



Rola białek rodziny BCL-2 w kontroli apoptozy w pęcherzykach jajnikowych

Jolanta Opiela, Lucyna Kątska-Książkiewicz

Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki,
Balice k. Krakowa

Bcl-2 proteins in ovarian apoptosis

Summary

Members of the Bcl-2 family are considered principal players in the cascade of events that activate or inhibit apoptosis. Recent evidence strongly supports fundamental role of Bcl-2 and related proteins in regulating ovarian cell death. This article will provide an overview of the current knowledge regarding Bcl-2 proteins in programmed cell death in development of the ovary and the postnatal ovarian cycles.

Key words:

mammals, ovary, apoptosis, Bcl-2, Bax.

1. Wprowadzenie

Apoptozę określa się jako fizjologiczną śmierć komórki co oznacza, że jest ona genetycznie zaprogramowanym procesem, podczas którego komórka bierze aktywny udział we własnym unicestwieniu. Pierwszą wzmiankę na temat apoptozy datuje się na rok 1885, kiedy to Flemming zbadał zmiany morfologiczne w komórkach wzgórka jajonośnego w zdrowych i degenerujących pęcherzykach jajnikowych królika (1,2). Jajnik jest znakomitym materiałem do badania apoptozy, zarówno w okresie pre- jak i postnatalnym. Gonada samicy cechuje się bowiem najwyższym odsetkiem komórek podlegających apoptozie jak i najdłuższym czasem trwania tego procesu. Stwierdzono, że w jajniku płodu ludzkiego do połowy ciąży powstaje około 7 milionów komórek

Adres do korespondencji

Jolanta Opiela,
Dział Biotechnologii
Rozrodu Zwierząt,
Instytut Zootechniki,
ul. Krakowska 1,
32-083 Balice k. Krakowa.

płciowych, ale tylko ok. miliona pozostaje w momencie narodzin lub krótko po urodzeniu (1). Liczba oocytów ulega dalszej redukcji w trakcie wzrostu i rozwoju, a w czasie menopauzy w jajniku stwierdza się już tylko kilkaset oocytów, głównie atretycznych (3). Przyjmując, że w okresie reprodukcyjnym może owulować około 400 oocytów, oznacza to, że ponad 99,9% komórek płciowych ulega degeneracji. Podobne straty komórek płciowych w okresie pre- i postnatalnym występują u samic innych ssaków, jak np. mysz, szczur czy krowa (4-6).

Próbując wyjaśnić tę ogromną degenerację, obejmującą około dwóch trzecich puli pierwotnych komórek płciowych, która następuje jeszcze podczas życia płodowego lub wkrótce po urodzeniu, Tilly (2) zaproponował trzy hipotetyczne mechanizmy regulujące. Pierwszy z nich, „śmierć przez zaniedbanie” (ang. *death by neglect*) jest następstwem zbyt niskiej aktywności czynników wzrostu, które są znane jako związki przeciwdziałające wystąpieniu apoptozy. Drugi mechanizm, „śmierć przez uszkodzenie” (ang. *death by defect*), wywołany jest błędami podczas rekombinacji mejozy, a trzeci, nazwany „śmierć przez poświęcenie własne” (ang. *death by self-sacrifice*), jest dowodem „altruizmu” komórek. Pierwotne komórki płciowe poświęcają się na rzecz sąsiadującej komórki w celu zwiększenia jej szans na przeżycie, np. poprzez lepsze odżywianie.

Komórki, którym udało się uniknąć śmierci na drodze apoptozy w życiu płodowym, po urodzeniu dziesiątkowane są wskutek procesu zwanego atrezią. Atrezią może wystąpić w każdym stadium rozwoju pęcherzyka. Bodźcem inicjującym atrezię pęcherzyków: pierwotnego, pierwszego rzędu oraz małego przedantralnego jest apoptoza oocyty. Natomiast w pęcherzykach większych, od stadium późno-przedantralnego do owulacyjnego atrezią następuje w efekcie apoptozy komórek wzgórka jajonośnego (7,8).

Oprócz fizjologicznie zaprogramowanej śmierci komórki proces apoptozy może być również indukowany czynnikami środowiskowymi lub terapią, np. antynowotworową. Stwierdzono, że policykliczne węglowodory aromatyczne (PAH, ang. *polycyclic aromatic hydrocarbons*), które powstają w procesie spalania, także w dymie tytoniowym, aktywują apoptozę w oocytach (9,10).

W wewnątrzkomórkowej „maszynie”, która u kręgowców decyduje o życiu lub śmierci komórki, współdziałają oraz oddziałują na wewnątrzkomórkowe organelle białka różnych rodzin. Wśród nich najważniejszą rolę pełnią białka rodziny Bcl-2.

2. Aktywność białek rodziny Bcl-2 w apoptozie

Niewątpliwym przełomem w badaniach nad poznaniem funkcji białka Bcl-2 oraz pokrewnych białek tej rodziny, które uczestniczą w kontroli apoptozy, było sklonowanie w 1985 r. genu *bcl-2* (11). Dotychczasowa znajomość omawianych procesów powstała w oparciu na wynikach uzyskanych *in vitro*, przy użyciu izolowanych linii komórkowych. Fundamentalne znaczenie ma jednak określenie roli białek Bcl-2 w rozwoju organizmu i utrzymaniu jego homeostazy w warunkach *in vivo*.

Białka rodziny Bcl-2 są ewolucyjnie konserwatywne, mogą wykazywać aktywność pro- lub antyapoptotyczną. Wszystkie białka tej rodziny charakteryzują się obecnością co najmniej jednej z czterech domen homologii (BH, ang. *Bcl-2 homology domains*). Domena BH3 białek proapoptotycznych odpowiedzialna jest za właściwości tych białek promujące śmierć (12,13). Interakcja domeny BH3 z hydrofobową szczeliną utworzoną przez domeny BH1, BH2, BH3 antyapoptotycznych białek rodziny Bcl-2 neutralizuje śmiertcionośną aktywność białek proapoptotycznych (12,13). Zdolność białek rodziny Bcl-2 do heterodimeryzacji jest niezbędna w kontroli życia lub śmierci komórki. Śmierć komórki jest konsekwencją procesów prowadzących do aktywacji kaspaz, która następuje bezpośrednio lub przy udziale 'receptorów śmierci' i/lub aktywacji proapoptotycznych czynników mitochondrialnych (12-14). Często sygnał apoptotyczny przekazywany jest do mitochondrium poprzez wzbudzenie, modyfikację i przemieszczenie proapoptotycznych białek, które posiadają tylko domenę BH3 (zaliczono tu białka oznaczone jako Bid, Bad, Bim, Bik/Nbk, Blk, Hrk, Bnip3, Nix, NOXA, PUMA i Bcl-G_s) (2,13). Aktywowane białka, zawierające 'tylko BH3', ułatwiają tworzenie heterodimerskich kompleksów z proapoptotycznymi białkami rodziny Bcl-2 typu '*multi-domain*' czyli posiadającymi więcej niż jedną domenę homologii (zaliczono tu białka Bax, Bak, Bok/Mtd oraz Bcl-rambo) (2,13).

Białka proapoptotyczne ułatwiają tworzenie 'porów' albo kanałów jonowych w błonie mitochondrium. Wynikiem tych procesów jest uwolnienie z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium do cytozolu czynników apoptotycznych takich jak: cytochrom c, białko Smac/DIABLO, czynnik AIF i endonukleazy G (2). Uwalnianie tych czynników może być zahamowane przez białka antyapoptotyczne rodziny Bcl-2, do których zalicza się Bcl-2, Bcl-x_l, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1 i Bcl-B (2,13). Na tym etapie ważą się dalsze losy komórki. Decyzja – życie albo śmierć – zależy od wzajemnych relacji ilościowych między białkami pro- i antyapoptotycznymi. W przypadku przewagi białek proapoptotycznych dochodzi do obniżenia potencjału błonowego mitochondrium, zwiększenia przepuszczalności tej błony oraz wypływu wspomnianych czynników apoptotycznych. Cytochrom c wraz z prokaspazą 9 oraz czynnikiem Apaf 1 tworzy strukturę zwaną *apoptosomem*. Apoptosom z kolei aktywuje kaspazy wykonawcze za pośrednictwem kaspazy inicjującej – 9. Kaspazy wykonawcze odpowiedzialne są za śmierć komórki, która następuje w wyniku proteolizy białek cytoszkieletu i błon komórkowych, białek odpowiedzialnych za organizację przestrzenną DNA oraz samego DNA (2,14).

3. Białka proapoptotyczne

Najdokładniej poznanym białkiem rodziny Bcl-2 o działaniu proapoptotycznym jest Bax. Pierwsze doniesienie na jego temat, powstałe w oparciu na badaniach prowadzonych na pęcherzykach jajnikowych szczura, wskazywało na występowanie korelacji między jakością komórek wzgórka jajonośnego a ekspresją genu *bax* (15).

Prawidłowe komórki wzgórka jajonośnego wykazywały obniżoną ekspresję genu *bax*, natomiast ekspresja genów *bcl-2* i *bcl-x* utrzymywana była na niezmiennym poziomie (15). Kolejne doświadczenia na jajnikach szczura, małpy, a także kobiety potwierdziły występowanie zależności między podwyższoną ekspresją genu *bax* na poziomie mRNA oraz białek a obniżoną jakością komórek wzgórka jajonośnego i występowaniem atrezji pęcherzyków jajnikowych (16-18). Podobne wyniki uzyskano w badaniach na komórkach somatycznych i na jajnikach płodowych myszy. Wykazano, że apoptozie towarzyszy zwiększona ekspresja białka Bax. Jednocześnie nie obserwowano zmian w poziomie antyapoptotycznego białka Bcl-2 (19). Rolę białka Bax we wzbudzaniu apoptozy w komórkach płciowych płodu myszy potwierdziło również doświadczenie Rucker i wsp. (20). Badacze ci wykazali, że inaktywacja białka Bax, przy jednoczesnym braku białka Bcl-x, zapobiega masowej apoptozie oocytów. Natomiast wstrzyknięcie białka Bax do izolowanych oocytów wywoływało apoptozę (21). Stwierdzono ponadto, że eliminacja z jajnika oocytów, w których powstały anomalie na skutek błędów w mejozie następuje bez udziału białka Bax (22). Doświadczenie to wskazuje, że w żeńskich komórkach płciowych istnieją inne, niezależne od białka Bax, szlaki sygnalizacji proapoptotycznej (22).

Zależność między ekspresją genu *bax* a apoptozą w jajniku dobrze dokumentują badania nad mechanizmem śmierci oocytu pod wpływem policyklicznych węglowodorów aromatycznych (PAH). Wiadomo, że wiele związków chemicznych może spowodować uszkodzenia gonady żeńskiej, jednak związki tej klasy są szczególnie niebezpieczne z uwagi na obecność w oocytach wewnątrzkomórkowego białka wiążącego PAH, które nazwane zostało receptorem AHR (ang. *aryl hydrocarbon receptor*) (23,24). W dotychczas przeprowadzonych badaniach wskazuje się, że aktywacja receptora AHR bezpośrednio reguluje ekspresję genów zaangażowanych w kontrolę śmierci oocytu (9). U myszy, którym podawano PAH, obserwowano gwałtowny wzrost ekspresji genu *bax* w oocytach, po czym wkrótce następowała apoptoza (9,10). Na podstawie wyników tych doświadczeń wskazuje się, że śmierć oocytów spowodowana działaniem PAH, przy udziale białka wiążącego AHR, następuje według ustalonej ścieżki genetycznej, niezależnie od stadium rozwoju jajnika. Wykorzystując model ksenograficzny stwierdzono, że PAH wywołują *in vivo* ekspresję *bax* i apoptozę w oocytach ludzkich (9), co potwierdza ewolucyjny konserwatyzm tej ścieżki apoptozy.

Podobnie jak w przypadku białka Bax, wykazano pozytywną korelację między ekspresją większości proapoptotycznych białek rodziny Bcl-2 a występowaniem apoptozy. Nadekspresja białek Mtd/Bok (25) czy Bad (26) w komórkach wzgórka jajonośnego wywołuje ich śmierć. Ciekawostką jest, że białko Mtd/Bok heterodimeryzuje specyficznie z antyapoptotycznym białkiem Mcl-1 (25). Stwierdzono, że komórki wzgórka jajonośnego w rosnących pęcherzykach jajnikowych charakteryzuje wczesny i ciągły wzrost transkryptów mRNA genu *mcl-1*, które najprawdopodobniej mają zrównoważyć proapoptotyczne działanie białka Mtd/Bok (25).

4. Białka antyapoptotyczne

Najlepiej poznanym przedstawicielem białek rodziny Bcl-2 o działaniu antyapoptotycznym jest białko Bcl-2. Wyłączenie genu *bcl-2* w jajnikach transgenicznej myszy skutkowało obniżeniem liczby pierwotnych komórek płciowych oraz pęcherzyków jajnikowych (27). Natomiast w wyniku nadekspresji białka Bcl-2 następował spadek apoptozy w komórkach pęcherzyka oraz tworzenie się guzów wywodzących się z komórek płciowych (28).

W przeciwieństwie do Bcl-2, wyłączenie genu *bcl-x* nie powodowało zmniejszenia liczby pęcherzyków jajnikowych myszy (29). Doświadczenie to wskazuje, że ekspresja *Bcl-x* nie jest konieczna dla zachowania zdrowych pęcherzyków jajnikowych, a także dowodzi istnienia mechanizmu kompensującego brak białka Bcl-x, najprawdopodobniej poprzez działanie innych białek antyapoptotycznych. Możliwe, że nawet minimalna ilość białka Bcl-x wystarcza dla zachowania zdrowego, prawidłowego pęcherzyka w warunkach fizjologicznych (gdy nie działa czynnik indukujący apoptozę), natomiast zwiększona ekspresja genu *bcl-x* jest konieczna w sytuacji gdy na komórkę działają bodźce apoptogenne (8).

W jajnikach ssaków wykryto również białko Boo/Diva, o aktywności antyapoptotycznej (30) i proapoptotycznej (31). Doświadczenie Russella i wsp., (32) przeprowadzone na jajnikach transgenicznej myszy z wyłączonym genem Boo/Diva nie wykazało żadnych morfologicznych i fizjologicznych różnic w porównaniu z jajnikami samicy nietransgenicznej (32). Najprawdopodobniej białko Boo/Diva, podobnie jak Bcl-x, należy do białek, których funkcja pro- lub antyapoptotyczna uzależniona jest od wzajemnych interakcji z innymi przedstawicielami białek rodziny Bcl-2.

5. Aplikacyjny aspekt badań

Badania nad ekspresją genów *bax* i *bcl-2* mają aspekt aplikacyjny w medycynie ludzkiej. U kobiet poddanych terapii przeciwnowotworowej dochodzi do niepłodności w wyniku utraty komórek płciowych, która następuje na drodze apoptozy kontrolowanej przez białko Bax. Używając myszy jako zwierzęcia modelowego wykazano, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, że chemioterapeutyk, doxorubicin (Adriamycyna, 14-hydroxydaunomycyna) nie wywołuje apoptozy w oocytach z wyłączonym genem *bax* (33). Najnowsze metody leczenia, zmierzające do zminimalizowania szkodliwego wpływu chemio- i radioterapii, prowadzone są dwutorowo, tj. albo poprzez inaktywację genu *bax* lub poprzez zwiększenie ekspresji białka Bcl-2 w oocytach (34). Wyniki uzyskane na myszach wskazują, że powyższe sposoby postępowania mogą być skuteczne (34).

W dobie dynamicznego rozwoju biotechnologii rozrodu zwierząt niezwykle ważną jest jakość materiału używanego do doświadczeń, a także ocena jakości oocytów i zarodków uzyskanych metodami *in vitro*. W oocytach i zarodkach bydła wykazano

występowanie korelacji między ekspresją białek Bcl-2 i Bax a stopniem ich kompetencji rozwojowej (35). W prawidłowych oocytach i zarodkach obserwuje się przewagę białek Bcl-2 nad Bax, natomiast sytuacja odwrotna cechuje oocyty i zarodki o oznakach apoptozy. Podobne rezultaty obserwowano u myszy (36). Można zakładać, że ekspresja białek Bcl-2 i Bax może służyć jako marker jakości oocytów i blastocyst.

6. Podsumowanie

Proces apoptozy, odgrywający niezwykle istotną rolę zarówno w oogenezie jak i embriogenezie, znajduje się pod kontrolą białek rodziny Bcl-2. Poznanie molekularnych szlaków kierujących śmiercią oocytów otworzy nowe możliwości doskonalenia warunków hodowli *in vitro* oocytów, które przeznaczane są do celów eksperymentalnych jak i terapeutycznych. Z uwagi na fakt, że apoptoza odpowiedzialna jest za dziesiątkowanie oocytów już od momentu powstawania jajników w życiu płodowym, ograniczenie tego procesu pozwoliłoby na pełniejsze wykorzystanie potencjału rozrodczego samicy, a także przedłużenie zdolności reprodukcyjnej samicy. Poznanie mechanizmów kierujących apoptozą umożliwiłoby również opracowanie nowych terapii niepłodności, a także ulepszenie metod antykoncepcji. Kolejnym istotnym aspektem badań nad apoptozą, o znaczeniu użytecznym, jest możliwość opracowania bardziej skutecznych terapii antynowotworowych. Sterowanie białkami rodziny Bcl-2 może stanowić nieocenione narzędzie badawcze we wszystkich wymienionych dziedzinach.

Praca finansowana ze środków KBN nr grantu promotorskiego 2P06D00728.

Literatura

1. Kim M-R., Tilly J. L., (2004), *Biochim. Biophys. Acta*, 1644, 205-210.
2. Tilly J. L., (2001), *Nature Rev.*, 2, 838-848.
3. Richardson S. J., Senikas V., Nelson J. F., (1987), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 65, 1231-1237.
4. Kątska L., (2001), *Post. Biol. Kom.*, 28, 177-187.
5. Pepling M. E., Spradling A. C., (2001), *Dev. Biol.*, 234, 339-351.
6. Perez G. I., Robles R., Knudson C. M., Flaws J. A., Korsmeyer S. J., Tilly J. L., (1999), *Nat. Genet.*, 21, 200-203.
7. Hughes Jr., F.M., Gorospe W. C., (1991), *Endocrinology*, 129, 2415-2422.
8. Johnson A. L., (2003), *Anim. Reprod. Sci.*, 78, 185-201.
9. Matikainen T., Perez G. I., Jurisicova A., Schlezinger J. J., Ryu H.-Y., Pru J. K., Sakai T., Korsmeyer S. J., Casper R. F., Sherr D. H., Tilly J. L., (2001), *Nat. Genet.*, 28, 355-360.
10. Matikainen T., Moriyama T., Morita Y., Perez G. I., Korsmeyer S. J., Sherr D. H., Tilly J. L., (2002), *Endocrinology*, 143, 615-620.
11. Cleary M. L., Smith S. D., Sklar J., (1986), *Cell*, 47, 19-28.
12. Rapp U. R., Rennefahrt U., Troppmair J., (2004), *Biochim. Biophys. Acta*, 1644, 149-158.
13. Borner C., (2003), *Mol. Immunol.*, 39, 615-647.

14. Joza N., Kroemer G., Penninger J. M., (2002), *Trends Gen.*, 18, 142-149.
15. Tilly J. L., Tilly K. I., Kenton M. L., Johnson A. L., (1995), *Endocrinology*, 136, 232-241.
16. Yoon S. J., Choi K. H., Lee K. A., (2002), *Mol. Reprod. Dev.*, 61, 504-510.
17. Kugu K., Ratts V. S., Piquette G. N., Tilly K. I., Tao X.-J., Martimbeau S., Aberdeen G. W., Krajewski S., Reed J. C., Pepe G. J., Albrecht E. D., Tilly J. L., (1998), *Cell Death Differ.*, 5, 67-76.
18. Uma J., Muraly P., Verma-Kumar S., Medhamurthy R., (2003), *Biol. Reprod.*, 69, 1379-1387.
19. de Felici M., Di Carlo A., Pesce M., Iona S., Farrace M. G., Piacentini M., (1999), *Cell Death Differ.*, 6, 908-915.
20. Rucker E. B., Dierisseau P., Wagner K. U., Garrett L., Wynshaw-Boris A., Flaws J. A., Hennighausen L., (2000), *Mol. Endocrinol.*, 14, 1038-1052.
21. Morita Y., Perez G. I., Paris F., Miranda S., Ehleiter D., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Xie Z., Reed J. C., Schuchman E. H., Kolesnick R. N., Tilly J. L., (2000), *Nat. Med.*, 6, 1109-1114.
22. Morita Y., Maravei D. V., Bergeron L., Wang S., Perez G. I., Tsutsumi O., Taketani Y., Asano M., Horai R., Korsmeyer S. J., Iwakura Y., Yuan J., Tilly J. L., (2001), *Cell Death Differ.*, 8, 614-620.
23. Wilson C. L., Safe S., (1998), *Toxicol. Pathol.*, 26, 657-671.
24. Valdez K. E., Petroff B. K., (2004), *Reprod. Biol.*, 4, 243-258.
25. Hsu S. Y., Kaipia A., McGee E., Lomeli M., Hsueh A. J. W., (1997), *Proc. Natl. Acad. USA.*, 94, 12401-12406.
26. Kaipia A., Hsu S. Y., Hsueh A. J. W., (1997), *Endocrinology*, 138, 5497-5504
27. Ratts V. S., Flaws J. A., Kolp R., Sorenson C. M., Tilly J. L., (1995), *Endocrinology*, 136, 3665-3668.
28. Hsu S. Y., Lai R. J., Finegold M., Hsueh A. J., (1996), *Endocrinology*, 137, 4837-4843.
29. Riedlinger G., Okagaki R., Wagner K. U., Rucker III, E. B., Oka T., Miyoshi K., Flaws J. A., Hennighausen L., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 438-444.
30. Song Q., Kuang Y., Dixit V. M., Vincenz C., (1999), *EMBO J.*, 18, 167-178.
31. Lee R., Chen J., Matthews C. P., McDougall J. K., Neiman P. E., (2001), *Biochim. Biophys. Acta*, 1520, 187-194.
32. Russell H. R., Lee Y., Miller H. L., Zhao J., McKinnon P. J., (2002), *Mol. Cell Biol.*, 22, 6866-6870.
33. Perez G. I., Knudson C. M., Leykin L., Korsmeyer S. J., Tilly J. L., (1997), *Nat. Med.*, 3, 1228-1332.
34. Morita Y., Perez G. I., Maravei D. V., Tilly K. I., Tilly J. L., (1999), *Mol. Endocrinol.*, 13, 841-580.
35. Yang M. Y., Rajamahendran R., (2002), *Anim. Reprod. Sci.*, (2002), 70, 159-169.
36. Exley G. E., Tang C. Y., McElhinny A. S., Warner C. M., (1999), *Biol. Reprod.*, 61, 231-239.