

UDZIAŁ BIAŁEK ZAWIERAJĄCYCH POWTÓRZENIA BOGATE W LEUCYNĘ (LRR) W MOLEKULARNYCH MECHANIZMACH ODPORNOŚCI WRODZONEJ ROŚLIN I ZWIERZĄT*

INVOLVEMENT OF LEUCINE RICH REPEATS (LRR) DOMAIN
CONTAINING PROTEINS IN MOLECULAR MECHANISMS
OF INNATE IMMUNITY OF PLANTS AND ANIMALS

Zbysław SOŃDKA¹, Andrzej TRETYN¹, Jacek SZELIGA², Marek JACKOWSKI²

¹Zakład Biotechnologii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej oraz

²Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologii i Onkologii Collegium
Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie: Mechanizmy odporności nieswoistej są pierwszą, a u większości organizmów jedyną linią obrony przeciw patogennym drobnoustrojom. Działanie tych mechanizmów zaczyna się od rozpoznania charakterystycznego wzoru molekularnego związanego z patogenem (PAMP) przez białka zawierające powtórzenia bogate w leucynę (LRR). Roślinne białka „R” zbudowane są z domen TIR, NBD oraz LRR i specyficznym rozpoznają patogeny pochodzenia grzybowego, bakteryjnego, jak i wirusowego. Po rozpoznaniu obecności patogena zapoczątkowują one kaskadę sygnałową, w większości przypadków prowadzącą do wywołania reakcji nadwrażliwości w rejonie infekcji. Najlepiej dotąd poznanymi zwierzęcymi białkami rozpoznającymi PAMP są receptory Toll-podobne. Podczas infekcji przy pomocy zewnętrznej domeny LRR wiążą one cząsteczki patogena. Oddziaływania te prowadzą do wystąpienia reakcji immunologicznej: produkcji chemokin, cytokin, regulatorów transkrypcji, translacji i procesów proteolitycznych oraz białek sekrecyjnych, takich jak składniki układu dopełniacza. Białka z rodziny NOD to ostatnio odkryte wewnątrzkomórkowe receptory PAMP. Pod względem struktury przypominają one roślinne białka „R”. Ich funkcja polega na rozpoznawaniu składników bakteryjnych ścian komórkowych i uruchamianiu reakcji zapalnych poprzez aktywację czynnika jądrowego NF-κB. Wykazano, że obecność mutacji w białku NOD2 ma związek z występowaniem choroby Leśniowskiego-Crohna, młodzieńczej sarkoidozy, syndromu Blau’a oraz pewnych typów nowotworów.

Słowa kluczowe: odporność nieswoista, wzory cząsteczkowe związane z patogenami, PAMP, domena LRR, receptory Toll-podobne, NOD, CARD.

*Praca powstała podczas realizacji grantu pomostowego (552 CM/B) Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Summary: Innate immunity is the first and in most organisms sole line of defence against pathogenic microorganisms. The activity of mechanisms of innate immunity starts with recognition of pathogen-associated molecular pattern (PAMP) by proteins that contain leucine rich repeats (LRR) domain. Plant proteins 'R' contain TIR, NBD and LRR domains and recognize specifically fungal, bacterial or viral pathogens. After pathogen detection signal cascade is initiated that results in most cases with hypersensitive reaction in region of infection. In animals Toll-like receptors are best described PAMP-recognizing molecules to date. With its extracellular LRR domain they can bind pathogen-derived molecules but also molecules that are produced by host organism during infection. Such interaction leads to immune reaction: production of chemokines, cytokines, regulators of transcription, translation and proteolytic processes or synthesis of secretional proteins including these belonging to complement system. NOD proteins are recently discovered mammalian intracellular PAMP receptors that resembles plant 'R' proteins by its domain structure. They recognize components of bacterial cell wall and trigger inflammatory reaction by activation of nuclear factor (NF- κ B). Mutations in NOD protein NOD2 has been found to be related to Crohn disease, early onset sarcoidosis, Blau syndrom and certain types of cancer.

Key words: innate immunity, pathogen-associated molecular pattern, PAMP, LRR domain, Toll-like receptors, NOD, CARD.

WSTĘP

Historia patogennych mikroorganizmów pasożytujących na organizmach wyższych jest równie długa jak historia istnienia samych wielokomórkowców. Zarówno u roślin [77], jak i u zwierząt [52] stwierdzono występowanie złożonych systemów mających za zadanie ochronę przed patogenami. Systemy te wyewoluowały pod wpływem wzajemnego oddziaływania patogena i atakowanego przez niego organizmu, co skutkowało lepszym rozprzestrzenianiem się patogenów wykształcających nowe cechy pozwalające pokonać bariery odpornościowe gospodarza. Z drugiej strony wśród gospodarzy większe szanse na przekazanie swych genów potomstwu miały osobniki wyposażone w doskonalszy układ odpornościowy [58].

W związku z odmiennymi strategiami życia roślin i zwierząt, różna jest specyfika atakujących je pasożytów oraz strategii i mechanizmów obrony przed nimi. Zwierzęta mają zdolność ruchu, zatem mogą sobie przekazywać patogeny. Mają także mniej lub bardziej rozwinięty układ krążenia z wyspecjalizowanymi w obronie komórkami żernymi oraz komórkami produkującymi przeciwciała [52]. Rośliny prowadzą osiadły tryb życia, co wymusza na ich pasożytach zdolność do poruszania się lub korzystania z wektorów zwierzęcych umożliwiających ich przenoszenie na gospodarza. U roślin, w trakcie ich ewolucji, nie wykształcony został układ krążenia. Jednocześnie nie mają one krytycznych organów, których uszkodzenie prowadziłoby do śmierci całego organizmu. Dlatego najczęstszą odpowiedzią rośliny na infekcję jest reakcja nadwrażliwości (ang. *hypersensitive response*; HR), w wyniku której komórki w miejscu zaatakowanym obumierają, zanim patogen zdąży rozprzestrzenić się poza miejsce ataku [77].

1. UKŁAD ODPORNOŚCI WRODZONEJ

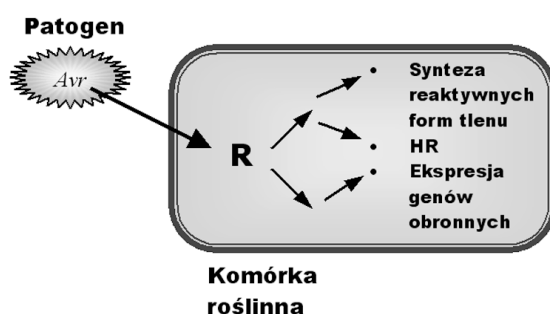
U zwierząt i człowieka wyróżnia się odporność nabytą i wrodzoną. Ta pierwsza wykształca się w czasie życia osobniczego pod wpływem kontaktów z patogenami. Funkcjonującą również u roślin odporność wrodzoną tworzy system mechanizmów obronnych, działających niezmiennie od początku życia obu grup organizmów. System odporności wrodzonej jest ewolucyjnie bardzo stary. Jego składniki zostały odnalezione u większości organizmów, a receptory do niego należące charakteryzują się bardzo zbliżoną budową u roślin, zwierząt bezkręgowych oraz kręgowców, w tym również u człowieka [17, 32, 60, 67].

W odróżnieniu od receptorów układu odporności nabytej, które bardzo specyficznie rozpoznają konkretne epitopy odpowiedniego antygeny, receptory należące do układu odporności wrodzonej rozpoznają konserwatywne motywy charakterystyczne dla całej grupy patogenów: lipopolisacharydy (LPS), peptydoglikany (PGN), bakteryjne sekwencje CpG DNA i inne, zwane ogólnie wzorami cząsteczkowymi związanymi z patogenem (ang. *pathogen-associated molecular patterns*; PAMP). W związku z tym reakcje organizmu wywołane przez aktywację systemu odporności wrodzonej są niespecyficzne. U zwierząt wykrycie obecności patogena przez receptory układu odporności wrodzonej prowadzi do zwiększonej produkcji cytokin, a zwłaszcza interferonów (IFN), czynników martwicy nowotworów (TNF), interleukin (IL) oraz chemokin. Do reakcji systemu odporności wrodzonej zalicza się także uśmiercanie zainfekowanych lub uległych transformacji nowotworowej komórek przez limfocyty NK, makrofagi, komórki dendrytyczne i układ dopełniacza w sposób niezależny od głównego kompleksu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*; MHC) [52].

2. BIAŁKA R – KLUCZOWY ELEMENT SYSTEMU ODPORNOŚCI WRODZONEJ ROŚLIN

W latach 40. XX wieku, stosując metody genetyki klasycznej Flor opracował model „gen na gen”, opisujący mechanizm działania odporności wrodzonej roślin [30]. Odkrył, że do wystąpienia odpowiedzi na atak patogena konieczne jest współdziałanie produktu roślinnego genu, określonego jako gen odporności (ang. *resistance*; *R*) oraz pochodzącego od patogena czynnika (elicitora), będącego produktem genu awirulencji (ang. *avirulence*; *Avr*). Oba rodzaje genów dziedziczone są jako dominujące.

Patogen atakujący roślinę jest rozpoznawany przy udziale roślinnych genów odporności (*R*), które aktywują się pod wpływem obecności odpowiadających im genów awirulencji (*Avr*), ulegających ekspresji w komórkach patogena (ryc. 1). Odpowiedź protekcyjna rośliny następuje tylko w przypadku jednoczesnego występowania odpowiedniego genu *Avr* u patogena i specyficznego dla niego genu *R* u rośliny. W innym przypadku odpowiedzi nie ma i choroba może się rozwijać [77, 84]. Tak więc



RYCINA 1. Model „gen na gen”. W modelu „gen na gen” wyróżnia się cztery etapy reakcji komórki roślinnej na atak patogena: dostarczenie cząsteczki elicitora do komórki roślinnej; rozpoznanie elicitora przez komórkę roślinną przy udziale białka R, przekazanie sygnału, aktywacja mechanizmów obronnych (na podstawie [84], zmodyfikowane)

ten rodzaj odporności opiera się na informacji wpisanej w genom rośliny, na podstawie której tworzy ona ściśle wyspecjalizowane cząsteczki białka, wykrywające konkretny gatunek patogena.

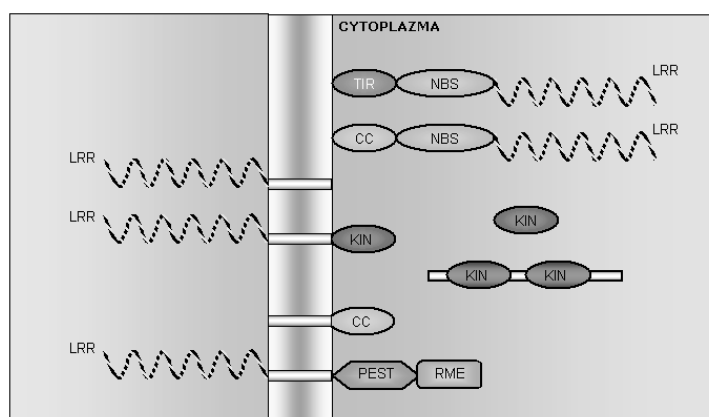
Jak dotąd opisano zaledwie jeden przypadek bezpośredniego oddziaływania pomiędzy białkiem R i czynnikiem wirulencji. Występujące u ryżu białko Pita, poprzez swoją domenę LRR (patrz poniżej) łączy się z białkiem Avr-Pita, pochodzącym od pasożytującego na ryżu grzyba *Magnaporthe grisea*, wywołując reakcję odpornościową [53]. W wielu innych badanych układach nie udało się jednak potwierdzić takiego oddziaływania [62].

Obecnie coraz więcej dowodów przemawia za tzw. teorią strażnika, w której białka R nie rozpoznają produktów genów *Avr* bezpośrednio, lecz są częścią większego kompleksu. Czynniki *Avr* są wprowadzane do wnętrza komórki, by zaatakować pewne krytyczne punkty systemu metabolicznego komórki i umożliwić inwazję patogena. Białko R działa jako strażnik, pilnujący prawidłowego działania potencjalnie atakowanego punktu. Wykrywa przyłączenie czynnika wirulencji do cząsteczki docelowej, uruchamiając reakcję odpornościową [28].

W ostatnich latach odkryto naturę produktów genów *R*. Białka kodowane przez te geny sklasyfikowano w pięciu rodzinach [28]. Największa z nich obejmuje polipeptydy mające miejsce wiązania nukleotydu (ang. *nucleotide binding site*; NBS) oraz domeny zawierające powtórzenia bogate w leucynę (ang. *nucleotide binding site and leucine-rich repeat domains*; *NBS-LRR proteins*) (ryc. 2). W komórce białka te występują w cytoplazmie, prawdopodobnie w bliskim sąsiedztwie błony komórkowej i mogą odpowiadać pośrednio lub bezpośrednio za wykrycie obecności patogena [20]. Zsekwencjonowanie genomu *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnika pospolitego) pozwoliło na identyfikację wszystkich 149 genów należących do rodziny *NBS-LRR* [67].

Stosując metody genetyki klasycznej wykazano, że wiele genów *R* ułożonych jest w genomie pakietowo [47]. Komputerowe analizy zsekwencjonowanych genomów roślinnych potwierdziły te odkrycia u *Arabidopsis* i ryżu [11, 66, 73].

Okolo 2/3 genów *NBS-LRR* (109 ze 149) u *Arabidopsis* jest ułożonych w 43 grupy. Największa z nich (*RPP4/RPP5*) znajduje się na chromosomie 4 i zawiera sekwencje nukleotydowe kodujące 7 różnych białek *NBS-LRR* [67].



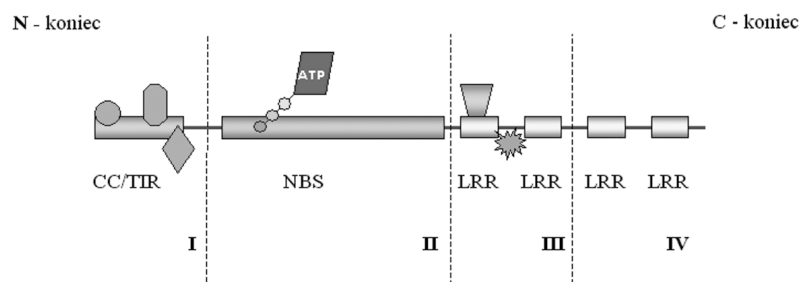
RYCINA 2. Rodzaje białek R. Większość białek R zawiera powtórzenia bogate w leucynę (LRR), odpowiedzialne za specyficzną rozpoznawanie patogena. Największą grupę wśród białek R tworzą białka NBS-LRR, zawierające na N-końcu domenę TIR lub CC. Rodzina eLRR to białka z zewnątrzkomórkową domeną LRR połączoną z domeną transbłonową. Po stronie cytoplazmatycznej plazmolemy, może być do nich dołączona domena o aktywności kinazy serynowo-treoninowej (KIN). Białko RPW8 z *Arabidopsis* składa się jedynie z domeny transbłonowej oraz przypuszczalnej domeny CC. Odkryte u pomidora białko Ve2 zawiera zewnątrzkomórkową domenę LRR, natomiast po stronie cytoplazmatycznej błony komórkowej ma domenę PEST odpowiedzialną za degradację białek oraz krótkie motywy mające związek z zależną od receptora endocytozą (RME) (na podstawie [54], zmodyfikowane)

W obrębie grupy białek NBS-LRR można wyróżnić dwa podtypy charakteryzujące się występowaniem bądź brakiem regionu homologicznego do domeny TIR (*Toll/Interleukin-1 Receptor*) w rejonie N-końcowym (ryc. 3). TIR jest wysoce konserwatywnym motywem, zidentyfikowanym pierwotnie u owadów, a następnie u ssaków, który podobnie jak u roślin bierze udział w procesach odpowiedzi wrodzonej na atak patogenów [21, 65, 66].

Większość białek pozbawionych domeny TIR ma N-końcowy motyw CC (ang. *coiled coil*), który zlokalizowany jest w odległości 25 do 50 reszt aminokwasowych (aa) od N-końca. Białka te tworzą podgrupę białek NBS-LRR nazwaną CNL (CC-NBS-LRR). Nie stwierdzono przypadku, aby motywy CC oraz TIR występowały obok siebie w obrębie tego samego polipeptydu [65, 67].

Występowanie miejsc wiązania nukleotydu (NBS) stwierdzono u wielu różnych białek. Ich funkcja polega na wiązaniu ATP lub GTP [75, 86]. Zdolność roślinnych białek NBS-LRR do wiązania nukleotydów (ATP, dATP, ADP, dADP), jak również ich hydrolizy została wykazana dla białek I2 oraz Mi pomidora [78].

Na swym C-końcu białka NBS-LRR mają region o zmiennej długości, zbudowany z różnej liczby powtórzeń bogatych w reszty leucynowe (LRR) [15, 16, 21, 37]. Powtórzenia te występują w liczbie od 8 do 25 (najczęściej 14) [67]. Wykazano, że oprócz wiązania różnego typu ligandów domeny LRR mogą brać udział w tworzeniu oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych, odpowiedzialnych za modulację sygnału [48].



RYCINA 3. Budowa białek NBS-LRR: I – miejsce oddziaływania z przekaźnikami sygnału *downstream*, II – miejsce przyłączenia i hydrolizy ATP lub GTP z dostarczeniem energii koniecznej dla uwolnienia sygnału, III – miejsce przyłączenia czynników modulujących sygnał, IV – miejsce oddziaływania z aktywatorem *upstream* (na podstawie [67], zmodyfikowane)

3. ZWIERZĘCE RECEPTORY UKŁADU ODPORNOŚCI WRODZONEJ

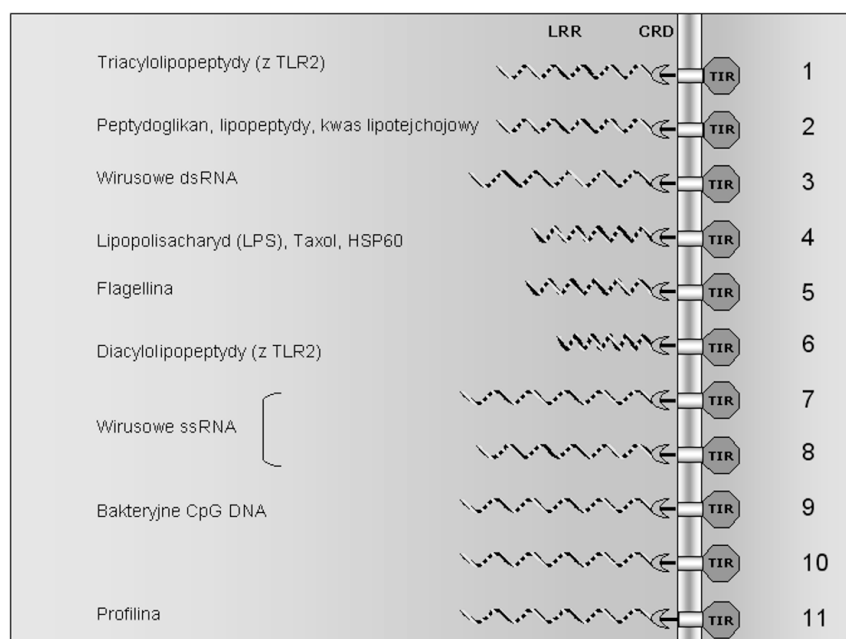
3.1. Budowa i działanie TLR

Najważniejsze ze zwierzęcych receptorów wchodzących w skład układu odporności wrodzonej należą do rodziny znanej jako TLR (ang. *Toll-Like Receptors*). Gen *toll* został odkryty w roku 1980 w genomie *Drosophila melanogaster* przez Nusslein-Volhard i Wieschausa. Zidentyfikowano go jako gen odpowiedzialny za zróżnicowanie grzbietowo-brzuszne w rozwoju muszki owocowej i nazwano *toll*, co w języku niemieckim oznacza „światny, klawy” [69]. W 1995 r. za badania te wyżej wymienieni naukowcy zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny. Później okazało się także, że ten sam gen u dorosłych osobników muszki owocowej jest odpowiedzialny za odporność na infekcje grzybowe [60].

Podobne geny oraz ich produkty zostały odnalezione także u innych organizmów – zarówno bezkręgowców, jak i kręgowców, a także u roślin [17, 39, 67].

Białka kodowane przez geny podobne do *toll* określane są mianem TLR. U człowieka motyw identyczny z TLR odkryto w receptorze interleukiny 1, gdzie stanowi on cytozolową domenę białka. TLR uważane są obecnie za najważniejsze cząsteczki rozpoznające PAMP, znajdujące się po zewnętrznej stronie błony komórkowej [32].

Do tej pory u człowieka odkryto 11 różnych typów TLR. Każdy z nich odpowiada za rozpoznanie specyficznej grupy cząsteczek charakterystycznych dla patogena (ryc. 4). Wykazano także, że TLR zdolne są także do rozpoznawania pewnych cząsteczek endogennych. Obserwacje te są zgodne z założeniami modelu zagrożenia (ang. *danger model*), według której do aktywacji odpowiedzi immunologicznej dochodzi nie tylko poprzez działanie ligandów pochodzących od patogena, ale też poprzez działanie endogennych cząsteczek, tzw. sygnałów zagrożenia, uwalnianych przez ginące lub martwe komórki [63]. Do endogennych ligandów TLR należą: białka szoku cieplnego, białko A surfaktantu płucnego i kwas hialuronowy [35, 80, 83].



RYCINA 4. Receptory TLR oraz ich ligandy. Objaśnienia: LRR – reszty bogate w leucynę; CRD – domena bogata w cysteinę (na podstawie [82], zmodyfikowane)

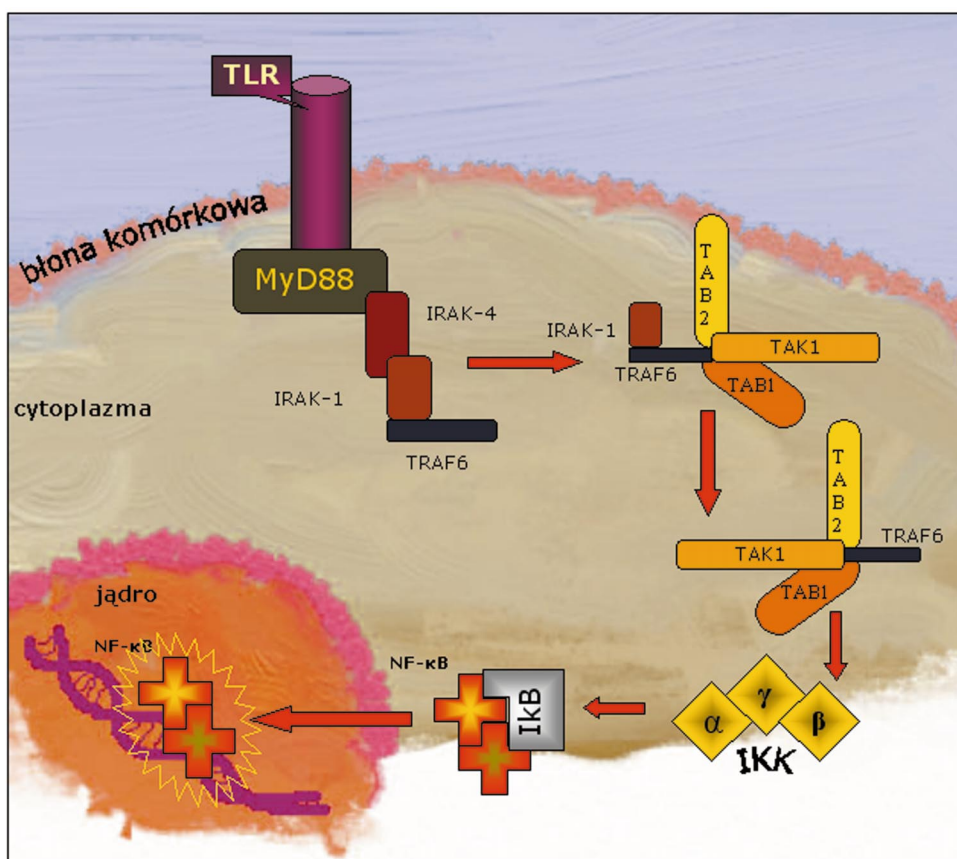
Receptory TLR są zlokalizowane na powierzchni niektórych komórek układu immuno-logicznego oraz na powierzchni innych typów komórek w rejonach ciała, które w naturalnych warunkach pozostają sterylne [7]. Niższą ekspresją TLR charakteryzują się natomiast komórki nabłonka, w miejscach stałego kontaktu z mikroflorą, np. w świetle jelita [1]. Sposobem na uniknięcie stałego pobudzania receptorów TLR przez bakterie jest odpowiednie ich umiejscowienie w obrębie komórki lub tkanki. Wykrywa-jący obecność bakteryjnej flagelliny TLR5 jest zlokalizowany wyłącznie w bazolateralnej części komórek nabłonka jelit, co powoduje, że jego aktywacja zachodzi dopiero po translokacji flagelliny przez warstwę komórek nabłonka [33]. Podobnie TLR4 ulega ekspresji w komórkach nabłonkowych krypt jelita, gdzie bakterie występują w o wiele mniejszych ilościach niż ma to miejsce w świetle jelita. TLR4 nie jest jednak w tym przypadku białkiem powierzchniowym, ale umiejscowiony jest w błonie aparatu Golgiego. Wykazano, że LPS jest transportowany przez komórki do tych organelli, gdzie następuje aktywacja TLR4 i inicjacja odpowiedzi zapalnej [43]. Wewnątrz-komórkowa lokalizacja TLR4 została odkryta także w nabłonku płuc, gdzie receptor ten pełni kluczową rolę w powstawaniu odpowiedzi immunologicznej na chorobotwórcze bakterie Gram-ujemne [36].

TLR ssaków są transbłonowymi białkami mającymi zewnątrzkomórkową domenę LRR, zawierającą wielokrotne powtórzenia sekwencji aminokwasowych bogate w leucynę oraz wewnątrzkomórkową domenę TIR (*Toll-IL-1-Receptor*), która oddziałuje

z białkami rozpoczynając kaskadę sygnałową, kończącą się w jądrze komórkowym uruchomieniem ekspresji czynników obronnych [2].

Wynikiem przyłączenia ligandu do receptora TLR jest uruchomienie kaskady sygnałowej z udziałem takich białek, jak: MyD88, kinaza IRAK (ang. *IL-1RI-associated protein kinases*), kinaza TAK1 (ang. *transforming growth factor- β -activated kinase*), białko wiążące kinazę TAK1 – TAB1 i TAB2 oraz czynnik związany z receptorem TNF – TRAF6 (ryc. 5).

Pobudzenie receptora TLR sprawia, że cząsteczka adaptorowa przyłącza się do kompleksu receptorowego, co inicjuje proces dołączania się kolejnych cząsteczek. Pierwszą zidentyfikowaną cząsteczką adaptorową dla receptorów TLR jest MyD88. Do niej, po związaniu się z receptorem TLR, przyłączają się kinazy IRAK-1 oraz IRAK-4. W trakcie formowania tego kompleksu dochodzi do aktywacji IRAK-4, która fosforyluje IRAK-1, co z kolei indukuje przyłączenie TRAF6 do kompleksu receptorowego. Dołączenie czynnika TRAF6 powoduje zmiany konformacyjne białek tworzących kompleks receptorowy, prowadzące do oddysocjowania od niego heterotrimeru IRAK-4/IRAK-1/ TRAF6. Białka te przyłączają się do innego, związanego z błoną komórkową kompleksu, w skład którego wchodzi TAK1, TAB1 i TAB2. W

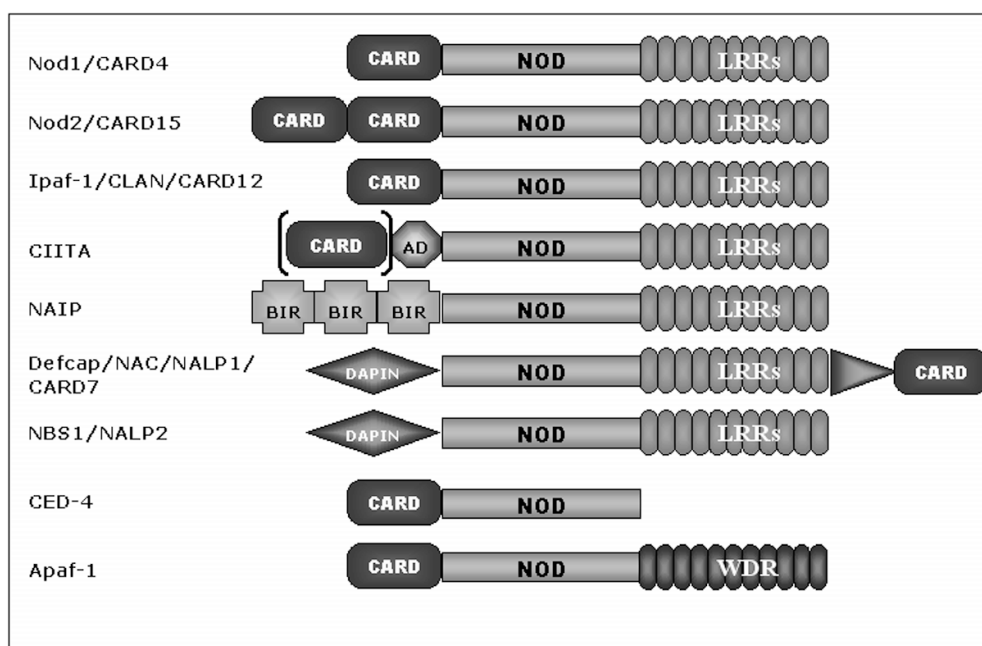


RYCINA 5. Szlak sygnałowy zależny od TLR, opis w tekście (na podstawie [4], zmodyfikowane)

efekcie tego zachodzi fosforylacja TAB2 i TAK1 oraz ich translokacja wraz z TAB1 i TRAF6 do cytozolu. Tam w wyniku kolejnej aktywacji TAK1 dochodzi do oddziaływania z kompleksem kinazy I ϵ B, co prowadzi do aktywacji czynnika jądrowego NF- κ B i indukcji transkrypcji genów kodujących chemokiny, regulatory transkrypcji, translacji i procesów proteolitycznych oraz białka sekrecyjne, takie jak składniki układu dopełniacza [4, 81]. Ponadto aktywacja TAK1 w obrębie cytoplazmy powoduje aktywację kinaz MAP i JNK [3, 13].

3.2. Białka NOD i ich rola w mechanizmach odporności wrodzonej

Jak wspomniano wcześniej, lokalizacja zewnątrzkomórkowych receptorów TLR ogranicza się głównie do sterylnych rejonów ciała, natomiast w miejscach stałego kontaktu z bakteriami receptorów tych brak. Występują natomiast w niektórych tkankach wewnątrzkomórkowe odmiany TLR, dzięki czemu alarm ma miejsce dopiero po pokonaniu przez ligand bariery nabłonka. Niedawno u ssaków wykryto rodzinę genów *NOD* (ryc. 6), kodujących peptydy przypominające roślinne białka R. Białka NOD należą do rodziny cytoplazmatycznych białek CATERPILLER (*CARD*, *Transcription*



RYCINA 6. Białka z rodziny NOD i domeny wchodzące w ich skład. Domena CARD białka CIITA ujęta w nawias występuje w izoformie tego peptydu ulegającej ekspresji w komórkach dendrytycznych. W pobliżu C-końca białka CARD7 umiejscowiona jest niekompletna domena DAPIN. Objasnienia: **AD** – *Activation Domain*; **BIR** – *Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repeat*; **CARD** – *Caspase Recruitment Domain*; **DAPIN** – *Domain in Apoptosis and Interferon response*; **LRRs** – *Leucine Rich Repeats*; **NOD** – *Nucleotide binding Oligomerisation Domain*; **WDR** – *WD40 Repeats* (na podstawie [51], zmodyfikowane)

Enhancer, R(purine)-binding, Pyrin, Lots of Leucine Repeats), uczestniczących w procesach regulacji apoptozy i odpowiedzi zapalnej. U człowieka w skład rodziny CATERPILLER wchodzi około dwudziestu różnych białek, charakteryzujących się podobnym układem domen [38]. N-końcową część tych białek tworzy zwykle domena PYD lub CARD, której zadaniem jest przekazywanie sygnału cząsteczce efektorowej. Centralną część białka zajmuje domena NACHT/NOD wraz z towarzyszącymi jej domenami NAD (*NACHT-Associated Domains*), odpowiadająca za zdolność do oligomeryzacji białek, a także wiązania trifosfonukleotydów. W części C-końcowej znajdują się powtórzenia bogate w leucynę, dzięki którym następuje rozpoznanie ligandu.

Podobnie jak białka R, a w odróżnieniu od TLR białka z rodziny NOD nie mają domen transbłonowych ani zewnątrzkomórkowych i umiejscowione są w cytozolu. Dwa z nich – NOD1 i NOD2 pełnią rolę cytoplazmatycznych receptorów, składników bakteryjnej ściany komórkowej oraz inicjatorów szlaku sygnałowego prowadzącego do reakcji zapalnej [51].

NOD1 oraz *NOD2* znaleziono w genomowych bazach danych przeszukiwanych pod kątem występowania białek o strukturalnej homologii do Apaf-1, jednego z kluczowych białek zaangażowanych w inicjację procesu programowanej śmierci komórki (tzw. apoptozy). Wykazano, że *NOD1* ulega ekspresji w makrofagach oraz komórkach nabłonka, a także w nabłonku wyścielającym światło jelita [49].

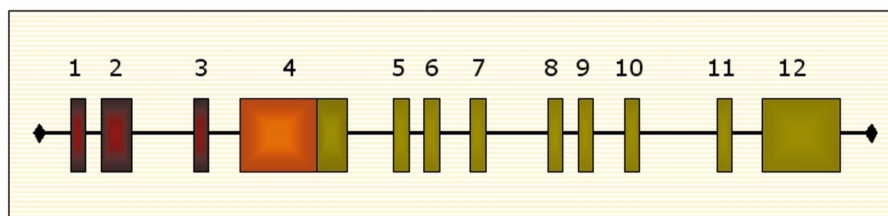
Ligandem specyficznie rozpoznawanym przez Nod1 jest kwas MurNAc-L-Ala-D-Glu-mezo-diaminopimelinowy (M-Tri_{DAP}), składnik peptydoglikanu (PGN) występującego w ścianach komórkowych bakterii Gram-ujemnych. Dzięki temu białko to pełni kluczową rolę w rozpoznawaniu obecności tego typu bakterii przez komórki nabłonka oraz w aktywacji odpowiedzi zapalnej poprzez czynnik transkrypcyjny NF- κ B [34]. Obecnie coraz większą uwagę skupia na sobie białko NOD2, którego nieprawidłowe działanie kojarzone jest z występowaniem wielu poważnych schorzeń, włączając w to nowotwory [61].

4. CHARAKTERYSTYKA GENU *NOD2* I BIAŁKA, KTÓRE KODUJE

4.1. Odkrycie i budowa genu *NOD2*

W 1996 roku Hugot i wsp. przeprowadzili przeszukiwanie genomów rodzin z występującymi licznymi przypadkami choroby Leśniowskiego-Crohna. Posługując się analizą sprzężeń [68], zidentyfikowali przypuszczalny *locus* związany z podatnością na chorobę. Stwierdzili, że występuje on na chromosomie 16. Genowi, który się tam znajdował, nadali nazwę *IBD1* [46].

Związek choroby Leśniowskiego-Crohna z *locus IBD1* został potwierdzony przez kilka innych ośrodków, w tym przez IBD (*International Genetics Consortium*) [22]. W maju 2001 r. dwa zespoły badawcze niezależnie odkryły pierwszy gen związany z występowaniem choroby Leśniowskiego-Crohna – *NOD2* [45, 70]. Stwierdzono, że gen ten składa się z 12 egzonów (ryc. 7 i 8) i koduje białko o długości 1040 aa i masie



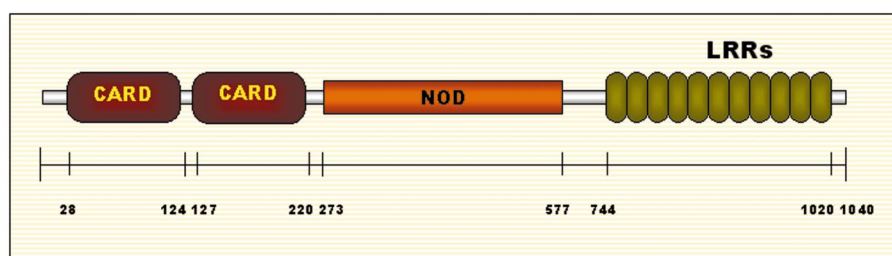
RYCINA 7. Budowa genu *NOD2*. Gen składa się z 12 egzonów oznaczonych cyframi. Domeny białka kodowane przez poszczególne egzony wyróżniono kolorami: ciemnoczerwonym – CARD, pomarańczowym – NOD, zielonym – LRR

115 kDa. Wykazano również, że polipeptyd kodowany przez *NOD2* jest wewnątrzkomórkowym receptorem, częścią systemu odporności wrodzonej. Bierze on udział w rozpoznawaniu składników ściany komórkowej bakterii i wywoływaniu reakcji obronnej przeciw tym bakteriom poprzez czynnik jądrowy κ B (NF- κ B) aktywujący transkrypcję cytokin prozapalnych, cząstek adhezyjnych, a także cząstek MHC (głównego układu zgodności tkankowej) klasy II [26, 76].

4. 2. Komórkowy i tkankowy wzorzec ekspresji *NOD2*

Początkowo ustalono, że *NOD2* ulega ekspresji jedynie w monocytach [71]. Później wykazano również, że wysoka ekspresja tego genu zachodzi również w komórkach Panetha [59]. Odkryte w 1888 r. przez Josepha Panetha komórki (nazwane później jego nazwiskiem) stanowią część nabłonka jelit. Występują głównie w kryptach jelita cienkiego w pobliżu komórek macierzystych nabłonka [31]. Syntetyzują one substancje antibakteryjne i gromadzą je w cytoplazmatycznych ziarnistościach. W obecności patogenów prokariotycznych w świetle jelita substancje te są uwalniane poza komórkę [8]. Do czynników przeciwdrobnoustrojowych, produkowanych przez komórki Panetha należą lizozym, fosfolipaza A2, trypsyna, α -defensyny oraz angiogeniny [8, 31, 42].

W wyniku aktywacji genu *NOD2* następuje rozpoznanie i eliminacja bakterii przez komórki nabłonkowe jelita. W przypadku powstania mutacji prowadzącej do upośledzenia



RYCINA 8. Budowa białka *NOD2* (CARD15). Na N-końcu białka zlokalizowane są dwie domeny CARD (*Caspase Recruitment Domain*). Środkową część łańcucha polipeptydowego stanowi domena wiążąca nukleotyd (NOD), zaś C-końcowa część białka składa się z 11 powtórzeń bogatych w leucynę (LRR)

funkcji tego genu opisany proces ulega zaburzeniu. U chorych z najczęstszymi wariantami mutacji zaobserwowano nieprawidłową odpowiedź na pojawianie się PG i LPS (powstających w wyniku rozkładu składników bakteryjnych ścian komórkowych) w cytoplazmie komórek nabłonkowych jelita [18]. W rezultacie może dochodzić do spotęgowania reakcji zapalnych.

Ostatnio wykazano jednak, że prócz monocytów i komórek Panetha ekspresja NOD2 może zachodzić w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych człowieka [72].

4. 3. Budowa białka NOD2

Białko NOD2 zbudowane jest z czterech domen. Na N-końcu białka znajdują się dwie domeny CARD (*Caspase Recruitment Domain*). Za nimi umiejscowiona jest domena wiążąca nukleotyd (NOD). C-końcową część białka tworzy domena LRR, składająca się z 11 powtórzeń bogatych w leucynę. Ze względu na obecność domen CARD, komisja do spraw nazewnictwa HUGO (*Human Genome Organisation*) nadała genowi *NOD2* nazwę *CARD15* [44].

4. 3. 1. Domena CARD

Domena CARD po raz pierwszy została opisana jako motyw wiążący białka, który oddziałuje z kaspazą poprzez wiązanie się z jej własną domeną CARD. Później domena ta została wykryta także w innych białkach nieoddziałujących bezpośrednio z kaspazami, a biorących udział w przekazywaniu sygnałów wywołujących apoptozę i aktywację czynnika NF- κ B. Sygnały prowadzące do programowanej śmierci komórki są przenoszone dzięki oddziaływaniom pomiędzy domenami CARD białek uczestniczących w kaskadzie sygnałowej.

Także aktywacja kaspaz, które są obecne w komórce jako nieaktywne zymogeny, zachodzi dzięki cząsteczkom adaptorowym zawierającym domenę CARD. Ponadto białka zawierające tę domenę zaangażowane są w regulację ekspresji genów związanych z przetrwaniem komórki i odpowiedzią immunologiczną poprzez aktywację czynnika NF- κ B [41, 79].

W przypadku białka *CARD15* znajdująca się na jego N-końcu domena CARD odpowiada za interakcję z domeną tego samego rodzaju, należąca do serynowo-treoninowej kinazy białkowej RICK (znanej też pod nazwą RIP2), która odpowiada za aktywację czynnika jądrowego NF- κ B [71].

4. 3. 2. Domena NOD

Domeny NOD (nazywane też NACHT) to motywy o długości 300–400 aa mające właściwości trifosfatazy nukleotydu (NTP-azy). Znajdowane są w białkach zwierzęcych, grzybowych i bakteryjnych. U zwierząt domena NOD występuje w polipeptydach związanych z apoptozą i reakcjami systemu odpornościowego. Jednym z konserwatywnych motywów w obrębie tej domeny jest pętla P, charakterystyczna dla miejsc wiążących ATP/GTP (kasetka Walkera A) oraz miejsce wiążące jony Mg^{2+} (kasetka Walkera B). Specyficzną cechą domeny NOD, odróżniającą ją od innych domen o aktywności trifosfatazy nukleotydu, jest występowanie reszty aminokwasu o niskiej masie cząsteczkowej (glicyna, alanina, seryna) bezpośrednio po C-końcowej stronie

krytycznej dla działania kasety Walkera B reszty asparaginanu, w miejsce innego aminokwasu o charakterze kwasowym. Inną cechą charakterystyczną dla domeny NOD jest występowanie na jej C-końcu konserwatywnego motywu złożonego z aminokwasów polarnych, aromatycznych i hydrofobowych, niewystępującego w obrębie żadnej innej rodziny NTP-az [57].

Poprzez domenę NOD białka mają zdolność tworzenia homo- i heterodimerów. Oligomeryzacja NOD1, a zapewne i NOD2, ułatwia zbliżenie cząsteczki białka RICK oraz podjednostek kinazy I- κ B (IKK), prowadząc do aktywacji IKK i NF- κ B [23].

Aby ustalić udział domeny NOD w mechanizmie działania NOD2, przeprowadzono badania z użyciem syntetycznego dipeptydu muramylowego i białek NOD2 z mutacjami w rejonie badanej domeny. Zamiana konserwatywnej reszty asparaginanu w pozycji 379 (D379A), gdzie znajduje się kasetka B Walkera (miejsce wiązania jonów magnezowych i hydrolizy nukleotydów [86]), sprawiała, że taki mutant nie reagował na MDP, co sugeruje, że hydroliza nukleotydu jest warunkiem aktywacji czynnika NF- κ B zależnej od MDP. Analogiczna mutacja w białku NOD1 (D284A) także blokuje zależną od ligandu aktywację NF- κ B [79].

4.3.3. Domena LRR

Motywy LRR występują w wielu białkach o różnych funkcjach. Głównym ich zadaniem jest stworzenie strukturalnego rusztowania umożliwiającego specyficzne oddziaływanie międzycząsteczkowe; najczęściej typu białko – białko [56].

Komputerowe modelowanie trójwymiarowej struktury domeny LRR białka NOD2 pozwoliło stwierdzić, że mutacje w obrębie genu *NOD2* kodującego ten region białka powodują utratę zdolności rozpoznawania ligandu. Ich skutkiem jest substytucja aminokwasów tworzących zwroty α -helis domeny LRR lub struktury typu β -kartki, formujące wklęsłą stronę domeny LRR. Wszystkie mutacje powodujące utratę funkcji białka dotyczyły reszt aminokwasowych należących do C-końcowych powtórzeń bogatych w leucynę – od LRR6 do LRR11. Wyniki tych badań jednoznacznie sugerują, że C-końcowe domeny LRR odpowiadają za rozpoznawanie motywów ściany komórkowej bakterii [79].

Opisano również wpływ mutacji w obrębie *NOD2* kodujących początkowe powtórzenia LRR oraz w regionie pomiędzy domenami NOD i LRR na upośledzenie funkcji białka NOD2.

4. 4. Polimorfizm genu *NOD*

Mutacje nonsensowne w obrębie domen CARD skutkują niezdolnością do aktywacji NF- κ B. W C-końcowym odcinku regionu LRR (reszty aminokwasowe od 855 do 1040) mutacje takie nie upośledzają procesu aktywacji NF- κ B, zakłócona jest jednak zdolność do rozpoznawania składników pochodzenia bakteryjnego. W przypadku występowania w komórce białek NOD2, których transkrypcja w wyniku mutacji nonsensownej kończy się w rejonie od 664 do 854 aa (C-końcowa część domeny NOD i N-końcowa LRR), obserwuje się podwyższoną aktywność podstawową czynnika NF- κ B. Gdy jednak białko zakończone jest w rejonie C-końcowych LRR (reszty

aminokwasowe od 855 do 1040), aktywność podstawowa NF- κ B pozostaje na normalnym poziomie. Stosując technikę immunodetekcji białek wykazano, że poziomy ekspresji nonsensownych mutantów *NOD2* nie odbiegają od poziomu ekspresji prawidłowego *NOD2* [79].

Badanie mutantów *NOD1* potwierdziło, że mechanizm aktywacji NF- κ B jest konserwatywny u *NOD1* i *NOD2*. Białka *NOD1* o łańcuchach polipeptydowych kończących się w wyniku mutacji nonsensownych w C-końcowym rejonie domeny *NOD* i N-końcowych LRR również wywołują zwiększoną stałą aktywność NF- κ B i brak reakcji na obecność specyficznego ligandu [79].

Sugeruje to, że omawiany region pełni funkcje regulatorowe, modulujące stopień aktywacji czynnika NF- κ B. Obecnie uważa się, że rejon C-końcowej części domeny *NOD* i N-końcowych LRR odpowiada za aktywację NF- κ B, natomiast C-końcowe LRR, oprócz rozpoznawania składników ściany komórkowej bakterii, pełnią także funkcję inhibitora aktywności podstawowej (niezależnej od ligandu) *NOD1* i *NOD2*.

4.5. Funkcje i regulacja działania *NOD2*

Główną funkcją białka *NOD2* jest rozpoznawanie pochodzącego ze ściany komórkowej bakterii muramyłodipeptydu i uruchamianie kaskady sygnałowej prowadzącej do mobilizacji mechanizmów obrony immunologicznej. Muramyłodipeptyd to składnik peptydoglikanu (PGN), charakterystyczny zarówno dla bakterii Gram ujemnych, jak i dodatnich.

PGN to skomplikowana makromolekuła, główny składnik ścian komórkowych bakterii, nadający im komórkom odporność na zewnętrzne ciśnienie osmotyczne. Bakteryjna osłona zbudowana z warstw PGN, mimo iż pełni funkcję ochronną, jest strukturą niezwykle dynamiczną, ulegającą ciągłym przemianom, związanym ze wzrostem i podziałem komórek. Na kształt trójwymiarowej struktury PGN mają wpływ obecne w niej enzymy: glikozylo-transferazy, transpeptydazy, D, D-karboksypeptydazy i hydrolazy [40].

Po związaniu określonego ligandu *NOD2* ulega homodimeryzacji, po czym wchodzi za pomocą N-końcowej domeny CARD w interakcję z domeną tego samego rodzaju, należąca do serynowo-treoninowej kinazy białkowej RICK (znanej też pod nazwą RIP2) [50]. Kinaza RICK wiąże się z kompleksem kinazy I κ B (IKK) poprzez podjednostkę γ IKK, aktywując IKK [50]. Fosforylacja I κ B przez kinazy I κ B (IKK) prowadzi do aktywacji NF- κ B [55]. Białko blokujące I κ B jest stabilnie związane z czynnikiem jądrowym NF- κ B [10]. To oddziaływanie blokuje motyw NLS (sygnał lokalizacji jądrowej) NF- κ B, dzięki czemu cały kompleks pozostaje w cytoplazmie [14]. Aktywacja NF- κ B związana z odłączeniem cząsteczki I κ B, odsłania sygnał lokalizacji jądrowej (NLS), co pozwala na translokację NF- κ B do jądra komórkowego [9], gdzie inicjuje on ekspresję odpowiednich genów.

Czynnik jądrowy NF- κ B wykryto w wielu typach komórek zarówno w tkankach prawidłowych, jak i w czasie stanów chorobowych. Jego działanie polega na aktywowaniu ekspresji genu przez przyłączenie się do specyficznych sekwencji DNA w obrębie

promotora. NF- κ B stymuluje ekspresję genów kodujących chemokiny, regulatory transkrypcji, translacji i procesów proteolitycznych oraz białka sekrecyjne, takie jak składniki układu dopełniacza [81].

Za aktywację NF- κ B może odpowiadać wiele różnorodnych czynników: cytokiny, wolne rodniki, promieniowanie UV, a także czynniki pochodzenia bakteryjnego i wirusowego. Anomalię aktywacji czynnika NF- κ B wiąże się z występowaniem stanów zapalnych obserwowanych w przypadku autoagresyjnego zapalenia stawów, astmy, szoku septycznego, zwłóknienia płuc, zapaleniu kłębuszków nerwowych, miażdżycy i AIDS. Z kolei całkowita lub długotrwała inaktywacja tego czynnika prowadzi do apoptozy, nieprawidłowego rozwoju komórek układu odpornościowego i opóźnienia wzrostu komórki [25].

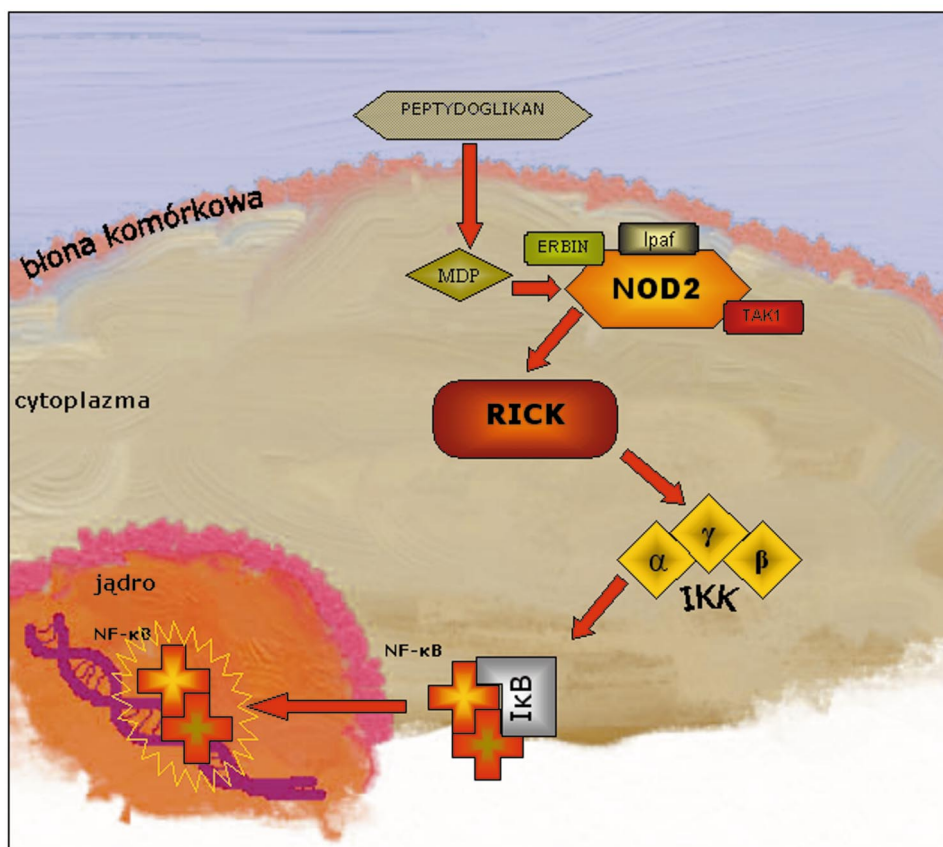
Wrażliwość komórek na MDP może być regulowana przez zmianę poziomu ekspresji genu *NOD2* lub też przez interakcje białka *NOD2* z innymi polipeptydami, wpływającymi na jego aktywność. Na poziomie ekspresji *NOD2* regulowany jest przez czynnik martwicy nowotworów typu α (TNF α) oraz interferon γ (IFN- γ). Pod wpływem TNF- α oraz IFN- γ w komórkach nabłonka jelit następuje aktywacja ekspresji *NOD2*, co powoduje podwyższenie wrażliwości tych komórek na składniki ściany komórkowej bakterii [74].

Ostatnie poszukiwania potencjalnych regulatorów wpływających na poziom ekspresji *NOD2* doprowadziły do odkrycia kilku białek. Pierwszym z nich jest Ipaf (opisywane także pod nazwą CLAN lub CARD12). Poprzez tworzenie heterodimeru z CARD15, zachodzące przy udziale domen NOD, białko to reguluje aktywność *NOD2*, hamując przekazywanie sygnału prowadzącego do aktywacji NF- κ B [27].

Chen i wsp. [24] opisali hamujące działanie *NOD2* na proces aktywacji NF- κ B zależny od kinazy TAK1 (*TGF- β -Activated Kinase 1*). Dzika forma białka *NOD2*, oddziałując poprzez swój region LRR z TAK1 hamuje zależną od tej kinazy aktywację czynnika NF- κ B skuteczniej niż skrócona w wyniku mutacji 1007fs forma *NOD2*. Z drugiej strony obecność funkcjonalnej kinazy TAK1 okazała się być niezbędna do stymulowanej MDP, a zależnej od *NOD2* aktywacji NF- κ B [24].

Kolejnym białkiem oddziałującym z *NOD2* zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* oraz wpływającym na jego aktywność jest ERBIN. Białko to zostało odkryte jako cząsteczka niezbędna do prawidłowej lokalizacji receptora ErbB2 w bazolateralnej części plazmolemy komórek nabłonkowych [19]. Wykazano także, że obniżona ekspresja *ERBIN* jest związana ze złymi rokowaniami we wczesnym pierwotnym raku piersi [6, 64, 85].

Przeprowadzona przez Barnicha i wsp. [12] analiza delecyjnych i substytucyjnych mutantów *NOD2* pozwoliła zaobserwować, że białkowy produkt tego genu ma zdolność przyłączania się do wewnętrznej strony plazmolemy komórek nabłonkowych jelita, podczas gdy mutant 3020insC (1007fs) charakteryzuje się brakiem takiej zdolności. Wykazano, że do aktywacji czynnika jądrowego NF- κ B po detekcji przez *NOD2* obecności MDP w cytoplazmie komórek nabłonkowych jelita konieczne jest związanie *NOD2* z błoną komórkową. Za przyłączenie się *NOD2* do błony komórkowej odpowiadają dwie reszty leucynowe oraz motyw zawierający tryptofan zlokalizowane w pobliżu C-końca białka *NOD2*.



RYCINA 9. Zależna od NOD2 aktywacja NF-κB. MDP zostaje rozpoznany przez domenę LRR NOD2, który poprzez oddziaływanie pomiędzy domenami CARD, wiąże się z białkiem RICK. RICK posiadający aktywność kinazy ser/thr, oddziałuje z podjednostką gamma kompleksu IKK. Aktywowany IKK fosforyluje inhibitor NF-κB – IκB, powodując jego oddysocjowanie od NF-κB i jego transport do wnętrza jądra. W jądrze NF-κB aktywuje transkrypcję genów związanych z reakcją zapalną

NOD2 jest także zaangażowany w modulowanie zależnej od TLR reakcji na patogeny. W przeprowadzonych niedawno doświadczeniach Ferwerd i wsp. [29] wykazali, że do rozpoznania zakażenia prątkiem gruźlicy niezbędne jest działanie receptorów TLR oraz NOD2. Komórki jednojądrowe krwi osób z mutacją 1007fs w obu allelach genu *NOD2* w odpowiedzi na obecność *Mycobacterium tuberculosis* charakteryzowały się osłabieniem o 80% syntezy obronnych cytokin w porównaniu z osobami bez mutacji. Ponadto zaobserwowano synergistyczne działanie receptora wewnątrzkomórkowego NOD2 i zewnątrzkomórkowego TLR2 w procesie mobilizacji cytokin: TNF, IL-6 oraz IL-1β w odpowiedzi na obecność składników bakteryjnej ściany komórkowej. Zarówno w przypadku komórek z dysfunkcyjnym TLR2, jak i NOD2 synergii tej nie obserwowano. Leukocyty nosiciele mutacji w genie *NOD2* nie są więc w stanie odpowiednio zareagować na obecność prątków gruźlicy.

PODSUMOWANIE

Badania prowadzone w ostatnich latach wykazują ogromne znaczenie mało dotąd poznanych mechanizmów odporności nieswoistej w obronie organizmu przed mikroorganizmami patogennymi. Stwierdzono, że zwierzęce i roślinne receptory związane z funkcjonowaniem układu odporności wrodzonej zawierają domeny LRR, dzięki którym dochodzi do rozpoznania cząsteczek substancji związanych z atakiem patogena na organizm (PAMP). Zewnątrzkomórkowymi receptorami u zwierząt są receptory Toll-podobne, natomiast rolę receptorów wewnątrzkomórkowych pełnią białka z rodziny NOD. Przedstawiciel tej ostatniej grupy – NOD2, jest przykładem na to, jak ważna jest rola prawidłowego działania mechanizmów odporności wrodzonej. Nieprawidłowe funkcjonowanie tego białka, spowodowane mutacjami, wiąże się z występowaniem choroby Leśniowskiego-Crohna, syndromu Blau'a, młodzieńczej postaci sarkoidozy, a także ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia reakcji typu przeszczep przeciwko gospodarzowi w przypadku allogenicznego przeszczepu szpiku kostnego i szoku septycznego u noworodków. Ponadto wykazano częstsze zachorowania na niektóre nowotwory u nosicieli mutacji w genie *NOD2*. Pomimo bardzo odległego pokrewieństwa filogenetycznego roślin i zwierząt, roślinne receptory wykrywające PAMP są niezwykle podobne do występujących u zwierząt. Oprócz domeny LRR zawierają one domenę NBD, homologiczną do domeny NOD. Część z nich zawiera także domenę TIR, która przypomina cytoplazmatyczną domenę receptorów TLR.

LITERATURA

- [1] ABREU MT, VORA P, FAURE E, THOMAS LS, ARNOLD ET, ARDITI M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001; **167**: 1609–1616.
- [2] AKIRA S, TAKEDA K, KAISHO T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; **2**: 675–680.
- [3] AKIRA S, YAMAMOTO M, TAKEDA K. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem Soc Trans* 2003; **31**: 637–642.
- [4] AKIRA S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003; **278**: 38105–38108.
- [5] ALBRECHT M, DOMINGUES FS, SCHREIBER S, LENGAUER T. Structural localization of disease-associated sequence variations in the NACHT and LRR domains of PYPAF1 and NOD2. *FEBS Lett* 2003; **554**: 520–528.
- [6] ATALAY A, CROOK T, OZTURK M, YULUG IG. Identification of genes induced by BRCA1 in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **299**: 839–846.
- [7] ATHMAN R, PHILPOTT D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol* 2004; **7**: 25–32.
- [8] AYABE T, SATCHELL DP, WILSON CL, PARKS WC, SELSTED ME, OUELLETTE AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 2000; **1**: 113–118.
- [9] BAEUERLE PA, BALTIMORE D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF- κ B transcription factor. *Cell* 1988; **53**: 211–217.

- [10] BAEUERLE PA, BALTIMORE D. IKB: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science* 1988; **242**: 540–546.
- [11] BAI J, PENNILL LA, NING J, LEE SW, RAMALINGAM J, WEBB CR, ZHAO B, SUN Q, NELSON JC, LEACH JE, HULBERT SH. Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals. *Genome Res* 2002; **12**: 1871–1884.
- [12] BARNICH N, AGUIRRE JE, REINECKER HC, XAVIER R, PODOLSKY DK. Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- κ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J Cell Biol* 2005; **170**: 21–26.
- [13] BARTON GM, MEDZHITOV R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003; **300**: 1524–1525.
- [14] BEG AA, RUBEN SM, SCHEINMAN RI, HASKILL S, ROSEN CA, BALDWIN AS Jr. I κ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF- κ B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev* 1992; **6**: 1899–1913.
- [15] BENT AF, KUNKEL BN, DAHLBECK D, BROWN KL, SCHMIDT R, GIRAUDAT J, LEUNG J, STASKAWICZ BJ. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 1994; **265**: 1856–1860.
- [16] BERGELSON J, KREITMAN M, STAHL EA, TIAN D. Evolutionary dynamics of plant R-genes. *Science* 2001; **292**: 2281–2285.
- [17] BLANDIN S, LEVASHINA EA. Mosquito immune responses against malaria parasites. *Curr Opin Immunol* 2004; **16**: 16–20.
- [18] BONEN DK, OGURA Y, NICOLAE DL, INOHARA N, SAAB L, TANABE T, CHEN FF, FOSTER SJ, DUERR RH, BRANT SR, CHO JH, NUNEZ G. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 2003; **124**: 140–146.
- [19] BORG JP, MARCHETTO S, LE BIVIC A, OLLENDORFF V, JAULIN-BASTARD F, SAITO H, FOURNIER E, ADELAIDE J, MARGOLIS B, BIRNBAUM D. ERBIN: a basolateral PDZ protein that interacts with the mammalian ERBB2/HER2 receptor. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 407–414.
- [20] BOYES DC, NAM J, DANGL JL. The *Arabidopsis thaliana* RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15849–15854.
- [21] CANNON SB, ZHU H, BAUMGARTEN AM, SPANGLER R, MAY G, COOK DR, YOUNG ND. Diversity, distribution, and ancient taxonomic relationships within the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene subfamilies. *J Mol Evol* 2002; **54**: 548–562.
- [22] CAVANAUGH J. The IBD International Genetics Consortium. International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn's disease and chromosome 16. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 1165–1171.
- [23] CHAMAILLARD M, GIRARDIN SE, VIALA J, PHILPOTT DJ. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* 2003; **5**: 581–592.
- [24] CHEN CM, GONG Y, ZHANG M, CHEN JJ. Reciprocal cross-talk between Nod2 and TAK1 signaling pathways. *J Biol Chem* 2004; **279**: 25876–25882.
- [25] CHEN F, CASTRANOVA V, SHI X, DEMERS LM. New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999; **45**: 7–17.
- [26] CHO JH. Significant role of genetics in IBD: the NOD2 gene. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; **3**: S18–S22.
- [27] DAMIANO JS, OLIVEIRA V, WELSH K, REED JC. Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses. *Biochem J* 2004; **381**: 213–219.
- [28] DANGL JL, JONES JD. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 2001; **411**: 826–833.
- [29] FERWERDA G, GIRARDIN SE, KULLBERG BJ, LE BOURHIS L, de JONG DJ, LANGENBERG DM, van CREVEL R, ADEMA GJ, OTTENHOFF TH, van der MEER JW, NETEA MG. NOD2 and Toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2005; **1**: 34.
- [30] FLOR HH. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv Genet* 1956; **8**: 29–54.
- [31] GANZ T. Paneth cells – guardians of the gut cell hatchery. *Nat Immunol* 2000; **1**: 99–100.
- [32] GAY NJ, KEITH FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991; **351**: 355–356.
- [33] GEWIRTZ AT, NAVAS TA, LYONS S, GODOWSKI PJ, MADARA JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001; **167**: 1882–1885.

- [34] GIRARDIN SE, TOURNEBIZE R, MAVRIS M, PAGE AL, LI X, STARK GR, BERTIN J, DISTEFANO PS, YANIV M, SANSONETTI PJ, PHILPOTT DJ. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* 2001; **2**: 736–742.
- [35] GUILLOT L, BALLOY V, MCCORMACK FX, GOLENBOCK DT, CHIGNARD M, SI-TAHAR M. Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol* 2002; **168**: 5989–5992.
- [36] GUILLOT L, MEDJANE S, LE-BARILLEC K, BALLOY V, DANIEL C, CHIGNARD M, SI-TAHAR M. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J Biol Chem* 2004; **279**: 2712–2718.
- [37] HAMMOND-KOSACK KE, JONES JD. Resistance genedependent plant defense responses. *Plant Cell* 1996; **8**: 1773–1791.
- [38] HARTON JA, LINHOFF MW, ZHANG J, TING JP. Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J Immunol* 2002; **169**: 4088–4093.
- [39] HEGUY A, BALDARI CT, MACCHIA G, TELFORD JL, MELLI M. Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the *Drosophila* toll protein are essential for IL-1R signal transduction. *J Biol Chem* 1992; **267**: 2605–2609.
- [40] HOLTJE JV. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; **62**: 181–203.
- [41] HONG GS, JUNG YK. Caspase recruitment domain (CARD) as a bi-functional switch of caspase regulation and NF-kappaB signals. *J Biochem Mol Biol* 2002; **35**: 19–23.
- [42] HOOPER LV, STAPPENBECK TS, HONG CV, GORDON JI. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* 2003; **4**: 269–273.
- [43] HORNEF MW, NORMARK BH, VANDEWALLE A, NORMARK S. Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2003; **198**: 1225–1235.
- [44] http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/data/get_data.php?hgnc_id=HGNC:5331
- [45] HUGOT JP, CHAMAILLARD M, ZOUALI H, LESAGE S, CEZARD JP, BELAICHE J, ALMER S, TYSK C, O'MORAIN CA, GASSULL M, BINDER V, FINKEL Y, CORTOT A, MODIGLIANI R, LAURENT-PUIG P, GOWER-ROUSSEAU C, MACRY J, COLOMBEL JF, SAHBATOU M, THOMAS G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; **411**: 599–603.
- [46] HUGOT JP, LAURENT-PUIG P, GOWER-ROUSSEAU C, OLSON JM, LEE JC, BEAUGERIE L, NAOMI I, DUPAS JL, VAN GOSSUM A, ORHOLM M, BONAITI-PELLIE C, WEISSENBACH J, MATHEW CG, LENNARD-JONES JE, CORTOT A, COLOMBEL JF, THOMAS G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; **379**: 772–773.
- [47] HULBERT SH, WEBB CA, SMITH SM, SUN Q. Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annu Rev Phytopathol* 2001; **39**: 285–312.
- [48] HWANG CF, WILLIAMSON VM. Leucine-rich repeat-mediated intramolecular interactions in nematode recognition and cell death signaling by the tomato resistance protein Mi. *Plant J* 2003; **34**: 585–593.
- [49] INOHARA N, KOSEKI T, del PESO L, HU Y, YEE C, CHEN S, CARRIO R, MERINO J, LIU D, NI J, NUNEZ G. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 1999; **274**: 14560–14567.
- [50] INOHARA N, KOSEKI T, LIN J, DEL PESO L, LUCAS PC, CHEN FF, OGURA Y, NUNEZ G. An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem* 2000; **275**: 27823–27831.
- [51] INOHARA N, OGURA Y, NUNEZ G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2002; **5**: 76–80.
- [52] JAKÓBISIAK M, GOŁĄB J. Odporność nieswoista. [w] Gołąb J, Jakóbisziak M, Lasek W [red.] Immunologia. Wyd Nauk PWN, Warszawa 2005: 137–156.
- [53] JIA Y, MCADAMS SA, BRYAN GT, HERSHEY HP, VALENT B. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* 2000; **19**: 4004–4014.
- [54] JONES JD. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 281–287.
- [55] KARIN M. The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 27339–27342.
- [56] KOBE B, KAJAVA AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 2001; **11**: 725–732.

- [56] KOONIN EV, ARAVIND L. The NACHT family – a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci* 2000; **25**: 223–224.
- [57] KURTZ J. Sex, parasites and resistance – an evolutionary approach. *Zoology (Jena)* 2003; **106**: 327–339.
- [58] LALA S, OGURA Y, OSBORNE C, HOR SY, BROMFIELD A, DAVIES S, OGUNBIYI O, NUNEZ G, KESHAV S. Crohn's disease and *NOD2* gene: a role for Paneth cells. *Gastroenterology* 2003; **125**: 47–57.
- [59] LEMAITRE B, NICOLAS E, MICHAUT L, REICHHART JM, HOFFMANN JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; **86**: 973–983.
- [60] LUBIŃSKI J, HUZARSKI T, KURZAWSKI G, SUCHY J, MASOJĆ B, MIERZEJEWSKI M, LENER M, DOMAGAŁA W, CHOSIA M, TEODORCZYK U, MĘDREK K, DĘBNIAK T, ZŁOWOCKA E, GRONWALD J, BYRSKI T, GRABOWSKA E, NEJ K, SZYMAŃSKA A, SZYMAŃSKA J, MATYJASIK J, CYBULSKI C, JAKUBOWSKA A, GÓRSKI B, NAROD SA. The 3020insC allele of *NOD2* predisposes to cancers of multiple organs. *Hered Cancer Clin Pract* 2005; **3**: 59–63.
- [61] LUDERER R, RIVAS S, NURNBERGER T, MATTEI B, VAN DEN HOOVEN HW, Van der HOORN RA, ROMEIS T, WEHRFRITZ JM, BLUME B, NENNSTIEL D, ZUIDEMA D, VERVOORT J, de LORENZO G, JONES JD, de WIT PJ, JOOSTEN MH. No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Mol Plant Microbe Interact* 2001; **14**: 867–876.
- [62] MATZINGER P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; **296**: 301–305.
- [63] McDONALD C, CHEN FF, OLLENDORFF V, OGURA Y, MARCHETTO S, LECINE P, BORG JP, NUNEZ G. A Role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF- κ B signaling. *J Biol Chem* 2005; **280**: 40301–40309.
- [64] McDOWELL JM, CUZICK A, CAN C, BEYNON J, DANGL JL, PAN Q, WENDEL J, FLUHR R. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *J Mol Evol* 2000; **50**: 203–213.
- [65] MEYERS BC, DICKERMAN AW, MICHELMORE RW, SIVARAMAKRISHNAN S, SOBRAL BW, YOUNG ND. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J* 1999; **2**: 317–332.
- [66] MEYERS BC, KOZIK A, GRIEGO A, KUANG H, MICHELMORE RW. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2003; **15**: 809–834.
- [67] MORTON NE. Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 1955; **7**: 277–318.
- [68] NUSSLEIN-VOLHARD C, LOHS-SCHARDIN M, SANDER K, CREMER C. A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of *Drosophila*. *Nature* 1980; **283**: 474–476.
- [69] OGURA Y, BONEN DK, INOHARA N, NICOLAE DL, CHEN FF, RAMOS R, BRITTON H, MORAN T, KARALIUSKAS R, DUERR RH, ACHKAR JP, BRANT SR, BAYLESS TM, KIRSCHNER BS, HANAUER SB, NUNEZ G, CHO JH. A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; **411**: 603–606.
- [70] OGURA Y, INOHARA N, BENITO A, CHEN FF, YAMAOKA S, NUNEZ G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- κ B. *J Biol Chem* 2001; **276**: 4812–4818.
- [71] OH HM, LEE HJ, SEO GS, CHOI EY, KWEON SH, CHUN CH, HAN WC, LEE KM, LEE MS, CHOI SC, JUN CD. Induction and localization of NOD2 protein in human endothelial cells. *Cell Immunol* 2005; **237**: 37–44.
- [72] RICHLY E, KURTH J, LEISTER D. Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* evolution. *Mol Biol Evol* 2002; **19**: 76–84.
- [73] ROSENSTIEL P, FANTINI M, BRAUTIGAM K, KUHBACHER T, WAETZIG GH, SEEGER D, SCHREIBER S. TNF- α and IFN- γ regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; **124**: 1001–1009.
- [74] SARASTE M, SIBBALD PR, WITTINGHOFER A. The P-loop: A common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 1990; **15**: 430–434.
- [75] SATSANGI J, MORECROFT J, SHAH NB, NIMMO E. Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. *Best Pract Res Clin Gastroenterology* 2003; **17**: 3–18.
- [76] STASKAWICZ BJ, AUSUBEL FM., BAKER BJ, ELLIS JG, JONES JDG. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 1995; **268**: 661–667.

- [77] TAMELING WI, ELZINGA SD, DARMIN PS, VOSSEN JH, TAKKEN FL, HARING MA, CORNELISSEN BJ. The tomato *R* gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* 2002; **14**: 2929–2939.
- [78] TANABE T, CHAMAILLARD M, OGURA Y, ZHU L, QIU S, MASUMOTO J, GHOSH P, MORAN A, PREDERGAST MM, TROMP G, WILLIAMS CJ, INOHARA N, NUNEZ G. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J* 2004; **23**: 1587–1597.
- [79] TAYLOR KR, TROWBRIDGE JM, RUDISILL JA, TERMEER CC, SIMON JC, GALLO RL. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem* 2004; **279**: 17079–17084.
- [80] TIAN B, BRASIER AR. Identification of a nuclear factor kappa beta-dependent gene network. *Recent Prog Horm Res* 2003; **58**: 95–130.
- [81] ULEVITCH RJ, MATHISON JC, da SILVA CORREIA J. Innate immune responses during infection. *Vaccine* 2004; **22**: S25–S30.
- [82] VABULAS RM, WAGNER H, SCHILD H. Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; **270**: 169–184.
- [83] Van der BIEZEN EA, JONES JD. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* 1998; **23**: 454–456.
- [84] van 'T VEER LJ, DAI H, van de VIJVER MJ, HE YD, HART AA, MAO M, PETERSE HL, van der KOOY K, MARTON MJ, WITTEVEEN AT, SCHREIBER GJ, KERKHOVEN RM, ROBERTS C, LINSLEY PS, BERNARDS R, FRIEND SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; **415**: 530–536.
- [85] WALKER JE, SARASTE M, RUNSWICK MJ, GAY NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1982; **1**: 945–951.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 25.04. 2006 r.
Przyjęto: 24.07. 2006 r.
ul. Gagarina 11, 87-100 Toruń
e-mail: prat@uni.torun.pl