18. Taiz L *Plant Physiology*, Third Ed. 2002 Sinauer Associates. Inc. Rozdz. 9 i 10:146-197

19. Hall R A Those late corn dates: Isotopic fractionation as a source of error in carbon-14 dates. *Michigan Archaeologist* 1967, 13:171-180
20. Hyodo F Linking aboveground and belowground food webs through carbon and nitrogen stable isotope analyses. *Ecol Res* 2010, 25:745-756
21. DeNiro M *et al.* Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 1978, 42: 495-506
22. Eldon M J *et al.* Problems in radiocarbon dating human remains from arid coastal areas: an example from the cape region of Baja. *California American Antiquity* 62:489-507
23. Koch L Isotopic Reconstruction Of Past Continental Environments. *Annu Rev Earth Planet Sci* 1998, 26:573-613
24. Saurer M *et al.* Tracing carbon uptake from a natural CO₂ spring into tree rings: an isotope approach. *Tree Physiol* 2003, 23:997-1004
25. Hellborg R *et al.* Development of Accelerator Mass Spectrometry at the Lund Pelletron. *Physica Scripta* 2000, 61:530-535
26. Ye, H W Factors affecting the isotopic composition of organic matter (1) Carbon isotopic composition of terrestrial plant materials. *Proc Natl Sci Counc* 2001, 25:137-147
27. Whelan T *et al.* Enzymatic fractionation of carbon isotopes by phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄ plants. *Plant Physiol* 1973, 51:1051-1054
28. Bonsall C *et al.* Radiocarbon and stable isotope evidence of dietary change from the mesolithic to the middle ages in the iron gates: new results from Lepenski Vir. *Radiocarbon* 2004, 46:293-300
29. Connin S L *et al.* Late Pleistocene C₄ Plant Dominance and Summer Rainfall in the Southwestern United States from Isotopic Study of Herbivore Teeth. *Quaternary Research* 1998, 50:179-193
30. Chen F Variations of organic carbon isotopic composition and its environmental significance during the last glacial on western Chinese Loess Plateau. *Chin Sci Bull* 2006, 51:1593-1602
31. G Müldner *et al.* Strontium and stable isotope evidence for diet and mobility in Roman Gloucester, UK. *J Archaeol Sci* 2010, 37:150-163
32. Van der Merwe NJ *et al.* Recent carbon isotope research and its implications for African archaeology. *Afr Archaeol Rev* 1983, 1:33-56
33. Wang Y *et al.* Chemical and carbon isotopic evidence for the source and fate of dissolved organic matter in the northern Everglades. *Biogeochemistry* 2002, 61: 269-289
34. Tieszen L L *et al.* Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia* 1983, 57:32-37
35. Paulet Y-M *et al.* Experimental shift in diet $\delta^{13}\text{C}$: a potential tool for ecophysiological studies in marine bivalves *Organic Geochemistry* 2006, 37:1359-1370
36. Bonani S *et al.* AMS ^{14}C age determinations of tissue, bone and grass samples from the Ötztal Ice Man, *Radiocarbon* 1994, 36:247-250.
37. Petchey F *et al.* Use of three isotopes to calibrate human bone radiocarbon determinations from Kainapirina (sac), Watom Island, Papua New Guinea. *Radiocarbon* 2005, 47:181-192
38. Wilmshurst J M High-precision radiocarbon dating shows recent and rapid initial human colonization of East Polynesia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 10.1073/pnas.1015876108.

ROLA PEPTYDAZ BAKTERYJNYCH W ROZWOJU PARADONTOZY

1. Wstęp

Peptydazy (proteazy) są enzymami, które katalizują reakcje hydrolizy wiązań peptydowych. Peptydazy zostały przyporządkowane przez Komisję Enzymatyczną (ang. *Enzyme Commission*) do klasy 3 (hydrolazy) i podklasy 4 (peptydazy). Peptydazy są enzymami szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie, w związku z czym pełnią one kluczową rolę w wielu procesach takich jak:

- degradacja białek [1];
- modyfikacja proteolityczna białek i ich prekursorów (np. udział w sekrecji białek poprzez odcinanie sekwencji sygnałowych, regulacja aktywności enzymów) [1,2];
- zewnątrzkomórkowa hydroliza polipeptydów do mniejszych peptydów i aminokwasów, które następnie mogą być wchłaniane przez komórkę i użyte jako materiał budulcowy [1,2];
- regulacja ekspresji genów: degradacja białek regulatorowych ma kluczowe znaczenie m.in. w odpowiedzi komórki na szok cieplny czy też uszkodzenie DNA (odpowiedź SOS) [1];
- udział w rozwoju takich chorób jak AIDS, nowotwory czy też infekcje bakteryjne [3,4,5]

Fakt, że peptydazy pełnią tak różnorodne funkcje, sprawia, że enzymy te są niezwykle interesującym obiektem badań naukowych, które z kolei mogą doprowadzić do poznania mechanizmu wielu zjawisk zachodzących w naturze.

2. Peptydazy a wirulencja bakterii

Geny, które kodują domniemane peptydazy, stanowią w przybliżeniu 3% wszystkich genów bakterii. Jednakże, liczba genów peptydaz w genomach organizmów

prokariotycznych jest bardzo zróżnicowana: waha się od kilkunastu w przypadku gatunków bakterii z rodzaju *Mycoplasma* aż do 179 genów potencjalnych enzymów proteolitycznych w przypadku *Bacillus cereus* [6].

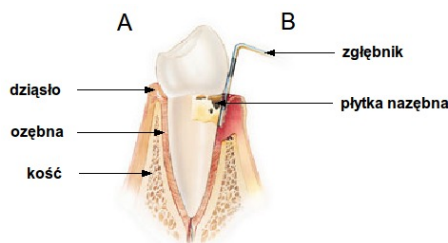
Peptydazy bakteryjne mogą być uważane za czynniki wirulencji, ponieważ zaangażowane są w sposób bezpośredni w takie procesy jak: niszczenie tkanek gospodarza, kolonizacja gospodarza, rozprzestrzenianie się bakterii w obrębie za-infekowanego organizmu czy też ochrona patogenu przed odpowiedzią układu immunologicznego. Ponadto, peptydazy organizmów prokariotycznych nie mogą być traktowane tylko jako czynniki wirulencji, ponieważ wiele peptydaz jest niezbędnych do produkcji innych czynników wirulencji bakterii poprzez modyfikację aktywności enzymów czy też udział w sekrecji białek. Przykładem choroby, w której rozwoju znaczącą rolę odgrywają bakteryjne peptydazy, jest paradontoza.

3. Paradontoza

Wśród bakteryjnych chorób jamy ustnej wyróżniamy choroby zębów oraz choroby przyzębia [7]. Najczęściej występującą chorobą zębów jest próchnica, która w sposób bezpośredni prowadzi do zniszczenia struktury zębów.

Natomiast w przypadku chorób przyzębia dochodzi do zniszczenia połączenia pomiędzy dziąsłami a zębami (Rysunek 1). Do przyzębia zaliczane są

tkanki będące w kontakcie z szyjką zęba, czyli dziąsło, ozębna, okostna, cement korzeniowy oraz kość wyrostka zębodołowego [8]. Wśród chorób przyzębia wyróżnia się dwa schorzenia: zapalenie dziąseł i zapalenie przyzębia, czyli paradontozę [7]. Obie powyższe choroby prowadzą do uszkodzenia tkanek podporowych zębów, które w ostateczności mogą doprowadzić do rozchwiania, a następnie wypadnięcia zębów. Jednakże, paradontoza prowadzi do uszkodzenia głębiej położonych tkanek podporowych zęba, czyli ozębnej, która jest zbudowana głównie z włókien kolagenowych, oraz kości wyrostka zębodołowego [8].



Rysunek 1: Porównanie stanu przyzębia w warunkach fizjologicznych (A) i w czasie paradontozy (B). Źródło: rycina własna, Internet.

3.1 Rozwój paradontozy

Wstępnym etapem większości bakteryjnych chorób jamy ustnej jest wytworzenie na powierzchni zębów biofilmu w postaci płytki nazębnej. We wczesnym etapie tworzenia biofilmu biorą udział głównie bakterie z rodzaju *Streptococcus* [9]. Płytką nazębną powstaje również w szczelinach pomiędzy zębami a dziąsłami – w tym przypadku mówi się o powstaniu poddziąsłowej płytki nazębnej. Za początek paradontozy można uznać moment, w którym w poddziąsłowej płytce nazębnej dojdzie do niekontrolowanego wzrostu bakterii – głównie Gram-ujemnych bakterii beztlenowych. Za uszkodzenia tkanek mocujących zęby w zębodole są odpowiedzialne zarówno produkty wytwarzane przez komórki drobnoustrojów (toksyny, enzymy – m.in. peptydazy) jak i silny stan zapalny indukowany w miejscu infekcji [8]. Najczęstszymi czynnikami etiologicznymi paradontozy są następujące gatunki bakterii: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens* oraz *Tannerella forsythia*. W tym miejscu warto wspomnieć, że powyżej wymienione gatunki bakterii często są składnikiem fizjologicznej mikroflory jamy ustnej człowieka [10].

3.2 Paradontoza a inne choroby

Choroby przyzębia, w tym paradontoza, są bardzo częstymi schorzeniami jamy ustnej ludzi. Szacuje się, że na całym świecie 10 – 15% dorosłych ludzi cierpi z powodu paradontozy [11]. Paradontoza nie ogranicza się tylko do zmian patologicznych w jamie ustnej, ale również związana jest ze wzrostem ryzyka zachorowania na różne choroby [12]. Opisywana jest m.in. korelacja pomiędzy zapaleniem przyzębia a chorobami płuc [13] oraz ryzykiem przedwczesnego urodzenia dziecka o niskiej masie ciała [14]. Duże zainteresowanie budzi również fakt, że choroby przyzębia mogą być czynnikiem ryzyka w chorobach układu krążenia takich jak miażdżycy tętnic, zapalenie wsierdza czy też zapalenie osierdza. I tak około 3% przypadków zakaźnego zapalenia wsierdza jest wywołane przez Gram-ujemne gatunki bakterii, które są czynnikami etiologicznymi paradontozy [15]. Ponadto opisano również związek paradontozy z systemowymi schorzeniami takimi jak cukrzyca czy też reumatoidalne zapalenie stawów [16,17].

4. Rola peptydaz w rozwoju paradontozy

Wiele gatunków bakterii jest odpowiedzialnych za rozwój paradontozy, ale w przypadku trzech gatunków bakterii: *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* i *Treponema denticola*, które tworzą tzw. czerwony kompleks, korelacja pomiędzy paradontozą a obecnością wymienionych patogenów jest najbardziej znacząca [18]. Wszyscy przedstawiciele czerwonego kompleksu produkują zewnątrzkomórkowe peptydazy, które są istotnymi czynnikami wirulencji odpowiedzialnymi za rozwój choroby.

4.1 *Porphyromonas gingivalis*

Podstawową funkcją zewnątrzwydzielniczych peptydaz *Porphyromonas gingivalis* jest zapewnienie odpowiedniej ilości substancji odżywczych poprzez hydrolizę białek gospodarza [19]. Opisano również wiele innych, bardziej subtelnych funkcji peptydaz produkowanych przez *Porphyromonas gingivalis*. Poniżej zamieszczono kilka przykładów:

- aktywacja układu kalikreina-kinina prowadząca do produkcji dużych ilości bradykininy – hormonu peptydowego, który zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych [19];
- degradacja białek tworzących tkanki gospodarza (np. kolagen typu IV) [20];
- aktywacja fibroblastów oraz neutrofilów gospodarza prowadząca do produkcji metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *matrix metalloproteinases*), które hydrolizują kolagen [21];
- ochrona przed układem immunologicznym gospodarza poprzez proteolityczną inaktywację interleukiny 8 (IL-8), która jest chemoatraktantem dla neutrofilów [22];
- oddziaływanie z układem dopełniacza – trawienie enzymatyczne składnika C5 do biologicznie aktywnej formy C5a [19,22]. C5a jest chemoatraktantem, który zwiększa migrację neutrofilów do miejsca infekcji. Prowadzi to do zwiększenia stanu zapalnego oraz ilości peptydaz gospodarza w miejscu infekcji, które poprzez hydrolizę białek dostarczają składników odżywczych patogenowi.

4.2 *Treponema denticola*

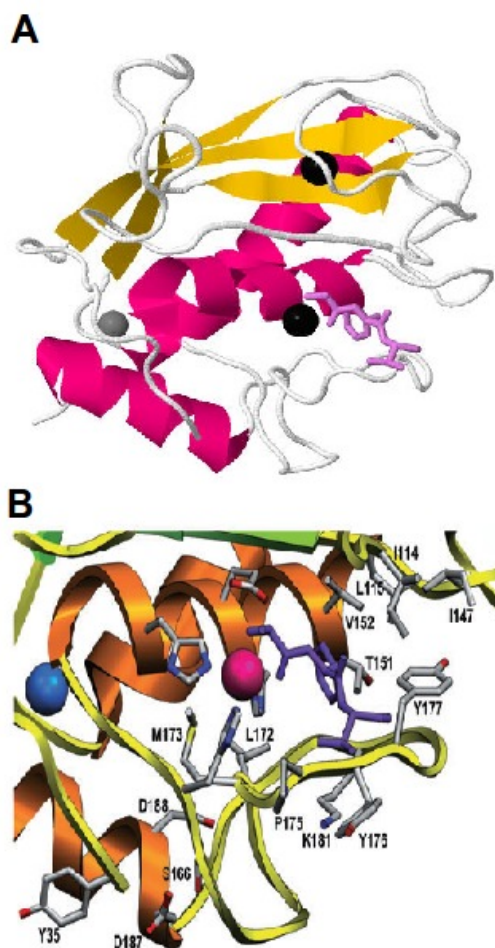
Rolę peptydaz produkowanych przez bakterie z gatunku *Treponema denticola* w rozwoju paradontozy najlepiej jest opisać na przykładzie proteazy dentylizyna (ang. *dentilisin*), która jest związana z powierzchnią bakterii (Tabela 1).

Proces	Aktywność
Adherencja	Ligand przy koagregacji z <i>Porphyromonas gingivalis</i> [23]
	Aktywacja składnika C3 układu dopełniacza [24]
Immunomodulacja	Hydroliza ludzkiej Il-8, Il-6 oraz TNF- α [25]
	Hydroliza ludzkich IgG oraz IgA [26]
	Degradacja białek gospodarza (m.in. fibronektyna, laminina, kolagen typu IV) [26, 27]
Cytotoksyczność	Wiązanie i degradacja fibrynogenu [24, 28]

Tabela 1: Średnie nachylenie wektora skonstruowanego na atomach P i P' do osi OZ. Parametr ten liczono w dwóch grupach – tworzących stabilne wiązania wodorowe ze skwalaminą, przez co najmniej 25% lub 75% czasu (pierwsza kolumna), oraz nie uczestniczące w oddziaływaniach tego typu (druga kolumna).

4.3 *Tannerella forsythia*

Nasza wiedza na temat zewnątrzkomórkowych peptydaz bakterii z gatunku *Tannerella forsythia* oraz ich roli w rozwoju paradontozy wciąż jest bardzo ograniczona. Pierwszą opisaną peptydazą wydzielaną przez *Tannerella forsythia* jest karilizyna, 52 kDa białko o budowie wielodomenowej, które składa się z centralnej 18 kDa domeny katalitycznej, nazwanej Kly18, otoczonej przez domeny niespokrewnione z żadnymi znanymi białkami [29]. Wykazano również, że nowo scharakteryzowany enzym podobny do metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej hydrolizuje obecny w jamie ustnej człowieka peptyd antybakteryjny LL-37, a co za tym idzie znacząco obniża jego aktywność antybakteryjną. Fakt ten może przyczyniać się do oporności na działanie peptydu antybakteryjnego LL-37 nie tylko *Tannerella forsythia*, ale również innych bakterii znajdujących się w poddziąsłowej



Rysunek 2: Struktura metalopeptydazy Kly18. (A) Struktura przestrzenna Kly18 związanego z dwoma jonami cynku (czarne sfery) i jednym jonem magnezu (szara sfera). Nieoczekiwanie, do kieszeni katalitycznej Kly18 był związany trójepeptyd (zaznaczony na fioletowo) naśladujący produkt cięcia proteolitycznego. Źródło struktury: PDB 2XS4. (B) Zbliżenie na centrum aktywne Kly18 z centralnie znajdującym się jonem cynku. Źródło: [31].

plytce nazębnej. Wobec tego proteaza karilizyna może mieć bezpośredni wpływ na uszkodzenie tkanek przyzębia oraz powstawanie i/lub rozwój przewlekłej paradontozy [30].

Struktura przestrzenna Kly18 została rozwiązana (Rysunek 2). Kly18 posiada większość cech strukturalnych charakterystycznych dla domen katalitycznych ssaczych metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. Ponadto analiza podobieństwa filogenetycznego i sekwencji ujawniła, że ewolucyjnie Kly18 jest bardziej zbliżone do ssaczych i pochodzących z owadów skrzydlatych metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej niż do potencjalnych odpowiedników bakteryjnych znalezionych przez projekty sekwencjonowania genomu. Wobec tego wnioskuje się, że ta pierwsza strukturalnie scharakteryzowana niessacza metaloproteinaza macie-

rzy zewnątrzkomórkowej jest ksenologiem pozyskanym na drodze horyzontalnego transferu genów podczas bliskiej koegzystencji *Tannerella forsythia* z ludźmi lub innymi zwierzętami w bardzo rzadkim przypadku przeniesienia genu z eukariotów do prokariotów. Następnie białko to ewoluowało w bakteriach w wyniku czego powstała pełna forma karilizyny, która zawiera unikalne domeny otaczające domenę katalityczną, które nie odpowiadają ogólnej wielodomenowej budowie zwierzęcych metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej [31].

5. Podsumowanie

Peptydazy są dobrze opisanymi czynnikami wirulencji bakterii biorących udział w powstawaniu i/lub rozwoju paradontozy. Mimo to nie opracowano jeszcze żadnego skutecznego leku, który hamowałby aktywność tych enzymów proteolitycznych i tym samym mógłby być zastosowany w medycynie. Związane jest to z faktem, że nasza wiedza na temat systemów proteolitycznych periopatogenów wciąż jest niewystarczająca do opracowania związków, które znajdą zastosowanie nie tylko w leczeniu paradontozy, ale przede wszystkim w profilaktyce tej choroby. W związku z powyższym wciąż niezbędne są badania nad peptydazami produkowanymi przez bakterie zaangażowane w rozwój paradontozy.

6. Literatura

1. Rao MB et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, 62(3):597-635.
2. Gupta R et al. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002, 59:15-32.
3. Otto M Virulence factors of coagulase-negative ataphylococci. *Frontiers in Bioscience* 2004, 9:841-863.
4. Bogaczewicz J et al. The role of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in invasion of tumours of neuroepithelial tissue. *Neurol Neurochir Pol* 2006, 40(5):404-12.
5. Badley AD In vitro and in vivo effects of HIV protease inhibitors on apoptosis. *Cell Death Differ* 2005, 12(1):924-31.
6. Potempa J et al. Bacterial peptidases. *Contrib Microbiol* 2005, 12:132-80.
7. Armitage GC Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 2004, 34:9-21.
8. Stefańska I et al. Molecular characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* virulence factors. *Postępy Mikrobiologii* 2007, 46(2):113-123.

9. Li J, Helmerhorst EJ et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004, 97(6):1311-8.
10. Sbordone L et al. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig* 2003, 7(4):181-8.
11. Fox CH New considerations in the prevalence of periodontal disease. *Curr Opin Dent* 1992, 2: 5?11.
12. Niedzielska I et al. The effect of chronic periodontitis on the development of atherosclerosis: review of the literature. *Med Sci Monit* 2008, 14(7):103-6.
13. Garcia RI et al. Epidemiologic associations between periodontal disease and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Periodontol* 2001, 6:71?77.
14. Offenbacher S et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol* 1996, 67(10):1103-13.
15. Paturel L et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 2004, 10(2):98-118.
16. Wegner N et al. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010, 62:2662?2672.
17. Pihlstrom BL et al. Periodontal diseases. *Lancet* 2005, 366:1809?1820.
18. Socransky SS et al. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998, 25:134?144.
19. Travis J et al. Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1477(1-2):35-50.
20. Eley BM et al. Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000, 2003;31:105-24.
21. Sorsa T et al. Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases. *Infect Immun* 1992, 60(11):4491-5.
22. O'Brien-Simpson NM et al. *Porphyromonas gingivalis* gingipains: the molecular teeth of a microbial vampire. *Curr Protein Pept Sci* 2003, 4(6):409-26.
23. Hashimoto M et al. Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to *Treponema denticola* dentilisin. *FEMS Microbiol Lett* 2003, 226:267?271.
24. Yamazaki T et al. Surface protease of *Treponema denticola* hydrolyzes C3 and influences function of polymorphonuclear leukocytes. *Microbes Infect* 2006, 8:1758?1763.
25. Miyamoto M et al. The *Treponema denticola* surface protease dentilisin degrades interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and tumor necrosis factor α . *Infect Immun* 2006, 74:2462?2467.
26. Ishihara K et al. Characterization of the *Treponema denticola* prtP gene encoding a prolyl-phenylalanine-specific protease (dentilisin). *Infect Immun* 1996, 64:5178?5186.
27. Makinen P-L et al. Role of the chymotrypsin-like membrane associated proteinase from *Treponema denticola* ATCC 35405 in inactivation of bioactive peptides. *Infect Immun* 1995, 63:3567?3575.

28. Cimasoni G et al. Adherence of *Treponema denticola* to modified hydroxyapatite. *J Dent Res* 1987, 66:1727-1729.
29. Karim AY et al. A novel matrix metalloprotease-like enzyme (karilysin) of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia* ATCC 43037. *Biol Chem* 2009, 391:105-117.
30. Koziel J et al. Proteolytic inactivation of LL-37 by karilysin, a novel virulence mechanism of *Tannerella forsythia*. *J Innate Immun* 2010, 2:288-293.
31. Cerdá-Costa N et al. The structure of the catalytic domain of *Tannerella forsythia* karilysin reveals it is a bacterial xenologue of animal matrix metalloproteinases. *Mol Microbiol* 2011, 79(1):119-32.

TERAPIA KOMÓRKOWA – ROLA KOMÓREK MACIERZYSTYCH, NAJNOWSZE ODKRYCIA, LECZENIE CHORÓB UKŁADU KRAŻENIA

Wprowadzenie

Jedną z najbardziej rozwijających się obecnie dziedzin medycyny terapeutycznej jest terapia komórkowa. W najogólniejszym znaczeniu polega ona najczęściej na transplantacji komórek własnych lub innego osobnika danego gatunku w celu zastąpienia lub naprawy uszkodzonych tkanek [1]. Metoda ta została z powodzeniem wykorzystana między innymi do odbudowy chrząstek stawowych, rdzenia kręgowego, do wzmocnienia układu immunologicznego w modelach zwierzęcych, a nawet do pomocy pacjentom cierpiącym na chorobę Alzheimera, Parkinsona czy padaczkę. Wiele badań wskazuje też na pozytywne efekty terapii komórkowej w leczeniu schorzeń chronicznych, takich jak miażdżycy i różne wady wrodzone [1].

Można uznać, że historia terapii komórkowej sięga późnego średniowiecza, kiedy to P.A.Paracelsus umieścił w swojej książce słowa: „the heart heals the heart, lung heals the lung, spleen heals the spleen; like cares like”. Natomiast pierwszym udokumentowanym przypadkiem transfuzji krwi (będącej w pewnym sensie najprostszym rodzajem terapii komórkowej) była transfuzja krwi bydlęcej do psychicznie chorego pacjenta, przeprowadzona na dworze Ludwika XIV. Za „ojca terapii komórkowej” uważa się Paul’a Niehans – szwajcarskiego lekarza żyjącego na przełomie XIX i XX wieku. Przedłużył on o miesiąc życie pacjenta, wszczepiając mu zawieszone w soli fizjologicznej komórki gruczołu przytarczycznego.

Istnieje wiele różnych form terapii z użyciem komórek. Można przeszczepiać różnego rodzaju komórki dojrzałe oraz macierzyste pochodzące zarówno od tego samego pacjenta (tzw. przeszczep autologiczny), jak i od innego dawcy tego samego gatunku (tzw. przeszczep allogeniczny). Podejmowano także próby zastosowania komórek zróżnicowanych, pochodzących od innego gatunku (tzw. prze-

szczep ksenogeniczny) lub komórek specjalnie zmodyfikowanych (np. produkujących potrzebne pacjentowi substancje). Jednak największe nadzieje wiąże się z użyciem komórek macierzystych i progenitorowych. Ich cechą charakterystyczną jest możliwość przekształcenia się w różne typy komórek z różnego rodzaju tkanek, jeśli tylko stworzy się im odpowiednie warunki wzrostu i rozwoju. Ponadto, komórki macierzyste posiadają zdolność do samoodnawiania się, czyli odtwarzania swojej puli po podziałach komórkowych. Można je podzielić ze względu na zdolność do różnicowania się na toti- , pluri- , multi- i unipotencjalne, natomiast ze względu na źródło pochodzenia – na embrionalne, zarodkowe i somatyczne.

Do tej pory naukowcy sądzili, że jedynie komórki pobrane z wczesnych embrionów zdolne są do wszechstronnego różnicowania. Ostatnie badania wykazały jednak, że możliwe jest to również w przypadku komórek pobranych od dorosłych osobników. Dzięki takim komórkom można będzie potencjalnie otrzymywać dowolne tkanki i organy do przeszczepów, co stanowi prawdziwy przełom w medycynie i pozwala częściowo pominąć problemy etyczne.

Najnowsze odkrycia

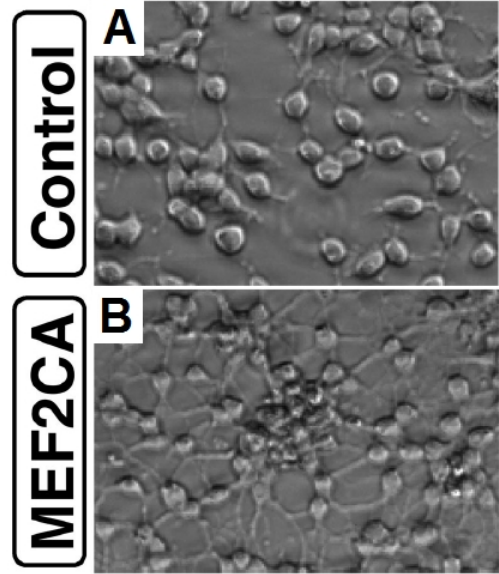
W czasopismach naukowych nie brakuje przykładów skutecznego wykorzystania komórek macierzystych w terapii. Jednym z nich są badania przeprowadzone w Burnham Institute for Medical Research w stanie California, które dały nadzieję na rozwój metod leczenia schorzeń neurodegeneracyjnych [2]. We wspomnianych badaniach, udało się po raz pierwszy tak zaprogramować genetycznie embrionalne komórki macierzyste, aby zróżnicowały się one w neurony po iniekcji do mózgu myszy. Ważny wydaje się fakt, że żadna z myszy poddanych zabiegowi nie zachorowała na nowotwór, co było poważną przeszkodą we wcześniejszych próbach transplantacji komórek macierzystych do mózgu. Co więcej, w doświadczeniu uniknięto innych problemów, takich jak przekształcanie się dużej części komórek w komórki glejowe, a także wymierania ich po wprowadzeniu do mózgu (w procesie apoptozy). Dokonano tego dzięki zaindukowaniu w komórkach macierzystych ekspresji białka MEF2C (myocyte enhancer factor 2C), będącego czynnikiem transkrypcyjnym włączającym odpowiednie geny odpowiedzialne za ochronę komórek oraz ich odpowiednie różnicowanie się [2] . Poniższy rysunek (Rys.1) przedstawia morfologię komórek kontrolnych oraz po zaindukowaniu eks-

presji MEF2C. Komórki z MEF2C rozwinęły dużo więcej wypustek nerwowych niż komórki kontrolne.

Inny eksperyment na myszach, który również dotyczył schorzeń układu nerwowego został przeprowadzony w laboratoriach University of Rochester Medical Center (NY, USA) [3]. Przeszczep ludzkich glejowych komórek macierzystych do myszy cierpiących na demielinizację włókien nerwowych zakończył się sukcesem. Mimo, że trzy czwarte z przeszczepionych zwierząt przeżyło zaledwie kilka tygodni więcej od grupy kontrolnej, to sześć osobników praktycznie całkowicie wyzdrowiało nie wykazując żadnych objawów choroby. Przyczyną poprawy stanu zdrowia myszy było rozprzestrzenienie się komórek po centralnym układzie nerwowym (w przeciągu dwóch miesięcy od ich wprowadzenia) oraz rozpoczęcie przez te komórki produkcji brakującej mieliny [3]. Daje to nadzieje na wynalezienie w przyszłości skutecznej terapii nieuleczalnych dotąd chorób ludzkich.

Szczęśliwym przypadkiem można nazwać odkrycie naukowców z University of Twente (w Holandii) [4]. Zajmowali się oni otrzymywaniem prekursorów komórek chrząstki, stosując metody inżynierii tkankowej. Po wprowadzeniu nowo otrzymanej *in vitro* tkanki pod skórę myszy, zaobserwowali jej zróżnicowanie się w tkankę kostną. Na poniższym rysunku (Rys.2) przedstawiony jest skrawek histologiczny pobrany z tkanek zwierzęcia po czternastu dniach po przeszczepie. Chondrocyty są otoczone tkanką kostną.

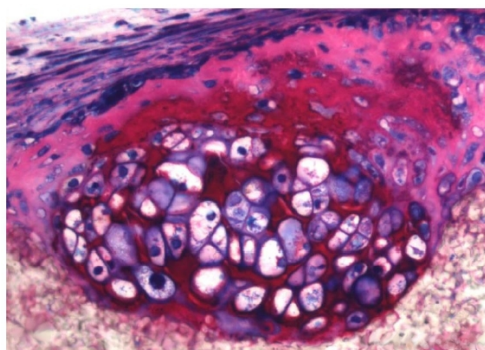
Powyższe obserwacje były zaskakujące, gdyż dotychczas proces ten uważano za powszechny jedynie w przypadku embrionów i dzieci, a nie tkanek dorosłych osobników. W związku z tym powtórzono badania, wszczepiając podobne komórki myszom chorym na częściowy ubytek kości czaszki. Uzyskane wyniki potwierdziły



Rysunek 1: Morfologia komórek kontrolnych (A) oraz po zaindukowaniu ekspresji MEF2C (B), źródło: [2]

duży potencjał terapeutyczny otrzymanych wcześniej komórek [4]. Inne doświadczenie przeprowadzone w tym samym instytucie badawczym ujawniło rolę kinazy PKA (protein kinase A) w różnicowaniu się dorosłych mezenchymalnych komórek macierzystych [5]. Dodatek tego enzymu do kultury *in vitro* znacznie poprawił zdolność tych komórek do przekształcania się w komórki kościotwórcze [5]. Wynika z tego, że zarówno hodowle *in vitro*, jak i inżynieria tkankowa mogą być przydatne w praktyce klinicznej.

W pełni zróżnicowane komórki również mogą być w niektórych przypadkach przydatnym narzędziem terapii komórkowej. Jednym z takich przykładów jest wykorzystanie komórek wysepek trzustkowych w leczeniu cukrzycy typu I [12]. Zabiegi transplantacji tych komórek z powodzeniem wykonywano w pracowniach Diabetes Institute for Immunology and Transplantation (MN, USA). Do eksperymentu wybrano 26 pacjentów z najcięższymi postaciami tej choroby, którzy mieli problemy z kontrolowaniem poziomu cukru we krwi z użyciem insuliny. Celem zabiegów było zastąpienie zniszczonych komórek β wysepek trzustkowych komórkami zdrowymi. Pozytywnie na terapię odpowiedziało 90% pacjentów, natomiast 50% z nich uniknęło nawrotu dolegliwości w przeciągu pięciu lat od transplantacji [12]. Wyniki te wykazały więc podobną skuteczność terapii komórkowej do tradycyjnych przeszczepów całej trzustki sugerując potencjalną możliwość zastosowania tego typu terapii u osób cierpiących na cukrzycę typu I.



Rysunek 2: Skrawek histologiczny z czternastego dnia różnicowania prekursorów chrzęstnych w komórki kostne, źródło: [4]

Ważną rolę w rozwoju terapii komórkowej odegrało odkrycie naukowców z Cambridge University (UK), którzy stwierdzili, że mysie embrionalne komórki macierzyste nie potrzebują zewnętrznych czynników wzrostowych do różnicowania się [6]. Mogą one bowiem spontanicznie różnicować w odpowiedzi na samodzielnie wytwarzane cząsteczki sygnałowe. Aby utrzymać pluripotencjalny charakter tych komórek, wystarczy więc zablokować sygnały do różnicowania się. W celu potwier-

dzenia tej teorii, badacze wykorzystali substancje blokujące kluczową cząsteczkę sygnałową znaną jako FGF4. Ponadto, przeprowadzono badania komórek z defektem genu kodującego tę cząsteczkę. W obu przypadkach utrata FGF4 skutkowałą utrzymaniem komórek w stanie nieodróżnicowanym [6]. Naukowcy mają zatem nadzieję, że to odkrycie pozwoli na bardziej świadome i rzetelne eksperymenty na komórkach ludzkich.

Terapia komórkowa w leczeniu chorób układu krążenia

Choroby układu krążenia stanowią główną przyczynę zgonów w krajach wysoko rozwiniętych. Dlatego wiele prac zostało jak dotąd poświęconych nowym, potencjalnym metodom leczenia tego typu schorzeń, przede wszystkim z wykorzystaniem komórek macierzystych.

Badacze z Children's Hospital Boston (USA) odkryli wcześniej nierozpoznaną populację komórek macierzystych, przekształcających się w kardiomiocyty, czyli właściwe komórki mięśnia sercowego, odrębne od komórek układu przewodzącego serca oraz od komórek wewnątrzwydzielniczych. Wcześniejsze badania wskazywały bowiem jedynie na dwa typy komórek macierzystych będących prekursorami różnych typów tkanek tworzących serce – jedne tworzyły prawą, a drugie lewą część serca [7].

Ta nowo odkryta, trzecia grupa komórek, została zidentyfikowana na podstawie ekspresji genu *Wt1* i jest zlokalizowana głównie w obrębie epicardium, czyli zewnętrznej części serca. Aby stwierdzić potwierdzić obecność tej populacji, badacze użyli enzymu zwanego rekombinazą Cre do wyznakowania tych komórek (w żywych embrionach myszy) fluoryzującym na czerwono białkiem RFP. Przy każdej aktywacji genu *Wt1* białko świeciło na czerwono, a ponieważ marker był dziedziczony przez kolejne pokolenia komórek, to można było je zlokalizować, a tym samym określić ich pochodzenie [7].

Warto wspomnieć, że potencjalną wartość w leczeniu chorób układu krążenia mają nie tylko komórki macierzyste zlokalizowane w samym sercu. W roku 2001 pojawiły się pierwsze doniesienia o wykorzystaniu komórek szpiku kostnego w terapii chorób sercowo-naczyniowych [8]. Pięć lat później opublikowano wyniki trzech badań klinicznych oceniających efektywność terapii z zastosowaniem tych komórek. Pierwsze wyniki badań były obiecujące, choć wykazały jedynie niewielką

poprawę wartości wskaźnika LVEF (ang. *Left Ventricle Ejection Fraction*) u leczonych pacjentów. Wcześniej oszacowano bowiem, że istotna z punktu widzenia klinicznego zmiana tego parametru powinna przekraczać 5%, a w badaniach używano zaledwie poprawę o 2-3% [9]. Sprawę dodatkowo komplikuje fakt, że LVEF nie zawsze jest dobrym wskaźnikiem efektywności leczenia – wiele terapii z użyciem leków nie wpływa na wartość LVEF mimo znaczącej poprawy stanu zdrowia pacjentów. W takiej sytuacji należy poszukać innych sposobów oceny skuteczności leczenia.

Z poznawczego i klinicznego punktu widzenia ważne jest również śledzenie losu przeszczepionych komórek *in vivo* (np. z wykorzystaniem MRI) oraz staranne dobieranie pacjentów do badań klinicznych. Muszą oni spełniać ściśle określone kryteria kwalifikalności do terapii, a eksperymenty powinny być wykonywane w miarę możliwości na tym samym etapie rozwoju choroby dla wszystkich uczestników eksperymentu.

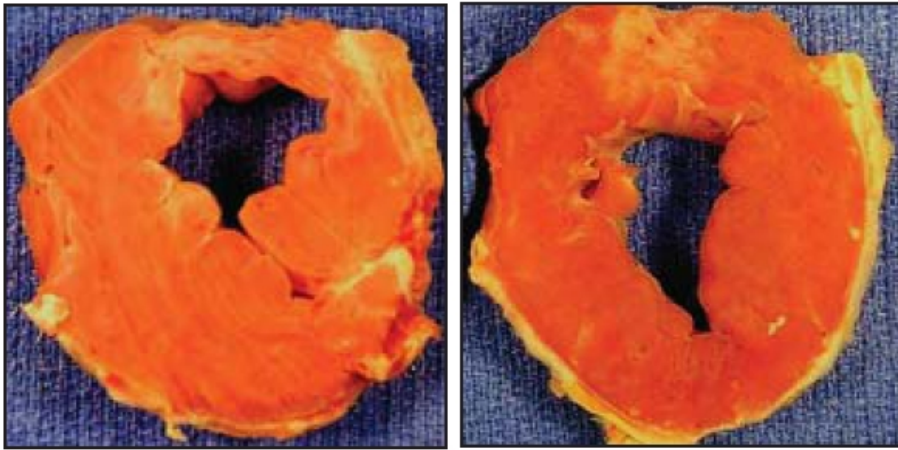
Kluczową kwestią jest także konieczność wyselekcjonowania z heterogennej populacji komórkowej takich komórek, które przynoszą największe korzyści chorym. Wykazano bowiem, że tylko niewielki odsetek wprowadzonych do organizmu komórek szpiku kostnego jest w stanie przekształcić się w kardiomiocyty [10].

Te wszystkie przeszkody i wątpliwości sprawiają, że nieoczekiwanie niska ocena wyników wyżej wspomnianych prób klinicznych jest przedwczesna.

Eksperymenty dotyczące odnowy mięśnia sercowego były przeprowadzane w wielu krajach. Dla większości biorących w nich udział pacjentów stanowiły one ostatnią szansę na wyleczenie, więc nie brakowało ochotników. Wyniki prób często dowodziły, że terapia komórkowa nie jest tak bezpieczna, jak by się wydawało, szczególnie przy zastosowaniu niektórych typów komórek. U kilku francuskich pacjentów leczonych przeszczepem z mioblastów mięśni szkieletowych rozwinęła się arytmia, zdarzały się także przypadki zwichnięcia naczyń krwionośnych i inne powikłania [11]. Niektórzy eksperci obawiają się również, że transplantacja komórek macierzystych może wywoływać unaczynianie guzów nowotworowych lub wywołać nowotwory przez przekształcanie się przeszczepionych komórek macierzystych w komórki tumorogenne [12]. Dlatego nierzadko instytucje naukowe miewają problemy z otrzymaniem pozwolenia na badania i eksperymenty kliniczne.

Pomimo tych trudności badania z wykorzystaniem zwierząt są obiecujące.

Na poniższym rysunku (Rys.3) przedstawiono przekroje serc świńskich po wyidukowanym zawale, a następnie poddanych terapii komórkowej. Serce zwierzęcia leczonego komórkami macierzystymi (po prawej stronie) wykazuje zdecydowanie mniej nieprawidłowości w budowie w porównaniu z sercem nie poddanym leczeniu (po lewej stronie).



Rysunek 3: Przekroje serc świńskich po wyidukowanym zawale. Po prawej: po zastosowaniu terapii komórkami macierzystymi, źródło: [9]

Zakończenie

Najnowsze odkrycia wskazują na ogromny potencjał terapeutyczny komórek macierzystych. Jest to optymistyczne, ale nie musi oznaczać niestety braku problemów, ani zdecydowanego przełomu w medycynie. Wiele kwestii nie zostało bowiem jeszcze wyjaśnionych, a postępy badań są stosunkowo powolne ze względu na ich koszty i stopień skomplikowania. Ponadto, większość doświadczeń jest prowadzonych razie jak dotąd tylko na zwierzętach i nie przekroczyła etapu wczesnych prób klinicznych. Nie wiadomo więc do końca, czy obiecujące wyniki badań na myszach przekładają się na równie spektakularne sukcesy w terapii chorób ludzkich, choć badania wykonane na dużych modelach zwierzęcych, np. na wspomnianej wyżej świni, są obiecujące

Sytuacji nie poprawia fakt, że użycie komórek macierzystych (zwłaszcza pochodzenia embrionalnego) wywołuje w wielu krajach debaty o charakterze etycz-

nym. Dodatkowym problemem wydaje się kwestia działań niepożądanych, zmienności osobniczej w badanych populacjach (utrudniającej interpretację wyników prób klinicznych) oraz konieczność wykonywania rzetelnych, często bardzo kosztownych badań z uwzględnieniem próby kontrolnej.

Warto być jednak optymistą, gdyż terapia komórkowa odniosła już sukcesy, a medycyna i genetyka są ostatnimi czasy bardzo prężnie rozwijającymi się dziedzinami nauki. Niepewności i ciągle poszukiwanie właściwych metod postępowania są nieuniknione, a ich pokonywanie nieodłącznie wpisane w pracę naukową. Ponadto, historia pokazuje, że dziś powszechnie stosowane terapie jeszcze stosunkowo niedawno należały do świata „science-fiction”. Tylko dzięki wytrwałości badaczy ujrzały światło dzienne, a my możemy cieszyć się ich bezcennymi owocami.

Literatura

1. Flynn A et al. Stem cell therapy for cardiac disease. *Expert Opin Biol Ther* 2011, 11(2):177-87
2. Li Z et al. Myocyte enhancer factor 2C as a neurogenic and antiapoptotic transcription factor in murine embryonic stem cells. *J Neurosci*. 2008, 28(26):6557-68.
3. Windrem MS et al. Neonatal Chimerization with Human Glial Progenitor Cells Can Both Remyelinate and Rescue the Otherwise Lethally Hypomyelinated Shiverer Mouse. *Cell Stem Cell* 2008, 2(6):553-65.
4. Jukes JM et al. Endochondral bone tissue engineering using embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105(19):6840-45.
5. Siddappa R et al. cAMP/PKA pathway activation in human mesenchymal stem cells in vitro results in robust bone formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105(20):7281-86.
6. Ying QL et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 2008, 453(7194):519-23.
7. Zhou B et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 2008, 454(7200):109-13.
8. Orlic D et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001, 410: 701?705.
9. Lunde K et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006, 355: 1199?1209
10. Adler ED et al. Cell therapy for Cardiac Disease: Where Do We Go From Here?. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 2007, 4(1):2-3
11. Couzin J et al. News Focus: Renovating the Heart. *Science* 2004, 304: 192-94
12. <http://www.med.umn.edu/diabinst/>

Zakład Immunologii,

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

KIEDY PŁACIMY CENĘ ZA OBRONĘ ORGANIZMU – UDZIAŁ RECEPTORÓW TLR W PATOGENEZIE MIAŻDŻYCY

1. Wstęp

Jak najszybsze rozpoznanie i przekaz sygnału aktywacji w wyniku pojawienia się w ustroju czynnika infekcyjnego to podstawa działania wrodzonego układu odporności. Jego zadaniem jest natychmiastowe ograniczenie lub eliminacja zagrożenia, jak również pobudzenie wysokospecyficznej odpowiedzi swoistej. Komórki odpowiedzialne za pierwszą linię obrony organizmu (np. monocyty, makrofagi, neutrofile, komórki nabłonka) są w tym celu wyposażone w „system wczesnego ostrzegania” – receptory PRR (ang. *pattern recognition receptors*), rozpoznające molekularne wzorce patogenności (PAMP, ang. *pathogen-associated molecular patterns*) czyli struktury występujące u drobnoustrojów, a nieobecne u gospodarza. Dodatkowo, ze względu na różne drogi wnikania patogenów, zaistniała ewolucyjna konieczność, aby receptory PRR różniły się lokalizacją w obrębie komórki (błona komórkowa, cytoplazma, endosomy).

Ważną i obecnie szeroko badaną grupą cząsteczek PRR stanowi konserwatywna rodzina receptorów TLR (ang. *Toll-like receptors*). Rozpoznanie i związanie ligandów przez te receptory inicjuje złożoną kaskadę przekazu sygnału, której ostatecznym rezultatem jest indukcja produkcji cytokin prozapalnych takich jak $\text{TNF}\alpha$, interleukina 1β ($\text{IL-1}\beta$) czy też interferony. Dochodzi także do aktywacji i zmiany fenotypu komórki, przejawiającej się np. ekspozycją cząsteczek adhezyjnych bądź receptorów chemokin. Pobudzenie receptorów TLR skutkuje wzmożoną produkcją cytokin i cząsteczek kostymulujących przez prezentujące antygen komórki dendrytyczne, co umożliwia następnie aktywację naiwnych limfocytów T. W ten sposób sygnał z receptorów wrodzonego układu odporności zapoczątkowuje i koordynuje późniejszą odpowiedź swoistą, w której dominującą rolę odgrywają limfocyty T oraz B. W wyniku aktywacji receptorów TLR dochodzi także do uruchomienia mechanizmów kontrolnych, czego przykładem jest produkcja przeciw-

zapalnej IL-10. Ostatecznie procesy te mają doprowadzić do usunięcia czynnika infekcyjnego [1].

Obok niezaprzeczalnie pozytywnej roli w obronie organizmu, receptory TLR dzięki zdolności do bezpośredniej inicjacji stanu zapalnego, przy jednoczesnym rozregulowaniu mechanizmów kontrolnych, mogą brać udział w patogenezie chorób autoimmunologicznych, infekcyjnych, jak również stanów o charakterze chronicznego zapalenia. Zaburzoną sygnalizację przez te receptory podejrzewa się także o udział w patogenezie miażdżycy [2,3].

2. Historia odkrycia

Receptory TLR zawdzięczają swoją nazwę homologicznemu receptorowi Toll, którego istnienie wykazała w 1985 r. Christiane Nüsslein-Volhard z Instytutu Maxa-Plancka w trakcie badań genów wpływających na rozwój larwalny *Drosophila melanogaster*. Produkt odkrytego genu *toll* został zidentyfikowany jako białko niezbędne do utrzymania prawidłowej polarnośći grzbietowo-brzuszej w trakcie wczesnego rozwoju embrionalnego. W latach późniejszych powiązано również jego aktywność z wrodzoną odpornością dorosłych osobników muszki na zakażenia grzybami, a także bakteriami gramdodatnimi.

Receptory TLR zidentyfikowane u ssaków poprzez analizę porównawczą sekwencyjnych baz danych, wykazują znaczne podobieństwo strukturalne do białka Toll. Pierwszym odkrytym przez R. Medzhitov'a i C. Janeway'a w 1998 r. receptorem z rodziny Toll-like był TLR4 rozpoznający endotoksynę (LPS) – składnik ściany komórkowej bakterii gramujemnych. Zarówno w przypadku TLR4, jak i u kolejnych odkrywanych receptorów TLR, nie wykazano funkcji w rozwoju embrionalnym, a jedynie w układzie immunologicznym [4 - 6].

3. Występowanie i budowa

Do rodziny ssaczych receptorów TLR należy kilkanaście cząsteczek. Do tej pory zidentyfikowano 10 receptorów TLR u człowieka i 13 u myszy [7]. Receptory TLR oznaczane indeksami od 1 do 9 są wysoce konserwatywne, wykazując znaczne podobieństwo strukturalne oraz funkcjonalne u myszy i człowieka. Różnice dotyczą receptora kodowanego przez gen *TLR10*, który u człowieka ulega prawidłowej

ekspresji, natomiast u myszy fragment kodujący C-terminalną część białka uległ niefunkcjonalnej substytucji. Odwrotna sytuacja występuje w przypadku genu receptora TLR11, który w komórkach ludzkich jest nieproduktywny ze względu na wewnętrzny kodon STOP. U myszy z kolei, w pełni funkcjonalny TLR11 jest receptorem profilinopodobnego białka *Toxoplasma gondii* [1].

Receptory TLR występują w wielu typach komórek: w największej ilości w makrofagach, monocytach, komórkach dendrytycznych, ale także granulocytach, limfocytach i komórkach tucznych oraz śródbłonku, fibroblastach, kardiomiocytach, keratynocytach i adipocytach. Repertuar i ilość posiadanych receptorów TLR zależy od typu komórki [7-12].

Receptory TLR należą do białek transbłonowych I typu. Zewnątrzkomórkowa domena N-końcowa, odpowiadająca za rozpoznanie ligandów, zbudowana jest z powtarzających się tandemowo motywów leucynowych LRR (ang. *leucine-rich repeats*) i jest odmienna u każdego z receptorów. Natomiast część cytoplazmatyczną, odpowiedzialną za przekaz sygnału pobudzenia do wnętrza komórki, stanowi konserwatywna domena TIR (ang. *Toll/IL-1R*), która występuje również w receptorze IL-1. Receptory TLR są zlokalizowane na powierzchni komórki lub wewnątrzkomórkowo w błonie endosomów - częścią LRR do środowiska zewnętrznego [1, 8-12].

Większość receptorów TLR funkcjonuje w postaci homodimerów, rzadziej jako heterodimery. Ciekawy przykład stanowi receptor TLR2, który dimeryzuje z receptorem TLR1 lub TLR6, zwiększając w ten sposób różnorodność rozpoznawanych ligandów. W zależności od rodzaju partnera heterodimeryzacji rozpoznaje odpowiednio triacylowane lub diacylowane lipopeptydy [1, 8-12]. Ponadto wykazano, że receptor TLR2 prawdopodobnie rozpoznaje niektóre ligandy niezależnie od TLR1 i TLR6 [12].

Receptory TLR mogą wiązać ligandy samodzielnie lub w kooperacji z cząsteczkami towarzyszącymi. Obecność tych ostatnich służy właściwej prezentacji ligandów oraz zwiększa specyficzność detekcji. Przykładowo, do prawidłowego rozpoznania lipopolisacharydu przez receptor TLR4 konieczny jest udział rozpuszczalnego białka wiążącego LPS (LBP, ang. *lipopolysaccharide-binding protein*), występującej w formie wolnej lub związanej z błoną łącznikiem glikozylofasfatydyloinozytolowym cząsteczki CD14 oraz stale zasocjowanego z receptorem białka MD2.

Receptor TLR2 oddziałuje z białkiem CD14, a także wykazano interakcję heterodimeru TLR2/6 z cząsteczką CD36 [12,13].

Receptor	Ligand	Lokalizacja subkomórkowa
heterodimer TLR1/2	triacylowane lipopeptydy bakteryjne Pam3CSK4 (syntetyczny analog)	błona komórkowa
heterodimer TLR2/6	bakteryjne lipoproteiny i diacylowane lipopetydy kwas lipoteichojowy (bakterie gramdodatnie) peptydoglikan glikolipidy glikoinozytolofosfolipidy zymosan Pam2CSK4 (syntetyczny analog)	błona komórkowa
TLR3	dwuniciowe RNA, dsRNA (wirusy) Poli(I:C) (syntetyczny analog)	endosomy
TLR4	lipopolisacharyd (bakterie gramujemne)	błona komórkowa
TLR5	flagellina (bakterie gramujemne)	błona komórkowa
TLR7	jednoniciowe RNA, ssRNA (wirusy)	endosomy
TLR8	jednoniciowe RNA, ssRNA (wirusy)	endosomy
TLR9	niemetylowane sekwencje CpG DNA (bakterie, wirusy)	endosomy

Tabela 1: Ligandy i lokalizacja komórkowa najlepiej poznanych receptorów TLR.

4. Drogi sygnałowe receptorów TLR

Receptory TLR po związaniu ligandu uruchamiają wewnątrzkomórkową kaskadę przekazu sygnału, doprowadzając ostatecznie do ekspresji genów. Pobudzenie każdego z receptorów Toll-podobnych prowadzi do aktywacji czynnika NF- κ B, jednakże ostateczny profil ekspresji genów i odpowiedź komórki zależą od rodzaju

pobudzanego receptora [14]. Zjawisko to wynika z wykorzystania w drodze przekazu sygnału różnego repertuaru cząsteczek adaptorowych zawierających domenę TIR (MyD88, TRIF, TIRAP, TRAM oraz SARM). Najczęściej wyróżnia się dwie główne drogi sygnałowe: ścieżkę przekazu sygnału zależną i niezależną od cząsteczki MyD88 [1,6,8,12].

4.1 Droga sygnałowa zależna od cząsteczki MyD88

Ścieżkę przekazu sygnału zależną od białka adaptorowego MyD88 wykorzystują wszystkie receptory TLR z wyjątkiem TLR3. Prowadzi ona do szybkiej aktywacji czynnika jądrowego NF- κ B, uruchomienia kaskady kinaz MAP (ERK1/2, p38, JNK) i, w konsekwencji, aktywacji czynnika transkrypcyjnego AP-1 oraz pobudzenia niektórych białek z rodziny IRF (IRF7). Po aktywacji receptora cząsteczka MyD88 bezpośrednio lub za pośrednictwem dodatkowych białek oddziałuje z domeną TIR receptorów TLR, a następnie rekrutuje kinazy z rodziny IRAK i białko TRAF6 (ligazę E3 ubikwityny). Pojawienie się łańcuchów ubikwityny na TRAF6 umożliwia przyłączenie kinazy TAK1. TAK1 fosforyluje kompleks IKK doprowadzając do degradacji inhibitora czynnika NF- κ B (I κ B) i migracji aktywnego czynnika NF- κ B do jądra, gdzie wpływa on na transkrypcję genów prozapalnych. Jednocześnie TAK1 jako tzw. kinaza MAPKKK inicjuje kaskadę kinaz MAP [1, 4, 6, 8-12].

4.2 Droga sygnałowa niezależna od cząsteczki MyD88

Kaskada przekazu sygnału biegnąca niezależnie od białka MyD88 jest wykorzystywana jedynie przez dwa spośród receptorów TLR – receptor TLR3 (jako jedyny szlak sygnałowy) oraz TLR4. Do rodziny cząsteczek adaptorowych zawierających domenę TIR i biorących udział w sygnalizacji niezależnej od MyD88 zalicza się TRIF oraz TRAM. Cechami wyróżniającymi tę drogę sygnałową jest wpływ na aktywację czynnika transkrypcyjnego IRF3, ekspresję interferonów I typu, indukcję genów zależnych od interferonów oraz wspomnianą późną aktywację czynnika NF- κ B i kinaz MAP [1, 4, 6, 8-12].

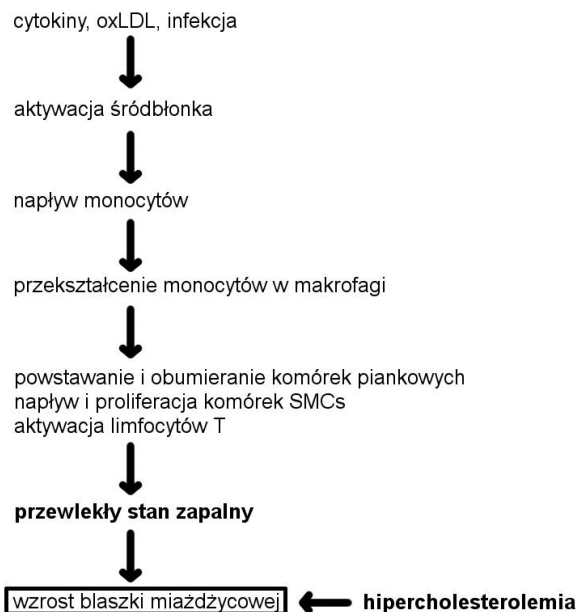
Miażdżyca

Miażdżyca tętnic (ang. *atherosclerosis*) jest przewlekłą chorobą o charakterze zapalnym, charakteryzującą się ogniskowym powstawaniem tzw. blaszek miażdżycowych w błonie wewnętrznej (łac. *tunica intima*) średnich i dużych tętnic. Blaszkami miażdżycowymi są charakterystycznymi miejscami akumulacji cholesterolu, jego estrów i innych lipidów, martwych komórek, włókien oraz soli wapnia. Proces miażdżycowy prowadzi do stopniowego zwężenia światła tętnic i zmniejszenia ich elastyczności, ograniczenia przepływu krwi i w rezultacie niedokrwienia narządów przez nie zaopatrywanych. Najgroźniejszą konsekwencją istnienia zmian chorobowych w naczyniach jest możliwość gwałtownego przerwania płytek miażdżycowych, w trakcie którego dochodzi do uwolnienia ich prozakrzepowej zawartości do krążenia. Skutkuje to uruchomieniem kaskady krzepnięcia w świetle naczynia, co może powodować w najgorszym przypadku jego całkowity zator. Miażdżyca tętnic w zależności od lokalizacji skutkuje takimi powikłaniami jak: nadciśnienie, niewydolność i zawał serca, niedotlenienie lub udar mózgu. Zmiany w tętnicach kończyn objawiają się bólami i mogą prowadzić do zaistnienia konieczności amputacji [15, 16].

Tworzenie blaszek miażdżycowych jest złożonym, dynamicznym procesem, w który zaangażowane są komórki ściany naczyń oraz układu immunologicznego (odpowiedzi wrodzonej i nabytej), a także niemorfotyczne składniki krwi. W dużym uproszczeniu immunologiczne podłoże formowania się blaszki miażdżycowej przebiega w następujących etapach [15, 16]:

6. Udział receptorów TLR w patogenezie miażdżycy

Etiologia miażdżycy jest złożona i nie w pełni poznana. Do klasycznych i niezbędnych do inicjacji choroby czynników ryzyka zalicza się podwyższony poziom cholesterolu oraz frakcji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) we krwi. Jednocześnie znaczącą rolę zaczęto przypisywać również immunologicznemu podłożu choroby – przewlekłemu stanowi zapalnemu, przyczyniającemu się do ciągłej ewolucji blaszek miażdżycowych [17]. W rezultacie receptory TLR jako narzędzia wrodzonego układu odporności i potencjalne inicjatory stany zapalne szybko znalazły się na liście podejrzanych [3, 7, 9].



Rysunek 1: Immunologiczne podłoże miażdżycy.

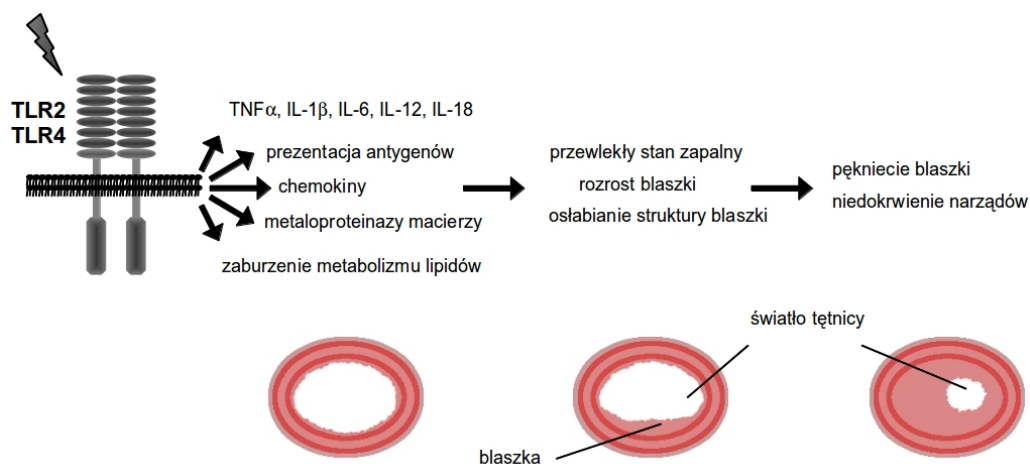
Do inicjacji zmian patologicznych dochodzi na skutek dysfunkcji śródbłónka. Aktywowany śródbłonek cechuje się wzmożoną ekspresją cząstek adhezyjnych i chemoatraktantów, dzięki czemu powstają warunki sprzyjające rekrutacji monocytów i limfocytów T do ściany tętnicy. Niezbędnym czynnikiem w rozwoju miażdżycy jest także zaburzona gospodarka cholesterolowa. W fazie inicjacji oraz rozwoju blaszki miażdżycowej dochodzi do deponowania i utleniania cząsteczek lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) w błonie wewnętrznej tętnicy w wyniku czego powstają oxLDL. Monocyty przekształcają się w makrofagi i pochłaniają oxLDL przy wykorzystaniu receptorów zmiataaczy. Wypełnione lipidami makrofagi są określane jako komórki piankowe (ang. *foam cells*). Część z nich w wyniku przeładowania lipidami i toczących się cały czas procesów zapalnych obumiera, tworząc nekrotyczny rdzeń blaszki miażdżycowej. Dalszy wzrost złoгу zależy od nasilenia migracji komórek mięśni gładkich (SMCs), liczby ich podziałów oraz ilości wydzielanych przez nie składników matryks zewnątrzkomórkowej. W obszarze blaszki występują w niewielkich liczbach również inne typy komórek - komórki dendrytyczne, tuczne, limfocyty B i T oraz limfocyty NKT (ang. *natural killer cells*).

Rzeczywiście, wyniki badań ostatnich lat wskazują na udział receptorów TLR, a w szczególności TLR2 i TLR4, w inicjacji i progresji miażdżycy. W obszarze ludzkiej blaszki miażdżycowej wykazano wzmożoną ekspresję receptorów TLR1, TLR2, TLR4 i TLR6 [18]. Receptory te są obecne w zwiększonej ilości na śródbłónku, makrofagach oraz fibroblastach – czyli głównych typach komórek zaangażowanych w rozwój choroby. Wzmożoną ekspresję TLR2 i TLR4 wykazano

również na krążących we krwi monocytach pacjentów cierpiących na miażdżycę [10,19-21]. W powikłaniach choroby nie jest wykluczony udział mieloidalnych i plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych, różniących się repertuarem receptorów TLR i występujących w regionach wzrostu i niestabilności blaszki [22]. Sygnalizację przez receptory TLR podejrzewa się o udział w wielu etapach powstawania złogów miażdżycowych w tętnicach, w tym o wpływ na produkcję działających lokalnie i systemowo cytokin prozapalnych ($\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6) oraz chemokin (MCP-1), tworzenie się komórek piankowych, a także aktywację odpowiedzi swoistej. Ponadto pobudzenie receptorów na komórkach makrofagów skutkuje zwiększoną produkcją metaloproteinaz trawiących macierz zewnątrzkomórkową, co przyczynia się do osłabienia struktury i stopniowej destabilizacji blaszki [7, 10, 15, 23-25]. Interesujących danych potwierdzających promiażdżycowy wpływ aktywacji receptorów TLR dostarczają badania na dwóch zwierzęcych modelach miażdżycy. Są to myszy z nokautem genu kodującego apolipoproteinę E ($\text{ApoE}^{-/-}$) – zapadające spontanicznie na hipercholesterolemię i miażdżycę – lub zwierzęta pozbawione receptora lipoprotein o niskiej gęstości ($\text{Ldlr}^{-/-}$), w których blaszki miażdżycowe pojawiają się w wyniku podawania karmy bogatej w cholesterol [7]. Również w przypadku tych modeli zaobserwowano wzmożoną ekspresję receptorów TLR2 ($\text{Ldlr}^{-/-}$) i TLR4 ($\text{ApoE}^{-/-}$) w obszarze tworzących się zmian miażdżycowych [7, 26, 27]. Myszy $\text{ApoE}^{-/-}$ pozbawione dodatkowo genu kodującego wspólną dla receptorów TLR (z wyjątkiem TLR3) cząsteczkę adaptorową MyD88, rozwijają znacznie łżejszą postać choroby w porównaniu do zwierząt z nokautem genu samej apolipoproteiny E (zmniejszoną powierzchnię blaszek miażdżycowych, mniejszą akumulację lipidów, ograniczenie liczby makrofagów oraz obniżoną ekspresję genów prozapalnych) [28].

6.1 TLR4

Pierwszym podejrzanym z grupy receptorów TLR był receptor TLR4 – długo poszukiwany receptor endotoksyny. LPS pobudza prozapalne funkcje monocytów i makrofagów, jak również aktywuje komórki ścian naczyń – śródbłonek i komórki mięśni gładkich. LPS może wywierać działanie promiażdżycowe poprzez bezpośredni lub pośredni wpływ na indukcję ekspresji cytokin prozapalnych ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IFN γ ?), chemokin (IL-8, MCP-1) oraz cząsteczek adhezyjnych, które



Rysunek 2: Udział receptorów TLR2 i TLR4 w procesie miażdżycowym.

stwarzają środowisko sprzyjające napływowi leukocytów do ścian tętnic [29]. Regularne podawanie myszom ApoE^{-/-} niskich dawek endotoksyny bakteryjnej znacznie przyspiesza powstanie zmian chorobowych. Ponadto w badaniach epidemiologicznych wykazano, że podniesiony poziom endotoksyny we krwi u osób zdrowych (powyżej 50 pg/ml) zwiększa ryzyko rozwoju miażdżycy [29, 30].

Należy jednak podkreślić, że udział TLR4 w inicjacji i progresji zmian miażdżycowych, choć ważny, nie jest czynnikiem dominującym. Zaobserwowano bowiem, że zupełny brak TLR4 u myszy ApoE^{-/-} skutkowało zmniejszeniem powierzchni tętniczych objętych chorobą o 24%, podczas gdy wspomniana nieobecność funkcjonalnej cząsteczki MyD88 aż o 57%. W tym miejscu trzeba zaznaczyć, że cząsteczka MyD88 jest zaangażowana także w sygnalizację innych receptorów TLR oraz receptorów IL-1 i IL-18 [5, 31].

Nadal trwają badania mające na celu identyfikację promiażdżycowych ligandów TLR4. Wykazanie, że LPS jest induktorem odpowiedzi zapalnej w miażdżycy napotyka na trudności. Głównymi przeszkodami wymienianymi przez niektórych naukowców jest prowadzenie badań na zwierzętach karmionych dietą wysokotłuszczową (obecne we krwi lipoproteiny mogą wiązać się z LPS uniemożliwiając jego interakcję z receptorem) oraz różnice pod względem wrażliwości na LPS – bardzo wysokiej u człowieka, a niskiej u myszy [32].

Ciekawą obserwacją jest to, że nie odnotowano promiażdżycowego wpływu

uważanej za niezbędną do rozpoznania LPS cząsteczki CD14, mimo że jest ona istotnym koreceptorem zarówno TLR4, jak i TLR2. Nokaut genu *Cd14* nie miał wpływu na rozwój aterosklerozy u myszy *ApoE*^{-/-}, podczas gdy przy braku funkcjonalnego TLR4 przebieg procesów chorobowych u zwierząt był znacznie łagodniejszy [33]. Na podstawie powyższych badań można wnioskować więc o istnieniu innego niż LPS ligandu TLR4, nie wymagającego CD14 do przekazu sygnału albo też niezależne od CD14 rozpoznanie LPS przez TLR4 [34].

6.2 TLR2

Obecnie coraz większa uwaga badaczy jest skupiona na receptorze TLR2, który może rozpoznawać bardzo szeroką grupę cząsteczek zarówno egzo- jak i endogennych. Zaobserwowano, że ekspresja tego receptora na komórkach nabłonkowych maleje pod wpływem dużych ciśnień i laminarnego przepływu krwi natomiast jest znaczna w obszarach rozgałęzień lub krzywizny tętnic - miejscach nielaminarnego przepływu (bifurkacji) krwi. Ponieważ są to miejsca szczególnie narażone na rozwój zmian miażdżycowych, korelacja ze wzmożoną ekspresją TLR2 prawdopodobnie nie jest przypadkowa [27].

Hipotezę tą potwierdzają również badania z wykorzystaniem mysich modeli aterosklerozy. Podawanie myszom *Ldlr*^{-/-} syntetycznego ligandu receptora TLR1/2 (Pam3CSK4) lub infekcja zwierząt *ApoE*^{-/+} przez *Porphyromonas gingivalis* znacznie przyspieszała rozwój blaszek miażdżycowych. Dodatkowo blaszki te wykazywały cechy niestabilności, co jak wspomniano wcześniej, stanowi największe zagrożenie drożności naczynia [35, 36]. Zauważono również – przy braku egzogenego ligandu – że naczynia zwierząt *Ldlr*^{-/-}, *Tlr2*^{-/-} są w mniejszym stopniu podatne na poważne zmiany miażdżycowe w porównaniu z kontrolą (*Ldlr*^{-/-}) [37]. Może świadczyć to o udziale jeszcze nie ustalonego endogennego agonisty TLR2 w rozwoju choroby. Podobny rezultat otrzymano również na zwierzętach *ApoE*^{-/-}, *Tlr2*^{-/-} [38].

W trakcie badań poświęconych wpływowi receptora TLR2 na rozwój miażdżycy zaobserwowano kolejną interesującą zależność. Przeszczep pochodzących ze szpiku i pozbawionych receptora TLR2 komórek zwierzęciu *Ldlr*^{-/-} nie przyczynił się do zahamowania zmian miażdżycowych w naczyniach. Z tego względu przypuszcza się, że to posiadające TLR2 i nie wywodzące się ze szpiku komórki

np. mięśni gładkich i śródbłónka są w dużej mierze odpowiedzialne za rozwój choroby przy braku infekcji. Z drugiej strony kiedy myszom o genotypie $Ldlr^{-/-}$ po analogicznym przeszczepie szpiku podano Pam3CSK4 (model infekcji) zmiany chorobowe były znacznie zredukowane. Istnieje więc prawdopodobieństwo, że komórki pochodzenia szpikowego (a więc związane z układem immunologicznym) wykazujące ekspresję TLR2 są odpowiedzialne za promiażdżycowe efekty egzogen-nych, ale nie endogennych ligandów TLR2 [37]. Jest to argument potwierdzający, że częste i przewlekłe infekcje bakteryjne mogą przyczynić się do rozwoju zmian w naczyniach.

6.3 „Aterogenne” ligandy receptorów TLR

Wskazanie, które z ligandów receptorów TLR mogą być odpowiedzialne za toczące się procesy zapalne w ścianach tętnic jest bardzo trudne ze względu na dynamiczny i długotrwały charakter zjawiska. Wśród podejrzanych wymieniane są, jak już wspomniano, cząsteczki pochodzenia egzo- i endogennego, jednakże do tej pory nie znaleziono jednoznacznego i dominującego sprawcy pobudzenia receptorów TLR.

Jako czynnik sprzyjający powstaniu i zaostrzeniu zmian wymienia się zakażenia wirusowe i bakteryjne (egzogenne źródło ligandów), tym bardziej, że ostre infekcje sprzyjają powikłaniom arterosklerozy – wylewom i zawałom. Według badań epidemiologicznych największe potencjalne zagrożenie wiąże się z infekcją bakteriami *Chlamydia pneumonia*, *Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis* i wirusami: cytomegalii, grypy (typ A), Epsteina-Barr, HIV, Herpes simplex – HSV1 i HSV2 oraz wirusowego zapalenia wątroby typu A i B [7, 23]. Obecność niektórych z tych patogenów wykazano w obszarze blaszki (np. *C. pneumonia*) [39, 40]. U myszy $ApoE^{-/-}$ zakażenie tą bakterią powoduje zależne od receptorów TLR2 i TLR4 zaostrzenie zmian miażdżycowych [41]. Należy jednak od razu podkreślić, że nie są to z pewnością dominujące czynniki ryzyka, ze względu na ograniczone występowanie u pacjentów. Wydaje się, że w kontekście miażdżycy istotne znaczenie może mieć całościowe narażenie organizmu na infekcje i aktywację receptorów TLR (ang. *total infectious burden*) [42]. Patogeny wywołujące w organizmie stan zapalny i pewnego rodzaju „dysfunkcję” układu odporności stanowią potencjalne zagrożenie inicjacją choroby np. poprzez wpływ na aktywację

środbłonka.

Drugie źródło pobudzenia receptorów TLR mogą stanowić ligandy pochodzenia endogennego, których szczególnie dużo gromadzi się w miejscach niszczenia macierzy zewnątrzkomórkowej, zapalenia czy stresu komórkowego. Ligandy te określa się nazwą DAMP (ang. *damage-associated molecular patterns*). Ich funkcją jest ostrzeganie układu immunologicznego o uszkodzeniu tkanek i śmierci nekrotycznej komórek [43]. W obrębie blaszki miażdżycowej, zawierającej rosnący z czasem rdzeń nekrotyczny, występuje wiele tego typu struktur. Wśród potencjalnie proaterogennych ligandów wymienia się białka HSP60 i HSP70, HMGB1, ekstra domenę A fibronektyny, hialuronian, rozpuszczalny siarczan heparanu i inne [7].

Za czynniki endogenne, które mogą interferować z aktywacją receptorów TLR podejrzewa się także związki lipidowe, bezpośrednio zaangażowane w inicjację choroby i indukujące wiele promiażdżycowych procesów w makrofagach, komórkach śródbłonki oraz mięśni gładkich. Wśród nich wymienia się lipoproteiny mmLDL (ang. *minimally modified low density lipoprotein*), oxLDL (ang. *oxidized LDL*), a także oksydowane fosfolipidy (oxPLs) [7, 10, 23-25]. mmLDL wywołują w makrofagach odpowiedź prozapalną zależną od receptorów CD14/ TLR4/ MD-2, w tym także produkcję ROS [44-46]. Natomiast w przypadku oxLDL i oxPLs odkryto, że przynajmniej w warunkach *in vitro* hamują (!) one pobudzenie receptorów TLR2 i TLR4 poprzez wiązanie cząsteczek towarzyszących – LBP, CD14 i MD-2 [47, 48]. Niedawno wykazano jednak, że oxLDL mogą działać również prozapalnie poprzez interesujący kompleks receptora CD36 oraz TLR4 i TLR6 [49].

6.4 Receptory TLR a metabolizm lipidów

Makrofagi w obszarze intymy pochłaniając dzięki posiadanym receptorom zmiataczom gromadzące się tam cząsteczki oxLDL i akumulując cholesterol w cytoplazmie przekształcają się stopniowo w komórki piankowe. Jest to jeden z najważniejszych etapów tworzenia pasm lipidowo-tłuszczowych, a później dojrzałej blaszki miażdżycowej. Za zaburzenie gospodarki lipidowej odpowiada wiele mechanizmów m.in. stymulacja receptorów TLR. Pobudzenie TLR3, TLR4 i TLR9 doprowadza do nasilonej ekspresji receptorów zmiataczy: SRA, MARCO i LOX-1 [10]. Ponadto aktywacja receptorów TLR3 i TLR4 wpływa hamująco na ekspresję transportera

ABCA1, umożliwiającego usuwanie z komórki nadmiaru cholesterolu. Przyczyną tego zjawiska jest hamowanie aktywności transkrypcyjnej czynnika LXR przez IRF3, aktywowany przez oba te receptory [50]. Z kolei stymulacja TLR2 i TLR4 (u myszy) nasila produkcję obecnego zwykle w bardzo niewielkiej ilości białka FABP4 (ang. *fatty-acid binding protein 4*) biorącego udział w transporcie kwasów tłuszczowych i lipidów [51, 52].

7. Na zakończenie

Promiażdżycowe działanie receptorów TLR wraz z upływem czasu staje się coraz lepiej udowodnione, a mechanizmy, w których biorą one udział, ulegają coraz większej komplikacji. Trzeba pamiętać, że w przebieg drogi sygnałowej receptorów TLR mogą interferować inne kaskady przekazu sygnału. Ponadto receptory te najprawdopodobniej wchodzi w interakcje z innymi cząsteczkami np. CD36, dektyną-1 czy LOX-1. Sprawą dyskusyjną pozostaje wpływ polimorfizmów genetycznych *TLR2* i *TLR4* na rozwój choroby, gdyż badania kohortowe przeprowadzone dotychczas nie przyniosły rozstrzygających wyników (być może z powodu zbyt małej ilości przebadanych pacjentów) [7,10]. Pozostaje także pytanie – czy pozyskaną wiedzę będzie można wykorzystać w celach terapeutycznych? Ewentualne strategie mające na celu hamowanie TLR2, TLR4 lub ich dróg sygnałowych muszą uwzględnić optymalny czas terapii (stadium choroby, która czasami rozpoczyna się już w wieku młodzieńczym), potencjalne osłabienie reakcji odpornościowych organizmu czy też inne konsekwencje metaboliczne. Modele zwierzęce, bardzo użyteczne w badaniach, niestety, nie w pełni odzwierciedlają rzeczywisty przebieg procesu miażdżycowego u człowieka [10]. Jednocześnie z laboratoriów naukowych stale płyną nowe doniesienia, które weryfikują nasze hipotezy. Przykładowo niedawno wykazano, że u człowieka receptor TLR2 ma zdecydowanie większy wpływ na produkcję mediatorów prozapalnych przez komórki wyizolowane z blaszki niż TLR4 [53]. Wydaje się więc, że na skuteczny lek przeciwmiażdżycowy trzeba będzie jeszcze poczekać.

Literatura

1. Takeda K et al. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005, 1(17):1-14.
2. Lang T et al. The negative regulation of Toll-like receptor and associated pathways. *Immunol Cell Biol* 2007, 8:425-434.
3. Cook D et al. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 2004, 5(10):975-979.
4. Akira S et al. Toll-like receptors. *Ann Rev Immunol* 2003, 21:335 - 76.
5. Hansson GK et al. Toll to be paid at the gateway to the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 25:1085-1087.
6. Akira S et al. Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 2004, 44: 499-511.
7. Laberge M et al. Atherosclerosis and innate immune signaling. *Ann Med* 2005, 37(2):130-40.
8. Takeda K et al. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003, 23:335-376.
9. Erridge C Toll-like receptors and atherosclerosis. Key contributors in disease and health? *Immunol Res* 2006, 34(3):193-209.
10. Cole J et al. The expression and functions of Toll-like receptors in atherosclerosis. *Mediat Inflamm* 2010, article ID 393946.
11. Iwasaki A et al. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004, 5:987-994.
12. Watters AM et al. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol Cell Biol* 2007, 85, 411-419.
13. Hoebe K et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 2005, 433(7025):523-527.
14. O'Neill, L. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol* 2005,18:3-9.
15. Hansson GK et al. The immune response in atherosclerosis: a double edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006, 6:508-519.
16. Hansson, GK et al. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunol Rev* 2007, 219: 187-203.
17. Steinberg D Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nature Med* 2005, 8:1211-1217.
18. Edfeldt K et al. Expression of Toll-like receptors in human atherosclerotic lesions. A possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002, 105:1158-1161.
19. Geng H et al. Increased expression of Toll like receptor 4 on peripheral-blood mononuclear cells in patients with coronary arteriosclerosis disease *Clin Exp Immunol* 2006, 143(2):269-273.
20. Methe H et al. Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. *Circulation* 2005, 111(20):2654-2661.
21. Kuwahata S et al. High expression level of Toll-like receptor 2 on monocytes is an important risk factor for arteriosclerotic disease. *Atherosclerosis* 2010, 209(1): 248-254.
22. Erbel C et al. Functional profile of activated dendritic cells in unstable atherosclerotic plaque. *Basic Res Cardiol* 2007, 102(2):123-132.

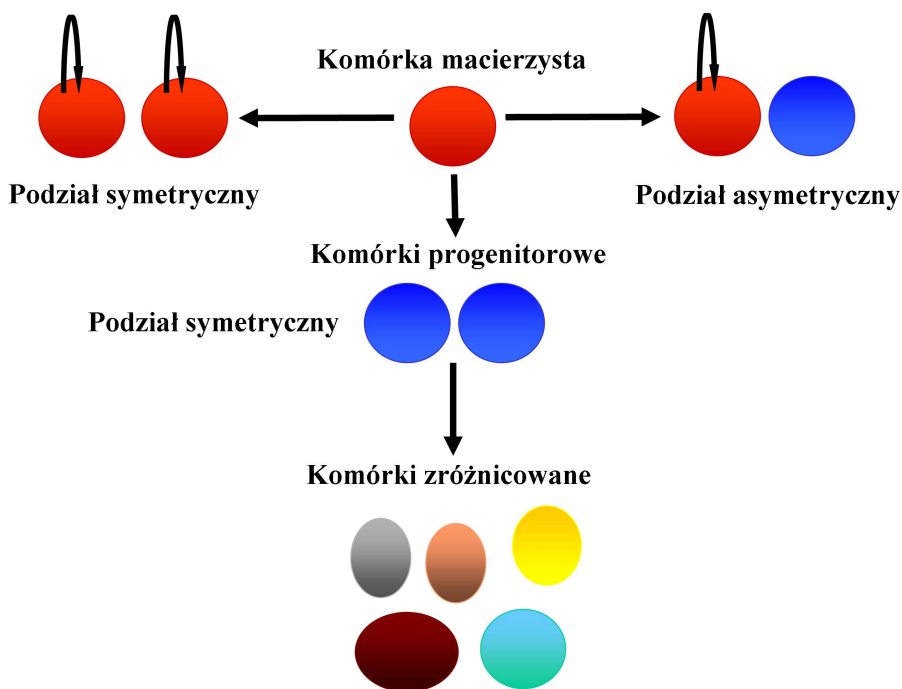
23. Michelsen KS Toll-like receptor signaling and atherosclerosis. *Curr Opin Hematol* 2006, 13:163-168.
24. Tobias P Paying the price for pathogen protection: toll receptors in atherogenesis. *J Lip Res* 2005,14:404-411.
25. Hansson GK Toll to be paid at the vessel wall. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25:1085-1087.
26. Xu X et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* 2001, 104: 3103-3108.
27. Mullick A et al. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *J Exp Med* 2008, 205: 373-383.
28. Michelson KS et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101: 10679-84.
29. Wiedermann CJ et al. Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck study. *J Am Coll Cardiol* 1999, 34:1975-1981.
30. Stoll L et al. Potential role of endotoxins as a proinflammatory mediator of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24(12):2227-2236.
31. Michelsen K et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:10679-10684.
32. Doherty TM et al. Lipopolysaccharide, Toll-like receptors, and the immune contribution to atherosclerosis *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 25:e38-e39.
33. Bjorkbacka H et al. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 2004, 10:416-421.
34. Doherty T Lipopolysaccharide, Toll-like receptors, and the immune contribution to atherosclerosis *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 25:e38-e39.
35. Madan M et al. Toll-like receptor 2 mediates diet and/or pathogen associated atherosclerosis: proteomic findings. *PLoS ONE* 2008, 3(9):e3204.
36. Schoneveld A et al. Toll-like receptor 2 stimulation induces intimal hyperplasia atherosclerotic lesion development. *Cardiovasc Res* 2005, 66:162.
37. Mullick AE et al. Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. *J Clin Invest* 2005, 115:3149-3156.
38. Liu X et al. Toll-like receptor 2 plays a critical role in the progression of atherosclerosis that is independent of dietary lipids. *Atherosclerosis* 2007, 196:146-154.
39. Kuo C et al. Detection of Chlamydia pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb* 1993, 13:1501-1504.
40. Hendrix M et al. High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *Am J Pathol* 1990, 136:23 - 28.
41. Naiki Y et al. TLR/MyD88 and liver X receptor alpha signaling pathways reciprocally control Chlamydia pneumoniae-induced acceleration of atherosclerosis. *J Immunol* 2008, 181:27176-7185.

42. Espinola - Klein C et al. Impact of infectious burden on extent and long-term prognosis of atherosclerosis. *Circulation* 2002 , 105(1):15-21.
43. Piccinini A et al. DAMPening inflammation by modulating TLR signaling. *Mediat Inflamm* 2010, Article ID 672395.
44. Miller Y et al. Toll-like receptor 4-dependent and - independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25:1213-1219.
45. Miller Y et al. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem* 2003, 278:1561-1568.
46. Bae Y Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circ Res* 2009, 104:210-218.
47. Erridge C et al. Oxidised phospholipids inhibition of Toll-like receptor signaling is restricted to TLR2 and TLR4:roles for CD14, LPS-binding protein, and MD-2 as targets for specificity of inhibition. *J Biol Chem* 2008, 283 (36): 24748-59.
48. Von Schlieffen E et al. Multi-hit inhibition of circulating and cell-associated components of the Toll-like receptor 4 pathway by oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, 29:356-362.
49. Stewart C et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* 2010, 11(2):155-61.
50. Castrillo A et al. Crosstalk between LXR and Toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell* 2003, 12:805-816.
51. Kazemi M et al. Adipocyte fatty acid-binding protein expression and lipid accumulation are increased during activation of murine macrophages by toll-like receptor agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25:1220-1224.
52. Makowski L et al. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 2001, 7:699 - 705.
53. Monaco C et al. Toll-like receptor-2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis. *Circulation* 2009, 120(24):2462-2469.

ROLA BIAŁKA C-MYC W REPROGRAMOWANIU KOMÓREK SOMATYCZNYCH

Wstęp

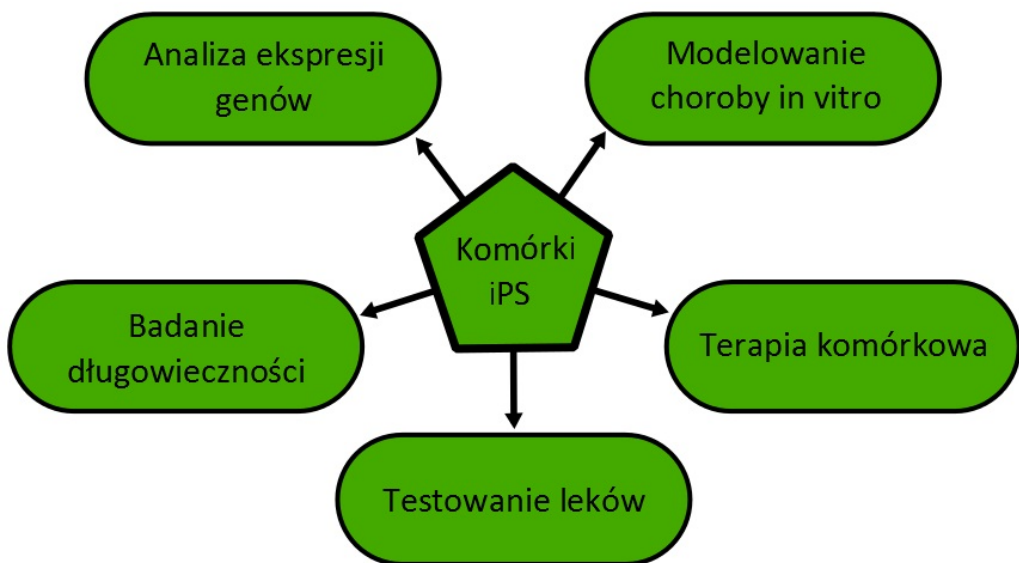
Komórki macierzyste (ang. *Stem Cells*) to komórki, których najważniejszymi cechami są zdolność do samoodnowy w trakcie podziałów oraz zdolność do różnicowania. Podział komórkowy może przebiegać zarówno symetrycznie, w wyniku czego powstają dwie identyczne komórki macierzyste lub dwie, bardziej zróżnicowane, tzw. komórki progenitorowe, jak i asymetrycznie – gdzie jedna z komórek potomnych jest komórką macierzystą, a druga – progenitorową. Z pierwszym przypadkiem można się spotkać np. w sytuacjach stresu komórkowego: najpierw następuje wzmożona produkcja progenitorów i ich różnicowanie, a następnie odnowienie puli komórek macierzystych. Podział asymetryczny zachodzi stale w warunkach fizjologicznych i jest odpowiedzialny za utrzymanie stanu równowagi organizmu – homeostazy. Ze względu na potencjał do różnicowania, komórki macierzyste można podzielić na cztery typy: totipotencjalne (zdolne do różnicowania we wszystkie typy komórek dorosłego organizmu oraz w tkanki pozazarodkowe), pluripotencjalne (zdolne do różnicowania w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych), multipotencjalne (różnicujące w komórki jednego listka zarodkowego) oraz unipotencjalne (komórki liniowo określone – mogące różnicować tylko w 1 rodzaj tkanki). Jeśli chodzi natomiast o pochodzenie – wyróżnia się komórki embrionalne (ang. *Embryonic Stem Cells* – ESC), które wywodzą się z zarodka oraz komórki somatyczne (ang. *Adult Stem Cells* – ASC), które zajmują charakterystyczne nisze w dorosłym organizmie [1]. Termin „indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste” (ang. *Induced Pluripotent Stem Cells* – komórki iPS lub iPSC) odnosi się do komórek, które wywodzą się z komórek somatycznych organizmu, lecz na skutek aktywacji kluczowych czynników transkrypcyjnych uzyskały stan pluripotencji. Procesy zachodzące wtedy wewnątrz komórek somatycznych określa się mianem reprogramowania. Oprócz produkcji białek regulujących ekspresję genów zaliczamy tu również zmiany epigenetyczne: acetylację histonów czy



Rysunek 1: Podział symetryczny i asymetryczny komórki macierzystej.

też demetylację promotorów genów, które w trakcie ontogenezy uległy wyciszeniu [2,3]. W trakcie reprogramowania dochodzi zarówno do usunięcia markerów komórki zróżnicowanej jak i do produkcji czynników odpowiedzialnych za utrzymanie pluripotencjalnego fenotypu komórek embrionalnych. Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste charakteryzują się zdolnością do różnicowania w komórki ektodermy, mezodermy jak i endodermy oraz praktycznie nieograniczoną proliferacją. Cechy te decydują o tym, że mogą one stanowić doskonałe źródło poznawcze dla badaczy zarówno jeśli chodzi o analizę mechanizmów różnicowania i modelowanie tkanek, czy testowanie innowacyjnych leków [4–6]. Otrzymywanie komórek iPS można podzielić na 3 etapy. Pierwszym i najważniejszym z nich jest wprowadzenie do komórek czynników transkrypcyjnych indukujących stan pluripotencji. Zwykle odbywa się to na drodze kotransdukcji komórek 4 wektorami wirusowymi, zawierającymi wybrane cDNA (najczęściej w tym celu stosuje się retro- lub lentiwirusy [3]). Następnym krokiem jest założenie nowej hodowli, czyli

pasaż wybranych komórek na warstwę odżywczą w pożywce, wzbogaconej o gatunkowo specyficzne związki potrzebne do podtrzymania stanu odróżnicowania. Proces rozwoju i różnicowania komórek *in vitro* jest sterowany przez odpowiednie czynniki stymulujące, znajdujące się w pożywce, tak więc na każdym etapie doświadczeń laboratoryjnych z komórkami iPS należy dostosowywać składniki pożywki do ich aktualnego stanu oraz celu eksperymentu. Jako, że samo uzyskanie morfologii komórek embrionalnych nie gwarantuje ich pluripotencjalnego fenotypu ostatnim etapem generacji indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych jest przeprowadzenie tzw. testów na pluripotencję. Złotym standardem jest test na tworzenie potworniaka (teratoma) – wszczepienie masy komórkowej do organizmu myszy z upośledzonym układem odporności i histologiczna analiza powstałego guza [3]. Inny test, który polega na transplantacji komórek do wnętrza blastocysty, pozbawionej wcześniej węzła zarodkowego, oraz obserwacji rozwoju zarodka nazywa się „uzupełnieniem blastocysty” (ang. *blastocyst complementation*), jednak ze względu np. na trudności techniczne jest on rzadziej stosowany.



Rysunek 2: Możliwe zastosowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych.

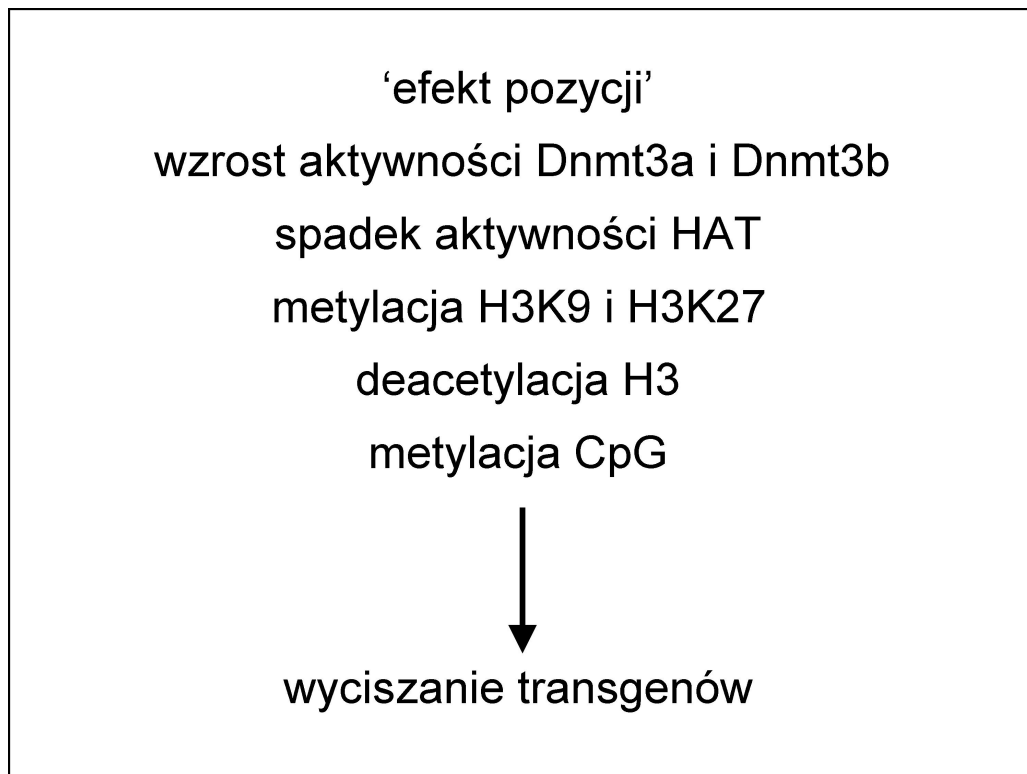
Geny pluripotencji

Pierwszym naukowcem, który przedstawił czynniki indukujące stan pluripotencji w komórkach zróżnicowanych był Shinya Yamanaka (2006r – mysie fibroblasty, 2007r – komórki ludzkie) [7–8]. Wykazano, iż zarówno mysie embrionalne fibroblasty (ang. *Mouse Embryonic Fibroblasts* – MEF) jak i fibroblasty dorosłych organizmów są w stanie być odróżnicowane do komórek iPS. Co ciekawe, nieznacznie później, niezależnie od badań z Uniwersytetu w Kyoto druga grupa naukowców pod przewodnictwem Jamesa Thomsona również opublikowała pracę na temat reprogramowania komórek ludzkich [9]. Od tego czasu wraz z dynamicznym rozwojem metod biologii molekularnej i lawinowym wzrostem publikacji naukowych coraz więcej grup badawczych interesuje się potencjalnym zastosowaniem indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej. Obecnie badania prowadzone są również na komórkach szczurzych i świńskich [10–11]. Mechanizm obrania konkretnej linii rozwojowej przez komórkę sterowany jest zarówno sygnałami zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowymi [3]. Przeprowadzenie komórek somatycznych w stan pluripotencji wymaga aktywacji specyficznych szlaków sygnałowych. Za proces reprogramowania odpowiedzialne są czynniki transkrypcyjne, które regulując ekspresję genów na bardzo wczesnym etapie mają możliwość aktywacji wielu kaskad reakcji, tworzących wspólną sieć regulacji. Spośród 24 genów, które badał profesor Yamanaka, ostatecznie wybrał 4, które uznał za kluczowe: Sox2, Oct3/4, Klf4 oraz c-Myc. Każdy z nich jest ważny dla podtrzymania pluripotencji zarodkowych komórek macierzystych [2]. Ze względu na bardzo skomplikowaną sieć interakcji i wzajemnej regulacji rola każdego z nich nie jest jednoznacznie określona. Z tego samego powodu skutków ekspresji każdego z nich w komórce nie można zdefiniować w wąskim zakresie. Wiadomo jednak, że równowaga Klf4 i c-Myc wpływa na tempo proliferacji, apoptozę, dekondensację chromatyny i regulację aktywności białek p53 i p21 [7], podczas gdy Oct3/4 i Sox2 regulują ekspresję genów zarówno aktywnie transkrybowanych w ESC (między innymi są to geny szlaków Wnt i TGF- β), jak i tych nieaktywnych [12]. Warto tutaj dodać, że Thomson uzyskał wspomniane wcześniej ludzkie komórki iPS wykorzystując do transdukcji odmienne geny: Sox2, Oct3/4, Nanog i lin28 oraz stosując wektory lentiwirusowe (w odróżnieniu od Yamanaki, który używał wektorów re-

trowirusowych) [9]. Zarówno przy wyborze pierwszego jak i drugiego typu wektorów transkrypcja wprowadzonych genów nie jest długotrwała [2, 3, 7, 8, 9, 13]. Z czasem geny te są wyciszane na drodze epigenetycznej, a ekspresji ulegają ich endogenne odpowiedniki, znajdujące się w konkretnych loci genomu gospodarza. Miejsce integracji wektora wirusowego w genomie odgrywa znaczącą rolę w specyficzności wyciszenia wprowadzonego genu. Jest to tzw. „efekt pozycji”, czyli wpływ organizacji strukturalnej sekwencji DNA na ekspresję transgenów. W przypadku wektorów retrowirusowych sugeruje się, że do kompletnego zahamowania ich ekspresji w trakcie reprogramowania zachodzi w momencie reorganizacji chromatyny prowadzącej do wyciszenia genów związanych z charakterystyką komórki zróżnicowanej. Modyfikacje chromatyny prowadzące do zaniku ekspresji genów to przede wszystkim: deacetylacja histonów (histon H3), metylacja histonów (H3K9 i H3K27) oraz metylacja DNA (cytozyna wysp CpG). ścisła kontrola aktywności metylotransferaz Dnmt3a i Dnmt3b reguluje kinetykę zmian epigenetycznych w trakcie różnicowania. Spadek aktywności acetylotransferazy histonów (HAT) przyczynia się do utrzymania niskiego poziomu ekspresji genów. W konsekwencji zmian struktury chromatyny, a poprzez to – transkryptomu, komórki somatyczne uzyskują fenotyp embrionalny, związany z aktywną transkrypcją m.in.: genów kodujących enzymy podstawowych szlaków metabolicznych, genów związanych z organizacją cytoszkieletu, genów kodujących białka potrzebne w procesach transkrypcji i translacji, czy też endogenne czynniki transkrypcyjne użyte w procesie reprogramowania. Co ciekawe, te ostatnie, mogą aktywować swoją własną ekspresję na zasadzie sprzężenia dodatniego. Oznacza to, iż przejście w stan pluripotencji wymaga jedynie silnego stymulującego sygnału. [2, 3, 7, 8, 9, 13].

Kompleks Myc–Max jako czynnik transkrypcyjny

Ludzki czynnik c–Myc, kodowany przez znajdujący się na chromosomie 8q24 gen c–myc, powstaje w wyniku translacji dwóch z trzech egzonów [14, 16]. Główne miejsce inicjacji translacji znajduje się na egzonie drugim, choć alternatywnie może dojść do powstania produktu dłuższego (p67 Myc) oraz krótszego (MycS). Natywne białko c–Myc podlega glikozylacji i fosforylacji, co może wpływać na jego okres półtrwania i funkcję. Jest ono jedynym z trzech białek wchodzących w skład rodziny Myc. Oprócz niego wyróżniamy także cząsteczki L–Myc i N–Myc.

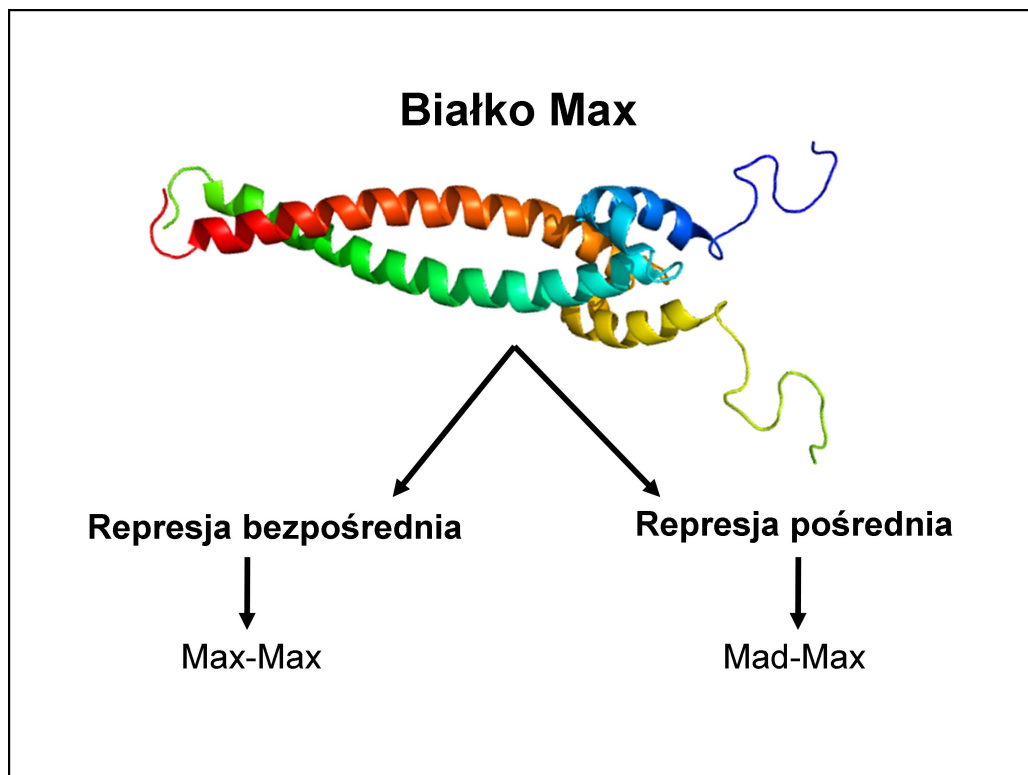


Rysunek 3: Główne czynniki wpływające na wyciszenie sekwencji wprowadzonych wektorami wirusowymi.

Wszystkie one mogą wchodzić w interakcje z czynnikiem transkrypcyjnym Max, tworząc funkcjonalny kompleks Myc–Max, który dzięki domenie Max wiążącej DNA oraz domenie trans–aktywującej Myc indukuje transkrypcję. Wysokie podobieństwo w sekwencji tych białek wskazuje na ich konserwatywny ewolucyjnie charakter [3, 14, 16]. W strukturze białka Max wyróżniamy dwa motywy wiążące kwas nukleinowy: helisa–zwrot–helisa oraz zamek leucynowy [15]. Warto wspomnieć, że ekspresja tego białka utrzymuje się na stałym poziomie w komórkach we wszystkich fazach cyklu komórkowego, aczkolwiek może być różna dla konkretnych typów komórek. Jest to kontrast dla białek Myc, których wzmożona produkcja towarzyszy podziałom komórkowym [15, 16]. Alternatywny splicing transkryptów max prowadzi do produkcji dwóch izoform białka: p21 Max oraz p22 Max [14]. Kompleks Myc–Max wiąże się z dużym powinowactwem do DNA rozpoznając sekwencję CA[C/T][A/G]TG (tzw. sekwencja wzmacniająca: E–box),

zwykle znajdującą się w pierwszym lub drugim intronie transkrybowanego genu, choć może się zdarzyć, iż leży ona wewnątrz egzonu, lub rejonu promotorowego [14]. Konkurencyjnie, białko Max może tworzyć homodimery, jak również heterodimery z białkami Mad1, Mad2, Mad3, Mad4 i Mnt1 (czynniki związane z różnicowaniem) [14, 15]. Kompleksy takie po związaniu rozpoznawanej sekwencji nukleotydowej są represorami transkrypcji. Represja może być bezpośrednia, poprzez wiązanie opisanej wyżej sekwencji bez aktywacji ekspresji genu (jak w przypadku dimeru Max—Max) lub pośrednia – z udziałem dodatkowych kompleksów represyjnych i mechanizmów interakcji (dimery Mad—Max). Z drugiej strony – białka Myc mogą wchodzić w interakcje z liczną grupą innych białek. Można tu zaliczyć: białko TRRAP, supresor nowotworów p107 (inhibitor trans-aktywatorowej domeny Myc), białka wiążące kasetę TATA (TPB), czynnik transkrypcyjny Yin Yang-1 (kompleks Myc-YY-1 jest słabszym aktywatorem transkrypcji) i wiele innych [14]. Niektóre cząsteczki wpływają bezpośrednio na konkretne domeny białek Myc, podczas gdy inne regulują funkcjonalność całego białka. Czynnik c-Myc może zarówno aktywować transkrypcję jak i być jej represorem, przy czym blokada ekspresji genu może odbywać się na drodze zależnej od białka Max (represorem jest kompleks Myc—Max) lub niezależnej. Przykładami sekwencji ulegających całkowitej supresji są promotory zależne od czynnika transkrypcyjnego CTF/NF-1 (opisano w [14]). W większości przypadków nie ustalono jeszcze, czy represja odbywa się na poziomie transkrypcyjnym czy post-transkrypcyjnym oraz nie zdefiniowano miejsc regulatorowych w sekwencji nukleotydowej, z którymi białko miałyby oddziaływać. Sam c-myc reguluje swoją własną ekspresję na drodze sprzężenia zwrotnego ujemnego (jak przedstawiono w [14]). Zrozumienie funkcji białka c-Myc w proliferującej komórce opiera się na identyfikacji i analizie genów, których regulacja podlega temu białku. Rozważając ich funkcjonalne produkty można stworzyć złożoną sieć wzajemnych oddziaływań, gdzie jednymi z ważniejszych elementów są: cad (biosynteza pirymidyn), p53 (czynnik transkrypcyjny), eIF-4E (eukariotyczny czynnik inicjacji translacji), Cykliny D (regulacja cyklu komórkowego w fazie G1 i ochrona przed uszkodzeniem genomu) oraz cdc25a (koduje fosfatazę kinaz cyklino-zależnych) [14, 16]. Obecnie postuluje się trzy możliwe mechanizmy represji transkrypcji przez c—Myc: wiązanie białka TFII-I, które bierze udział w formowaniu inicjatorowego kompleksu transkrypcji dla polimerazy

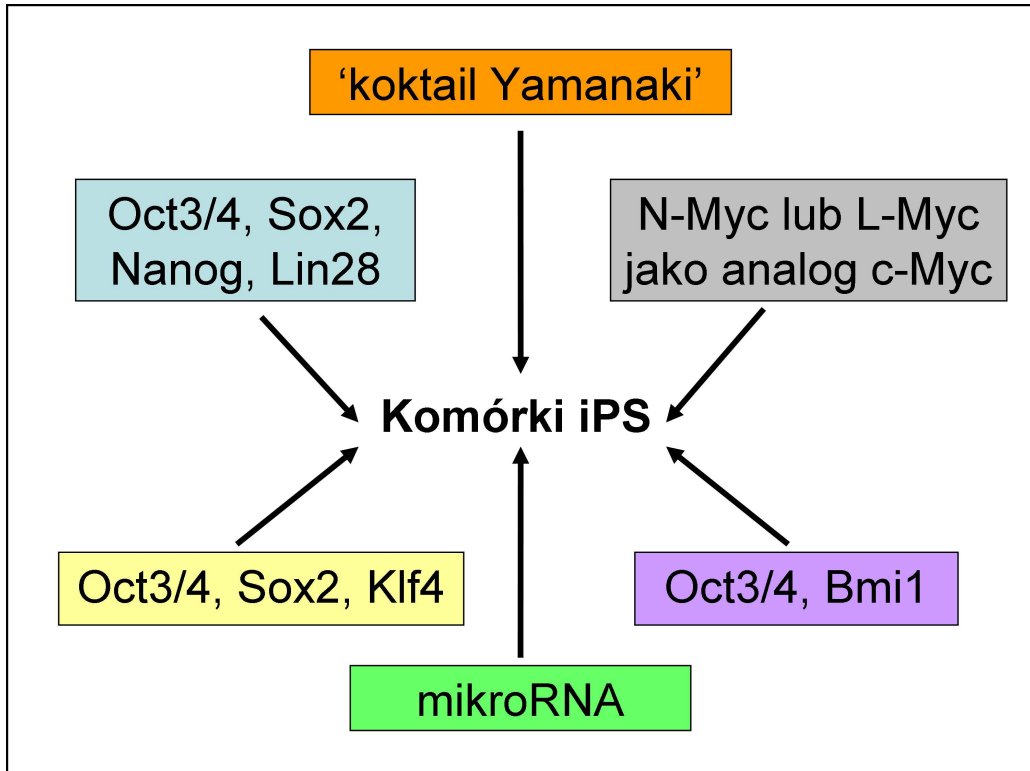
RNA II, oddziaływanie bezpośrednio z sekwencją promotorową lub z kompleksem inicjatorowym – ściślej – z TBP (omówiono w [14]).



Rysunek 4: Struktura przestrzenna białka Max i jego kompleksy biorące udział w represji transkrypcji.

c-Myc ma charakter protoonkogenny

W związku z plejotropowym charakterem c-Myc, białko to stwarza potencjalne niebezpieczeństwo dla komórki. Gen myc jest protoonkogenem – do aktywacji dochodzi najczęściej poprzez amplifikację fragmentu nici DNA (np. w rozwoju nerwiaka płodowego – neuroblastoma), lub też poprzez pęknięcia chromosomów i translokacji fragmentu na inny chromosom (przykładem może być chłoniak Burkitta), w wyniku czego ma miejsce zwiększona produkcja białka [15, 16]. Wiadomo, że nadekspresja c-myc związana jest z większością przypadków ludzkich raków sutka, raków wątrobowokomórkowych i raków jajnika. Innym z postulowanych mechanizmów zwiększonej produkcji białka c-Myc jest działanie zmutowanej



Rysunek 5: Wybrane sposoby generowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych.

formy β -kateniny, która nie będąc inaktywowana przez białko genu supresorowego APC stale indukuje ekspresję genu c-myc [16]. Może także dojść do usunięcia fragmentu regulatorowego 3'-UTR z mRNA c-myc, co powoduje zwiększenie czasu półtrwania transkryptu w komórce [16]. Zważając na złożoność sieci oddziaływań białka c-Myc i produktów regulowanych przez niego genów można stwierdzić, że zachwianie równowagi pomiędzy tymi czynnikami sygnałowymi prowadzi między innymi do zwiększonego tempa metabolizmu oraz niekontrolowanej proliferacji, będącej skutkiem zaburzeń w regulacji interakcji cyklin i kinaz cyklinozależnych (cyklina D1 i D2, cyklina E, CDK4, i cdc25A) [14, 16]. Dodatkowo, jeśli w takiej sytuacji dochodzi do aktywacji sygnałów antyapoptotycznych istnieje wysokie ryzyko transformacji nowotworowej. Co ciekawe, roli białka z rodziny Myc można też dopatrzeć się w tzw. efekcie Warburga, czyli wzmożonej glikolizie dzielących się komórek nowotworowych. Okazuje się, że istnieje wiele podobieństw pomiędzy

aktywacją szlaków glikolitycznych przez czynnik indukowany przez niedotlenienie – HIF-1 w stanie hipoksji, a wiązaniem c-Myc do specyficznych rejonów promotorowych. Czynnik ten jest w stanie aktywować wiele z enzymów potrzebnych do rozkładu glukozy, oraz jest kluczowy w nowotworowych procesach angiogenezy i waskulogenezy [17]. Ze względu na tak duże ryzyko utworzenia nowotworu grupy badawcze zajmujące się reprogramowaniem intensywnie szukają zamiennika c-Myc. Dobrymi kandydatami wydają się być inne białka z rodziny Myc. Działanie N-Myc jest bardzo zbliżone do rozważanego czynnika, podczas gdy aktywność L-Myc często z nim kontrastuje [18, 19]. Wydajność reprogramowania z użyciem drugiego z tych białek jest znacznie mniejsza, choć wydaje się, że jego domena N-końcowa – inna niż w przypadku c-Myc i N-Myc i w przeciwieństwie do nich – nie promuje transformacji nowotworowej [3]. Wielu naukowcom udaje się również zaindukować stan pluripotencji w komórkach bez użycia czynnika z rodziny Myc [3, 20–26]. Sam prof. Yamanaka stwierdził, iż mimo faktu, że c-Myc podnosi efektywność reprogramowania nie jest w tym procesie niezbędny. Chociaż transfekcja komórki somatycznej genem c-myc zwiększa prawdopodobieństwo reprogramowania do stadium pluripotencji, wiele grup badawczych pokazało, że używając jedynie Sox2, Oct3/4 i Klf4 można otrzymać indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (kosztem wydajności i tempa procesu). Profil ekspresji genów markerowych i aktywności enzymów pokrywał się z danymi otrzymanymi z analizy komórek iPS transdukowanych wcześniej „koktajlem Yamanaki”. Wykazano, że komórki takie, wywodzące się z fibroblastów, bardzo dobrze różnicują w kardiomiocyty. Innym rozwiązaniem, przedstawionym już przez Thomsona i współpracowników, jest użycie czynnika Lin28, który wydaje się stanowić funkcjonalny analog c-Myc w komórce [21]. Fakt, że jest to supresor mikroRNA z rodziny let-7 wskazuje, iż ułatwia on reprogramowanie komórek poprzez hamowanie różnicowania. Dodatkowo, czynnik ten promuje ekspresję Oct3/4. Z drugiej strony, wysoki poziom wspomnianych regulatorowych cząsteczek RNA chroni komórkę przed nowotworzeniem. Coraz bardziej znacząca wydaje się być również rola cząsteczek mikroRNA w generacji indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych. Najnowsze badania traktują także o reprogramowaniu komórek somatycznych z użyciem zarówno regulatorowych cząsteczek RNA, które podlegają kontroli c-Myc (miR-141, miR-200, miR-429) jak i tych, które odgrywają zna-

czącą rolę w proliferacji ESC i utrzymaniu ich macierzystego charakteru (miR-92b oraz czynniki z grupy miR-290) [27]. Możliwe jest także, że mikroRNA produkowane przez MEF uczestniczą w obróbce post-transkrypcyjnej białek regulujących reprogramowanie. Inhibicja takich czynników (zwłaszcza miR-21 i miR-29a) może podnosić efektywność tego procesu – jednym z białek wywierającym taki wpływ jest właśnie c-Myc [28]. Kolejną alternatywą wydaje się być zastosowanie Bmi1, białka odpowiedzialnego za remodelowanie struktury chromatyny podczas rozwoju embrionalnego, wraz z Oct3/4 – również prowadzące do reprogramowania komórek somatycznych. [3, 20–26].

Bezpieczeństwo przede wszystkim

Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste niosą wiele nadziei dla współczesnej medycyny. Główna idea polega na pobraniu fibroblastów pacjenta, a następnie reprogramowaniu i różnicowaniu materiału do określonego typu komórek – tego, którego bezpośrednio dotyczy indywidualne schorzenie. Nie da się ukryć, iż modelowanie *in vitro* uszkodzonych tkanek jest w obecnej chwili najbardziej obiecującym wykorzystaniem komórek iPS. Otrzymany materiał może służyć dogłębnej analizie patologicznych zmian, analizie ekspresji genów, lub też badaniu reakcji na czynniki stymulujące, co w konsekwencji może prowadzić do opracowania molekularnego mechanizmu danej choroby. Modelowanie tkanek można również wykorzystać do opracowywania nowych leków i terapii – wśród nich tych najbardziej innowacyjnych: terapii genowej i komórkowej. Zastosowanie samych indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w terapii komórkowej to dosyć odległa perspektywa. Głównym wymogiem stawianym komórkom, które pretendują do aplikacji klinicznej jest bowiem bezpieczeństwo. Reprogramowanie komórek somatycznych oraz kierunkowe różnicowanie wiąże się z ryzykiem pozostawienia niewielkiej subpopulacji komórek będących w stanie dać początek nowotworowi. Należy pamiętać, że bez względu na strategię różnicowania hodowla komórek iPS nie tworzy homogennej populacji. Opracowanie rygorystycznych testów kontrolujących stan komórek na każdym etapie eksperymentu jest warunkiem dopuszczenia komórek do zastosowania w medycynie. Niektóre z takich testów to: wspomniane tworzenie potworniaka, badanie markerów powierzchniowych przeciwciałami i analiza ekspresji genów. Ze względów bezpieczeństwa warte bliższej

uwagi są też kwestie pamięci epigenetycznej, analizy kariotypu oraz zachowania integralności genomu po transferze lentiwirusowym. Jednakże komórki iPS same w sobie również stanowią doskonały materiał do badań. Mechanizmy kontroli regulacji proliferacji komórek ciągle nie są do końca poznane, a przecież proces starzenia się znacząco wpływa na wydajność organizmu. Już teraz wiadomo, że problem ten nie dotyczy jedynie skracających się telomerów i aktywności telomerazy, lecz także systemów naprawczych DNA, aktywności enzymów oraz ochrony przez wolnymi rodnikami. Mając do dyspozycji indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste analiza tych procesów w różnych stadiach rozwojowych komórki staje się o wiele prostsza i bardziej obiecująca.

Literatura

1. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2009. 114, 185-199
2. Papp B, Plath K. Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell Research.* 2011. 21(3), 486-501
3. Okita K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Phil Trans R Soc.* 2011. 366, 2198-2207
4. Kang L, Gao S. Pluripotency of induced pluripotent stem cells. *J Anim Sci Biotechnol.* 2012. 3(1), 5
5. Dimos J.T, Rodolfa K.T, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science.* 2008. 321, 1218-1221
6. Yagi T, Kosakai A, et al. Establishment of Induced Pluripotent Stem Cells from Centenarians for Neurodegenerative Disease Research. *PLoS ONE.* 2012. 7(7), e41572
7. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006. 126(4), 663-676
8. Takahashi K, Yamanaka S, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007. 131(5), 861-872
9. Yu J, Vodyanik M.A, et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science.* 2007. 318(5858), 1917-1920
10. Hamanaka S, Yamaguchi T, et al. Generation of Germline-Competent Rat Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE.* 2011. 6(7), e22008
11. Montserrat N, Bahima E.G, Batlle L, et al. Generation of pig iPS cells: a model for cell therapy. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011. 4, 121-130
12. Boyer L.A, Lee T.I, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 2005. 122, 947-956
13. Hotta A, Ellis J. Retroviral vector silencing during iPS cells induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2008. 105, 940-948

14. Facchini L.M, Penn L.Z. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J.* 1998. 12, 633?651
15. Nema R. C-Myc (Oncogenic) Transcription Factor. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences.* 2011. 1, 343-345
16. Gardner L, Lee L, Dang C. The c-Myc Oncogenic Transcription Factor. In: Bertino J.R, editor. *Encyclopedia of Cancer.* San Diego, CA: Academic Press. 2002.
17. Baudino T.A, McKay C, et al. c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev.* 2002. 16, 2530?2543
18. Malynn B.A, de Alboran I.M, et al. N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes Dev.* 2000. 14(11), 1390-1399
19. Morgenbesser S.D, Schreiber-Agus N, Bidder M, Mahon K.A, Overbeek P.A, Horner J, De-Pinho R.A. Contrasting roles for c-Myc and L-Myc in the regulation of cellular growth and differentiation in vivo. *EMBO J.* 1995. 14, 743?756
20. Martinez-Fernandez A, Nelson T.J, Yamada S, Reyes S, Alekseev A.E, Perez-Terzic C, Ikeda Y, Terzic A. iPS Programmed without c-MYC yield proficient cardiogenesis for functional heart chimerism. *Circulation Research.* 2009. 105(7), 648?656
21. Martinez-Fernandez A, Nelson T.J, Ikeda Y, Terzic A. c-MYC independent nuclear reprogramming favors cardiogenic potential of induced pluripotent stem cells. *Journal of Cardiovascular Translational Research.* 2010. 3, 13?23
22. Zhao T, Xu Y. iPS cells generated without c-Myc have active Dlk1-Dio3 region and are capable of producing full-term mice through tetraploid complementation. *Cell Res.* 2011. 21(3), 550?553
23. Khodadadi K, Sumer H, Pashaiasl M, Lim S, Williamson M, Verma P.J. Induction of Pluripotency in Adult Equine Fibroblasts without c-MYC. *Stem Cells International.* 2012. Article ID 429160.
24. Moon J.H, Heo J.S, et al. Reprogramming fibroblasts into induced pluripotent stem cells with Bmi1. *Cell Res.* 2011. 21, 1305?1315
25. Varlakhanova N.V, Cotterman R.F, et al. myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Differentiation.* 2010. 80, 9?19.
26. Smith K.N, Singh A.M, Dalton S. Myc Represses Primitive Endoderm Differentiation in Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2010. 7(3), 343-354
27. Mallanna S.K, Rizzino A. Emerging Roles of microRNAs in the Control of Embryonic Stem Cells and the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Dev Biol.* 2010. 344, 16-25
28. Yang C.S, Li Z, Rana T.M. microRNAs modulate iPS cell generation. *RNA.* 2011. 17, 1451-1460