

JUSTYNA BANAS, JOANNA HOMA

*Zakład Immunologii Ewolucyjnej
Instytut Zoologii
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
E-mail: joanna.homa@uj.edu.pl*

UKŁAD PROFENOLOKSYDAZY (pro-PO) U ZWIERZĄT BEZKRĘGOWYCH. MECHANIZM WRODZONEJ ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ

ROLA UKŁADU PROFENOLOKSYDAZY W ODPORNOŚCI BEZKRĘGOWCÓW

Wszystkie organizmy zwierzęce chronione są przez układ odpornościowy, którego komórki posiadają unikatową zdolność do rozpoznawania i odróżniania elementów własnych od obcych (ang. self/non-self). Wyróżniamy odporność wrodzoną (nieswoistą, głównie z udziałem fagocytów i komórek cytotoksycznych) oraz nabytą (swoistą, z udziałem limfocytów i wytwarzanych przez plazmocyty przeciwciał). Odporność wrodzona występuje u wszystkich zwierząt wielokomórkowych, zarówno bezkręgowców, jak i kręgowców, a jej mechanizmy operują zarówno na powierzchni nabłonków, jak i w tkankach i płynach tkankowych (np. układ dopełniacza) (GOŁĄB i współaut. 2009). Zgodnie z powszechnie przyjętymi poglądami, organizmy bezkręgowce jako filogenetycznie starsze, dysponują tylko mechanizmami odporności wrodzonej. Chociaż nie ma u nich właściwych dla odpowiedzi nabytej limfocytów, wyniki badań z ostatnich lat wskazują na możliwość występowania u nich pewnej pamięci immunologicznej (KURTZ 2005, KURTZ i ARMITAGE 2006).

Jednym z ważnych mechanizmów uczestniczących w eliminacji patogenów u bezkręgowców jest układ profenoloksydazy (pro-PO). Układ ten jest elementem odpowiedzi humoralnej, która przejawia się występowaniem specyficznych substancji w płynach ciała.

Końcowym produktem aktywacji kaskady profenoloksydazy jest melanina, stąd proces ten inaczej nazywany jest melanizacją. Warto wspomnieć, że barwnik ten zaangażowany jest również w szereg innych biologicznych reakcji, takich jak zmiana koloru ludzkich włosów czy ciemnienie epidermy owoców (CAMMARATA i PARRINELLO 2009). Melanina występuje między innymi w melanocytach, komórkach siatkówki i makrofagach kręgowców, a jej główną funkcją jest nie tylko ochrona przed szkodliwym promieniowaniem UV, ale także obrona komórek przed reaktywnymi formami tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS), np. nadtleniem wodoru (H_2O_2), rodnikiem hydroksylowym ($\cdot OH$) czy anionorodnikiem ponadtlenkowym ($\cdot O^2$) (ZHAO i współaut. 2011).

Polimorfizm pro-PO występuje u niektórych bezkręgowców i najprawdopodobniej związany jest z faktem, że różne formy tego związku mogą pełnić odrębne funkcje, np. jedna odkładana jest w oskórku, co prowadzi do jego utwardzania (u owadów jest to proces sklerotyzacji), a inna w komórkach krwi (hemocytach) uczestniczy w zwalczaniu patogenów (SODERHALL i CERENIUS 1998, PANG i współaut. 2004).

Zlokalizowana w obrębie komórek immunokompetentnych (np. celomocytów, hemocytów), a także osoczu czy kutykuli profenoloksydaza jest nieaktywnym prekursorem

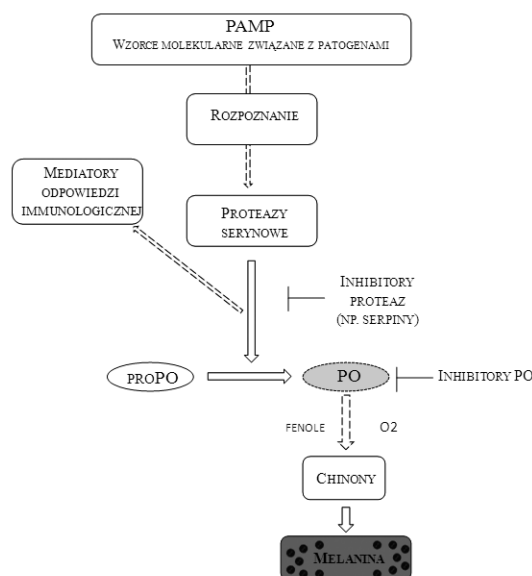
(zymogenem), z którego powstaje fenoloksydaza, PO (inaczej tyrozynaza) (PANG i współaut. 2004). Białko to, po raz pierwszy zidentyfikowane przez Blocha, jest kluczowym enzymem, katalizującym reakcję oksydacji polifenoli, z których następnie powstają chinony oraz semichinony (BLOCH 1917). Te ostatnie mają zdolność do polimeryzacji i tworzenia brunatnego barwnika, melaniny. Skłonność chinonów do udziału w cyklu redukcji mniej reaktywnych form tlenu do bardziej agresywnych form sprawia także, że są one potencjalnymi źródłami wolnych rodników skierowanych przeciwko patogenom (BECK i STRAND 2007, ZHAO i współaut. 2011).

Kaskadę prowadzącą do powstania PO z pro-PO uruchamia rozpoznanie przez komórkę układu odpornościowego wzorców molekularnych związanych z patogenami, tzw. PAMP (ang. pathogen associated molecular patterns), takimi jak peptydoglikany, lipopolisacharydy bakteryjne (LPS) i β -1,3-glukany grzybów. Sygnałem do uruchomienia kaskady aktywacji pro-PO może być także uszkodzenie tkanki po zranieniu i przerwanie ciągłości błony komórkowej (SODERHALL i CERENIUS 1998).

Zagadkowy wydaje się udział jonów wapnia w procesie aktywacji pro-PO. Niektóre źródła przypisują jonom Ca^{2+} kluczową rolę w aktywacji tego układu (GOLLAS-GALVAN i współaut. 1997, DA SILVA i współaut. 2000), inne zaprzeczają jakoby wapń w jakikolwiek sposób na niego wpływał (LOCKEY i OURTH 1992). Wiadomo jednak, że przekroczenie wartości fizjologicznych stężenia jonów Ca^{2+} prowadzi do stabilizacji pro-PO i zapobiega spontanicznej aktywacji układu, co z kolei ma miejsce przy jego niskich stężeniach (GOLLAS-GALVAN i współaut. 1997).

Układ pro-PO spełnia ważną rolę w odporności wielu grup organizmów, począwszy od gąbek (Porifera), pierścienic (Annelida), mięczaków (Mollusca), stawonogów (Arthropoda), żachw (Ascidiacea), a skończywszy na beczaszkiowcach (Cephalochordata). Jednak jak dotąd proces aktywacji pro-PO i rolę PO w odporności najlepiej opisano dla stawonogów (Arthropoda) (CYTRYŃSKA 2009, SODERHALL i CERENIUS 1998).

Liczba reakcji proteolitycznych, składających się na kaskadę aktywacji pro-PO nie jest znana dla żadnego z przebadanych pod tym kątem gatunków, wiadomo jednak, że główną rolę pełnią tu proteazy serynowe, aktywujące profenoloksydazę, tzw. PAP (ang. serine prophenoloxidase-activating proteinase), a także czynnik PPAF (ang. prophenoloxidase activation factor) i enzym PPAE (ang. prophenoloxidase activating enzyme). W wyniku ich działania dochodzi do powstania PO i katalitycznej hydroksylacji mono-



Ryc. 1. Schemat aktywacji układu profenoloksydazy (pro-PO) u Artchopoda (wg SÖDERHALL i CERENIUS 1998, zmieniona).

fenoli do o-difenoli oraz oksydacji o-difenoli do chinonów (BECK i STRAND 2007) (Ryc. 1).

UKŁAD PRO-PO U OWADÓW

W przypadku infekcji u owadów, w aktywację całego procesu zaangażowany jest szereg zlokalizowanych w hemolimfie proteaz z rodziny HP (ang. hemolymph proteases). Proteaza HP-14 zdolna jest do autokatalitycznej aktywacji procesu w obecności grzybów lub bakterii gram dodatnich, może być aktywowana również przez β -1,3-glukan. Autokataliza prowadzi do aktywacji pro-PO za pomocą trzech kroków: (i) aktywacji PAP przez HP-12 i HP-14, (ii) aktywacji PAP przez HP-21 i ostatecznie, (iii) powstawania PO. Natomiast bakterie gram ujemne prawdopodobnie uruchamiają kaskadę aktywacji pro-PO za pośrednictwem innej ścieżki, nie włączającej HP-14 (WANG i JIANG 2007, CERENIUS i współaut. 2008, KANOST i GORMAN 2008).

Biorąc pod uwagę toksyczność głównych i pośrednich produktów melanizacji, muszą istnieć skuteczne systemy ich kontroli. Odpowiedzialne są za to między innymi wspomniane już białka rozpoznające. Natomiast, kiedy fenoloksydaza jest już aktywna, nadmierne odkładanie się melaniny może być hamowane przez specyficzne regulatory negatywne, którymi są inhibitory proteaz serynowych z rodziny serpin (związkom tym poświęcono osobny podrozdział) (Ryc. 1) (BECK i STRAND 2007, CERENIUS i współaut. 2008, NOONIN i współaut. 2010). Badania pokazu-

ja, że aktywacja fenoloksydazy u niektórych gatunków owadów może różnić się ze względu na płeć. Zjawisko to udowodniono na przykładzie wojsiłki *Panorpa vulgaris*. Okazało się, że u osobników płci męskiej nie odnaleziono hemocytów, które zawierałyby aktywną fenoloksydazę. Nie oznacza to jednak, że mechanizm ten w ogóle u nich nie występuje. Aktywacja PO prawdopodobnie zachodzi w hemolimfie, a nie w komórkach choć w pewnych sytuacjach układ ten może ulegać zmianie. Różnice wynikają prawdopodobnie z różnych warunków aktywacji i inhibicji PO hemocytów (KURTZ i SAUER 2001).

UKŁAD pro-PO U SKORUPIAKÓW

Wysoki poziom ekspresji PO stwierdzono też u skorupiaków (Crustacea), które, obok owadów, stanowią kolejny podtyp stawonogów. Obecność PO stwierdzono między innymi w komórkach trzustki, narządach limfoidalnych oraz w komórkach immunokompetentnych hemolimfy, hemocytach krewetek, zainfekowanych przez bakterie *Vibrio* sp. Warto zauważyć, że tylko dojrzałe hemocyty są zdolne do przeprowadzania procesu aktywacji PO (GAO i współaut. 2009).

W przypadku innych grup systematycznych, mięczaków i pierścienic, dowody na obecność systemu profenoloksydazy opierają się głównie na obserwacji procesu melanizacji w przypadku zranienia czy uszkodzenia tkanki, a wiele aspektów tego procesu nie zostało do tej pory wyjaśnionych.

UKŁAD pro-PO U DŹDŹOWNIC

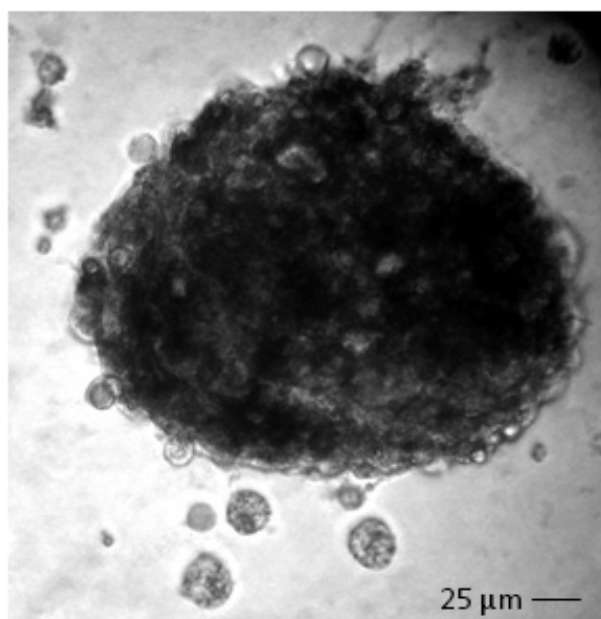
U dżdżownic (Lumbricidae), organizmów należących do gromady pierścienic (Annelida), układ odpornościowy zlokalizowany jest głównie w jamie ciała, celomie. W odpowiedzi na patogen biorą udział celomocyty: amebocyty hialinowe (nieziarniste) i granulocyty (ziarniste), oraz eleocyty, jak również składniki płynu celomatycznego (np. lizozym, fetydyny, hemolizyny) (COOPER 1996). Celomocyty są odpowiedzialne za syntezę i wydzielanie czynników humoralnych, które biorą udział w naprawie uszkodzonych tkanek i w eliminacji patogenu, m.in. powodując jego aglutynację (zlepianie) i opsonizację (opłaszczanie). Jednym z nich jest CCF-1, czyli celomatyczny czynnik cytolytyczny, odpowiedzialny za rozpoznawanie patogenów poprzez opsonizację i aktywację pro-PO (FIELD i współaut. 2004). W tym przypadku konsekwencją uaktywnienia układu pro-PO jest enkapsulacja, przejawiająca się formowaniem w płynie celomatycznym tzw. „ciała brunatnych” oddzielających patogen od tkanek gospodarza (Ryc. 2A). Kluczowa rola

„ciała brunatnych” w hamowaniu ekspansji bakterii i pasożytów została opisana między innymi u *E. fetida* (PROHAZKOVA i współaut. 2006). Patogen otaczany jest przez celomocyty, a kiedy taka kapsuła osiąga wielkość 1–2 mm, raptownie ciemnieje. Jest to wynik powstających w jej wnętrzu pokładów lipofuscyny oraz melaniny. Kiedy „ciała brunatne” są już „dojrzałe”, następuje ich przesuwanie w kierunku końcowych segmentów ciała dżdżownicy, a następnie dochodzi do ich usuwania poprzez grzbietowe pory w ciele lub autotomię, czyli odrzucanie końcowych segmentów ciała (VALEMBOIS i współaut. 1992, 1994) (Ryc. 2B). Na formowanie „ciała brunatnych” istotny wpływ ma fenoloksydaza, wykorzystująca jako substrat L-β-3,4-dihydroksyfenylolaninę – L-DOPA (FIELD i współaut. 2004). Aminokwas L-DOPA powstaje w procesie hydroksylacji tyrozyny, na skutek reakcji prowadzonej przez hydroksylazę tyrozynową i jest prekursorem dopaminy. Z tego powodu głównymi substratami używanymi w laboratorium do badań nad tą formą odpowiedzi są L-DOPA, dopamina, N-acyldopamina lub tyrozyna. Wykorzystując właśnie te substraty stwierdzono, że aktywacja kaskady pro-PO u *Eisenia fetida* (dżdżownica kompostowa) zachodzi pod wpływem lipopolisacharydu, β-1,3-glukanu i niektórych detergentów, np. dodecylsulfianu sodu (SDS) i chlorku cetylpirydyny (CPC) (PROHAZKOVA i współaut. 2006).

Zaobserwowano, że enzymy aktywujące fenoloksydazę znajdują się u dżdżownic w wakuolach oraz aparatach Golgiego wszystkich celomocytów, natomiast prekursorzy melaniny znaleziono w granulocytach (SMITH 1996). Zidentyfikowano jak dotąd trzy proteazy serynowe zaangażowane w aktywację pro-PO u dżdżownic: A2, B2, C2, a ich aktywacja okazała się silnie zależna od pH środowiska (optimum dla 7 i 10) oraz temperatury (SMITH 1996). Trzeba jednak zaznaczyć, że u dżdżownic poziom aktywacji pro-PO jest niższy i wolniejszy niż u innych bezkręgowców.

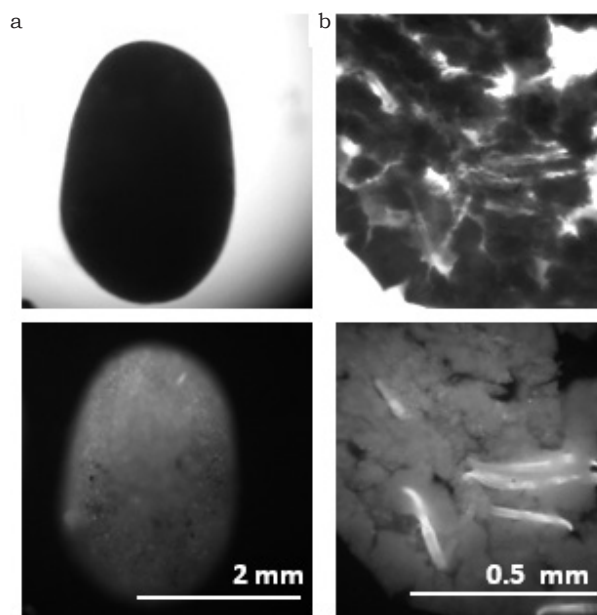
UKŁAD pro-PO U MIĘCZAKÓW

Proces aktywacji pro-PO wydaje się być dużo lepiej poznany w przypadku mięczaków, choć i tu istnieją aspekty, które nie zostały jeszcze przebadane (SMITH 1996, CERENIUS i współaut. 2008). Szczególne miejsce w aktywacji pro-PO mięczaków zajmuje prawdopodobnie hemocyjanina. Biało to znajduje się w hemolimfie, a w warunkach fizjologicznych bierze udział w procesie oddychania. Jej funkcją jest przenoszenie tlenu, który to proces możliwy jest dzięki obecności w hemocyjaninie dwóch atomów



Ryc. 2A. „Ciało brunatne” pozyskane z dżdżownicy *Eisenia andrei* (fot. Joanna Homa).

miedzi (DECKER i współaut. 2001, PROCHAZKOVA i współaut. 2006). Co ciekawe, jony Cu^{2+} mogą też powodować większą przyswajalność aromatycznych związków fenolowych i przez to oddziaływać na aktywację kaskady pro-PO. Niektóre zwierzęta, np. skrzyplące (krab podkowiasty, *Limulus polyphemus*), nie posiadają specjalnych przenośników dla O_2 we krwi, dlatego wykorzystują do tego celu hemocyjaninę zawartą w hemocelu. Należy wspomnieć, że hemocyjanina produkowana jest przez gruczoły trawienne, podczas gdy pro-PO u tego gatunku wytwarzana jest wyłącznie w hemocytach. Ważnym elementem w procesie aktywacji pro-PO jest PPA. Enzym ten odpowiedzialny jest zarówno za proces fagocytozy (pośrednio), jak i melanizacji (bezpośrednia aktywacja PO). Enzym PPA 1 jest rozszczepiany przez kolejny PPA i przez to staje się formą aktywną, co powoduje przejście proformy w czynną fenoloksydazę (CERENIUS i współaut. 2008). Również u mięczaków układ pro-PO może zostać aktywowany przez proteazy (trypsyna i chymotrypsyna), struktury PAMP, detergenty, a także przez wysokie stężenie jonów Ca^{2+} w obecności PPA (GOLLAS-GALVAN i współaut. 1997). Innym ważnym czynnikiem biorącym udział w aktywacji pro-PO mięczaków jest, będąca homologiem mieloperoksydazy kręgowców, peroksynektyna (PXN). Enzym ten powstaje z pro-PXN i odgrywa ważną rolę w procesie przylegania komórek oraz powstawaniu opsonin ułatwiających fagocytozę. Dzieje się tak dzięki połączeniu PXN ze specyficznymi receptorami integrynowymi (odpowiedzialnymi za agregację komórek) na powierzch-



Ryc. 2B. Dojrzałe „ciało brunatne” pozyskane z dżdżownicy *Eisenia andrei*.

a) cała kapsuła; b) uwolnione z ciała brunatnego komórki oraz widoczne, uwięzione wewnątrz nicienie. Górne zdjęcia, mikroskop świetlny, dolne fluorescencyjne (fot. Joanna Homa).

ni hemocytu. Jednocześnie peroksynektyna może wspomagać produkcję chinonów i melaniny, a także halogenowodorów (CERENIUS i współaut. 2008).

UKŁAD pro-PO U OSŁONIC

Warto zwrócić uwagę na słabo przebadaną pod kątem aktywności PO grupę, jakimi są osłonice należące do strunowców. Wiele opisanych dla innych zwierząt elementów układu pro-PO odgrywa też rolę w aktywacji kaskady fenoloksydazy w hemocytach osłonice. Podobnie jak u stawonogów, u osłonice do aktywacji pro-PO wymagane jest jej proteolityczne cięcie. Aktywacja układu zachodzi np. w obecności LPS, a poziom aktywności PO jest znacznie wyższy po inkubacji z proteazą serynową, natomiast zmniejsza się w wyniku działania inhibitorów proteaz. Dwa zsekwencjonowane białka zachwy przejrzystki (*Ciona intestinalis*): *CinPO-1* i *CinPO-2*, wykazują podobieństwo do PO, hemocyjaniny i tyrozyny stawonogów (CAMMARATA i PARRINELLO 2009).

Jednak w odniesieniu do klasycznie występującej aktywacji PO u osłonice, w pierwszej kolejności powstają ortodifenole zamiast monofenoli, a obecność kationów (wapnia lub magnezu) nie ma wpływu na zwiększenie poziomu aktywacji pro-PO (CAMMARATA i PARRINELLO 2009).

UKŁAD PRO-PO U BEZCZASZKOWCÓW

Badania PO beczaszkwowców prowadzono głównie na przykładzie lancetnika. Co ważne nie posiada on swobodnie krążących komórek o charakterze fagocytów, co czyni go bardzo ciekawym obiektem badań pod względem mechanizmu działania układu odpornościowego. Aktywność pro-PO zaobserwowano u tego gatunku w komórkach skrzeli, jelita oraz epidermalnego śluzu, gdzie przejawia właściwości antybakteryjne (ZHANG i LI 2000). Przez długi czas występowanie PO u lancetnika było zagadką. W 2004 r. PANG i współaut. udowodnili, że w płynach ustrojowych lancetnika występuje enzym o masie 150 kD, składający się z trzech łańcuchów, których ciężar molekularny jest prawdopodobnie specyficzny gatunkowo. Ostatecznie obecność układu pro-PO potwierdzono w płynie komórkowym zwierząt zainfekowanych bakteriami *Escherichia coli* i *Vibrio alginolyticus* (PANG i współaut. 2009).

UKŁAD pro-PO U GĄBEK

Na koniec warto zwrócić uwagę na grupę najprostszych organizmów wielokomórkowych, czyli gąbek (Porifera). U gąbek proces melanizacji został zaobserwowany u licznych gatunków np. *Halichondria*, *Hymeniacidon*, *Microciona* i *Verongia* sp. Nie posiadają one komórek wyspecjalizowanych w produkcji melaniny, ale podobnie jak u wyższych grup bezkręgowców, również u gąbek wykazano działanie układu pro-PO i zaobserwowano proces melanizacji. Badania wskazują u nich na syntezę melaniny w komórkach starych, apoptotycznych oraz w odpowiedzi na przeszczepy komórek innego osobnika (tzw. alloprzeszczepy). Klasycznie, szlak syntezy melaniny rozpoczyna się od fenyloalaniny, która jest przekształcana przez pierwszy enzym rozpoczynający proces melanizacji, hydroksylazę fenyloalaniny (ang. phenylalanine hydroxylase, PAH). Badania reakcji na alloprzeszczepy wykazały, że w komórkach gąbek *Geodia cydonium* dochodzi do podniesienia aktywności PAH. W odpowiedzi na przeszczep wzrasta u nich zarówno ekspresja mRNA PAH, jak i aktywność tego enzymu (WIENS i współaut. 1998).

WPŁYW AKTYWNOŚCI PO NA PRZEŻYCIE PATOGENU

Aktywna fenoloksydaza, oprócz samej melanizacji, jest zdolna do katalizowania reakcji powstawania ROS, silnie reaktywnych związków, których zadaniem jest uszkodzenie mikroorganizmów i pasożytów, poprzez działanie cytotoksyczne. Wiele źródeł łączy

aktywność PO z obniżoną zdolnością do przeżycia patogenów zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Istnieją jednak przykłady, w których melanizacja i aktywacja pro-PO nie wydają się niezbędne do wyeliminowania patogenu, a aktywność innych komponentów układu odpornościowego jest do tego całkowicie wystarczająca. W związku z tym nasuwa się pytanie, czy i jak aktywność układu pro-PO wpływa na zdolność do obrony przed patogenami?

Z badań wynika, że mutanty muszki owocowej *D. melanogaster*, które nie są zdolne do uruchamiania kaskady aktywacji pro-PO w hemolimfie, nie są bardziej wrażliwe na infekcje bakteryjne w porównaniu do szczepu dzikiego, u którego aktywacja zachodzi. Okazuje się, że brak u mutantów enzymów aktywujących pro-PO (np. PAE1) nie wpływa na przeżywalność badanych osobników. W tym przypadku na przeżywalność muszki owocowej wpływ mają mutacje związane z brakiem aktywacji szlaków związanych z rozpoznaniem PAMP, np. mutacje genów kodujących receptory Toll i receptory Imd (ang. immune deficiency) (CERENIUS i współaut. 2008).

Z drugiej strony stwierdzono, że u słodkowodnego raka *Pacifastacus leniusculus* wyciszenie aktywności genu kodującego pro-PO powodowało zwiększenie śmiertelności zwierząt podczas infekcji wysoce wirulentnymi bakteriami *Aeromonas hydrophila*. Z kolei wyciszenie genu dla pacyfastyny, będącej inhibitorem PO, podniosło aktywność PO i w konsekwencji zmniejszyło śmiertelność osobników. Stwierdzono również, że wzrost aktywności PO pobudzał u tych zwierząt fagocytozę, najprawdopodobniej poprzez zwiększenie produkcji opsonin (CERENIUS i współaut. 2008).

Aktywacja PO z pewnością drastycznie redukuje zdolność utrzymania się przy życiu patogenów, ale nie jest jedyną formą odpowiedzi przeciwko nim. Istotne jest również to, że aktywacja procesu melanizacji zachodzić może w różnych sytuacjach, np. w odpowiedzi na zranienia. Co istotne, sama melanizacja jest procesem silnie toksycznym, ponieważ aktywowane są w niej liczne składniki, które mogą być szkodliwe dla samego gospodarza, np. chinony czy reaktywne formy tlenu. Możliwe jest, że gospodarz poprzez „manipulację” ilością i aktywnością poszczególnych składowych systemu pro-PO, może regulować stopień ich toksyczności (LECLERC i współaut. 2006).

INHIBITORY UKŁADU pro-PO

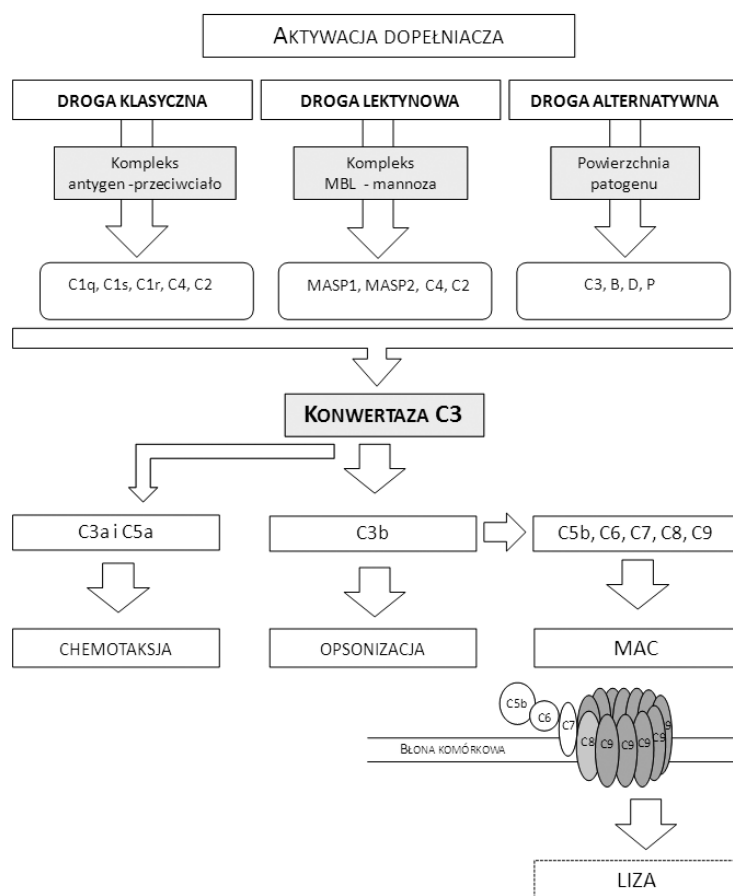
W celu uniknięcia szkodliwego działania układu fenoloksydazy, jest on kontrolowa-

ny i regulowany zarówno na poziomie aktywacji kaskady proteaz, aktywacji pro-PO oraz już aktywnej fenoloksydazy i związanej z nią melanizacji. I tak na przykład u owadów scharakteryzowano szereg inhibitorów pro-PO, np. u szarańczy funkcje takie spełniają niskocząsteczkowe białka należące do inhibitorów proteaz: LCIM I i LCIM II [ang. protease inhibitor LCMI-II, PARS intercerebralis major peptide D2, PMP-D2; protease inhibitor LCMI-II, PARS intercerebralis major peptide C, PMP-C]. Z kolei u motyla *Manduca sexta* za regulację proteaz odpowiada serpiny-1J,-3,-6 oraz serpiny-4-5. Serpina SPN27A jest inhibitorem aktywacji pro-PO u *Drosophila melanogaster* (JIANG i KANOST 1997, TONG i KANOST 2005). W przypadku słodkowodnych raków, skutecznym inhibitorem pro-PO jest pacyfastyna (ang. pacifastin) (LIANG i współaut. 1997).

Inhibicję aktywnej fenoloksydazy i melanizacji może powodować także białko MIP (ang. melanization-inhibiting protein). U chrząszczy, np. mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*), wpływa ono na zakłócenie pro-

dukcji melaniny z fenoli. U wielu owadów inhibitory fenoloksydazy, tzw. białka POI (ang. phenoloxidase inhibitor), wpływają na pośrednie reakcje prowadzące do melanizacji (CERENIUS i współaut. 2008).

Zdolność do hamowania procesu aktywacji układu pro-PO jest wykorzystywana również przez same patogeny. Wiele spośród pasożytów wykształciło mechanizmy obronne, dzięki którym skutecznie potrafią unikać odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Przykładowo, larwy pasożytnej osy (*Leptopilina boulardi*) produkują czynniki obniżające odporność gospodarza (muszki owocowej), w tym także czynniki redukujące powstawanie jednego z produktów kaskady aktywacji PO, przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybiczego DHI (5,6-dihydroksyindolu) (ZHAO i współaut. 2011). Niektóre z bakterii potrafią produkować podobne do serpin inhibitorów lub inne czynniki, które wpływają niekorzystnie na proces melanizacji w organizmie gospodarza. Przykładem mogą być symbiotyczne bakterie *Xenorhabdus bovienii* (Proteobacteria) nicieni owadobójczych *Steinernema feltiae* (Ne-



Ryc. 3. Schemat klasycznej, lektynowej i alternatywnej drogi aktywacji dopełniacza.

C1 (C1q, C1r, C1s), C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, B, D, P (properdyna), składniki dopełniacza; MBL, lektyna wiążąca mannozę; MASP-1, MASP-2, proteazy serynowe; C3a i C5a, czynniki chemotaktyczne; C3b, opsonina; MAC, C5b-C9, kompleks atakujący błonę (wg KLASKA i NOWAK 2007, zmieniona).

matoda, Rhabditida), które potrafią wpływać supresyjnie na aktywację układu pro-PO, obniżając możliwości obronne zakażonego nicieniemi owada. Mechanizmy hamowania aktywacji układu pro-PO przez bakterie *X. bovienii* nie są jeszcze dokładnie poznane. Natomiast z badań wynika, że nastrzyknięcie owada zabitymi bakteriami powoduje aktywację białek przeciwbakteryjnych oraz aktywację pro-PO, podczas gdy wprowadzenie żywych bakterii wpływa hamująco na aktywację odpowiedzi immunologicznej owada, wyrażoną m.in. aktywacją układu pro-PO (HERBERT i GOODRICH-BLAIR, 2007).

Z kolei, infekujący osy brakowirus *Microplitis demolitor* (MdBV) zawiera w swoim genomie gen kodujący białko Egf1.0. Powoduje ono inhibicję kaskady pro-PO, prawdopodobnie przez zahamowanie PAP, jednak, co ciekawe, nie jest w stanie powstrzymać aktywnej już kaskady. Białko Egf1.0 należy do dużej rodziny protein podobnych do inhibitora trypsyny. Wykazuje także duże powinowactwo do inhibitorów proteinaz serynowych. Wszystkie, znajdujące się w genomie wirusa MdBV, geny kodujące białka Egf spełniają podobną funkcję, a końcowym efektem ich aktywności jest obniżenie odporności gospodarza czyli immunosupresja (BECK i STRAND 2007).

KASKADA pro-PO I UKŁAD DOPEŁNIACZA, JAKO ANALOGICZNE MECHANIZMY ELIMINACJI PATOGENU

System pro-PO przedstawiany jest często jako odpowiednik układu dopełniacza występującego u kręgowców.

Istnieją 3 główne drogi aktywacji dopełniacza: (i) klasyczna, gdzie do jego aktywacji niezbędne jest związanie drobnoustroju ze specyficznymi przeciwciałami, (ii) alternatywna, w której do aktywacji dopełniacza dochodzi na powierzchni patogenu oraz (iii) droga lektynowa, związana z połączeniem cząsteczki cukru (np. mannozy) obecnej na powierzchni patogenu z lektyną wiążącą mannozę tzw. MBL (ang. mannose binding lectin). Ta interakcja czyni kompleks MBL wrażliwym na działanie proteaz serynowych MASP (ang. mannose-binding lectin-associated serine protease) oraz prowadzi do rozkładu kolejnych składników układu dopełniacza (Ryc. 3) (KLASKA I NOWAK 2007).

Ze względu na podobieństwo aktywatorów, powstawanie kaskady reakcji oraz zaangażowanie licznych proteaz, aktywacja kaskady pro-PO wydaje się podobna do alternatywnego i/lub pektynowego szlaku aktywacji układu dopełniacza (PANG i współaut. 2004). Spełniając podobne funkcje, oba układy opierają się na zbliżonych zasadach

działania, a skierowane przeciwko patogenowi bezpośrednio go unieszkodliwiają. Natomiast różnicą jest końcowy efekt ich działania. W wyniku aktywacji układu dopełniacza powstaje kompleks atakujący błonę (ang. membrane attack complex, MAC), natomiast w układzie pro-PO produkowana jest melanina i dochodzi do enkapsulacji patogenu.

Do najważniejszych, wspólnych cech obu układów zaliczyć można uruchamianie kaskady proteaz, wytwarzanie w trakcie aktywacji opsonin wspomagających fagocytozę oraz pobudzenie innych elementów układu odpornościowego do walki z patogenem. Można więc stwierdzić, że oba układy dopełniają działanie układu odpornościowego. W obu mechanizmach znaczącą rolę pełnią proteazy, które nie tylko biorą udział w aktywacji pro-PO i układu dopełniacza, ale także np. w programowanej śmierci komórki i bezpośrednim niszczeniu patogenów (KAUSCHKE i współaut. 2007). Większość proteaz zaangażowanych w aktywację dopełniacza u kręgowców klasyfikowana jest do dwóch rodzin: Bf (czynnik B), składającej się z Bf, C2, oraz rodziny MASP (ang. mannose-binding lectin MBL associated serine protease) w skład, której wchodzi MASP-1, MASP-2, MASP-3, C1 r i C1s. Razem z rodziną proteaz C3, C4 i C5 budują one centralną część układu aktywującego dopełniacz (SEKINE i współaut. 2013).

Warto w tym miejscu wspomnieć, że składniki układu dopełniacza znaleziono również u bezkręgowców. U jeżowca purpurowego (*Strongylocentrotus purpuratus*) stwierdzono występowanie prostej wersji tego układu, z homologami głównych proteaz: Sp-C3 i Sp-Bf. Genom jeżowca ujawnił też kolejne sekwencje kodujące białka z wiązaniami tioestrowymi, takie jak Sp-C3-2 (kolejny homolog C3), kilka genów homologicznych do czynnika B kręgowców, lektynę MBL wiążącą mannan i fikolinę (SMITH 1996).

Uważa się, że aktywacja dopełniacza bezkręgowców zachodziła w analogiczny sposób, jak u kręgowców, a najważniejszą jego funkcją u tych zwierząt wydaje się być wytwarzanie opsonin.

Sadzi się, że ze względu na bardziej efektywne działanie w przypadku zwierząt bezkręgowych układ profenoloksydazy częściowo uzupełnia, a częściowo zastępuje działanie dopełniacza.

PODSUMOWANIE

Układ dopełniacza kręgowców oraz kaskada profenoloksydazy u bezkręgowców, to charakterystyczne elementy wrodzonej, humoralnej odpowiedzi układu odpornościowego. Kaskada układu dopełniacza w konse-

kwencji odpowiada za powstawanie elementów, których głównym zadaniem jest: opsonizacja, pobudzenie chemotaksji fagocytów oraz powstanie kompleksu atakującego błonę, którego zadaniem jest liza komórek docelowych. Profenoloksydaza jest kluczowym elementem w procesie tworzenia melaniny. Wpływa na obronę komórkową, enkapsulację, degranulację czy gojenie ran, ale też na koagulację osocza. Oba omawiane układy pełnią podobne funkcje u odrębnych grup zwierząt. Przede wszystkim aktywność ich związana jest z unieszkodliwieniem patogenu, a także wytwarzaniem czynników, które mają na celu aktywację odpowiedzi komórkowej, a co za tym idzie dopełnienie i wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej organizmu.

PODZIĘKOWANIA

Autorki dziękują bardzo dr hab. Magdalenie Chadzińskiej z Zakładu Immunologii Ewolucyjnej Uniwersytetu Jagiellońskiego za cenne wskazówki. Badania realizowane były z funduszy K/ZDS/004831.

Streszczenie

Układ fenoloksydazy (pro-PO) u wielu grup organizmów bezkręgowych jest elementem humoralnej odpowiedzi immunologicznej i stanowi pierwszą linię obrony w walce z patogenami. Fenoloksydaza (PO) jest częścią złożonego systemu, w którego skład wchodzi: proteiny, białka opsonizujące patogeny oraz inhibitory proteiny, które tworzą razem układ aktywacji profenoloksydazy. Ta wrodzona reakcja immunologiczna możliwa jest dzięki produkcji toksycznych substancji, chinonów i innych krótkotrwałych elementów wytwarzanych w reakcjach pośrednich aktywacji kaskady pro-PO. Substancje te są również zaangażowane w produkcję elementów o dłuższym okresie biologicznego półtrwania, takich jak melanina, w efekcie odkładania, której, dochodzi do enkapsulacji patogenów. Ponadto, produkty pośrednie reakcji w szlaku melaniny biorą udział w procesie gojenia ran poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych w uszkodzonych tkankach, powodując sklerotyzację (np. u owadów). Najnowsze badania również sugerują, że kaskada melanizacji (układ aktywacji profenoloksydazy) jest ściśle związana z stymulacją obrony komórkowej poprzez wspomaganie fagocytozy. U dżdżownic, układ pro-PO jest zaangażowany w tworzenie „ciał brunatnych”, w których syntetyzowane są melanina i lipofuscyna. Dlatego też nie dziwi, że wiele badań jednoznacznie wskazuje na znaczenie reakcji melanizacji w wyniku kontaktu patogen-gospodarz, w tym zakażeń bakteryjnych.

Choć dużo wiadomo o układzie pro-PO i jego roli w odporności, wciąż nie są znane wszystkie białka i elementy zaangażowane w kaskadę układu u różnych grup organizmów bezkręgowych.

LITERATURA

BECK M. H., STRAND M. R., 2007. A novel polydnavirus protein inhibits the insect prophenoloxidase activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 19267-19272.

- BLOCH B., 1917. *Chemische untersuchungen uber das specifische pigmentbildende ferment der haut, die dopaoxydase*. Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie 98, 226-254.
- CAMMARATA M., PARRINELLO N., 2009. The ascidian prophenoloxidase activating system. *Invertebr. Surv. J.* 6, 67-76.
- CERENIUS L., LEE B. L., SODERHALL K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29, 263-271.
- COOPER E. L., 1996. *Earthworm immunity*. [W:] *Invertebrate Immunology*. RINCEVICH B., MÜLLER W. E. G. (Red.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 10-45.
- CYTRYŃSKA M., 2009. O odporności bez przeciwciał. *Post. Biol. Kom.* 36, 309-324.
- DA SILVA C., DUNPHY G. B., RAU M. E., 2000. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. *Devel. Compar. Immunol.* 24, 367-379.
- DECKER H., RYAN M., JAENICKE E., TERWILLIGER N., 2001. SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurytemora californicum*, and *Cancer magister*. *J. Biol. Chem.* 276, 17796-17799.
- FIELD S. G., KURTZ J., COOPER E. L., MICHIELS N. K., 2004. Evaluation of an innate immune reaction to parasites in earthworms. *J. Invertebr. Pathol.* 86, 45-49.
- GAO H., LI F., DONG B., ZHANG Q., XIANG J., 2009. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase (Pro-PO) cDNA from *Fenneropenaeus chinensis* and its transcription injected by *Vibrio anguillarum*. *Mol. Biol. Rep.* 36, 1159-1166.
- GOLLAS-GALVAN T., HERNANDEZ-LOPEZ J., VARGAS-ALBORES F., 1997. Effect of Calcium on the Prophenoloxidase System Activation of the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Compar. Biochem. Physiol.* 117A, 419-425.
- GOLAB J., JAKÓBISIAK M., LASEK W., STOKŁOSA T., 2009. *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- HERBERT E. E. GOODRICH-BLAIR H., 2007. Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 634-646.
- JIANG H., KANOST M., R., 1997. Characterization and functional analysis of 12 naturally occurring reactive site variants of serpin-1 from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 94, 1082-1087.
- KANOST M. R., GORMAN M. J., 2008. Phenoloxidases in insect immunity. [W:] *Insect Immunology*. BECKAGE N. E. (red.). Academic Press, San Diego, USA, 69-96.
- KAUSCHKE E., MOHRIG W., COOPER E. L., 2007. Coelomic fluid as basic components of innate immunity in earthworms. *Eur. J. Soil Biol.* 43, 110-115.
- KLASKA I., NOWAK J. Z., 2007. Rola układu dopełniacza w fizjologii i patologii. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 61, 167-177.
- KURTZ J., 2005. Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol.* 4, 186-192.
- KURTZ J., SAUER K.P., 2001. Gender Differences in Phenoloxidase Activity of *Panorpa vulgaris* Hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 78, 53-55.
- KURTZ J., ARMITAGE S. A., 2006. Alternative adaptive immunity in invertebrates. *Trends Immunol.* 11, 493-496.
- LECLERC V., PELTE N., CHAMY L. E., MARTINELLI C., LIGOXYGAKIS P., HOFFMANN J. A., REICH-

- HART J.-M., 2006. *Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in Drosophila*. EMBO 7, 231-235.
- LIANG Z., SOTTRUP-JENSEN L., ASPÁN A., HALL M., SÖDERHÄLL K., 1997. *Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 6682-6687.
- LOCKEY T.D., OURTH D.D., 1992. *Phenoloxidase activity independent of calmodulin and calcium in hemolymph of Heliothis virescens (Lepidoptera: Noctuidae) larvae*. J. Econ. Entomol. 85, 1069-1071.
- NOONIN CH., JIRAVANICHPAISAL P., SODERHALL I., MERINO S., TOMAS J.M., SODERHALL K., 2010. *Melanization and Pathogenicity in the Insect, Tenebrio molitor, and the Crustacean, Pacifastacus leniusculus, by Aeromonas hydrophila AH-3*. PLoS One 5, e15728.
- PANG Q., ZHANG S., WANG C., SHI X., SUN Y., 2004. *Presence of prophenoloxidase in the humoral fluid of amphioxus Branchiostoma belcheri tsingtauense*. Fish Shellfish Immunol. 17, 477-487.
- PANG Q., ZHANG S., ZHAO B., 2009. *Induction of prophenoloxidases in the humoral fluids of amphioxus Branchiostoma belcheri by Vibrio alginolyticus and Escherichia coli*. Fish Shellfish Immunol. 26, 669-671.
- PROCHAZKOVA P., SILEROVA M., STIJLEMANS B., DIEU M., HALADA P., JOSKOVA R., BESCHIN A., DE BAETSELIER P., BILEJ M., 2006. *Evidence for proteins involved in prophenoloxidase cascade Eisenia fetida earthworms*. J. Compar. Physiol. B 176, 581-587.
- SEKINE H., TAKAHASHI M., IWAKI D., FUJITA T., 2013. *The role of MASP-1/3 in complement activation*. Adv. Exp. Med. Biol. 735, 41-53.
- SMITH V. J., 1996. *The prophenoloxidase activating system: a common defence pathway for deuterostomes and protostomes?* Adv. Compar. Environ. Physiol. 23, 75-114.
- SODERHALL K., CERENIUS L., 1998. *Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity*. Curr. Opin. Immunol. 10, 23-28.
- TONG Y., KANOST M. R., 2005. *Manduca sexta serpin-4 and serpin-5 inhibit the prophenol oxidase activation pathway: cDNA cloning, protein expression, and characterization*. J. Biol. Chem. 280, 14923-14931.
- VALEMBOIS P., LASSEGUES M., ROCH P., 1992. *Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworm Eisenia fetida Andrei and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells*. Devel. Compar. Immunol. 16, 95-101.
- VALEMBOIS P., SEYMOUR J., LASSEGUES M., 1994. *Evidence of lipofuscin and melanin in the brown body of the earthworm Eisenia fetida andrei*. Cell Tissue Res. 277, 183-188.
- WANG Y., JIANG H., 2007. *Reconstitution of a branch of the Manduca sexta prophenoloxidase activation cascade in vitro: Snake-like hemolymph proteinase 21 (HP21) cleaved by HP14 activates prophenoloxidase-activating proteinase-2 precursor*. Insect Biochem. Mol. Biol. 37, 1015-1025.
- WIENS M., KOZIOL C., BATEL R., MÜLLER W. E., 1998. *Phenylalanine hydroxylase from the sponge Geodia cydonium: implication for alloreognition and evolution of aromatic amino acid hydroxylases*. Devel. Compar. Immunol. 22, 469-478.
- ZHANG S. C., LI G. R., 2000. *Presence of phenoloxidase and prophenoloxidase in the epidermal cells and the epidermis mucus of the lancelet Branchiostoma belcheri tsingtauense*. Mechan. Devel. 96, 107-109.
- ZHAO P., LU Z., STRAND M. R., JIANG H., 2011. *Antiviral, antiparasitic, and cytotoxic effects of 5,6-dihydroxyindole (DHI), a reactive compound generated by phenoloxidase during insect immune response*. Insect Biochem. Mol. Biol. 41, 645-652.

KOSMOS 65, 1, 33-41, 2016

PROPHENOLOXIDASE SYSTEM (pro-PO) IN INVERTEBRATES. MECHANISMS OF INNATE IMMUNE RESPONSE

JUSTYNA BANAŚ, JOANNA HOMA

Department of Evolutionary Immunology, Institute of Zoology, Jagiellonian University, Gronostajowa 9, 30-387 Krakow,
e-mail: joanna.homa@uj.edu.pl

Summary

In many groups of invertebrates prophenoloxidase cascade (pro-PO), an element of humoral innate immune system, is the first line of defense in the fight against pathogens. Phenoloxidase (PO) is a part of a complex system of pattern recognition, made of proteinases and proteinase inhibitors, constituting the so-called prophenoloxidase-activating system. This innate immune reaction provides toxic quinone substances and other short-lived reaction intermediates, involved in formation of more long-lived products, such as melanin, that physically encapsulate pathogens. Furthermore, reaction intermediates in the melanin pathway participate in the wound healing process by the formation of covalent links in damaged tissues resulting in sclerotization (e.g. in insects). Recent evidence also strongly implies that the melanization cascade (the prophenoloxidase activating system) provides, or is intimately associated with, the appearance of factors stimulating cellular defense by aiding phagocytosis. In annelides, the pro-PO system is strictly involved in encapsulation and formation of "brown bodies", in which melanin and lipofuscin are synthesized. Therefore, it comes as no surprise that several studies have shown unequivocally the importance of the melanisation reaction for the outcome of several specific pathogen-host encounters, including bacterial infections.

Although much is known about the proPO system and its role in the immunity, still some details of its activation and the role of specific proteins and regulating factors in various groups of invertebrates remain to be elucidated.