

# Postępy Biochemii

PL ISSN  
0032-5422

## Advances in Biochemistry

TOM 50, NR 4, 2004 . . . . .

|                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------|-----|
| Michael Laskowski jr – wspomnienie<br>Nobel 2004. . . . . | 294 |
| CpG i immunostymulacja . . . . .                          | 296 |
| Białka wiążące penicylinę . . . . .                       | 304 |
| Izoprenylacja białek . . . . .                            | 316 |
| Apoptoza w komórkach nowotworowych . . . . .              | 330 |
| Apo E w patogenezie chorób . . . . .                      | 344 |
| Przemiany puryn w erytrocytach . . . . .                  | 353 |
| Rola glutaminy w OUN . . . . .                            | 363 |
| Mikromacierze DNA . . . . .                               | 371 |
| Akwaporyny . . . . .                                      | 383 |



HAND-PROD Sp. z o.o.

ul. Leszczyńskiego 40 A

02-496 Warszawa

Tel./fax: /22/ 867 87 37

## P R O M O C Y J N E    C E N Y

na wszystkie produkty Firmy „Biotools” do 31.03.2005.

**Hot Start Taq DNA Polimeraza — 0,20 EURO/ 1U**

**Hot Start Taq DNA Polimeraza ze stabilizatorem — przechowywanie w temp. 4 st.C  
przez okres 2 lat! — 0,24 EURO/ 1U**

Unikalne zestawy do PCR ze stabilizatorem.

Zestawy do wykrywania i izolacji DNA.

Enzymy restrykcyjne.

Zestawy Diagnostyczne: Papilloma wirus, HBV, HCV, M.Tuberculosis, Cytomegalo wirus,  
Plazmodium.

Zestawy do wykrywania i identyfikacji Genetycznie Modyfikowanych Organizmów.

Zestawy do badania składników w produktach spożywczych.

## WYSOKA JAKOŚĆ PRODUKTÓW, KONKURENCYJNE CENY

Katalogi,ceny,informacje:

Dr Władysław Józwiak

Tel.: 22 8678737 w. 204, tel.kom.: 0601208730

Fax: 22 8678737 w. 126, e-mail: [w.jozwiak@hand-prod.com.pl](mailto:w.jozwiak@hand-prod.com.pl)

Zamówienia prosimy kierować:

Hand-Prod Sp.z o.o.

Dział Zamówień

02-496 Warszawa

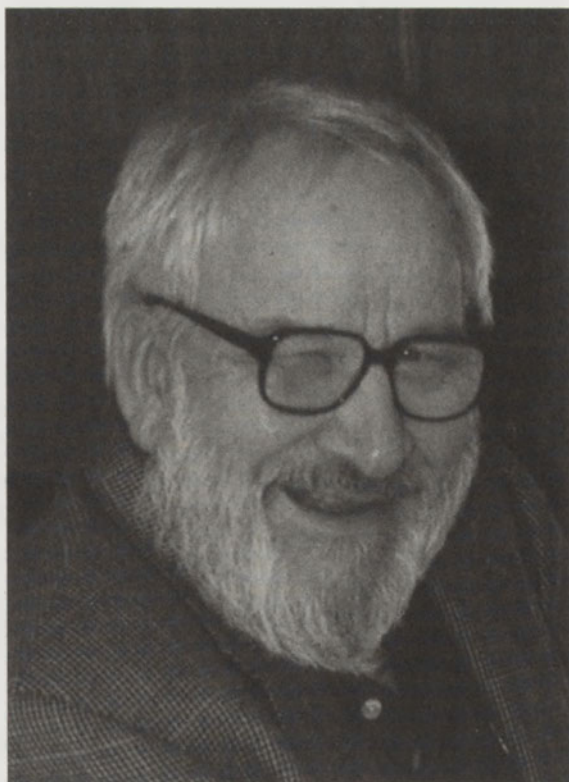
ul. Leszczyńskiego 40

tel.: 22 8678737 w.179, fax : 22 8678737 w. 128A

e-mail: [k.malek@hand-prod.com.pl](mailto:k.malek@hand-prod.com.pl)

**ZAPRASZAMY PAŃSTWA DO WSPÓŁPRACY Z  
FIRMĄ HAND-PROD**





Professor Michael Laskowski, Junior  
1930-2004

Michael Laskowski Junior urodził się 13 marca 1930 roku w Warszawie. W Polsce otrzymał wykształcenie podstawowe i średnie, którym później bardzo się szczycił. Szczególnie cenił sobie znakomite podstawy z matematyki i fizyki uzyskane w polskim liceum. Jego ojciec — prof. Michał Laskowski Senior — był znanym i cenionym chemikiem białka i enzymologiem. Można przypuszczać, że wpływ ojca był decydujący na późniejsze zainteresowanie syna nauką.

Wybuch II wojny światowej rozdzielił rodzinę Laskowskich. Ojciec, nominowany na profesora tuż przed wybuchem wojny, wziął udział w kampanii wrześniowej jako oficer rezerwy, a następnie walczył na froncie francuskim. W 1941 roku, dzięki pomocy Fundacji Rockefellera, znalazł się w Stanach Zjednoczonych, gdzie podjął pracę w laboratorium J.B. Sumnera w Cornell University. Synowi natomiast przyszło tułać się w czasie zawieruchy wojennej po Polsce pod opieką babci, aby połączyć się z rodzicami w USA dopiero w 1947 roku. Wcześniej jednak młody Michał Laskowski brał udział w Powstaniu Warszawskim jako kurier. Wtedy to, ochraniając kolegę, został ranny granatem. Przeżycia wojenne musiały wywrzeć silny wpływ na prof. Laskowskiego — nawet znacznie później, z perspektywy amerykańskiej, niechętnie do nich wracał.

Po połączeniu z rodzicami w USA Michael Laskowski studiował w Lawrence College, a wolny czas lubił spędzać w laboratorium ojca. Pierwsze fascynacje pracą laboratoryjną szybko przerodziły się w partnerskie stosunki — wspólnie pracowali nad oczyszczaniem oksydazy ksantynowej. Dodawaniu trypsyny w pierwszych etapach preparatyki towarzyszyły kłopoty związane z powtarzalnością wyników. Młody Michael szybko zorientował się, że wynikają one z obecności inhibitora trypsyny w wyjściowym wyciągu. Nieco później stwierdził obecność inhibitora trypsyny także w siarze bydlęcej i wykrył i wyizolował go mając zaledwie 19 lat, co było początkiem Jego błyskotliwej kariery badawczej. W tym czasie, po ukończeniu z wyróżnieniem college'u w 1950 roku, Michael Laskowski zaczął pracować w laboratorium prof. H. Scheragi w Cornell University. W 1954 roku został promowany na doktora jako pierwszy z licznej grupy doktorantów prof. Haralda Scheragi. Jego doktorat dotyczył termodynamiki reakcji, w których biorą udział białka. Tematyka ta będzie dominować w Jego późniejszej działalności naukowej.

W roku 1957 Michael Laskowski, Jr. został powołany na stanowisko profesora uniwersyteckiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Johna Purdue. Z uniwersytetem tym związana będzie cała Jego

działalność naukowa. W 1965 roku, w wieku 35 lat, zostaje powołany na stanowisko profesora. W początkowym okresie niezależnej działalności badawczej rozwinął technikę powszechnie znaną jako *solvent perturbation*, która umożliwia ocenę stopnia ekspozycji do rozpuszczalnika grup chromoforowych białek. W latach 60. i 70., a więc w okresie, gdy metody krystalografii i jądrowego rezonansu magnetycznego w zastosowaniu do badania struktury makrocząsteczek były w powijakach, technika ta była szeroko stosowana jako jedna z nielicznych umożliwiających precyzyjny wgląd w otoczenie łańcuchów bocznych aminokwasów aromatycznych.

Na początku lat 60. prof. Laskowski wraca do tematyki inhibitorów proteaz serynowych. Wspólnie z doktorantami precyzyjnie określa energię oddziaływania trypsyny z sojowym inhibitorem trypsyny (STI) poprzez pomiar liczby zwolnionych protonów jako sygnału wskazującego na tworzenie kompleksu. Szczegółowa analiza faz kinetyki procesu zwalniania protonów pozwoliła zaproponować Mu tzw. standardowy mechanizm oddziaływania proteaza serynowa — inhibitor białkowy. Zgodnie z tym mechanizmem inhibitory białkowe są rozpoznawane jak substraty, a wiązanie peptydowe  $P_1$ - $P_1'$ , nazwane przez Niego centrum reaktywnym, może być selektywnie hydrolizowane i resyntetyzowane przez proteazę. Mechanizm ten oryginalnie zaproponowany dla oddziaływania trypsyna — STI został później potwierdzony dla wszystkich 18 rodzin białkowych inhibitorów proteaz. Drugim poważnym osiągnięciem tamtego okresu była enzymatyczna wymiana reszty aminokwasowej  $P_1$  flankującej centrum reaktywne w inhibitorze STI. Stosując ciąg reakcji odwracalnej proteolizy z użyciem trypsyny oraz karboksypeptydazy B wymienił resztę argininy pozycji  $P_1$  na Lys, a później używając chymotrypsyny i karboksypeptydazy A „zmutował” argininę do fenyloalaniny i tryptofanu. Osiągnięcia te były możliwe, gdyż doskonale rozumiał On zasady odwracalności reakcji chemicznych, nawet tak „nieodwracalnych” jak hydroliza wiązań peptydowych. Były to pierwsze udane doświadczenia wymiany reszt aminokwasowych w białkach, dokonane na wiele lat przed wprowadzeniem metod genetycznych.

W latach 70. laboratorium prof. Laskowskiego zwróciło się w kierunku badań owomukoidów jaj ptasich. Te glikozylowane białka zbudowane są z trzech domen typu Kazala liczących po około 60 reszt aminokwasowych. Każda z domen odpowiedzialna jest za oddziaływanie z proteazą. Szczególne zainteresowanie wzbudziła trzecia domena: była ona tylko częściowo glikozylowana i dawała się stosun-

kowo łatwo wyodrębnić z całego owomukoidu poprzez zastosowanie ograniczonej proteolizy. W latach 70 i 80. laboratorium prof. Laskowskiego dokonało ogromnego wysiłku sekwencjonowania 159 trzecich domen owomukoidów, a ponadto wielu pierwszych i drugich domen. Jaja ptaków pozyskiwane były z ogrodów zoologicznych całego świata, z ferm ptasich, a szczególnie dzięki uprzejmości ornitologów. Badania te pozwoliły odkryć zdumiewającą cechę owomukoidów — reszty aminokwasowe odpowiedzialne za kontakt z enzymem, a więc funkcjonalne, okazały się być daleko bardziej zmienne ewolucyjnie niż reszty pozostałe. Jak wiadomo, zazwyczaj w białkach reszty funkcjonalne należą do najbardziej ewolucyjnie zachowywanych. Ponadto efekt podstawień aminokwasowych na oddziaływanie z proteazą był zwykle addytywny, tzn. nie zależał od innych podstawień. Właściwość addytywności efektów energetycznych jest jedną z najważniejszych cech reakcji chemicznych, a w zastosowaniu do inżynierii białka w znakomity sposób upraszcza liczbę wariantów potrzebnych do ustalenia zależności między sekwencją białka a jego reaktywnością.

Badania nad naturalnie występującymi owomukoidami pozwalały prof. Laskowskiemu rozwijać zainteresowania ewolucją białek a także ptaków, lecz nie dostarczały one danych o wariantach białek o systematycznie zmienianej sekwencji aminokwasowej. Badanie efektów addytywnych dla oddziaływania trzecich domen owomukoidów z proteazami serynowymi wymagały tymczasem pełnej kolekcji 191 wariantów, w których każda z dziesięciu pozycji typu dzikiego tego białka (za typ dziki przyjął on sekwencję trzeciej domeny owomukoidu z jaj indyka) wchodzących w kontakt z enzymem byłaby zmutowana do każdego z naturalnie występujących aminokwasów. Wszystkie potrzebne mutanty białka szczęśliwie udało się uzyskać w formie rekombinowanej. Zmierzenie ich oddziaływania z sześcioma proteazami serynowymi dostarczyło informacji o wkładzie energetycznym każdej z pozycji kontaktowej w energię asocjacji. Zakładając efekty addytywne, prof. Laskowski mógł teraz przetestować zależność między sekwencją białka a jego reaktywnością. Algorytm został przetestowany na szeregu naturalnie występujących białek, które różnią się wieloma podstawieniami od sekwencji typu dzikiego. Ostateczny wynik testów-obliczeń był wielkim sukcesem — analiza pokazała, że w około 90% przypadków można przewidzieć z dużą dokładnością wartość energii asocjacji poprzez założenie efektów addytywnych, tzn. sumując efekty energetyczne zmierzone dla mutantów jednopodstawionych.

Dalsze prace nad rozwijaniem algorytmu przerwała przedwczesna śmierć prof. Laskowskiego 2 sierpnia 2004 r. Michał zmarł w wieku 74 lat na rozległy zawał serca w czasie letnich wakacji spędzanych, jak corocznie, w ukochanych górach Grand Teton. Posiadał silną osobowość, której nie sposób było się oprzeć. Miał precyzyjny i analityczny umysł, w codziennych dyskusjach przytaczał z pamięci ogromne ilości danych literaturowych. Kochał liczby i dążył do ilościowego ujmowania rzeczywistości, także biologicznej. Wielkie nadzieje wiązał z komputerami. Zawsze gotów był do dyskusji, lubił

formułować oryginalne hipotezy, czasem tylko po to, aby innych wciągnąć w dyskusję i zmusić do myślenia. Do ostatnich dni życia był człowiekiem całkowicie oddanym nauce. W końcowych trzech latach swojego życia utrzymywał swoją dużą grupę z funduszy własnych. Naukę rozumiał jako formułowanie testowalnych hipotez. Dewizą Michała było stwierdzenie: „Badacz, który chce traktować mały obszar nauki jako swoje lenno, powinien dążyć do tego, aby zostawić go prostszym i bardziej spójnym niż je zastał.”

*Jacek Otlewski*

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Technika mikromacierzy DNA w analizie wielkoskalowych zmian ekspresji genów roślinnych w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiskowe<br>DNA microarray technology in large-scale analysis of changes in plant gene expression profile in response to changing environmental conditions<br>MAŁGORZATA SOLIŃSKA, ANNA JASIŃSKA, GRZEGORZ JACKOWSKI | 371 |
| Akwaporyny – nowe spojrzenie na transport wody w roślinach<br>Aquaporins – new entry into plants water movement<br>GRAŻYNA DĄBROWSKA, BEATA GŁOWACKA . . . . .                                                                                                                                                                                          | 383 |
| Sprawozdanie z sesji poświęconej pamięci profesora Witolda Drabikowskiego<br>MARIA JOLANTA RĘDOWICZ . . . . .                                                                                                                                                                                                                                           | 388 |
| Sprawozdanie z Konferencji "Modyfikowane kwasy nukleowe"<br>MAREK GNIAZDOWSKI . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                 | 392 |
| Roczny spis treści . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 395 |

## WYDAWCA

Editor

POLSKIE TOWARZYSTWO

BIOCHEMICZNE

Polish Biochemical Society

ul. Pasteura 3,

02-093 Warszawa, Poland

tel/fax 658-20-99

e-mail — ptbioch@nencki.gov.pl

www.ptbioch.edu.pl

## REDAKTOR SENIOR

Senior Editor

ZOFIA ZIELIŃSKA

tel. 831-24-03

## REDAKTOR NACZELNY

Editor in chief

GRAŻYNA PALAMARCZYK

tel. 658-47-02

## REDAKTORZY

Editors

KRYSTYNA GRZELAK

DANUTA HULANICKA

ANDRZEJ JERZMANOWSKI

ANDRZEJ KASPRZAK

LILIANA KONARSKA

ANNA SZAKIEL

ADAM SZEWCZYK

## BIURO REDAKCJI

Editorial office

SEKRETARZ

Secretary

HANNA LASKOWSKA

poniedziałki, czwartki

monday—thursday

14—16

tel. 589-24-41

SKŁAD I ŁAMANIE

Typesetting

MAŁGORZATA BASAJ

## RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue

ZBIGNIEW S. HERMAN (Katowice)

LONGINA KŁOSIEWICZ-

LATOSZEK (Warszawa)

EWA KOZŁOWSKA (Warszawa)

KRZYSZTOF SAFRANOW

(Warszawa)

EWA SIKORA (Warszawa)

DANUTA SOLECKA (Warszawa)

ANDRZEJ SZTOWICZ (Gdańsk)

STEFAN TYSKI (Warszawa)

ALICJA ZIEMIENOWICZ (Kraków)

## ADRES REDAKCJI

Address

REDAKCJA KWARTALNIKA

„POSTĘPY BIOCHEMII”

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: postepy@nencki.gov.pl

Kwartalnik „Postępy Biochemii” wydawany z pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych  
Indeksowany w Medline i Agrolibrex

## SPIS TREŚCI

## CONTENTS

Profesor Michael Laskowski, Junior — wspomnienie

Professor Michael Laskowski — obituary

JACEK OTLEWSKI . . . . .

Nagroda Nobla z chemii, czyli o systemie degradacji białek komórkowych

Nobel Prize in Chemistry and cellular protein degradation system

TERESA ŻOŁĄDEK . . . . . 294

Immunostymulacyjne właściwości sekwencji CpG w bakteryjnym DNA

Immunostimulatory properties of CpG sequences in bacterial DNA

RYSZARD SMOLARCZYK, STANISŁAW SZALA . . . . . 296

Białka wiążące penicylinę oraz ich rola w procesach fizjologicznych bakterii gramujemnych na przykładzie *Escherichia coli*

The penicillin-binding proteins and their role in physiological processes of gram-negative bacteria on the example of *Escherichia coli*

JOANNA ZAWADZKA-SKOMIAT . . . . . 304

Izoprenylacja białek

Protein isoprenylation

ANNA JAMROZ-WIŚNIEWSKA, JERZY BĘTOWSKI . . . . . 316

Hamowanie procesu apoptozy w komórkach nowotworowych opornych na działanie leków przeciwnowotworowych

The inhibition of apoptosis in cancer cells resistant to anticancer drugs

ROBERT NOWAK, JOANNA TARASIUK . . . . . 330

Apolipoproteina E — rola polimorfizmu w patogenezie licznych chorób

Apolipoprotein E — the role of polymorphism in pathogenesis of many diseases

ANNA BALCERZYK, IWONA ŻAK . . . . . 344

Nukleotydy purynowe erytrocytów ludzkich — metabolizm i regulacja

Purine nucleotides of human erythrocytes — metabolism and regulation

WIOLETTA DUDZIŃSKA, ALICJA JOANNA HŁYŃCZAK . . . . . 353

Transport glutaminy w ośrodkowym układzie nerwowym

Glutamine transport in the central nervous system

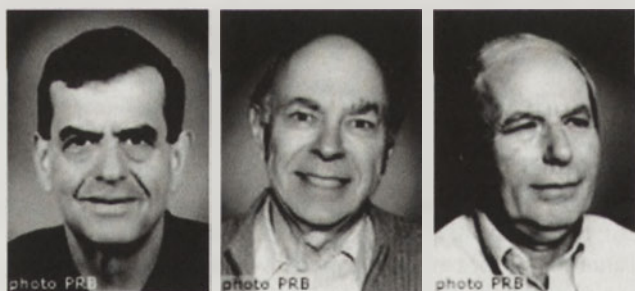
MARTA SIDORYK . . . . . 363

## Nagroda Nobla z chemii, czyli o systemie degradacji białek komórkowych

### Nobel Prize in Chemistry and cellular protein degradation system

TERESA ŻOŁĄDEK

Tegoroczna Nagroda Nobla w dziedzinie chemii została przyznana Aaronowi Ciechanoverowi, Avramowi Herszko, obaj z Technion, Izraelskiego Instytutu Technologicznego (Izrael) oraz Irwinowi Rose z Uniwersytetu Kalifornijskiego (USA) (Fot. 1) za od-



Fot. 1. Aaron Ciechanover, Avram Herszko, Irwin Rose.

krycie regulowanej degradacji białek zależnej od ubikwityny. Naukowcy ci na początku lat 80-tych XX wieku opublikowali wspólnie trzy prace biochemiczne [1, 2, 3], w których wykazali, że małe białko wyizolowane z retikulocytów (tj. ubikwityna, nazwane przez nich wtedy APF-1) jest przyłączane kowalencyjnie do różnych białek. Wykazali też, że przyłączenie wielu cząsteczek ubikwityny (poliubikwitynacja) warunkuje degradację białek i wymaga zużycia energii w postaci ATP. Prace te zapoczątkowały odkrycie całego systemu ubikwityny, co umo-

żliwiło zrozumienie mechanizmu molekularnego regulacji ważnych procesów komórkowych, takich jak: cykl komórkowy, naprawa DNA, transkrypcja genów, szlaki przekazywania sygnału, odpowiedź immunologiczna. System ubikwityny warunkuje degradację białek prawidłowych, zwykle tych krótko żyjących, przeprowadza też kontrolę jakości nowosyntetyzowanych białek i degraduje białka uszkodzone np. zmutowane, zdenaturowane, źle zwinięte [4]. Ten sposób degradacji jest wysoce selektywny, tzn. degradowane są tylko wybrane białka. Białko przeznaczone do degradacji jest znakowane przez przyłączenie ubikwityny, która jest małym globularnym białkiem, zawierającym 76 aminokwasów, odkrytym przez Goldsteina i współpracowników [5]. Poliubikwitynowane białka są rozpoznawane przez kompleks proteazowy zwany proteasomem 26S, składający się z rdzenia 20S i dwóch kompleksów regulatorowych 19S. Przechodząc przez proteasom białka są cięte na małe fragmenty (peptydy o długości 7-9 aminokwasów). Fragmenty te podlegają dalszemu rozkładowi do aminokwasów. Zanim degradowane białko przejdzie przez proteasom ubikwityna jest uwalniana i może być ponownie użyta. W uwalnianiu ubikwityny od degradowanych białek oraz w procesie dojrzewania ubikwityny biorą udział enzymy deubikwitynujące [4, 6].

Zanim tegorocznymi Nobliści dokonali swego odkrycia wiadomo było, że duża część białek komórkowych ulega rozkładowi w obrębie lizosomów (u roślin i grzybów zwanych wakuolami). Trafiają one tam drogą endocytozy, fagocytozy, autofagocytozy lub z aparatu Golgiego drogą transportu pęcherzyko-

Dr, Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, Tel: (48 22) 592-1304; e-mail: [teresa@ibb.waw.pl](mailto:teresa@ibb.waw.pl)

wego. Degradacja lizosomalna jest w dużym stopniu nieselektywna. W ostatnich latach stało się jasne, że liczne białka receptorowe, transportery i kanały błony plazmatycznej są ubikwitynowane w błonie komórkowej a modyfikacja ta odgrywa zasadniczą rolę w ich endocytozie i degradacji w lizosomie [7]. Tak więc ubikwitynacja pełni również inne role, niezwiązane z degradacją przez proteasomy.

Poznanie systemu ubikwitynacji przyczyniło się do poznania mechanizmów powstawania niektórych chorób i w przyszłości może się przyczynić do ich leczenia. Wiele chorób genetycznych jest związanych z zaburzeniem systemu ubikwitynacji. Zidentyfikowano mutacje w genach kodujących enzymy ubikwitynujące, enzymy deubikwitynujące, bądź w genach kodujących ważne białka substratowe [8]. Przykładem jest choroba Angelmana przebiegająca z zaburzeniami umysłowymi i epilepsją oraz dziedziczne nadciśnienie nerkowe (zespół Liddle'a). Bezpośredni związek chorób neurodegeneracyjnych z systemem ubikwityny został wykazany dla kilku rzadkich przypadków choroby Alzheimera i recesywnej młodzieńczej choroby Parkinsona. Zwróciło to uwagę badaczy na udział zaburzeń degradacji w patogenezie tych chorób [9]. Akumulacja ciałek inkluzyjnych zasocjowanych z ubikwityną, konjugatami ubikwityny, proteasomami i pewnymi charakterystycznymi dla choroby białkami była zaobserwowana już dawno w wielu chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak: choroba Alzheimera, choroba Parkinsona (również ich form spontanicznych) oraz choroba Huntingtona związana z wystąpieniem powtórzeń polylutaminu w zmutowanym białku. W większości przypadków związek tych chorób z systemem ubikwityny jest pośredni i jest odzwierciedleniem nieudanych prób usunięcia uszkodzonych lub nienormalnych białek przez ten system.

System ubikwityny stał się interesującym obszarem badań w kierunku opracowania nowych leków. Działanie terapeutyczne leku może mieć miejsce na poziomie ubikwitynacji i na poziomie aktywności proteasomów. Preparaty mogą hamować system ubikwitynacji zapobiegając degradacji pewnych ważnych białek lub też zwiększać jego aktywność tak aby zniszczyć niechciane, nagromadzone białko. Natomiast inhibitory proteasomów mogą być użyteczne w chorobach przebiegających z ich nadaktywnością, tj. w chorobach ze stanem zapalnym oraz w chorobach nowotworowych. Obecnie inhibitor proteasomu Velcade jest stosowany klinicznie w leczeniu choroby nowotworowej, szpiczaka mnogiego.

Nagroda Nobla została przyznana za odkrycie sprzed dwudziestu kilku lat. Nad czym obecnie pracują Nobliści? Zespół kierowany przez A. Hershko zajmuje się zależną od ubikwityny degradacją regulatorów cyklu komórkowego, cykliny B i inhibitora kinazy zależnej od cyklin. Jest to ważne dla zrozumienia patogenezy i leczenia chorób nowotworowych, które są spowodowane niekontrolowanym wzrostem i podziałem komórek. Zespół A. Ciechanovera bada regulowaną przez ubikwitynę aktywację i degradację regulatorów transkrypcji, takich jak: główny modulator systemu immunologicznego NF- $\kappa$ B, supresor nowotworów p53 i regulator różnicowania mięśni MyoD. I. Rose zajmuje się zagadnieniami niezwiązanymi z systemem ubikwityny. Inni znani badacze, którzy współpracowali z Noblistą A. Ciechanoverem, A. Varshavsky i D. Finley [10, 11], mają także wielkie zasługi w badaniach systemu ubikwityny i są wyróżniani ważnymi nagrodami naukowymi. Wychowali oni i wykształcili liczne rzesze badaczy, którzy następnie założyli własne laboratoria i kontynuują pracę nad ubikwitynacją. Obecnie jest to bardzo dynamicznie rozwijająca się dziedzina wiedzy.

System ubikwitynacji był przedmiotem artykułów w *Postęпах Biochemii* w 1997r., Tom 43, Nr 2, 91-97, Tobiasz A. i Żołądek T.: „System ubikwitynacji i jego rola u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*” oraz w 2001r., Tom 47, Nr 1, 63-71, Żołądek T. i Kamińska J.: „Rola ligazy ubikwitynowo-białkowej Rsp5p w endocytozie białek błony komórkowej u drożdży”.

## Piśmiennictwo

1. Hershko A, Ciechanover A, Rose IA (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 3107-3110
2. Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1783-1786
3. Hershko A, Ciechanover A, Rose IA (1981) *J Biol Chem* 256: 1525-1528
4. Hershko A, Ciechanover A (1998) *Annu Rev Biochem* 67: 425-479
5. Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Boyse EA, Schlesinger DH, Niall HD (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 11-15
6. Pickard CM (2004) *Cell* 116: 181-190
7. Hicke L, Dunn R (2003) *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 141-172
8. Jiang YH, Beaudet AL (2004) *Curr Opin Pediatr* 16: 419-426
9. Ciechanover A, Brundin P (2003) *Neuron* 40: 427-446
10. Finley D, Ciechanover A, A Varshavsky (1984) *Cell* 37: 43-55
11. Ciechanover A, Finley D, A Varshavsky (1984) *Cell* 37: 57-66

# Immunostymulacyjne właściwości sekwencji CpG w bakteryjnym DNA

## Immunostimulatory properties of CpG sequences in bacterial DNA

RYSZARD SMOLARCZYK<sup>1</sup>, STANISŁAW SZALA<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Mechanizm aktywacji immunologicznej przez sekwencje CpG
- III. Wpływ cytokin prozapalnych na terapię genową z użyciem plazmidowego DNA
- IV. Szczepionki DNA
- V. Hamowanie cytokin prozapalnych w terapii genowej z użyciem plazmidowego DNA
  - V-1. Czynniki immunosupresyjne
  - V-2. Redukcja ilości sekwencji CpG w plazmidowym DNA i transgenach
  - V-3. Sekwencyjny sposób podawania DNA i nośnika
- VI. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Mechanism of immunological activation by CpG sequences
- III. Influence of pro-inflammatory cytokines on gene therapy with plasmid DNA
- IV. DNA vaccines
- V. Inhibition of pro-inflammatory cytokines in gene therapy with plasmid DNA
  - V-1. Immunosuppressants
  - V-2. Reduction of the number of CpG motifs in plasmid DNA and transgenes
  - V-3. Sequential injection of DNA and carrier
- VI. Conclusions

**Wykaz stosowanych skrótów:** ALT — aminotransferaza alani-  
nowa (ang. *alanine aminotransferase*); AP-1 — czynnik tran-  
skrypcyjny-1 (ang. *activator protein-1*); AST — aminotransfe-  
raza asparaginianowa (ang. *aspartate aminotransferase*);  
EEA-1 (ang. *early endosome antigen 1*); GdCl<sub>3</sub> — chlorek gado-  
linu, IFN-γ — interferon-γ, IFN-α i β — interferon-α i β; IL-12  
— interleukina-12; IL-6 — interleukina-6; IRAK — (ang. *IL-1*  
*receptor-associated kinase*); IκB — inhibitor κB; JNK — kina-  
za końca aminowego białka c-Jun (ang. *c-Jun N-terminal kina-  
se*); MyD88 — (ang. *myeloid differentiation primary response*  
*protein (88)*); NF-κB — czynnik jądrowy κB (ang. *nuclear fac-  
tor κB*); PI3K — (ang. *phosphatidylinositol 3 kinases*); Rab 5 —  
(ang. *Ras-associated GTP-binding protein*); TAK1 — (ang.  
*TGFβ-activated kinase 1*); Th1, 2 — limfocyt pomocniczy 1, 2  
(ang. *T helper 1,2*); TIR — (ang. *Toll/interleukin 1 receptor*);  
TLR9 — (ang. *Toll like receptor 9*); TNF-α — czynnik martwi-  
cy nowotworu-α (ang. *tumor necrosis factor-α*); TRAF-6 —  
czynnik związany z TNFR-6 (ang. *TNF receptor-associated fac-  
tor-6*); TNFR — receptor dla TNF

### I. Wstęp

W roku 1995 K r i e g i wsp. udowodnili, że pla-  
zmidowy DNA wprowadzony do organizmu  
zwierząt wywołuje odpowiedź układu odpornościo-  
wego. Odpowiedź ta polegała na aktywacji komórek  
układu immunologicznego takich jak: limfocyty B,  
makrofagi, komórki dendrytyczne oraz komórki NK  
[1]. Aktywacja układu odpornościowego była  
związana z obecnością sekwencji dinukleotydowych  
CpG w bakteryjnym DNA. Motywy te składają się z  
położonych obok siebie w jednym łańcuchu fosfo-  
diestrowym nici DNA zasad azotowych: cytozyny i  
guaniny. W genomie bakterii motywy CpG wystę-  
pują z większą częstotliwością niż w genomie krę-  
gowców. Dodatkowo, około 75% sekwencji CpG u  
kręgowców jest metylowana w pozycji cytozyny,  
podczas gdy bakteryjny DNA zawiera prawie  
wyłącznie dinukleotydy CpG niemetylowane.

Podanie niemetylowanych sekwencji CpG  
wywołuje trzy rodzaje odpowiedzi organizmu krę-  
gowców. W pierwszym rzędzie, bakteryjna sekwen-  
cja CpG indukuje syntezę cytokin prozapalnych ta-  
kich jak: interferon γ (IFN-γ), interleukina 12 (IL-12)

<sup>1</sup>Mgr, <sup>2</sup>prof.dr hab.; Zakład Biologii Molekularnej, Instytut On-  
kologii im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział Gliwice, Wybrzeże  
Armii Krajowej 15, Gliwice, tel. 2789698, e-mail: rsmolar-  
czyk@io.gliwice.pl

oraz czynnik martwicy nowotworu- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). D drugim efektem działania sekwencji CpG jest zmniejszenie ilości białych krwinek oraz płytek krwi (leukopenia, trombocytopenia). Trzecim — podniesienie poziomu transaminaz: aminotransferazy alaninowej (ALT) i aminotransferazy asparaginianowej (AST) [2].

Terapia genowa jest metodą naprawy uszkodzonych genów, bądź wprowadzeniem nowych genów, kompensujących uszkodzenie lub brak genu. Terapia ta polega na wprowadzeniu do organizmu genu w nośniku jak np. wektor plazmidowy, który to gen ulega ekspresji i tworzone jest funkcjonalne białko [3].

Transfer do płuc genów obecnych w plazmidach, przez podawanie kompleksów wprost do krwioobiegu, wywołuje silną reakcję układu odpornościowego i indukcję syntezy cytokin prozapalnych (IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ). Podawanie samego plazmidowego DNA lub lipidów kationowych bez DNA wywołuje jedynie słabą indukcję cytokin prozapalnych [4]. Taka droga podania prowadzi głównie do transfekcji komórek śródbłónka płuc. Transfer genów za pomocą lipopleksów możliwy jest dzięki agregacji nośnika lipidowego indukowanej przez białka surowicy krwi. Strumień krwi, w której znajdują się agregaty, wędruje do płuc, gdzie w naczyniach śródbłónka, dzięki swojemu dużemu rozmiarowi, zostają „uwięzione” i są następnie internalizowane przez komórki śródbłónka. Podczas gdy agregacja nośnika umożliwia wzajemne oddziaływanie wprowadzonego DNA z komórkami docelowymi, to jednocześnie kontakt komórek układu odpornościowego z sekwencjami CpG znajdującymi się w wektorze bakteryjnym indukuje szybką aktywację cytokin prozapalnych [4, 5].

Podawanie kompleksów lipidów kationowych z genem terapeutycznym w plazmidowym wektorze ekspresji może ograniczać ich zastosowanie w terapii genowej, gdyż indukują one stan zapalny i hamują ekspresję genów terapeutycznych. Z drugiej jednak strony wykazano, że sekwencje CpG hamują rozwój guzów pierwotnych oraz przerzutów [6]. Efekt ten wywołany jest indukcją cytokin prozapalnych, które aktywują komórki układu odpornościowego, a ich aktywność ogranicza wzrost nowotworów. Zjawisko to może być wykorzystane w produkcji szczepionek DNA, które hamują wzrost nowotworów, zapobiegają infekcjom bakteryjnym lub wirusowym, bądź mogą się przyczynić do skutecznego zapobiegania alergii.

Celem niniejszej pracy jest omówienie immunostymulacyjnych właściwości sekwencji CpG. Staramy się przedyskutować ich negatywny wpływ na

terapię genową z wykorzystaniem plazmidowego DNA oraz korzyści jakie przynoszą w leczeniu nowotworów, infekcji bakteryjnych i wirusowych oraz chorób takich jak alergia czy astma.

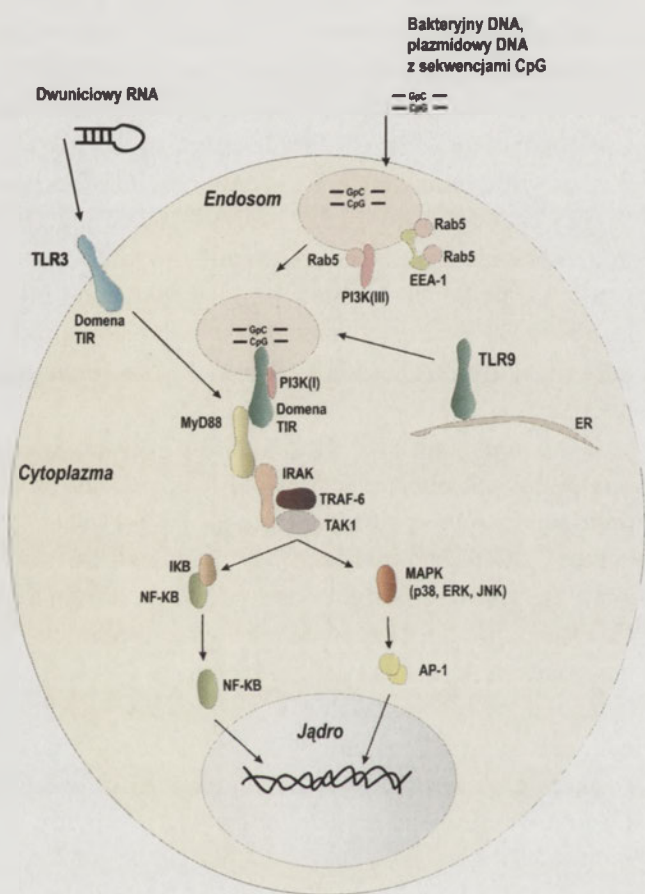
## II. Mechanizm aktywacji immunologicznej przez sekwencje CpG

Nie tylko obecność niemetylowanej sekwencji CpG jest niezbędna do aktywacji układu odpornościowego, równie ważne w stymulacji aktywności immunomodulacyjnej są sekwencje flankujące. Sekwencje DNA zawierające niemetylowany motyw CpG będące w otoczeniu dwu puryn na końcu 5' i dwu pirymidyn na końcu 3', jak np. GACGTT, pobudzają układ odpornościowy myszy o wiele mocniej niż sekwencje CpG w otoczeniu nukleotydu C na końcu 5' i G na końcu 3'. Inne motywy sekwencji flankujących są rozpoznawane przez ludzkie komórki odpornościowe (GTCGTT, TTGCTT), a inne np. przez mysie [7].

Za rozpoznanie specyficznych motywów kwasów nukleinowych obecnych w bakteriach i wirusach są odpowiedzialne dwa receptory: TLR3 i TLR9. Receptor TLR9 jest białkiem cytoplazmatycznym i znajduje się w retikulum endoplazmatycznym (ER) [8]. Receptor ten rozpoznaje wyłącznie niemetylowane sekwencje CpG [9]. Częsteczki DNA z sekwencjami CpG muszą dostać się do komórek drogą endocytozy przy udziale klatryn, które ułatwiają tworzenie pęcherzyków endosomalnych. Tworzenie i dojrzewanie pęcherzyków endosomalnych zawierających DNA z sekwencjami CpG jest regulowane przez PI3K i Rab 5 oraz EEA-1 [10, 11] (Ryc. 1). Po pobudzeniu komórek dendrytycznych i makrofagów przez motywy CpG, zarówno TLR9 jak i MyD88 są szybko kierowane do endosomów zawierających zinternalizowane cząsteczki DNA z sekwencjami CpG. W endosomach białko TLR9 bezpośrednio łączy się z ligandem i inicjuje szereg reakcji [8]. Efektem pobudzenia receptora jest indukcja czynników transkrypcyjnych i wzrost ekspresji cytokin prozapalnych, protoonkogenów i genów hamujących apoptozę [12].

Ligand, którym jest sekwencja CpG, inicjuje połączenie białka MyD88 z domeną Toll/IL-1R (TIR), która jest częścią receptora TLR9. Następnie do białka MyD88 zostaje przyłączone białko IRAK, do którego wiąże się białko TRAF-6 i białko TAK1. Utworzony kompleks pobudza kinazę JNK, białko p38 i inhibitor  $\kappa$ B. Pobudzenie tych białek aktywuje z kolei czynniki transkrypcyjne AP-1 i NF- $\kappa$ B.

Natomiast RNA wirusowy a także dwuniciowy RNA rozpoznawany jest przez receptor TLR3. Receptor ten jest białkiem znajdującym się w błonie komórkowej. Rezultatem pobudzenia białka TLR3 jest połączenie domeny TIR tego receptora z białkiem MyD88. Dalszy etap transdukcji sygnału jest podobny jak w przypadku białka TLR9. Ostatecznie aktywowane są białka AP-1 i NF- $\kappa$ B i ekspresja cytokin prozapalnych [13] (Ryc. 1).



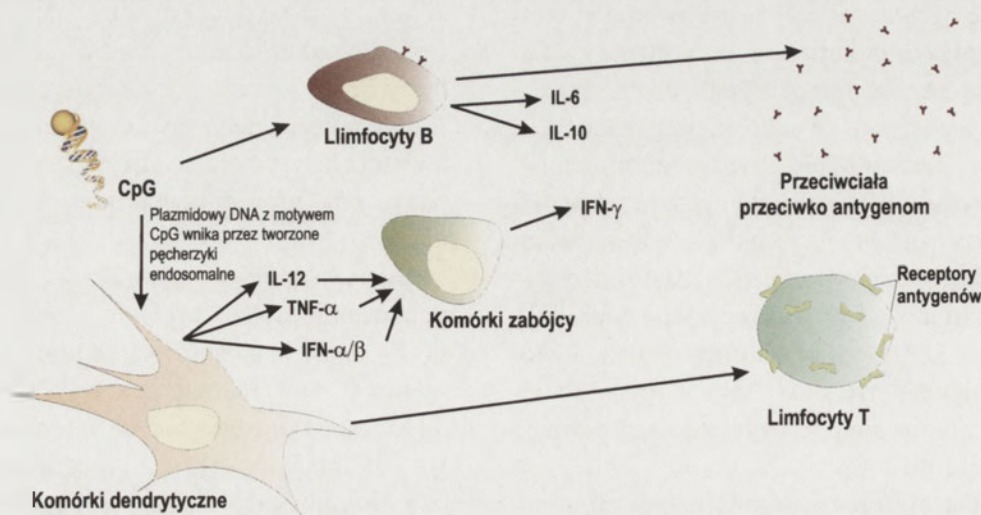
Ryc. 1. Mechanizm rozpoznania obcego DNA i RNA przez receptory TLR9 i TLR3.

Rozpoznanie sekwencji CpG w cząsteczkach DNA przez receptor TLR9 i pobudzenie różnych czynników transkrypcyjnych aktywuje bezpośrednio lub pośrednio kilka rodzajów komórek układu odpornościowego (Ryc. 2). Sekwencje CpG bezpośrednio indukują podziały limfocytów B, ich różnicowanie i wydzielanie cytokin prozapalnych takich jak: interleukina 6 i 10. Poza tym aktywacja limfocytów B sprawia, że stają się one komórkami opornymi na apoptozę [12]. W przeciągu kilku dni limfocyty B stają się zdolne do produkcji przeciwciał.

Bakteryjny DNA trafia także do komórek dendrytycznych i makrofagów, gdzie indukuje transkrypcję cytokin prozapalnych takich jak: IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  i  $\beta$  [14]. Ekspresja tych cytokin aktywuje komórki cytotoksyczne (NK). Ich aktywacja prowadzi do wydzielenia kolejnej cytokiny: IFN- $\gamma$ . Sekwencje CpG aktywują również limfocyty T, ale ich wzbudzenie nie odbywa się w sposób bezpośredni jak w przypadku komórek dendrytycznych, makrofagów, czy limfocytów B, lecz pośrednio przez produkcję IFN- i innych cytokin prozapalnych [15].

### III. Wpływ cytokin prozapalnych na terapię genową z użyciem plazmidowego DNA

Sekwencje CpG aktywują transkrypcję cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12) i ich wydzielanie do krwioobiegu. Ekspresja cytokin prozapalnych może mieć fatalne skutki w terapii genowej (Tab. 1). Cytokiny prozapalne stymulują komórki układu odpornościowego do rozpoznania i eliminacji komórek zawierających transgen. Cytokiny pobudzają limfocyty B i T, NK, makrofagi. Komórki te w przeciągu kilku godzin (limfocyty B, makrofagi, NK) lub kilku dni (limfocyty T) eliminują komórki z wprowadzonym DNA. Poza tym, cytokiny aktywowane sekwen-



Ryc. 2. Mechanizm aktywacji komórek układu odpornościowego i cytokin prozapalnych przez sekwencje CpG.

cjami CpG indukują apoptozę komórek transfekowanych [4].

Odpowiedź układu immunologicznego i obecność cytokin prozapalnych znacznie zmniejsza więc wydajność wprowadzania transgenów do komórek docelowych. Swoista odpowiedź układu odpornościowego skierowana przeciwko wektorowi lub produktowi genu może powodować eliminację transfekowanych komórek lub zmniejszać wydajność transfekcji po ponownym podaniu kompleksów liposomów z DNA [4].

Cytokiny mogą powodować zahamowanie ekspresji wprowadzonego genu terapeutycznego w

ziom białka terapeutycznego ogranicza skuteczność leczenia.

Sekwencje CpG ograniczają również ilość powstałego białka terapeutycznego po ponownym podaniu kompleksu. Częste podanie genu terapeutycznego nie wykazuje spodziewanego wzrostu ekspresji [16]. Aby jednak kolejne podanie było efektywne, niezbędny jest czas 7-14 dni między jednym a drugim podaniem [4]. Długość tego okresu jest uzależniona od ilości wprowadzonego DNA. Wraz ze zmniejszeniem ilości wprowadzanego DNA, można skrócić czas przerwy pomiędzy kolejnymi podaniami.

**Tabela 1.**

Negatywny wpływ cytokin prozapalnych na terapię genową z użyciem plazmidowego DNA

|                                      |                                                                                                            |                                                                                     |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Przeżycie komórek                    | Aktywacja układu immunologicznego, eliminacja komórek z obcym DNA, indukcja apoptozy w miejscu transfekcji | Hofman CR 2001<br>Li <i>et al.</i> 1999                                             |
| Wydajność transfekcji <i>in vivo</i> | Zmniejszenie wydajności transfekcji                                                                        | Tan Y 2001                                                                          |
| Utrzymywanie się ekspresji transgenu | Zahamowanie ekspresji transgenu                                                                            | Li <i>et al.</i> 1999<br>Yew NS <i>et al.</i> 2002<br>Whitmore M <i>et al.</i> 1999 |
| Ponowne podanie                      | Kilkukrotne podanie nie zwiększa ekspresji transgenu                                                       | Yew NS <i>et al.</i> 2000<br>Li <i>et al.</i> 1999                                  |

dwojaki sposób. Pierwszy z nich związany jest z samą produkcją cytokin, które mogą bezpośrednio blokować ekspresję genu. Inaktywacja cytokin przez specyficzne przeciwciała, czynniki immunosupresyjne (deksametazon, chlorek gadolinu) znacząco wydłuża czas ekspresji genu [4, 16, 17]. Drugi oparty jest na wysokiej wrażliwości komórek śródbłonna na cytokiny prozapalne [18]. Ekspozycja komórek śródbłonna na działanie np. TNF- $\alpha$  powoduje ich apoptozę. Apoptoza tych komórek jest bezpośrednio związana z sekwencjami CpG w kompleksach z lipidami kationowymi, gdyż dożylne podanie samych lipidów kationowych czy samego (tzw. „nagiego”) DNA nie wywołuje apoptozy na taką skalę [4, 5, 19, 20]. Może to być związane z ochroną DNA przed działaniem nukleaz przez lipidy kationowe.

Poza zahamowaniem ekspresji transgenu dodatkowym problemem jest czas jego „utrzymywania” się w komórkach docelowych. Czas trwania transgenu w komórkach docelowych jest krótki, a niski po-

#### IV. Szczepionki DNA

Mimo iż wydaje się, że zastosowanie plazmidowego DNA, który indukuje ekspresję cytokin prozapalnych, znacznie ogranicza jego stosowanie w terapii genowej jako wektora ekspresji genów terapeutycznych, to wzbudzenie układu immunologicznego może być jednak czynnikiem terapeutycznym w przypadku leczenia nowotworów. Efekt terapeutyczny wiąże się z uwrażliwieniem komórek układu odpornościowego na obce komórki, np. komórki nowotworowe [7]. Immunizacja organizmu aktywuje szereg komórek układu odpornościowego, szczególnie makrofagi oraz komórki cytotoksyczne typu NK, które niszczą komórki nowotworowe. Zatem sekwencje CpG mogą zostać użyte jako szczepionki w leczeniu nowotworów [21]. Monoterapia nowotworów z zastosowaniem sekwencji CpG nie pozwala na efektywne kontrolowanie wzrostu guzów. Dlatego Ishii i wsp. skojarzyli podawanie oligonukleoty-

dów zawierających sekwencję CpG z podawaniem białka fuzyjnego zawierającego interleukinę-13 i endotoksynę *Pseudomonas*. Połączenie białka IL-13 z endotoksyną bakteryjną umożliwia swoiste dostarczenie toksycznego białka bakteryjnego do komórek nowotworowych zawierających receptor dla interleukiny-13 jak np. nowotwory głowy i szyi, nowotwór prostaty, nowotwór nerki i inne. Taka terapia wpływała wydajnie na zahamowanie wzrostu guzów u zwierząt doświadczalnych [22].

Sekwencje CpG np. obecne w oligodeoksynukleotydach są skutecznym czynnikiem terapeutycznym w terapii astmy oraz chorób związanych z infekcjami bakteryjnymi i wirusowymi. Alergie są chorobami związanymi z uszkodzeniem odpowiedzi subpopulacji limfocytów Th2, wzrostem produkcji przeciwciał IgE. Sekwencje CpG wywołują aktywację subpopulacji limfocytów pomocniczych Th1 zaangażowanych w odpowiedź przeciwnieinfekcyjną i tłumienie subpopulacji Th2 związanych z rozwojem nadwrażliwości na alergenów środowiskowe. Regularne podawanie sekwencji CpG skutecznie leczy skutki alergii i chorób autoimmunizacyjnych [23, 24].

Powierzchnie śluzowe w drogach oddechowych są pierwszą barierą dla czynników wchłanianych drogą oddechową i stanowią najważniejszą granicę pomiędzy układem odpornościowym i środowiskiem. Dlatego najbardziej efektywną drogą poda-

faktancie płuc może znacząco wpływać na stan zapalny układu oddechowego i jego nadwrażliwość na alergenów prowadząc do leczenia objawów alergii czy astmy.

Natomiast w przypadku infekcji bakteryjnych i wirusowych sekwencje CpG mogą być uniwersalnymi szczepionkami DNA w leczeniu tych chorób. Motywy CpG indukują produkcję limfocytów pomocniczych Th1, odpowiedzialnych za aktywność przeciwnieinfekcyjną. Dostarczanie sekwencji CpG w plazmidowym DNA powinno więc podnieść oporność na zachorowania i zmniejszyć śmiertelność organizmów powodowaną infekcjami bakteryjnymi i wirusowymi [7, 12].

V. Hamowanie cytokin prozapalnych w terapii genowej z użyciem plazmidowego DNA

Hamowanie produkcji cytokin prozapalnych podczas terapii genowej, w której geny dostarczane są w wektorach bakteryjnych, znacznie zwiększa ilość produkowanych białek i pozwala na osiągnięcie lepszych wyników terapeutycznych. Ograniczenie ilości cytokin prozapalnych może odbywać się przez zastosowanie immunosupresantów, zmniejszenie ilości sekwencji CpG w plazmidowym DNA czy odpowiednie podawanie DNA i liposomów kationowych (Tab. 2).

Tabela 2.

Hamowanie cytokin prozapalnych

|                                            |                                                    |                                                           |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1. Czynniki immunosupresyjne               | Chlorek gadolinu (GdCl <sub>3</sub> )              | Sakurai F <i>et al.</i> 2002                              |
|                                            | Deksametazon                                       | Tan Y <i>et al.</i> 1999                                  |
|                                            | Chlorokina                                         | Yew NS <i>et al.</i> 2000                                 |
| 2. Zmniejszenie ilości sekwencji CpG w DNA | Eliminacja nieistotnych regionów DNA               | Yew NS <i>et al.</i> 2002                                 |
|                                            | Miejscowo specyficzna mutageneza                   | Yew NS <i>et al.</i> 2000                                 |
|                                            | Metylacja plazmidowego DNA                         | Tan Y <i>et al.</i> 1999<br>Tousignant <i>et al.</i> 2003 |
|                                            | Amplifikowane przez reakcję PCR fragmenty DNA      | Hofman CR <i>et al.</i> 2001                              |
| 3. Nowe taktyki podawania DNA              | Sekwencyjne podawanie plazmidowego DNA i liposomów | Tan Y <i>et al.</i> 2001                                  |

wania sekwencji CpG jest wprowadzanie ich do surfaktantu, czyli substancji lipidowej pokrywającej bardzo cienką warstwę powierzchnię nabłonka oddechowego pęcherzyków płucnych, drogą inhalacji [23, 24]. Modulacja odpowiedzi limfocytów T w sur-

V-1. Czynniki immunosupresyjne

Czynniki immunosupresyjne hamują odpowiedź układu immunologicznego przez zahamowanie indukcji komórek tego układu jak np. makrofagów,

limfocytów B i T, czy produkcji cytokin prozapalnych. Czynniki takimi są np. chlorek gadolinu —  $GdCl_3$ , cyklosporyna A, deksametazon. Wszystkie te czynniki hamują aktywność immunologiczną organizmu, zwiększają ekspresję genów wprowadzanych metodą terapii genowej i pozwalają na uzyskanie stale wysokiego poziomu białek terapeutycznych po ponownym podaniu genu. Związki immunosupresyjne zwiększają także poziom transfekcji komórek docelowych oraz ograniczają apoptozę w miejscu transfekcji wywołaną sekwencjami CpG i stymulacją cytokin prozapalnych.

Chlorek gadolinu przejściowo zmniejsza ilość komórek Kupffera w wątrobie i makrofagów w śledzionie. Wątroba i śledziona są organami odgrywającymi główną rolę w usuwaniu związków toksycznych i mikroorganizmów z krwioobiegu. Komórki Kupffera są dużymi makrofagami, aktywowanymi przez wirusy, lipopolisacharydy i  $TNF-\alpha$ . Dane eksperymentalne wskazują, że te komórki mogą odgrywać znaczącą rolę w produkcji cytokin prozapalnych podczas podawania lipopleksów z plazmidowym DNA [17]. Wcześniejsze podanie chlorku gadolinu zmniejsza ilość  $TNF-\alpha$  od 3 do 10-krotnie i równocześnie podnosi poziom ekspresji transgenów w płucach i komórkach śródbłónki płuc. Podanie chlorku gadolinu znacznie zmniejsza ilość cytokin prozapalnych, co wiąże się ze wzrostem ekspresji transgenów również po wielokrotnym podaniu lipopleksów [17].

Czynnikiem hamującym indukcję cytokin prozapalnych jest również analog hormonu sterydowego deksametazon. Podobnie jak chlorek gadolinu, deksametazon znacząco obniża poziom cytokin we krwi i podnosi efektywność ekspresji transgenów dostarczonych w lipopleksach. Podanie deksametazonu umożliwia uzyskanie wysokiej ekspresji transgenów, po ponownym podaniu genu [16].

Kolejnym czynnikiem hamującym aktywność układu odpornościowego jest chlorokina. Mechanizm jej działania nie jest jednak poznany do końca [25]. Prawdopodobnie hamuje ona dojrzewanie pęcherzyka endosomalnego i aktywację kolejnych białek w kaskadzie reakcji po pobudzeniu receptora [26]. Właściwości immunosupresyjne wykazuje również cyklosporyna A, która hamuje cykl dojrzewania limfocytów T i B.

## V-2. Redukcja ilości sekwencji CpG w plazmidowym DNA i transgenach

Samo zmniejszenie ilości sekwencji CpG w plazmidowym DNA redukuje ilość syntetyzowanych

cytokin prozapalnych. Eliminacja ta może polegać na ograniczeniu nieistotnych dla funkcjonowania plazmidu regionów DNA bogatych w sekwencje CpG np. przez: zmniejszenie ilości miejsc początku replikacji, wstawieniu syntetycznego genu oporności na kanamycynę ze zmniejszoną ilością sekwencji CpG, zastąpieniu promotorów i wzmacniaczy (ang. *enhancer*) odpowiednikami syntetycznymi [27]. Modyfikacje takie nie powodują zmiany funkcjonowania wektorów i pozwalają na efektywną ekspresję transgenów w komórkach docelowych. Usunięcie sekwencji CpG z regionów nieistotnych transkrypcyjnie pozwala na ominięcie problemów związanych z ich toksycznością. Ograniczenie sekwencji CpG w wektorze poprawia czas utrzymywania się ekspresji transgenów i wzrost jego ekspresji w czasie [27].

Poza eliminacją nieistotnych regionów DNA, ilość sekwencji CpG można ograniczyć przez miejscowo specyficzną mutagenezę. Miejscowo specyficzną mutagenezę przeprowadza się w miejscach z dużą ilością sekwencji CpG. Mimo, iż grupie Ye w i wsp. udało się zmniejszyć ilość sekwencji CpG w miejscu początku replikacji tylko o 8, to wektor ten indukował mniejszą ilość cytokin prozapalnych niż wektor niemodyfikowany. Drugim miejscem bogatym w sekwencje CpG jest gen oporności na kanamycynę. Jego miejscowo specyficzna mutageniza cytozyny do tyminy lub guaniny do adeniny znacznie zmniejsza ilość miejsc zawierających sekwencje CpG. Taka modyfikacja zmniejsza ilość produkowanych cytokin o około 50% [28]. Redukcja ilości cytokin aktywowanych przez układ immunologiczny, umożliwia zastosowanie wektorów plazmidowych w terapii genowej. Taki plazmidowy DNA zwiększa efektywność wprowadzania genów do komórek, zwiększa ekspresję wprowadzonych genów i wydłuża czas utrzymywania się transgenów w organizmie.

Skuteczniejszą metodą uniknięcia toksyczności związanej z sekwencjami CpG jest użycie fragmentów DNA amplifikowanych metodą PCR. Fragmenty, które zawierają wyłącznie promotor, intron, gen terapeutyczny i sygnał poliadenylacji można stosunkowo łatwo uzyskać i pozbawić zanieczyszczeń. DNA otrzymane drogą amplifikacji metodą PCR jest wydajnie wprowadzane do komórek zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, a produkt PCR z ograniczoną ilością sekwencji CpG znacznie słabiej indukuje produkcję cytokin prozapalnych. Ilość cytokin jest redukowana około trzykrotnie w porównaniu z wektorem bakteryjnym niemodyfikowanym. Użycie fragmentów ograniczonych do niezbędnych w ekspresji sekwencji transgenów, jest użyteczną strategią w terapii ge-

nowej z zastosowaniem lipopleksów podawanych dożylnie [29].

### V-3. Sekwencyjny sposób podawania DNA i nośnika

Nową metodą eliminacji efektu toksycznego związanego z sekwencjami CpG pochodzącymi z wektora plazmidowego jest tzw. sekwencyjne podawanie liposomów kationowych i plazmidowego DNA. Polega ono na podawaniu DNA do żyły ogonowej myszy 2-5 minut po podaniu liposomu kationowego. Taka taktyka podawania zmniejsza poziom cytokin prozapalnych (IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) w granicach 50-80% w porównaniu z lipopleksami. Spowodowane jest to prawdopodobnie tym, iż wprowadzony DNA jest w większości wolny lub słabo związany z liposomami kationowymi, co znacznie ogranicza oddziaływanie DNA z komórkami układu odpornościowego. Poza tym, „nagi” DNA prawdopodobnie jest stosunkowo łatwo internalizowany przez komórki śródbłónka płuc. Sekwencyjne podawanie lipopleksów i DNA zwiększa 2-3 krotnie poziom ekspresji transgenu [5]. Wzrost ten związany jest z tym, że agregaty liposomów ułatwiają oddziaływanie plazmidowego DNA z komórkami śródbłónka przez ograniczenie szybkości mikrokrażenia w płucach. Podanie liposomu i DNA w odwrotnej kolejności wywołuje podobny efekt jak przy podaniu lipopleksu. Wprowadzenie do krwioobiegu różnych ilości bakteryjnego DNA w przypadku lipopleksów znacznie zwiększa ilość produkowanych cytokin. Wraz ze wzrostem ilości DNA wzrasta ilość produkowanych cytokin. Natomiast w przypadku sekwencyjnego po-

dawania ilość znajdujących się w krwioobiegu cytokin prozapalnych nie ulega zmianie. Wysoki poziom cytokin, indukowany przez kompleksy liposomów z DNA bakteryjnym, nie tylko redukuje poziom ekspresji wprowadzanych genów, ale także wydłuża czas, w którym ponowne podanie kompleksu wykazuje niski poziom transfekcji. Efekt ten jest minimalizowany w przypadku sekwencyjnego podawania liposomów i plazmidowego DNA [5].

## VI. Podsumowanie

Sekwencje CpG obecne w bakteryjnych plazmidach wywołują w organizmie gospodarza stan zapalny. Objawia się on zwiększeniem ilości obecnych we krwi cytokin prozapalnych, szczególnie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IL-12. Stan ten wywołuje efekt toksyczny, który objawia się zwiększeniem ilości leukocytów i płytek krwi oraz wzrostem ilości enzymów wątrobowych: aminotransferazy alaninowej (ALT) i aminotransferazy asparaginianowej (AST).

Wzrost ilości cytokin prozapalnych w surowicy krwi wpływa na skuteczność terapii genowej. Cytokiny te znacznie ograniczają wydajność wprowadzania transgenu do komórek docelowych i obniżają poziom białka terapeutycznego. Cytokiny prozapalne skracają również czas utrzymywania się transgenu w komórkach docelowych.

Chociaż wysoki poziom cytokin prozapalnych wywiera niekorzystny wpływ na terapię genową, aktywacja układu odpornościowego przez sekwencje CpG może być czynnikiem terapeutycznym (Tab. 3). Aktywacja tego układu powoduje zwiększoną wra-

**Tabela 3.**

Zalety i wady sekwencji CpG w terapii genowej z użyciem plazmidowego DNA

| Zalety                                                                                                                           | Wady                                                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Uwrażliwienie układu immunologicznego na obce antygeny i eliminowanie komórek z modyfikowanym DNA (np. komórek nowotworowych) | 1. Eliminowanie komórek transfekowanych i zahamowanie ekspresji białek (brak skutecznego leczenia mukowiscydozy metodą terapii genowej) |
| 2. Możliwość tworzenia szczepionek przeciwko astmie, alergiom, nowotworom                                                        | 2. Wywołanie efektu toksycznego w organizmie — produkcja cytokin prozapalnych, degradacja wątroby, leukopenia, trombocytopenia          |
|                                                                                                                                  | 3. Zmniejszenie wydajności transfekcji <i>in vivo</i>                                                                                   |
|                                                                                                                                  | 4. Skrócenie czasu utrzymywania się transgenu                                                                                           |

żliwość komórek odpornościowych na antygeny, w tym na komórki nowotworowe. Występowanie sekwencji CpG pochodzenia bakteryjnego aktywuje komórki układu immunologicznego, przede wszystkim komórki cytotoksyczne i makrofagi, które mogą eliminować komórki nowotworowe. Motywy CpG są również czynnikami stosowanymi w leczeniu alergii czy chorób wywoływanych przez infekcje bakteryjne. Leczenie alergii polega na podawaniu alergenu w celu redukcji zwiększonej odpowiedzi układu odpornościowego na alergeny środowiskowe, które są odpowiedzialne za te choroby. Natomiast leczenie infekcji bakteryjnych czy wirusowych wiąże się ze wzrostem produkcji limfocytów pomocniczych Th1, biorących udział w odpowiedzi przeciwinfekcyjnej.

Zastosowanie bakteryjnych wektorów ekspresyjnych uniemożliwia leczenie chorób genowych takich jak np. mukowiscydoza, gdzie efektem końcowym ma być produkcja białka prawidłowego, a nie wzbudzenie aktywności układu odpornościowego i zmniejszenie ekspresji tego białka. Do dostarczania genów kodujących prawidłowe białka powinny być stosowane geny ze zredukowaną ilością sekwencji CpG, bądź też efekt toksyczny powinien być ograniczony przez użycie immunosupresantów hamujących układ immunologiczny.

Artykuł otrzymano 18 marca 2004

Zaakceptowano do druku 20 września 2004

## Piśmiennictwo

- Krieg AM (1999) *J Gene Med* 1: 56-63
- Tousignant JD, Zhao H, Yew NS, Cheng SH, Eastman SJ, Scheule RK (2003) *Hum Gene Ther* 14: 203-214.
- Szala S (2003) W: Szala S (red) *Terapia genowa*. PWN, Warszawa, str. 9-34
- Li S, Wu SP, Whitmore M, Loeffert EJ, Wang L, Watkins SC, Pitt BR, Huang L (1999) *Am J Physiol* 276: L796-804
- Tan Y, Liu F, Li Z, Li S, Huang L (2001) *Mol Ther* 3: 673-682
- Krieg AM (2003) *Nat Med* 9: 831-835
- Agrawal S, Kandimalla ER (2002) *Trends Mol Med* 8: 114-121
- Latz ESchoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock D (2004) *Nat Immunol* 5: 190-198
- Krieg AM (2003) *Scand J Infect Dis* 35: 653-659
- Takeshita F, Gursell I, Ishii KJ, Suzuki K, Gursell M, Klinmann M (2004) *Semin Immunol* 16: 17-22
- Ishii KJ, Takeshita F, Gursell I, Gursell M, Conover J, Nussenzweig A, Klinmann DM (2002) *J Exp Med* 196: 269-274
- Krieg AM (2000) *Current opinion in Drug Discovery & Development* 3: 214-221
- Kandimalla ER, Zhu FG, Bhagat L, Yu D, Agrawal S (2003) *Biochem Soc Trans* 31: 654-658
- Krieg AM (1999) *Biochim Biophys Acta* 1489: 107-116
- Rothenfusser S, Tuma E, Wagner M, Endress S, Hartmann G (2003) *Curr Opin Mol Ther* 5: 98-106
- Tan Y, Li S, Pitt BR, Huang (1999) *Hum Gene Ther* 10: 2153-2161
- Sakurai F, Terada T, Yasuda K, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M (2002) *Gene Ther* 9: 1120-1126
- Lindner H, Holler E, Ertl B, Multhoff G, Schreglmann I, Klaukel, Schultz-Hectors S, Eissner G (1997) *Blood* 89: 1931-1938
- Tousignant JD, Gates AL, Ingram LA, Johnson CL, Nietupski JB, Cheng SH, Eastman SJ, Scheule RK (2000) *Hum Gene Ther* 11: 2493-2513
- Whitmore M, Li S, Huang L (1999) *Gene Ther* 6: 1867-1875
- Krieg AM (2004) *Curr Oncol Rep* 6: 88-95
- Ishii KJ, Kawakami K, Gursell I, Conover J, Joshi BH, Klinmann DM, Puri RK (2003) *Clin Cancer Res* 9: 6516-6522
- Jain VV, Businga TR, Kitagaki K, George CL, O'Shaughnessy PT, Kline JN (2003) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L1137-1146
- Kline JN (2002) *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2: 69-73
- Macfarlane DE, Manzel L (1998) *J Immunol* 160: 1122-1131
- Verthelyi D, Zeuner RA (2003) *Trends Immunol* 10: 519-522
- Yew NS, Zhao H, Przybylska M, Wu IH, Tousignant JD, Scheule RK, Cheng SH (2002) *Mol Ther* 5: 731-738
- Yew NS, Zhao H, Wu IH, Song A, Tousignant JD, Przybylska M, Cheng SH (2000) *Mol Ther* 1: 255-262
- Hofman CR, Dileo JP, Li Z, Li S, Huang L (2001) *Gene Ther* 8: 71-74

# Białka wiążące penicylinę oraz ich rola w procesach fizjologicznych bakterii gramujemnych na przykładzie *Escherichia coli*

## The penicillin-binding proteins and their role in physiological processes of gramm-negative bacteria on the example of *Escherichia coli*

JOANNA ZAWADZKA-SKOMIAŁ

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Mureina
  - II-1. Budowa
  - II-2. Biosynteza
- III. Charakterystyka białek wiążących penicylinę (PBP)
  - III-1. Ogólna charakterystyka białek PBP
  - III-2. Biochemiczny obraz struktury białek PBP
  - III-3. Ogólny mechanizm transglikozylacji z udziałem HMW PBP
    - III-3.1. Szczegółowy mechanizm biochemiczny transglikozylacji
  - III-4. Ogólny mechanizm D,D-peptydacji z udziałem LMW PBP
    - III-4.1. Szczegółowy mechanizm biochemiczny D,D-peptydacji
  - III-5. Zależność aktywności białek PBP od ich budowy i lokalizacji w błonie cytoplazmatycznej na przykładzie LMW białka PBP5 *E. coli*
- IV. Funkcje fizjologiczne białek PBP
  - IV-1. Rola białek PBP w syntezie mureiny i określaniu kształtu komórek *E. coli*
- V. Regulacja aktywności białek PBP na poziomie genetycznym
- VI. Podsumowanie

### Contents:

- I Introduction
- II. Murein
  - II-1. Structure
  - II-2. Biosynthesis
- III. Characteristics of penicillin-binding proteins (PBP)
  - III-1. General characteristics of PBP proteins
  - III-2. Biochemical view of the structure of PBP proteins
  - III-3. General mechanism of transglycosylation with the participation of HMW PBP
    - III-3.1. Detailed biochemical mechanism of transglycosylation
  - III-4. General mechanism of D,D-peptidation with the participation of LMW PBP
    - III-4.1. Detailed biochemical mechanism of D,D-peptidation
  - III-5. Dependence of activity of PBP proteins on their structure and localization in cytoplasmatic membrane on the example of *E. coli* LMW PBP5
- IV. Physiological functions of PBP proteins
  - IV-1. Role of PBPs in murein synthesis and determination of the cell shape of *E. coli*
- V. Regulation of PBPs activity at the genetic level
- VI. Summary

**Wykaz stosowanych skrótów:** DMSO (ang. *Dimethyl sulfoxide*) — dimetylosulfotlenek; HMW (ang. *High Molecular Weight*) — o dużej masie, wysokocząsteczkowe; LMW (ang. *Low Molecular Weight*) — o małej masie, niskocząsteczkowe; MIC (ang. *Minimum Inhibitory Concentration*) — najniższe stężenie antybiotyku całkowicie hamujące wzrost bakterii; PBP (ang. *Penicillin Binding Protein*) — białko wiążące penicylinę; UDP

(ang. *Uridine Diphosphate*) — difosforan urydyny; UMP (ang. *Uridine Monophosphate*) — monofosforan urydyny

### I. Wstęp

Istnienie białek PBP zostało odkryte na początku lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia poprzez po-traktowanie poszczególnych frakcji białkowych ko-mórek bakteryjnych znakowaną trytem penicyliną benzylową, a następnie autoradiografię białek roz-dzielonych elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym [1, 2]. Ten pionierski eksperyment ujawnił zdolność wiązania penicyliny przez pewne bakteryj-

Mgr, Uniwersytet Warszawski, Zakład Fizjologii Bakterii, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. 55 41 320, e-mail: lister-  
iajz@biol.uw.edu.pl

ne białka, co dało podstawy do nazwania ich “białkami wiążącymi penicylinę” (ang. *penicillin binding proteins* — w skrócie PBP). Późniejsze badania wykazały, że białka PBP są bardzo rozpowszechnione w świecie bakterii i pełnią ważne funkcje enzymatyczne, uczestnicząc w syntezie bakteryjnej ściany komórkowej (zwanej inaczej mureiną lub peptydoglikanem). Aktywność enzymatyczna w tych procesach jest o tyle istotna, że ściana komórkowa stanowi niejako szkielet zewnętrzny komórki bakteryjnej, który powinien być na tyle sztywny, by zapewnić komórce ochronę przed szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi i różnicą ciśnień względem środowiska wewnętrznego w komórce, a z drugiej strony na tyle elastyczny, by umożliwiać procesy wzrostu i podziału bakterii. Białka PBP działają w równowadze z enzymami autolitycznymi, które w sytuacji zahamowania aktywności syntetaz PBP w sposób niekontrolowany zrywają wiązania w mureinie, co w efekcie prowadzi do śmierci komórki [3].

Rola białek wiążących penicylinę w naturalnych procesach fizjologicznych bakterii nie ogranicza się tylko do syntezy mureiny i nadawania przez to kształtu komórce bakteryjnej. Przypuszczalnie enzymy te uczestniczą także w sekrecji pewnych białek poza błonę cytoplazmatyczną, m. in. flagelliny, będącej składnikiem budulcowym rzęsek [4].

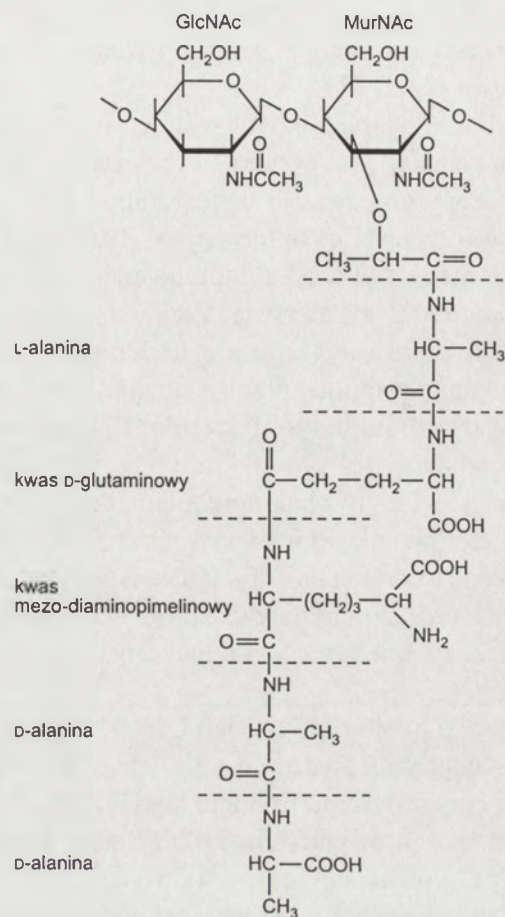
Budowa białek PBP oraz ich naturalne funkcje fizjologiczne w komórce zostały jak dotąd poznane najlepiej u bakterii *Escherichia coli*, wykorzystywane rutynowo do różnego typu badań w dziedzinie mikrobiologii molekularnej. Szczególne zainteresowanie w ostatnich latach wzbudza białko PBP5 tego gatunku, którego doniosłą rolę w komórce odkryto dopiero niedawno.

## II. Mureina

### II-1. Budowa

Ściana komórkowa bakterii jest specyficzną strukturą niespotykaną u organizmów eukariotycznych. Stanowi ona makrocząsteczkę (polimer) złożony z długich łańcuchów cukrowych powiązanych ze sobą bocznymi łańcuchami oligopeptydowymi. Poszczególne łańcuchy cukrowe zbudowane są z powtarzających się jednostek dwucukrowych (*N*-acetylglukozyaminy i kwasu *N*-acetylmuraminowego) połączonych ze sobą wiązaniem  $\beta$ -1,4-glikozydowym. Krótkie łańcuchy peptydowe związane są z resztami kwasu *N*-acetylmuraminowego. Ich budowa jest zróżnicowana u różnych gatunków bakterii, jednak ogólny jej schemat obejmuje

następujące aminokwasy (od N-końca): L-Ala-D-Glu-X-D-Ala- D-Ala (alanina, kwas glutaminowy, aminokwas diaminowy, D-alanina, D-alanina) (Ryc. 1). Warto zaznaczyć, że kwas *N*-acetylomura-



Ryc. 1. Budowa disacharydopentapeptydu mureiny *Escherichia coli*

uraminowy oraz aminokwasy w izomerii D występują wyłącznie w bakteryjnej ścianie komórkowej. Niektóre peptydy z sąsiednich łańcuchów cukrowych połączone są ze sobą wiązaniami poprzecznymi, dzięki czemu mureina tworzy rodzaj worczka (łac. *sacculus*) obejmującego całą komórkę bakterii. U bakterii gramujemnych (w tym też u *E. coli*) wiązania te występują między kwasem mezo-diaminopimelinowym (niewystępującym u organizmów eukariotycznych) a D-alaniną w pozycji czwartej drugiego oligopeptydu z sąsiedniego łańcucha cukrowego [3].

Długość łańcuchów cukrowych jest różna u różnych gatunków bakterii i zależy od warunków wzrostu, przy czym w danej komórce bakteryjnej waha się od kilku do ponad stu jednostek dwucukrowych [3].

### II-2. Biosynteza

Biosynteza mureiny odbywa się w trzech etapach w trzech różnych częściach komórki. Uproszczony przebieg tego procesu został opisany poniżej.

W pierwszej fazie, odbywającej się w cytoplazmie, następuje zsyntetyzowanie prekursora — UDP-*N*-acetylmuramoiopentapeptydu. Prekursor ten składa się z kwasu UDP-*N*-acetylmuraminowego (powstałego z przekształcenia *N*-acetylglukozaaminy) związanego z pentapeptydem o składzie opisanym w II-1 [3].

W drugim etapie, przebiegającym w błonie cytoplazmatycznej, powstały prekursor zostaje przyłączony poprzez resztę fosforanową do specyficznego przenośnika lipidowego — fosforanu undekaprenylu  $C_{55}H_{89}$  (syn. baktoprenol) z jednoczesnym uwolnieniem UMP. Ta postać prekursora nosi nazwę Lipidu I. Lipid I wiązany jest następnie z UDP-*N*-acetylglukozaamina, przekształcając się tym samym w tzw. Lipid II. Po odłączeniu UDP i wytworzeniu wiązania  $\beta$ -1,4 powstaje disacharydopentapeptyd nadal związany z baktoprenolem, który ostatecznie zostaje przeniesiony na zewnętrzną stronę błony cytoplazmatycznej (Ryc. 1). Podczas tego manewru fosforan undekaprenylu odłącza się, będąc gotowym do udziału w transporcie kolejnej cząsteczki prekursora [3].

Trzeci etap biosyntezy obejmuje przyłączanie disacharydopentapeptydów do już istniejących łańcuchów peptydoglikanu. Efektem tego jest wydłużanie łańcuchów cukrowych (transglikozylacja), skracanie wolnych pentapeptydów (karboksypeptydacja) często z równoczesnym tworzeniem peptydowych wiązań poprzecznych (transpeptydacja) sieciujących i usztywniających strukturę mureiny. Reakcje trans- i karboksypeptydacji określa się ogólnie mianem peptydacji, a okres ich następowania — okresem “dojrzenia” mureiny. Procesy peptydacji, jak i transglikozylacji, katalizowane są przez białka PBP [3].

### III. Charakterystyka białek wiążących penicylinę (PBP)

#### III-1. Ogólna charakterystyka białek PBP

Białka PBP dzieli się tradycyjnie na grupę białek (HMW) o masie w zakresie 60-120 kDa oraz białek niskocząsteczkowych (LMW) o masie mieszczącej się w przedziale (20-60 kDa) [5, 6]. Masę określa się wstępnie na podstawie wzoru elektroforetycznego białek PBP znakowanych radioaktywną [ $^3H$ ]penicyliną benzylową. Na podstawie oznaczonej masy przyporządkowuje się białkom PBP określoną cyfrę, numerując białka te w kolejności, poczynawszy od najcięższego [6]. Niekiedy pod postacią jednego prążka kryją się dwa lub trzy PBP o zbliżonych masach, któ-

re rozdziela się w zmienionych warunkach elektroforezy i oznacza dodatkowo literami, np. PBP1a, 1b i 1c *E. coli* [3]. U różnych gatunków bakterii białka wiążące penicylinę występują w różnej liczbie rodzajów (od 3 do 10) oraz liczbie kopii w komórce (od 1000 do 20000), przy czym większe zróżnicowanie ich rodzajów spotyka się wśród bakterii gramujemnych [3]. U daleko spokrewnionych drobnoustrojów białka PBP o tych samych przyporządkowanych numerach nie muszą spełniać tych samych funkcji, chociaż taksonomicznie pokrewne bakterie mają podobny zestaw PBP. Enzymy te, ze względu na swój udział w syntezie bakteryjnej ściany komórkowej, zlokalizowane są na zewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej, będąc w niej luźno zakotwiczone (np. PBP3 *E. coli* — związane poprzez cysteinę z N-końca z łańcuchami kwasów tłuszczowych błony) lub mocno (np. PBP1b *E. coli*, którego N-koniec umiejscowiony jest w cytoplazmie) [6]. Rozmieszczenie w błonie może nie być równomierne. Stwierdzono na przykład, że PBP2 *E. coli* zlokalizowane jest preferencyjnie w ścianie wzdłużnej komórki, szczególnie w połowie jej długości [7]. Ogólnie masa PBP stanowi około 1% całkowitej ilości białek błony cytoplazmatycznej [8]. Tylko niektóre szczepy promieniowców z rodzaju *Streptomyces*, *Actinomadura* i *Saccharopolyspora* produkują zewnątrzkomórkowe niskocząsteczkowe PBP (D,D-peptydazy), rozpuszczalne w środowisku wodnym [8]. Aktywność białek PBP jest niezbędna dla wzrostu i podziału komórki bakteryjnej, choć rola i znaczenie poszczególnych z nich są nierównocenne. Jednoczesna inaktywacja w komórkach wysokocząsteczkowych PBP okazuje się zawsze letalna w skutkach, natomiast inaktywacja białek o niskiej masie nie prowadzi do śmierci komórek, choć przeważnie wywołuje różne zmiany w ich morfologii [3]. Efekt tego typu doświadczeń związany jest z odmiennymi funkcjami reprezentowanymi przez białka PBP należące do grupy HMW i LMW. Białka o wysokiej masie od strony N-końca zawierają domenę transglikozylazową, warunkującą procesy wydłużania łańcuchów cukrowych oraz domenę transpeptydazową od strony C-końca, odpowiedzialną za poprzeczne łączenie tych łańcuchów za pośrednictwem bocznych peptydów, odbywające się w późniejszym etapie syntezy mureiny [3]. U niektórych gatunków bakterii znane są również monofunkcjonalne transglikozylazy, niezaliczane generalnie do białek PBP zawierające tylko domenę [9, 10]. W odróżnieniu od białek HMW, PBP o niskiej masie nie zawierają domeny transglikozylazowej, będąc zdolne jedynie do przeprowadzania transpeptydacji lub karboksypeptydacji

(skracań łańcuchów oligopeptydowych) w zależności od charakteru akceptora uczestniczącego w reakcji [6]. Na uwagę zasługuje fakt, iż białka PBP działają w multikompleksach tworzonych przez rozmaite enzymy biorące udział w syntezie mureiny — hydrolazy i syntetazy, np. w syntezie mureiny septalnej *E. coli* ważną rolę obok PBP odgrywają też hydrolityczne amidazy i endopeptydazy [6, 9]. Tylko niektóre białka wiążące penicylinę mogą do pewnego stopnia zastępować się funkcjonalnie, jednak ich wzajemne współdziałanie, jak również współdziałanie z innymi enzymami nie będącymi białkami PBP, jest bardzo złożone.

### III-2. Biochemiczny obraz struktury białek PBP

Budowa białek PBP jest ściśle określona przez biochemiczny mechanizm ich działania. Każdą grupę PBP (HMW i LMW) dzieli się na kilka klas według stopnia podobieństwa sekwencji aminokwasowej. Białka każdej klasy mają zbliżoną strukturę pierwszorzędową, przy czym podobieństwo tej struktury niekoniecznie odzwierciedla te same funkcje fizjologiczne (np. sekwencja LMW PBP klasy A *Streptomyces* sp.K15 zbliżona jest do  $\beta$ -laktamazy klasy A *S. aureus*) i odwrotnie — białka strukturalnie różne mogą spełniać podobne funkcje enzymatyczne [8]. We wszystkich dotychczas poznanych sekwencjach tych białek występują pewne wspólne motywy, np. w domenach transpeptydazowych SXXK (Ser-AA-AA-Lys), KTG (Lys/His-Tre-Gly), SXA (Ser/Tyr-AA-Asp) lub SXN (Ser-AA-Asn) [11, 12], a w domenach transglikozylazowych HMW PBP obecne są charakterystyczne konserwowane aminokwasy: Glu, Asp w konserwowanym motywie 1, Glu w motywie 3 (wszystkie zawierające dodatkowe reszty karboksylowe ważne w reakcji transglikozylacji) oraz Tyr w motywie 4 [10]. Sekwencje te (lub pojedyncze aminokwasy), znajdując się blisko siebie w wyniku zaginania się łańcucha polipeptydowego, uczestniczą w tworzeniu centrum aktywnego enzymu [8]. Seryna obecna w sekwencji SXXK jest istotnym aminokwasem w centrum aktywnym domeny peptydazowej PBP, uczestniczącą w wiązaniu grupy acylowej po rozbiciu wiązania peptydowego D-Ala-D-Ala, a tym samym wytworzeniu tymczasowego niestabilnego kompleksu enzym-substrat (PBP-tetrapeptyd) [6]. W wysokocząsteczkowych białkach PBP domena wiązania penicyliny rozpoczyna się od 60 reszt aminokwasowych od tej seryny w stronę N-końca białka i kończy około 60 reszt aminokwasowych powyżej triady KTG [6]. W budowie przestrzennej D,D-peptydaz o zbadanej strukturze

drugo- i trzeciorzędowej można wyróżnić dwie części: pierwszą, składającą się tylko z  $\alpha$ -helis, oraz drugą, złożoną z  $\alpha$ -helis i struktur  $\beta$ -harmonijkowych, przy czym pięć łańcuchów  $\beta$ -harmonijkowych o podobnej długości położonych jest obok siebie i są one zasłonięte  $\alpha$ -helisami. Centrum aktywne, zawierające serynę, znajduje się w szczelinie umiejscowionej pomiędzy wymienionymi częściami cząsteczki enzymu na aminowym końcu jednej z  $\alpha$ -helis. Lizyna w sekwencji SXXK mieści się na końcu następnego skrętu  $\alpha$ -helisy, a jej łańcuch boczny jest ukierunkowany na centrum aktywne [8]. Na przykładzie D,D-karboksypeptydazy *Streptomyces* sp.R61 stwierdzono, że karboksylowy łańcuch boczny Asp znajduje się w odległości 0,8 nm od atomu tlenu grupy hydroksylowej seryny, natomiast sekwencja KTG jest częścią ostatniego łańcucha  $\beta$ -harmonijkowej struktury enzymu i graniczy z zagłębieniem katalitycznym. Łańcuch boczny histydyny jest nakierowany na zagłębienie katalityczne, a łańcuch boczny treoniny na zewnątrz centrum aktywnego. Zastąpienie glicyny w opisanej sekwencji KTG przez inny aminokwas powoduje wydłużenie łańcucha bocznego, który zasłania dostęp do zagłębienia katalitycznego i wywołuje zmianę specyficzności enzymu [8]. Szczegółowy biochemiczny model działania białek PBP został przedstawiony poniżej na przykładzie HMW PBP1b *E. coli* funkcjonującego jako transglikozylaza i D,D-transpeptydaza oraz LMW PBP5 *E. coli* funkcjonującego jako D,D-karboksypeptydaza.

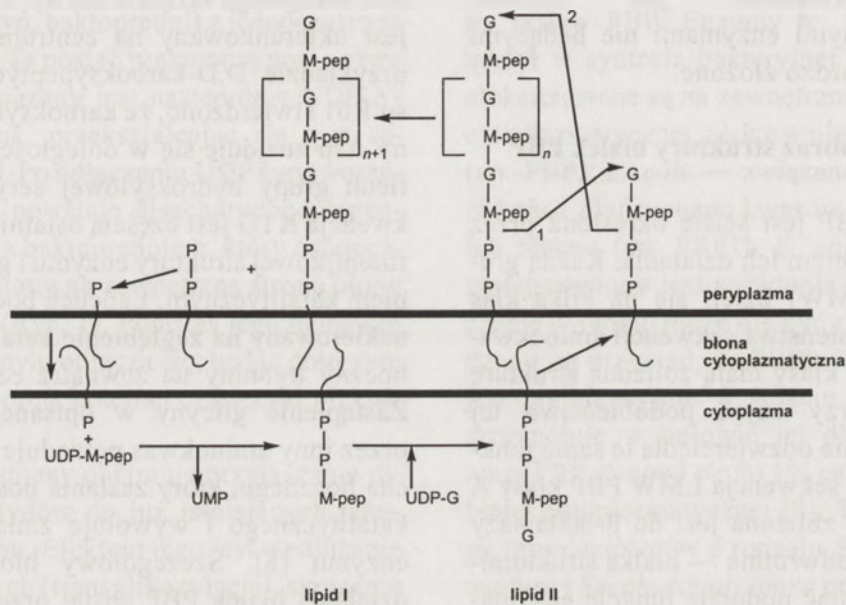
### III-3. Ogólny mechanizm transglikozylacji z udziałem HMW PBP

Mechanizm transglikozylacji zostanie tutaj opisany na przykładzie dość dobrze poznanej reakcji prowadzonej przez PBP1b *E. coli*. PBP1b działa w multikompleksie (diwisomie) obejmującym także enzymy hydrolityczne [13]. Białko to katalizuje połączenie jednostek *N*-acetylglukozamyl- $\beta$ -1,4-*N*-acetylmuramyl-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L(*meso*)-DAP(L)-D-Ala-D-Ala-disacharydopentapeptydu w polimeryczne łańcuchy. Na wstępie reakcji przedstawiona powyżej jednostka budulcowa związana jest poprzez atom węgla C<sub>1</sub> kwasu *N*-acetylmuraminowego z undekaprenylem wiązaniem fosfodiesterowym i łącznie nosi nazwę lipidu II. Podczas transglikozylacji następuje wytworzenie wiązania  $\beta$ -1,4-glikozydowego pomiędzy węglem C<sub>1</sub> kwasu *N*-acetylmuraminowego prekursora a węglem C<sub>4</sub> *N*-acetylglukoaminy obecnej już w łańcuchu cukrowym, z jednoczesnym rozerwaniem wiązania fosfoesterowego i

uwolnieniem lipidowego przenośnika (Ryc. 2). Według tak opisanej reakcji elongacja łańcuchów cukrowych odbywa się od strony ich końca nieredukującego [10]. Niekiedy (np. u *Bacillus licheniformis*) następuje presynteza mniejszych odcinków peptydoglikanu poprzez połączenie ze sobą kilku jednostek prekursorowych, które następnie jako całość włączane są do sakulusa [10]. Aktywność białka PBP1b wzrasta w obecności kationów metali  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ , które są katalizatorami

III-3.1. Szczegółowy mechanizm biochemiczny transglikozylacji

Białko PBP1b *E. coli*, które występuje w trzech formach (alfa, beta i gamma), zawiera domenę transglikozylazową o strukturze pierwszorzędowej charakterystycznej dla PBP klasy A, zawierającej pięć konserwowanych motywów: motyw I, w obrębie którego mieści się Glu-233 oraz Asp-234, motyw III, w którym znajduje się Glu-290 i motyw IV zawierający Tyr-310 [15]. Odcinkiem wysoko konser-



Ryc. 2. Schemat elongacji łańcucha cukrowego podczas syntezy peptydoglikanu; G — N-acetylo-glukozaamina; M — kwas N-acetylo-muraminowy; P — fosforan undekaprenyłu; P-P — difosforan undekaprenyłu; pep — pentapeptyd; 1 — reakcja transglikozylacji od końca redukującego łańcucha cukrowego; 2 — reakcja transglikozylacji od końca nieredukującego łańcucha cukrowego (opis w tekście).

reakcji transglikozylacji, a także DMSO, który prawdopodobnie zwiększa rozpuszczalność lipidu II w środowisku wodnym [13]. Hamująco wpływają na aktywność PBP1b flawomycyny (np. moenomycyna), będące lipopolisacharydowymi analogami strukturalnymi lipidu II, a także wankomycyna — antybiotyk glikopeptydowy, który dezaktywuje domenę transglikozylazową i transpeptydazową enzymu, działając jako sztuczny receptor D-Ala-D-Ala lipidu II [13]. Doświadczenia z użyciem moenomycyny wykazały, że zahamowanie procesu transglikozylacji prowadzonej przez białko PBP1b wpływa na zahamowanie transpeptydacji prowadzonej przez to białko, przy czym inaktywacja domeny transpeptydazy przez penicylinę nie wpływa na aktywność domeny transglikozylazy [3]. Zjawisko to dotyczy także bifunkcyjnych HMW PBP innych gatunków bakterii [6, 14]. Wynika z tego, że transglikozylacja jest warunkiem zajścia późniejszej transpeptydacji i chociaż domeny transpeptydazy i transglikozylazy znajdują się w różnych częściach białka, są powiązane funkcjonalnie.

wowanym jest również odcinek łączący moduł transglikozylazy z modulem transpeptydazy. Białko PBP1b zawiera także hydrofobowy fragment transmembranowy, przyłączony do N-końca domeny transglikozylazy, który zakotwicza w błonie cytoplazmatycznej fałdujący się na zewnątrz od niej polipeptydowy łańcuch białka [10]. Najważniejszym aminokwasem PBP1b, biorącym udział w reakcji katalitycznej, jest Glu-233 obecny w centrum aktywnym, którego grupa karboksylowa jest donorem protonu dla atomu tlenu z wiązania fosfoestrowego między jednostką budulcową a undekaprenylem. Przeniesienie protonu prowadzi do utworzenia kationu oksykarbonowego z udziałem węgla  $C_1$  kwasu N-acetylmuraminowego (łączącego lipid II z enzymem w kowalencyjny kompleks), który następnie zostaje poddany nukleofilowemu atakowi akceptorowej grupy 4-OH N-acetylglukozaaminy. Reakcja ta wymusza inwersję konfiguracji węgla  $C_1$  z konfiguracji  $\alpha$  na etapie prekursora do konfiguracji  $\beta$  na etapie glikozylowanego nukleofilowego akceptora, w wyniku czego powstaje wiązanie  $\beta$ -1,4-glikozyd-

owe. Przypuszcza się, że Asp-234 lub Glu-290 są odpowiedzialne za aktywację nukleofilowej grupy 4-OH *N*-acetyloglukozoaminy i jej deprotonację (co jest niezbędne do utworzenia wiązania), stabilizując jednocześnie kation oksykarbeniowy. Rolę stabilizacyjną pełnią także kationy metali (np.  $Mg^{2+}$ ) poprzez interakcje jonowe z ujemnie naładowanym atomem tlenu w odłączającej się później grupie difosforanowej undekaprenylu. Tyr-310 jest natomiast ważnym aminokwasem warunkującym fałdowanie się pierwszorzędowej struktury białka PBP1b [10].

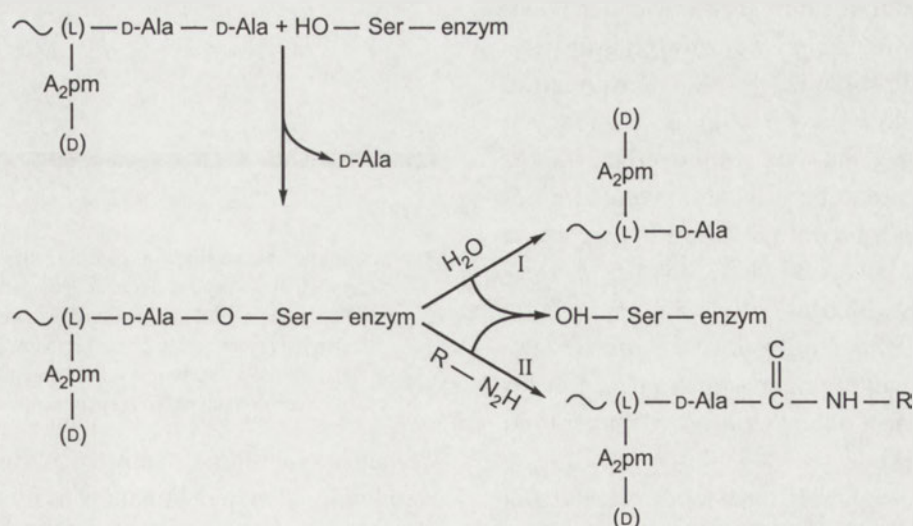
### III-4. Ogólny mechanizm D,D-peptydacji z udziałem LMW PBP

Podczas reakcji peptydacji ma miejsce redukcja łańcucha pentapeptydowego do tetrapeptydowego poprzez rozcięcie wiązania D-Ala-D-Ala, przy czym produkt tych reakcji zależy od charakteru akceptora. W przypadku karboksypeptydacji, kiedy akceptorem jest woda, redukcja pentapeptydu jest jedynym efektem zaszłej reakcji, natomiast podczas transpeptydacji — dzięki odpowiednim właściwościom katalitycznym enzymów transpeptydazowych — wolna grupa karbonylowa D-Ala w pozycji 4 nowopowstałego tetrapeptydu przenoszona jest na akceptor będący wolną grupą aminową diaminowego aminokwasu w sąsiednim niezredukowanym pentapeptydzie (u *E. coli* tym diaminowym aminokwasem jest kwas diaminopimelinowy) [3] (Ryc. 3). W ten spo-

tylko poprzez aktywność samych transpeptydaz, ale również karboksypeptydaz, które przeprowadzają reakcje redukcji wolnych pentapeptydów (również w starszych warstwach ściany komórkowej), co uniemożliwia wykorzystanie ich jako substratów przez transpeptydazy. Warto dodać, że stopień usieciowania mureiny (czyli procent powiązanych ze sobą łańcuchów oligopeptydowych) jest większy u bakterii gramododatnich niż u gramujemnych (przykładowo u *Staphylococcus aureus* wynosi on prawie 100%, u *E. coli* około 24%) [3].

### III-4.1. Szczegółowy mechanizm biochemiczny D,D-peptydacji

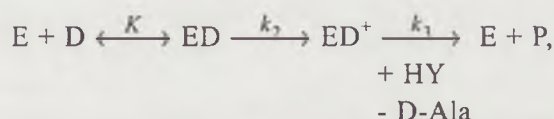
Szczegółowy schemat D,D-peptydacji zostanie opisany tutaj na przykładzie reakcji prowadzonej przez PBP5 *E. coli*. Kluczowymi aminokwasami uczestniczącymi w reakcjach enzymatycznych białka PBP5 *E. coli* są obecne w centrum aktywnym Ser-44 i Lys-47 należące do motywu SXXK oraz Lys-213 znajdująca się w bezpośrednim sąsiedztwie centrum aktywnego [5]. Działanie białka PBP5 (podobnie jak innych D,D-peptydaz) polega na przeniesieniu elektrofilowej grupy R-CO- z hydrolizowanego wiązania peptydowego D-Ala-D-Ala cząsteczki prekursora na serynę w pozycji 44 (acylowanie grupy -OH seryny), a następnie na akceptor, którym dla PBP5 jako D,D-karboksypeptydazy jest cząsteczka  $H_2O$  [5, 8]. D,D-transpeptydazy przenoszą grupę karbonylową R-CO- na aminoakceptor  $NH_2-R$  [3, 8].



Ryc. 3. Reakcje katalizowane przez D,D-peptydazy w zależności od charakteru czynnika nukleofilowego.

sób reakcje transpeptydacji prowadzą do usztywnienia struktury mureiny, która staje się mocnym szkieletem zewnętrznym komórki bakteryjnej, chroniącej ją przed rozerwaniem pod wpływem wysokiego ciśnienia wewnątrzkomórkowego (3-6 Atm) [3]. Proces sieciowania mureiny jest ściśle regulowany — nie

Schemat ogólnej reakcji D, D-peptydacji przedstawia równanie [8]:



I. Schemat reakcji katalitycznej prowadzonej przez białka PBP: E — enzym; D — substrat, donor grupy karbonylowej; HY — substrat, akceptor nukleofilowy ( $\text{H}_2\text{O}$  lub  $\text{NH}_2\text{-R}$ ); ED — kompleks Michaelisa;  $\text{ED}^+$  — wiązanie estrowe seryny (acylowana seryna centrum aktywnego enzymu); P — produkt reakcji ( $\text{R-D-Ala-Y}$ ); K — stała dysocjacji;  $k_2$ ,  $k_3$  — stałe szybkości reakcji

Powyższa reakcja przebiega trójstopniowo.

Pierwszy etap (K) polega na wstępnym rozpoznaniu donora karbonylowego oraz właściwym ustawieniu rozszczepianego wiązania peptydowego D-Ala-D-Ala donora względem katalitycznie aktywnych grup funkcyjnych enzymu. U wszystkich D,D-peptydaz następuje dopasowanie co najmniej trzech miejsc wiążących enzymu. Dwa z nich oddziałują z grupami metylowymi donora, natomiast trzecie miejsce katalityczne oddziałuje z łańcuchem bocznym lizyny substratu pentapeptydowego. Dodatkowo Lys-47 bierze udział w tworzeniu kompleksu Michaelisa poprzez interakcje z C-końcową grupą karboksylową substratu [8].

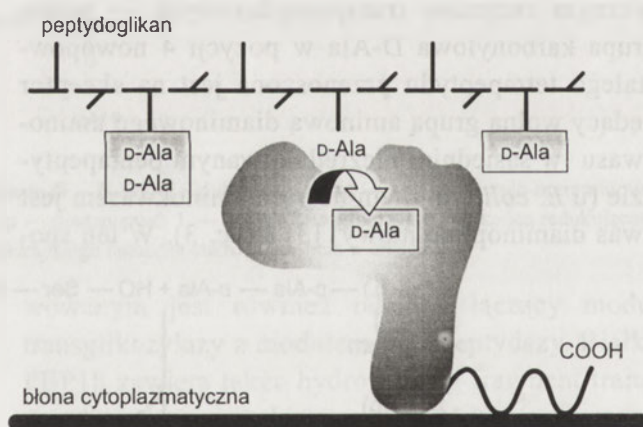
Drugi etap reakcji ( $k_2$ ) polega na polaryzacji grupy karbonylowej substratu ( $\text{R-CO-}$ ) i przeniesieniu protonu z atomu tlenu w pozycji  $\gamma$  Ser-44 w centrum aktywnym enzymu na atom węgla rozszczepianego wiązania peptydowego substratu. Polaryzacja grupy karbonylowej substratu oraz uzyskanie silnie nukleofilowego charakteru Ser-44 następuje poprzez oddziaływanie układu przeniesienia ładunku. Układ ten powstaje przy udziale oddziaływań van der Waalsa, hydrofobowych, i wiązań wodorowych grupy hydroksylowej -OH Ser-44 oraz Lys-47, także dodatnio naładowanych końców dwóch  $\alpha$ -helis, tworzących dipole [8]. Dużą rolę na tym etapie odgrywa też Lys-213, która — jako dodatnio naładowany aminokwas diaminowy — oddziałuje z terminalną grupą karboksylową pentapeptydu [5]. W wyniku wszystkich tych oddziaływań dokonuje się acylowanie Ser-44 w białku PBP5 i uformowanie pierwszego produktu przejściowego enzym-substrat, czemu towarzyszy jednoczesne odłączenie od pentapeptydu końcowej alaniny [8].

W trzecim etapie reakcji ( $k_3$ ) następuje deacylacja enzymu. Układ przeniesienia odciąga proton z cząsteczki akceptora (główną rolę odgrywa tu oddziaływanie Lys-47), którym dla PBP5 jest cząsteczka wody (w przypadku D,D-transpeptydaz — grupa  $\text{NH}_2\text{-R}$  z sąsiedniego łańcucha peptydowego). Powstały w ten sposób anion atakuje karbonylowy atom węgla w wiązaniu acylowym łączącym substrat z Ser-44 enzymu, w wyniku czego dochodzi do utworzenia drugiego produktu przejściowego [5, 8]. W

ostatniej fazie odbywa się przekazanie przez Lys-47 protonu z tego produktu z powrotem na atom tlenu  $\gamma$  Ser-44, a skutkiem tego jest uwolnienie D,D-karboksypeptydazy PBP5 gotowej do następnej reakcji katalitycznej oraz wolnego tetrapeptydu (w przypadku D,D-transpeptydacji produktem reakcji jest utworzone międzypeptydowe wiązanie poprzeczne w murynie) [3]. Warto zaznaczyć, że w reakcje D,D-peptydacji prowadzone z udziałem innych białek PBP mogą być zaangażowane inne aminokwasy sąsiadujące z centrum aktywnym, jednak zawsze pryncypalną rolę odgrywają reszty seryny i lizyny obecne w konserwowanym motywie SXXX.

### III-5. Zależność aktywności białek PBP od ich budowy i lokalizacji w błonie cytoplazmatycznej na przykładzie LMW białka PBP5 *E. coli*

D,D-karboksypeptydaza PBP5 *E. coli* złożona jest z dwóch części połączonych ze sobą pod kątem prostym, tworząc kształt odwróconej litery "L" (Ryc.4).



Ryc. 4. Struktura białka PBP5 *E. coli*. Strzałką oznaczono lokalizację centrum aktywnego w domenie globularnej enzymu, natomiast linią falistą u dołu 18-aminokwasowy C-końcowy odcinek białka połączony z jego częścią trzonową. Górne linie symbolizują pojedyncze murcinowy łańcuch cukrowy z odchodzącymi w różnych orientacjach oligopeptydami.

Domena globularna, stanowiąca niejako "głowę" tego kompleksu, jest bogata w motywy konserwowane obecne także w PBP6, DacD i  $\beta$ -laktamazach klasy A *E. coli* oraz mieści po swej zewnętrznej stronie centrum aktywne. Domena "trzonowa" — prostopadła do niej — zbudowana jest prawie wyłącznie z elementów  $\beta$ -harmonijkowych i pełni funkcję jak dotąd niewyjaśnioną, przy czym jej sekwencja nie jest tak silnie konserwowana jak w domenie pierwszej. Domena ta powiązana jest z błoną cytoplazmatyczną poprzez 18-aminokwasową amfipatyczną he-

li się od strony C-końca białka [16, 17]. Zlokalizowane w ten sposób białko PBP5 hydrolizuje tylko wiązania D-Ala-D-Ala pentapeptydów skierowanych do błony cytoplazmatycznej, natomiast pozostałe peptydy z łańcuchów bocznych, znajdujące się w innych płaszczyznach, są niedostępne dla tego enzymu. Stanowi to ważny mechanizm regulacji aktywności białka PBP5, co potwierdzają doświadczenia polegające na odcięciu od niego fragmentu kotwiczącego w błonie cytoplazmatycznej — zmodyfikowany w ten sposób enzym, dyfundujący swobodnie do peryplazmy, intensywnie hydrolizuje wiązania peptydowe w mureinie, do których ma nieograniczony dostęp, doprowadzając tym samym do osłabienia ściany komórkowej i lizy komórki [16]. Przyпуска się również, że domena „trzonowa” wraz z odcinkiem zakotwiczącym PBP5 może regulować jego aktywność enzymatyczną poprzez bliżej nieznaną interakcję z innymi białkami, uczestniczącymi w syntezie mureiny. Określone punktowe mutacje na tym odcinku, dotyczące zwłaszcza aminokwasów najbardziej konserwowanych wśród analogicznych odcinków spokrewnionych białek (głównie Lys-4 i Asp-7), wywołują zanik aktywności D,D-karboksypeptydazowej PBP5. Ma to prawdopodobnie związek ze zmianą typu interakcji biochemicznych, zwłaszcza w przekształconym układzie reszt aminowych. Zmiana tych oddziaływań wpływa znacząco na giętkość i swobodę ruchów białka PBP5 wymaganych do jego aktywności katalitycznej [17].

Przykład omawianego enzymu wskazuje na działanie białek PBP w wielobiałkowych kompleksach, przypuszczalnie przez oddziaływanie ich domen trzonowych i krótkich odcinków osadzonych w błonie cytoplazmatycznej z innymi obszarami tej błony a także z innymi enzymami uczestniczącymi w syntezie peptydoglikanu. Co więcej, różnorodność funkcji fizjologicznych pewnych spokrewnionych enzymów o takich samych właściwościach katalitycznych (np. PBP4, 5, 6 i DacD *E. coli*) mogą częściowo wynikać z subtelnych różnic sekwencji tych właśnie fragmentów łańcuchów białkowych (hybrydowe białko PBP6 z wymienionym odcinkiem C-terminalnym, pochodzącym od PBP5 nie przejawia aktywności D,D-karboksypeptydazowej) [17]. Inna koncepcja dotycząca modelu działania D,D-karboksypeptydaz zakłada, iż ich domeny „trzonowe”, zakotwiczone w błonie cytoplazmatycznej, nie są bezpośrednio odpowiedzialne za odmienne funkcjonowanie tych białek mimo ewidentnych różnic w ich sekwencji aminokwasowej. Enzymy te są aktywne w tych samych wielobiałkowych kompleksach, w związku z czym regulacja ich działania polega na

wzajemnym konkurowaniu ze sobą o miejsce w obrębie tych kompleksów, co stanowi mechanizm regulacji ich aktywności [17].

#### IV. Funkcje fizjologiczne białek PBP

##### IV-1. Rola białek PBP w syntezie mureiny i określaniu kształtu komórek *E. coli*

*E. coli* syntetyzuje 10 rodzajów białek PBP. Należą do nich zarówno białka wysokocząsteczkowe (PBP 1a, -1b, -1c, -2, -3) jak i niskocząsteczkowe (PBP4, -5, -6, -7, DacD), przy czym do tych ostatnich często zalicza się także białka AmpC i AmpH o aktywności  $\beta$ -laktamazowej [16]. Rola białek o dużej masie (HMW) jest w znacznym stopniu poznana: PBP1a i 1b działają jednocześnie jako transpeptydazy i transglikozylazy, odpowiadając za wydłużanie łańcuchów cukrowych mureiny oraz ich łączenie poprzeczne przez oligopeptydy, PBP1c — niedawno odkryte — działa jedynie jako transglikozylaza, natomiast białka PBP2 i 3 wykazują aktywność transpeptydazową [9]. W celu ustalenia funkcji fizjologicznych tych białek w warunkach *in vivo*, przeprowadzono liczne eksperymenty dotyczące szczepów dzikich *E. coli* z udziałem antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, a także zbadano efekt fenotypowy mutacji genów kodujących poszczególne białka PBP, wprowadzanych do genomu *E. coli* w różnych kombinacjach (konstrukcja mutantów wielokrotnych). Na tej podstawie udowodniono, że enzymatyczna aktywność PBP1a i 1b jest niezbędna do wzrostu komórek *E. coli*, ponieważ jednoczesna mutagenizacja genów kodujących te białka wywołuje efekt letalny, natomiast zahamowanie aktywności tych białek poprzez wybiórczo wiążące się z nimi antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, jak cefsulodyna, cefalorydyna lub imipenem, powoduje szybką lizę komórek w hodowlach [3]. Mutanty pojedyncze pozbawione jedynie funkcjonalnego białka PBP1a są żywotne, choć rosną na podłożu stałym w postaci mukoidalnej, wytwarzając grubą śluzowatą otoczkę, której głównym składnikiem jest kwas kolaninowy. Przyczyna i mechanizm wydzielania tego typu otoczki przez szczepy  $\Delta$ PBP1a nie są poznane, jednak — co istotne — efektu tego nie zaobserwowano u mutantów pozbawionych PBP1b [4]. Bakterie *E. coli* nadprodukujące PBP1a rosną w postaci bardzo krótkich pałeczek, dużo krótszych od komórek nadprodukujących PBP1b [9]. Obserwacje te wskazują na to, iż białka PBP1a i -1b pełnią w komórkach *E. coli* odmienne funkcje fizjologiczne, mimo że obydwa te enzymy o właściwościach transglikozylaz i transpeptydaz

uczestniczą w procesach syntezy mureiny cylindrycznej części komórki oraz jej sieciowania. Hipotezę tę potwierdza analiza sekwencji aminokwasowej tych białek, która nie wykazuje wysokiego stopnia ich pokrewieństwa [9]. Szczegółowe badania biochemiczne dowiodły, że PBP1a oraz -1b występują w formach homodimerycznych, co jest niezbędne w procesie prawidłowej syntezy mureiny i prawdopodobnie ma związek z bifunkcjonalnością tych białek. Białka te nie tworzą jednak wspólnego heterodimeru i co więcej, obydwa współdziałają z odmiennymi enzymami hydrolitycznymi i syntetyzującymi (zwłaszcza podczas transglikozylacji), należąc do różnych, lecz najważniejszych kompleksów wielobiałkowych, uczestniczących w skomplikowanej syntezie mureiny [9].

Selektywne zablokowanie aktywności PBP2 w rosnących komórkach *E. coli* przez mecylinam powoduje zmianę kształtu komórek (z pałeczek w formy kuliste) i w konsekwencji ich autolizę, co wskazuje na udział białka PBP2 w syntezie mureiny tworzącej cylindryczną część komórek *E. coli* oraz w inicjacji biosyntezy ściany komórkowej w nowych miejscach. Innego rodzaju zjawisko występuje w przypadku wybiórczej acylacji białka PBP3 przez penicylinę lub furozlacylinę, czego efektem jest powstanie równych i regularnych filamentów komórkowych, a następnie ich liza [3, 6]. Tego typu deformacje morfologiczne świadczą o uczestnictwie PBP3 w formowaniu przegrody poprzecznej podczas podziału komórek, stanowiącej później bieguny nowopowstałych komórek. Białko PBP3 (zwane inaczej FtsI) jest głównym białkiem przyłączającym się do polimerycznego pierścienia zbudowanego z białka FtsZ, inicjującego podział komórkowy. PBP3, aktywowane poprzez to przyłączenie, ukierunkowuje syntezę peptydoglikanu, doprowadzając do powstania septy pośrodku komórki [18]. Jak zatem widać, obydwie wymienione powyżej funkcje fizjologiczne białek PBP są na tyle istotne, że zmiany morfologiczne spowodowane zahamowaniem aktywności tych enzymów prowadzą do śmierci komórek. Jednoczesne potraktowanie żywych komórek *E. coli* szczepów dzikich mecylinamem i aztreonamem (antybiotykami wybiórczo wiążącymi się odpowiednio z PBP2 i PBP3) wywołuje gwałtowną lizę tych komórek [4]. Interesujące w tym świetle są wyniki najnowszych badań przeprowadzonych z udziałem mutantów pozbawionych poszczególnych białek PBP, poddanych jednoczesnemu działaniu wyżej wymienionych antybiotyków. Według tych badań komórki wielokrotnych mutantów delecyjnych zawierających aktywne białko PBP1b przestają się dzielić w obec-

ności mecylinamu i aztreonamu, lecz nie lizują, a jednocześnie powiększają swe rozmiary, tworząc olbrzymie formy sferyczne o średnicy 5 – 10  $\mu\text{m}$ . Obserwacje te potwierdzają słuszność wcześniejszych stwierdzeń dotyczących znaczenia fizjologicznych funkcji białek PBP2 i PBP3 *E. coli* [4].

W odróżnieniu od wysokocząsteczkowych białek PBP rola białek wiążących penicylinę o niskiej masie w komórkach *E. coli* pozostaje nadal w dużej mierze niewyjaśniona. Pod względem aktywności biochemicznej można wyróżnić wśród białek PBP LMW *E. coli* cztery klasy enzymów: D,D-karboksypeptydazy (PBP5, 6, DacD), D,D-endorpeptydazy (PBP7), D,D-karboksypeptydazy pełniące jednocześnie funkcję D,D-endorpeptydaz (PBP4) oraz  $\beta$ -laktamazy (AmpC, AmpH) [16, 21]. Na uwagę zasługuje fakt, iż wiele enzymów spośród tych białek — PBP4, 5, 6, 7 — wykazujące aktywność endopeptydazową lub karboksypeptydazową, należą jednocześnie do grupy enzymów hydrolitycznych, które, rozcinając odpowiednie wiązania kowalencyjne w strukturze mureiny, umożliwiają insercję nowych jednostek budulcowych i uwalnianie starszych, regulując tym samym wzrost komórki oraz jej podział. Białko PBP4 jako endopeptydaza hydrolizująca wiązania poprzeczne między bocznymi łańcuchami peptydowymi, jest jednocześnie enzymem o właściwościach autolitycznych, tzn. w określonych warunkach stresowych (np. w obecności antybiotyków  $\beta$ -laktamowych lub detergentów), w wyniku nadmiernej aktywności wywołanej zaburzeniem mechanizmów kontroli, może ona zaindukować samobójczą lizę komórki [19]. Bezpośrednie wywoływanie autolizy *E. coli* przez rozregulowaną aktywność PBP4 jest jednak rzadkie, na co wpływa lokalizacja tego białka (po zewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej, a więc z dala od miejsc docelowego działania w mureinie) oraz ścisła regulacja jego aktywności, której apogeum przypada na czas tuż przed podziałem komórki, słabnąc w końcu fazy logarytmicznej hodowli bakteryjnej. Mimo wcześniejszych przypuszczeń, zmiany w aktywności PBP4 nie mają bezpośredniego związku z replikacją DNA — procesy te są regulowane równolegle, lecz niezależnie od siebie [19].

Na temat drugiego białka PBP *E. coli* pełniącego funkcję endopeptydazy (PBP7) warto wspomnieć w tym miejscu jedynie tyle, iż jest ono niezbędne do syntezy mureiny odpornej na autolizę wywołowaną antybiotykami  $\beta$ -laktamowymi, charakterystycznej dla komórek nierosnących. Enzym ten umożliwia syntezę mureiny, nawet w niesprzyjających warunkach środowiskowych Białko PBP7 inaktywują wy-

biórczo penemy i karbapenemy (antybiotyki  $\beta$ -laktamowe nowej generacji) [19].

Badania mające na celu bliższe poznanie fizjologicznych funkcji niskocząsteczkowych białek PBP *E. coli* umożliwiła konstrukcja mutantów *E. coli* pozbawionych poszczególnych białek PBP w różnych kombinacjach. Tego typu postępowanie okazało się konieczne ze względu na fakt, iż pewne białka PBP LMW wykazują tę samą aktywność enzymatyczną, a zatem efekt pojedynczego mutowania genów kodujących poszczególne białka mógłby nie wyrażać się fenotypowo w sposób widoczny. Przeprowadzone do tej pory badania wskazują, że spośród białek niskocząsteczkowych *E. coli* najważniejszym białkiem determinującym kształt komórek jest PBP5 [16, 17]. Białko to, najliczniejsze spośród LMW PBP *E. coli* (ok. 1800 kopii cząsteczek w komórce), jest główną D,D-karboksypeptydazą i w głównej mierze decyduje o wymiarach komórek (szczególnie średnicy), jednolitości ich powierzchni i ogólnej topologii woreczka mureinowego [17, 20]. Inaktywacja białka PBP5 nie wywołuje efektu letalnego, jednak wszelkie zmiany dotyczące ilości jego cząsteczek w komórkach wyraźnie wyrażają się fenotypowo poprzez aberracje w morfologii tych komórek. Mutanty  $\Delta$ PBP5, w których PBP5 zostało zinaktywowane jako jedyne białko PBP, przejawiały nieznaczne deformacje kształtu komórek związane jedynie ze zwiększeniem ich długości ponad 1,2  $\mu$ m, jednak morfologia pozostałych skonstruowanych szczepów, w których oprócz PBP5 zinaktywowano także niektóre inne LMW PBP, uległa zdecydowanym zmianom [16, 17, 20]. Najsilniejsze defekty wykazują mutanty pozbawione jednocześnie funkcjonalnego białka PBP5 i PBP6 (lub PBP5 i DacD) oraz jednej z dwóch endopeptydaz (PBP4 lub PBP7) [16]. Istotny jest również fakt, iż silne aberracje morfologiczne wykazują mutanty pozbawione wszystkich białek PBP LMW (komórki o niepowtarzalnym, nieregularnym kształcie prezentujące liczne wybrzuszenia i rozgałęzienia) i jedynie rewersja mutacji inaktywującej białko PBP5 przywraca komórkom w pełni ich naturalną długość, średnicę i linię konturu [16, 20]. Obserwacje te wskazują na to, iż żadne z niskocząsteczkowych białek PBP *E. coli* nie pełni funkcji zastępczej wobec PBP5, choć białka PBP6 i DacD, jako enzymy najbliższe spokrewnione z PBP5, mogą w niewielkim stopniu łagodzić efekt delekcji genu kodującego PBP5 i — przeciwnie — ich jednoczesna delekcja potęguje defekty w morfologii komórek [17, 20]. Obserwacje ściany komórkowej pojedynczych mutantów  $\Delta$ PBP5 i  $\Delta$ PBP6 pod mikroskopem elektronowym TEM wskazują na zróżnicowany

udział PBP5 i PBP6 w syntezie mureiny (szczepy  $\Delta$ PBP5 mają cienką i rozluźnioną warstwę peptydoglikanu) [20]. Warto podkreślić, że również nadprodukcja białka PBP5 wpływa na kształt komórek bakteryjnych, który staje się w tych warunkach sferyczny. Ma to związek z nadmiernym usieciowaniem i skróceniem łańcuchów cukrowych w mureinie. Zjawisko to, w połączeniu z faktem wydłużania się komórek w warunkach braku aktywności PBP5, pozwala wykluczyć udział tego białka w syntezie mureiny elongacyjnej komórek. Co ciekawe, nadprodukcja PBP5 we wczesnej fazie logarytmicznej hodowli bakteryjnej prowadzi do lizy zdeformowanych komórek, czego nie obserwuje się przy nadprodukcji PBP4, PBP6 lub DacD [16]. Potwierdza to hipotezę o różnorodności funkcji pełnionych przez poszczególne niskocząsteczkowe białka PBP, mimo, że pewne funkcje enzymatyczne reprezentowane są przez więcej niż jeden rodzaj białek PBP, a mutacje delecyjne w genach kodujących te białka nie są letalne. Fenotypowe różnice wśród mutantów o różnych kombinacjach zinaktywowanych białek PBP świadczą o braku prostej substytucji funkcji jednych białek przez inne i przeczą hipotezie utrzymywaniu w komórkach białek funkcjonalnie zduplikowanych jako niepotrzebnego materiału. Warto przy tym podkreślić, że białka bakterii *E. coli*, dla którego to gatunku optimum pH wzrostu wynosi 6,0-8,0, wykazują zróżnicowany profil aktywności względem pH środowiska. Fakt ten jest ważny dla przeżycia i przynajmniej częściowo tłumaczy istnienie u tego gatunku tak wielu LMW PBP o podobnych funkcjach, co pozornie wydaje się niepotrzebne [5]. Wśród wyników badań dotyczących LMW PBP *E. coli* najbardziej intrygujące do tej pory okazały się właśnie te dotyczące białka PBP5. Szczególnie interesujący wydaje się odkryty fakt, iż za kształt komórki bakteryjnej odpowiadają nie tylko procesy elongacji mureiny prowadzone przez HMW PBP (co wydaje się oczywiste), ale również regulacja długości wolnych łańcuchów oligopeptydowych przez D,D-karboksypeptydazę, a tym samym kontrola stopnia usieciowania mureiny. Bezpośredni związek między aktywnością tych enzymów a efektem morfologicznym w komórkach *E. coli* pozostaje do końca niewyjaśniony, choć przypuszcza się, że w nieobecności białka PBP5 potencjalne jego substraty pentapeptydowe stają się dostępne dla transpeptydaz, które, tworząc w nadmierny i niekontrolowany sposób poprzeczne wiązania, deformują cylindryczny kształt komórki.

## V. Regulacja aktywności białek PBP na poziomie genetycznym

Kontrola ekspresji genów strukturalnych białek wiążących penicylinę jest złożona. Przeprowadzone do tej pory badania wskazują na to, że ekspresja tych genów uzależniona jest od wielu innych genów, np. gen *rodA* *E. coli* (kodujący białko biorące udział w syntezie mureiny elongacyjnej) sprzężony jest z genami *pbpA* (kodującym PBP2) oraz *dacA* lub *mrdB* (kodującymi PBP5) [6]. Jednym z ciekawszych i lepiej poznanych mechanizmów regulacji jest system kontroli białek odpowiedzialnych za syntezę ściany komórkowej *E. coli*, w którym pryncypialną rolę odgrywa gen *bolA*. Gen ten koduje niewielkie białko regulatorowe o masie 13 kDa zdolne do wiązania się z DNA, które działa jak aktywator transkrypcji genów strukturalnych D,D-karboksypeptydaz PBP5 i PBP6 (*dacA* i *dacC*) oraz  $\beta$ -laktamazy klasy C AmpC (*ampC*) [22]. Udowodniono także, iż gen *bolA* nie jest sprzężony z genami *pbpA* i *rodA* (kodującymi białka zaangażowane w syntezę mureiny elongacyjnej), natomiast działa w układzie z genem *ftsZ*, którego produkt FtsZ (PBP3) jest białkiem uczestniczącym w formowaniu pierścieniowego zwężenia podczas podziału komórki [18]. Współdziałanie zaś białka FtsZ z regulowanymi przez *bolA* D,D-karboksypeptydazami PBP5 i PBP6, które ograniczają nadmierną transpeptydację dokonywaną przez PBP3, umożliwia tworzenie podziałowego zwężenia i nowego bieguna dzielącej się komórki [20, 22]. Ekspresja genu *bolA* nasila się w niesprzyjających warunkach środowiskowych (głód węglowy, niedotlenienie) oraz w fazie stacjonarnej hodowli bakterii *E. coli* w bogatym podłożu, podczas której takie warunki mogą wystąpić. Warunkuje to utrzymanie odpowiedniej morfologii komórek w tych sytuacjach, a tym samym ich przeżycie. Komórki nadprodukujące białko Bola w fazie stacjonarnej hodowli nabierają kulistego kształtu i — jako osmotycznie stabilne — utrzymują się przy życiu przez dłuższy czas. Komórki nadprodukujące Bola w logarytmicznej fazie hodowli dzielą się nierówno w nietypowych miejscach, tworząc populację różnokształtnych komórek [22]. Warto zaznaczyć, że regulacja aktywności białek PBP5 i PBP6 przez *bolA* nie odbywa się jednakowo. Stwierdzono, że najwyższa ekspresja genu *dacA* (PBP5) ma miejsce w logarytmicznej fazie hodowli, podczas gdy już na wstępie fazy stacjonarnej przewyższa ją ekspresja genu *dacC* (PBP6). Wynika z tego, że D,D-karboksypeptydaza PBP6 — jako enzym o 3-4-krotnie niższym powinowactwie do substratów pentapeptydowych niż PBP5 — nabiera wię-

kszego znaczenia podczas wolniejszego metabolizmu komórkowego w niesprzyjających warunkach zewnętrznych. Zwiększenie ilości i poziomu aktywności D,D-karboksypeptydazy PBP6 w fazie stacjonarnej hodowli wiąże się z równoczesnym spadkiem ilości wysokocząsteczkowych PBP1C, -2 i -3 [22]. W ten sposób obniżona ilość prekursorów dla PBP3 ogranicza podział komórek w niekorzystnych warunkach, zwiększając ich szansę na przeżycie. Równowaga między aktywnością D,D-karboksypeptydaz i D,D-transpeptydaz w cyklu życiowym komórki ma ważne znaczenie dla tworzenia przegród komórkowych. Maksymalna aktywność D,D-transpeptydaz występuje natychmiast po podziale komórki, zaś najwyższa aktywność D,D-karboksypeptydaz tuż przed podziałem. Podobne zmiany w zestawie białek PBP oraz ich aktywności enzymatycznej mają też miejsce u innych gatunków bakterii [8]. Godny uwagi jest fakt, iż przedstawiony tu system kontroli morfologii kształtu komórek *E. coli* obejmuje również  $\beta$ -laktamazę AmpC i z tego względu jest jak do tej pory jedynym znanym przypadkiem wspólnej regulacji aktywności białek PBP i  $\beta$ -laktamaz na poziomie genetycznym. Białka PBP5, PBP6 i AmpC, działające pod kontrolą genu *bolA*, są sprzężone funkcjonalnie. Mechanizm bezpośredniej aktywacji ekspresji samego genu *bolA* przez czynniki zewnętrzne nie jest jednak poznany.

## VI. Podsumowanie

Badania nad białkami PBP ujawniają coraz większe ich znaczenie w procesach fizjologicznych komórek bakteryjnych. *E. coli* stanowi dogodny obiekt tego typu badań, dzięki którym zostają poznane zasady działania PBP oraz ich udział w procesach fizjologicznych bakterii. Jest to o tyle istotne, że budowa oraz funkcjonowanie tych białek pozostaje w ścisłym związku z poziomem oporności wielu bakterii na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, które stanowią najszerszą grupę antybiotyków stosowanych powszechnie w medycynie. Szczegółowe zrozumienie mechanizmów regulacji aktywności białek PBP na poziomie genetycznym oraz ich roli w prawidłowym wzroście komórek ma umożliwić w przyszłości doskonalanie syntetycznych antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, których bezpośrednim celem działania są właśnie bakteryjne białka PBP.

Artykuł otrzymano 20 lutego 2004

Zaakceptowano do druku 20 września 2004

1. Spratt B G (1975) *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 2999-3003
2. Spratt B G (1977) *Eur J Biochem* **72**: 341-352
3. Markiewicz Z (1993) *Struktura i Funkcje Osłon Bakteryjnych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
4. Young K D (2001) *Biochimie* **83**: 99-102
5. Stefanova ME, Davies C, Nicholas RA, Gutheil WG (2002) *Biochim Biophys Acta* **1597**: 292-300
6. Markiewicz Z, Kwiatkowski Z A (2001) (red) *Bakterie, Antybiotyki, Lekooporność*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
7. Den Blaauwen T, Aarsman ME, Vischer NO, Nannin-ga N (2003) *Mol Microbiol* **47**: 539-547
8. Solecka J, Kurzątkowski W (1998) *Post Mikrobiol* **37**: 33-56
9. Charpentier X, Chalut C, Remy MH, Masson JM (2002) *J Bacteriol* **184**: 3749-3752
10. Terrak M, Ghosh TK, van Heijenoort J, van Beeu-men J, Lampilas M, Aszodi J, Ayala JA, Ghuysen JM, Nguyen-Disteche M (1999) *Mol Microbiol* **34**: 350-364
11. Chesnel L, Zapun A, Mouz N, Dideberg O, Vernet T (2002) *Eur J Biochem* **269**: 1678-1683
12. Nagai K, Davies TA, Jacobs MR, Appelbaum PC (2002) *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1273 -1280
13. Schwartz B, Markwalder JA, Seitz SP, Wang Y, Stein R L (2002) *Biochemistry* **41**: 12552-12561
14. Di Guilmi AM, Dessen A, Dideberg O, Vernet T (2003) *J Bacteriol* **185**: 4418-4423
15. Meisel U, Holtje J V, Vollmer W (2003) *J Bacteriol* **185**: 5342-5348
16. Nelson DE, Young KD (2001) *J Bacteriol* **183**: 3055-3064
17. Nelson DE, Ghosh AS, Paulson AL, Young KD (2002) *J Bacteriol* **184**: 3630-3639
18. Young KD (2003) *Mol Microbiol* **49**: 571-580
19. Höltje J V, Tuomanen EI (1991) *J Gen Microbiol* **137**: 441-454
20. Nelson DE, Young KD (2000) *J Bacteriol* **182**: 1714-1721
21. Henderson TA, Young KD, Denome SA, Elf PK (1997) *J Bacteriol* **179**: 6112-6121
22. Santos JM, Lobo M, Matos APA, de Pedro MA, Arraiano CM (2002) *Mol Microbiol* **45**: 1729-1740

# Izoprenylacja białek

## Protein isoprenylation

ANNA JAMROZ-WIŚNIEWSKA<sup>1</sup>, JERZY BĘLTOWSKI<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Biosynteza izoprenoidów. Szlak miewalonowy
- III. Enzymy biorące udział w izoprenylacji białek
- IV. Białka ulegające izoprenylacji i ich znaczenie biologiczne:
  - IV-1. Ogólna charakterystyka małych białek wiążących GTP
  - IV-2. Białka Ras
  - IV-3. Białka Rho
  - IV-3. Białka Rab
  - IV-5. Inne białka ulegające izoprenylacji
- V. Farmakologiczna regulacja izoprenylacji białek
- VI. Inhibitory farnezylotransferazy (FTI)
- VII. Bisfosfoniany a izoprenylacja białek
- VIII. Statyny
- IX. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Isoprenoid biosynthesis. The mevalonate pathway
- III. Enzymes taking part in protein isoprenylation
- IV. Isoprenylated proteins and their biological significance
  - IV-1. General characteristics of small GTP-binding proteins
  - IV-2. Ras proteins
  - IV-3. Rho proteins
  - IV-4. Rab proteins
  - IV-5. Other isoprenylated proteins
- V. Pharmacological regulation of protein isoprenylation
- VI. Farnezylotransferase inhibitors (FTI)
- VII. Bisphosphonates and protein isoprenylation
- VIII. Statins
- IX. Conclusion

Wykaz stosowanych skrótów: eNOS — śródbłonkowa syntaza tlenu azotu; FTaza — farnezylotransferaza; GGTaza I — geranylogeranylotransferaza I; GGTaza II — geranylogeranylotransferaza II; GDP — difosforan guanozyny; GDI — białko hamujące odłączanie GDP (ang. *GDP dissociation inhibitor*); GEP — białko odłączające GDP (ang. *guanosine nucleotide exchange protein*); GTP — trifosforan guanozyny; HMG-CoA — 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzym A; IP<sub>3</sub> — trifosforan inozytolu; NF-κB — jądrowy czynnik transkrypcyjny κ; NO — tlenek azotu; REP — białko transportujące Rab (ang. *Rab escort protein*).

### I. Wstęp

Izoprenylacja białek polega na kowalencyjnym przyłączaniu związków izoprenylowych, farnezylu lub geranylogeranylu, do grupy –SH reszty cysteiny znajdującej się na C-końcu łańcucha polipeptydowego lub w jego pobliżu. W połowie lat 70-ych XX wieku po raz pierwszy wykazano, że izoprenylacji

podlegają czynniki doboru płciowego grzybów (ang. *fungal mating factors*). Obecnie wiadomo, że izoprenylacja jest jedną z podstawowych modyfikacji posttranslacyjnych białek, która ma miejsce we wszystkich komórkach eukariotycznych. Izoprenoidy podobnie jak cholesterol są syntetyzowane z kwasu miewalonowego. W latach 80-ych wykazano, że kompaktyna będąca inhibitorem reduktazy 3-hydroksy 3-metyloglutarylokoenzymu A (HMG-CoA), kluczowego enzymu w syntezie kwasu miewalonowego, hamuje proliferację fibroblastów, oraz że działaniu temu zapobiega dodanie do płynu inkubacyjnego kwasu miewalonowego, natomiast nie zapobiega mu cholesterol. Wskazywało to, że antyproliferacyjne działanie kompaktyny wynika z zahamowania syntezy niesterydowych pochodnych miewalonianu. Jednocześnie wykazano, że pochodne znakowanego izotopowo miewalonianu wiążą się kowalencyjnie z białkami. Na przełomie lat 80-ych i 90-ych stwierdzono, że izoprenylacji podlegają białka Ras, biorące udział w regulacji proliferacji komórek, oraz że mutacje genów kodujących te białka często występują w komórkach nowotworowych. Spowodowało to gwałtowny wzrost zainteresowania procesem izoprenylacji białek, trwający do chwili obecnej. Aspekty biochemiczne izoprenylacji białek zo-

<sup>1</sup>Lek. med. <sup>2</sup>dr n. med., Katedra i Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej im. Prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie, ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin, e-mail: ajamroz@wp.pl, e-mail: jerzybel@hotmail.com

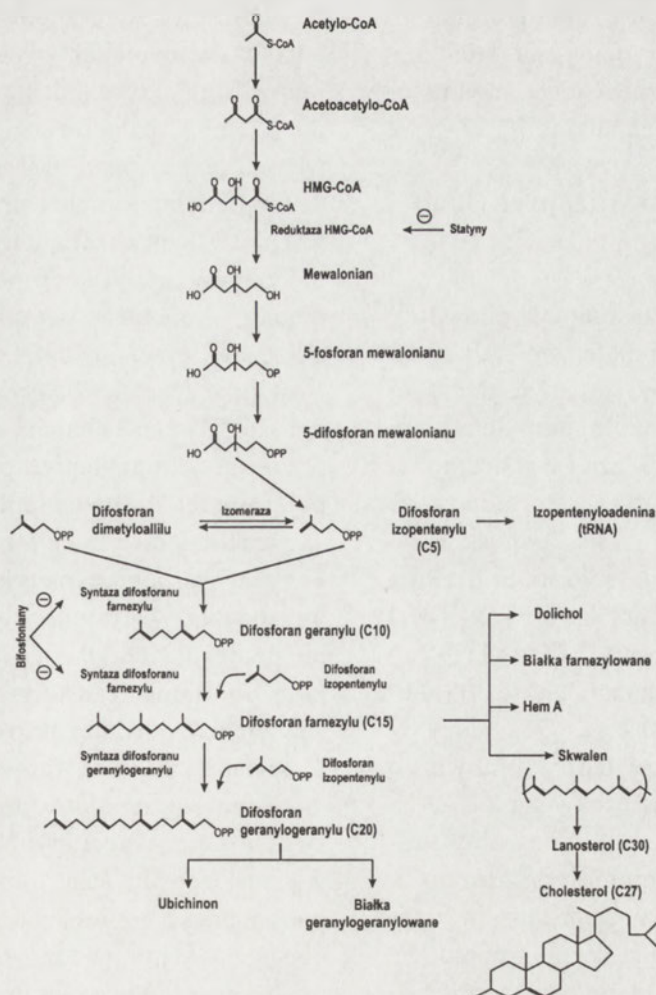
stały omówione w artykule opublikowanym w *Postęпах Biochemii* w 1995 roku [1]. W niniejszej pracy przedstawiono najnowsze informacje na ten temat ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia izoprenylacji w procesach fizjologicznych u człowieka oraz farmakologicznej regulacji tego procesu.

Podobnie do innych modyfikacji potranslacyjnych polegających na przyłączaniu lipidów jak palmitylacja czy mirystylacja, izoprenylacja nadaje cząsteczce białka bardziej hydrofobowy charakter, co ułatwia jej wiązanie z błonami plazmatycznymi. Wpływa to w sposób istotny na aktywność biologiczną izoprenylowanych białek, ich rozmieszczenie w komórce oraz umożliwia im interakcje z innymi białkami błonowymi. Izoprenylacji podlega ok. 0.5-2% wszystkich białek wewnątrzkomórkowych [2-5].

## II. Biosynteza izoprenoidów. Szlak mewalonowy

Wszystkie izoprenoidy składają się z jednej lub więcej jednostki izoprenoidowej zawierającej 5 atomów węgla (C5), która powstaje z kwasu mewalono-

wego. Kwas mewalonowy jest również związkiem wyjściowym w syntezie cholesterolu. Początkowo, w dwóch następujących po sobie reakcjach, z trzech cząsteczek acetylokoenzymu A powstaje jedna cząsteczka HMG-CoA, który jest przekształcany w mewalonian z udziałem mikrosomalnej reduktazy HMG-CoA. Reakcja ta jest etapem ograniczającym szybkość biosyntezy cholesterolu oraz innych pochodnych kwasu mewalonowego. Z kolei, w wyniku dwukrotnej fosforylacji mewalonianu, powstaje 5-difosforan mewalonianu, który w wyniku dekarboksylacji przekształcany jest w difosforan izopentenylu stanowiący podstawową jednostkę izoprenoidową. Po izomeryzacji izopentenylodifosforanu do difosforanu dimetyloallilu następuje kondensacja jednej cząsteczki difosforanu izopentenylu i jednej cząsteczki difosforanu dimetyloallilu, co daje 10-węglowy difosforan geranylu. Po dołączeniu kolejnej cząsteczki difosforanu izopentenylu powstaje difosforan farnezylu (FPP), 15-węglowy metabolit, który jest związkiem wyjściowym do wytwarzania innych związków izoprenoidowych, np. dolicholu, hemu A, oraz skwalenu, z którego powstaje cholesterol (Ryc. 1). W wyniku połączenia difosforanu izo-



Ryc. 1. Synteza izoprenoidów.

pentenyłu i difosforanu farnezyłu powstaje difosforan geranylogeranyłu (GGPP), który jest wykorzystywany do geranylogeranylowania białek lub może być dalej wydłużany do difosforanu nonaprenyłu lub dekaprenyłu, cząsteczek zużywanych do biosyntezy koenzymu Q (ubichinonu-9 u gryzoni lub ubichinonu-10 u ludzi) [2-6].

Regulacja szlaku miewalonowego odbywa się głównie na poziomie reduktazy HMG-CoA. Spadek stężenia cholesterolu w komórce powoduje znaczny wzrost aktywności tego enzymu wynikający z trzech mechanizmów: 1) wzmożonej ekspresji genu, 2) wzrostu efektywności translacji (zwiększenie ilości cząsteczek białka powstających na bazie jednej cząsteczki mRNA), 3) zahamowania degradacji białka enzymatycznego. Inhibitory reduktazy HMG-CoA zmniejszające stężenie pochodnych kwasu miewalonowego powodują nawet kilkusetkrotny wzrost ekspresji tego enzymu, czemu całkowicie zapobiega dodanie do płynu inkubacyjnego kwasu miewalonowego, lecz tylko częściowo dodanie cholesterolu. Wskazuje to, że nie tylko stężenie cholesterolu, ale również stężenie niesterydowych izoprenoidów wpływa na aktywność reduktazy HMG-CoA. Uważa się jednak, że izoprenoidy w odróżnieniu od cholesterolu nie wpływają na transkrypcję genu reduktazy HMG-CoA, ale regulują aktywność tego enzymu jedynie przez dwa pozostałe mechanizmy [7].

### III. Enzymy biorące udział w izoprenylacji białek

Izoprenylacja białek katalizowana jest przez trzy cytosolowe enzymy (prenylotransferazy białkowe): farnezylotransferazę (FTaza), geranylogeranylotransferazę I (GGTaza I) i geranylogeranylotransferazę II (GGTaza II). FTaza i GGTaza I wykazują szereg podobieństw. Oba enzymy są heterodimerami złożonymi z podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ . Podjednostka  $\alpha$  o masie cząsteczkowej 48 kDa jest wspólna dla obu tych prenylotransferaz. Podjednostka  $\beta$  FTazy ( $\beta_{FT}$ ) ma masę 46 kDa, a podjednostka  $\beta$  GGTazy I ( $\beta_{GGTI}$ ) — 43 kDa; podjednostki te wykazują około 30% homologię sekwencji aminokwasów. Oba enzymy przyłączają odpowiednie reszty izoprenoidowe do białek zawierających na C-końcu sekwencję CAAX, gdzie C oznacza resztę cysteiny, A — dowolny aminokwas alifatyczny a X — aminokwas, którym w przypadku FTazy jest metionina lub seryna a w przypadku GGTazy I — leucyna. Reszty izoprenoidowe są przyłączane do grup -SH cysteiny wiązaniem tioeterowym. FTaza i GGTaza I nie wykazują absolutnej swoistości ani w stosunku do substratu izopreno-

idowego, ani białkowego. FTaza może wiązać GGPP z 15-krotnie mniejszym powinowactwem niż FPP, natomiast GGTaza I wiąże FPP z około 300-krotnie mniejszym powinowactwem niż GGPP. *In vitro*, białka zawierające C-końcową resztę leucyny mogą być farnezylowane przez FTazę, a białka zawierające resztę metioniny lub seryny geranylogeranylowane przez GGTazę I, jednak efektywność tych reakcji jest w zależności od białka od kilkudziesięciu do kilku tysięcy razy mniejsza i z wyjątkiem nielicznych białek nie ma znaczenia *in vivo*. FTaza i GGTaza I mogą najpierw wiązać substrat izoprenoidowy, a później białkowy, lub odwrotnie, chociaż ta pierwsza kolejność jest preferowana. Uwalnianie produktu przez enzym zachodzi w wyniku związania kolejnej cząsteczki izoprenoidu i jest etapem ograniczającym szybkość reakcji. Przy małym stężeniu substratu izoprenoidowego, produkt (izoprenylowane białko) pozostaje związany z enzymem przez dłuższy czas. FTaza i GGTaza I zawierają w swojej cząsteczce po jednym jonie  $Zn^{2+}$ , który jest niezbędny do wiązania substratu białkowego (prawdopodobnie łączy się z grupą -SH cysteiny). Zastąpienie jonu cynkowego jodem  $Cd^{2+}$  zmniejsza swoistość enzymu w stosunku do substratu izoprenoidowego. Oba enzymy wymagają też dla swojej aktywności milimolarnych stężeń jonów  $Mg^{2+}$ , które, jak się wydaje, ułatwiają wiązanie ujemnie naładowanej grupy pirofosforanowej wchodzącej w skład FPP lub GGPP [7-13].

Izoprenylacja białek przez FTazę lub GGTazę I jest pierwszym z szeregu trzech następujących po sobie etapów modyfikacji potranslacyjnej. Po izoprenylacji, końcowe trzy aminokwasy (AAX) są odłączane przez specyficzną endoproteazę (Rce1). Następnie grupa karboksylowa znajdującej się obecnie na C-końcu łańcucha cysteiny jest metylowana przez metylotransferazę prenylocysteinową występującą w retikulum endoplazmatycznym i wykorzystującą S-adenozylometioninę jako donor grup metylowych. Warunkiem metylacji jest uprzednia izoprenylacja reszty cysteiny; białka nieizoprenylowane nie podlegają metylacji. Metylacja dodatkowo zwiększa lipofilność cząsteczki, która w tej postaci nie zawiera naładowanej grupy karboksylowej. Dotyczy to zwłaszcza białek farnezylowanych, o krótszym łańcuchu izoprenoidowym i mniejszej lipofilności. Białka geranylogeranylowane charakteryzują się większą lipofilnością, a metylacja zmienia ich rozpuszczalność w niewielkim stopniu [8, 14]. Według obecnego stanu wiedzy, izoprenylacja białek jest procesem nieodwracalnym. Nie są znane enzymy odłączające reszty izoprenoidowe, natomiast w czasie proteolizy izoprenylowanych białek farnezo-

geranylogeraniol są uwalniane i mogą być ponownie wykorzystywane po uprzedniej fosforylacji. Reakcja metylacji jest odwracalna, gdyż istnieje metyloesteraza zdolna do odłączania od izoprenyloowanych białek grupy  $-CH_3$ . Wskazuje to, że metylacja izoprenyloowanych białek może w sposób odwracalny modyfikować ich funkcję i że stopień metylacji tych białek może podlegać regulacji [8, 14].

Geranylogeranylotransferaza II (GGTaza II) różni się od omówionych wyżej enzymów. Składa się ona z podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  o masach cząsteczkowych odpowiednio 60 i 38 kDa. Ponadto, enzym współpracuje z białkiem eskortującym REP (ang. *Rab escort protein*), które wiąże białka Rab — jedyne znane substraty białkowe GGTazy II. Związanie białka Rab z białkiem REP jest niezbędne dla izoprenylacji białka Rab przez GGTazę II, dlatego białko REP uważane jest niekiedy za trzecią podjednostkę enzymu. Podobnie do FTazy i GGTazy I, GGTaza II jest aktywowana przez milimolarne stężenia jonów  $Mg^{2+}$ , ale w odróżnieniu od nich jest hamowana przez jony  $Zn^{2+}$ . GGTaza II katalizuje reakcję geranylogeranylacji białek kończących się sekwencją  $-CC$  lub  $-CXC$  (C — cysteina, X — dowolny aminokwas), działa ona też na syntetyczne peptydy zawierające sekwencje  $-CCX$ ,  $-CCXX$ ,  $-CCXXX$  lub  $-CXXX$ . Niezależnie od tego, czy białko kończy się sekwencją  $-CC$  czy  $-CXC$ , obie reszty cysteiny są geranylogeranylowane. Następnie, w przypadku, gdy białko zawiera sekwencję  $-CXC$ , grupa karboksylowa C-końcowej reszty cysteiny ulega metylacji. Natomiast białka kończące się sekwencją  $-CC$  nie podlegają metylacji [11].

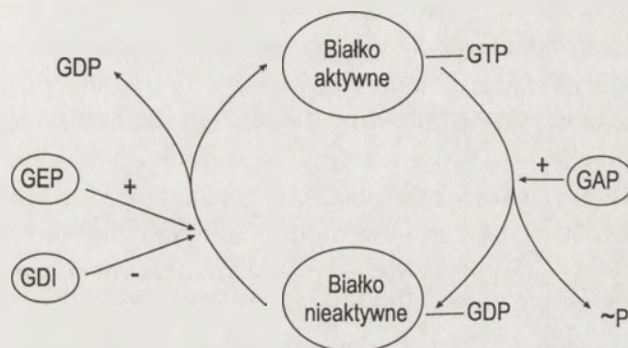
Niewiele wiadomo na temat regulacji aktywności poszczególnych prenylotransferaz. Wykazano, że insulina zwiększa aktywność wszystkich trzech prenylotransferaz, prawdopodobnie w wyniku ich fosforylacji [15, 16]. W komórkach tucznych aktywność FTazy wzrasta w wyniku związania antygeny z przeciwciałem IgE [17]. Wskazuje to na znaczenie FTazy w degranulacji mastocytów.

#### IV. Białka ulegające izoprenylacji i ich znaczenie biologiczne

##### IV-1. Ogólna charakterystyka małych białek wiążących GTP

Najwięcej badań poświęcono izoprenylacji małych (20-25 kDa), monomerycznych białek G wiążących GTP. Wśród białek tych wyróżnia się 5 grup: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf i Ran (dwie ostatnie grupy nie ulegają izoprenylacji). Białka te biorą

udział w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu informacji. Występują one w dwóch postaciach: nieaktywnej związanej z GDP i aktywnej związanej z GTP. Oddysocjowanie GDP umożliwia wiązanie GTP, co zmienia konformację białka powodując jego aktywację i oddziaływanie z białkiem efektorowym. Dzięki własnej aktywności GTP-azowej, związana cząsteczka GTP jest przekształcana w GDP i białko staje się nieaktywne. Białka te ulegają więc cyklicznym przekształceniom formy nieaktywnej w aktywną i odwrotnie (Ryc. 2). Etapem decydującym o



Ryc. 2. Regulacja aktywności małych białek G.

szybkości tych przemian jest odłączenie GDP, stymulowane przez białka GEF (ang. *guanosine nucleotide exchange protein*), swoiste dla poszczególnych białek G. Aktywność GEF jest regulowana przez proksymalne w stosunku do białek G etapy kaskady przekazywania informacji, np. czynniki wzrostowe. W przypadku białek Rho i Rab, reakcja odłączania GDP jest hamowana przez białka GDI (ang. *GDP dissociation inhibitor*). W wypadku białek Ras reakcja wymiany GDP na GTP jest regulowana wyłącznie przez GEF, gdyż brak jest białek GDI swoistych dla białek Ras. Aktywność GTP-azowa małych białek G jest również regulowana przez tzw. białka GAP (ang. *GTPase activating protein*). Regulacja aktywności GEF, GDI i GAP zapewnia odpowiednią proporcję formy aktywnej białka G (związanej z GTP) do formy nieaktywnej (związanej z GDP) [18].

##### IV-2. Białka Ras

Białka Ras są farnezylowane przez FTazę. Regulują one procesy wzrostu i różnicowania komórek. Białka Ras pobudzają kinazy białkowe aktywowane mitogenami (MAPK) i uruchamiają kaskadę sygnałową prowadzącą do proliferacji komórek. U ssaków występują cztery białka Ras: H-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B i N-Ras. Białko K-Ras4B składa się ze 189

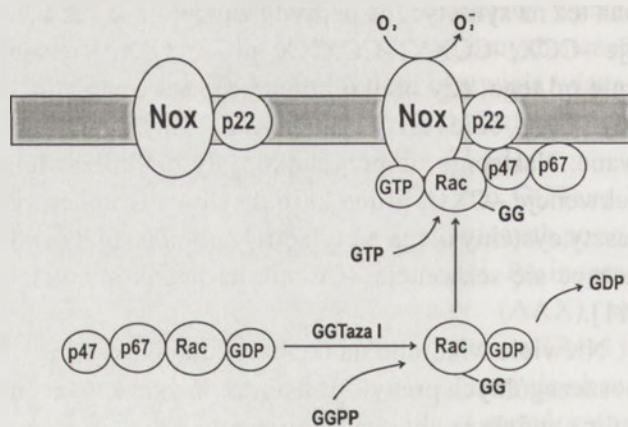
aminokwasów, wszystkie pozostałe zawierają 188 aminokwasów. Wszystkie białka Ras wykazują około 90% homologię sekwencji aminokwasowej. Są one kodowane przez trzy geny: *H-Ras*, *K-Ras* i *N-Ras*, w wyniku alternatywnego składowania mRNA gen *K-Ras* koduje dwa białka: K-Ras4A i K-Ras4B (tego ostatniego jest w komórkach 10-20 razy więcej). Białka H-Ras i N-Ras oprócz farnezytacji podlegają też palmitylacji. Reszta kwasu palmitynowego przyłączana jest do grupy –SH reszty cysteiny znajdującej się w pobliżu sekwencji –CAAX, co dodatkowo zwiększa stopień lipofilności białka. Białko K-Ras4B nie podlega palmitylacji, ale zawiera region o ładunku dodatnim (bogaty w lizynę), który oddziałując z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi fosfolipidów ułatwia wiązanie z błoną komórkową. Wydaje się, że w warunkach fizjologicznych największe znaczenie ma białko K-Ras4B; nokaut genu *K-Ras* powoduje obumieranie zarodków myszy, natomiast zwierzęta z nokautowanym genem *H-Ras* lub *N-Ras* mają prawidłowy fenotyp. Poszczególne białka Ras mają częściowo różne funkcje, np. aktywne białko H-Ras zwiększa wytwarzanie reaktywnych form tlenu przez aktywację oksydazy NAD(P)H syntetyzującej anionorodnik nadadtlenkowy ( $O_2^-$ ), natomiast K-Ras4B wzmacnia mechanizmy antyoksydacyjne zwiększając ekspresję mitochondrialnej dysmutazy nadadtlenkowej [14, 18, 19].

Geny kodujące białka Ras są protoonkogenami. Mutacje tych genów zmniejszające aktywność GTP-Pazową białek Ras powodują transformację nowotworową, gdyż nieprawidłowe białka pozostają dłużej w postaci aktywnej (związanej z GTP) i stale stymulują proces proliferacji komórek niezależnie od sygnałów kontrolujących ich aktywność. Mutacje genów *Ras* występują w ok. 30% przypadków nowotworów złośliwych u człowieka. Najczęściej są to mutacje genu *K-Ras* obserwowane w 40-50% przypadków nowotworów płuc i jelita grubego i w ok. 90% przypadków raka trzustki. Mutacje genu *H-Ras* spotykane są głównie w raku pęcherza moczowego, a genu *N-Ras* w ostrych białaczkach szpikowych i limfatycznych [19].

#### IV-3. Białka Rho

Białka Rho, które są geranylogeranylowane przez GGTazę I, regulują organizację cytoszkieletu aktynowego. Biorą one udział w takich procesach jak agregacja płytek, adhezja leukocytów do śródbłonna, fagocytoza, pinocytoza, degranulacja komórek tucznych, skurcz mięśni gładkich. Aktywne białka Rho

stymulują specyficzną kinazę serynowo-treoninową (kinazę Rho), która fosforyluje i unieczynnia fosfatazę łańcuchów lekkich miozyny. Prowadzi to do ich nadmiernej fosforylacji i zwiększonej kurczliwości mięśni gładkich naczyń. Zahamowanie geranylogeranylowania białek Rho lub blokowanie kinazy Rho prowadzi do rozszerzenia naczyń i spadku ciśnienia tętniczego w niektórych doświadczalnych modelach nadciśnienia. Innym działaniem białek Rho jest destabilizacja mRNA śródbłonkowej syntazy tlenu azotu, co prowadzi do zmniejszonego wydzielania tego mediatora przez komórki śródbłonna. Jednym z rodzajów białek Rho są białka Rac. Geranylogeranylowane białka Rac regulują aktywność oksydazy NAD(P)H w leukocytach syntetyzującej anion nadadtlenkowy niezbędny do niszczenia fagocytowanych bakterii. Enzym ten składa się z podjednostek gp91<sup>phox</sup> (Nox2) i p22<sup>phox</sup> znajdujących się w błonie komórkowej oraz podjednostek p47<sup>phox</sup> i p67<sup>phox</sup> znajdujących się w cytosolu. Geranylogeranylowanie białka Rac2 umożliwia jego wiązanie z podjednostkami p47<sup>phox</sup> i p67<sup>phox</sup> i ich transport do błony komórkowej, gdzie łączą się one z pozostałymi podjednostkami tworząc aktywny multimer (Ryc. 3). Badania



Ryc. 3. Mechanizm aktywacji oksydazy NAD(P)H.

ostatnich lat wskazują, że podobny enzym znajduje się w komórkach śródbłonna oraz innych komórkach ściany naczyń. Oksydaza NAD(P)H jest głównym źródłem  $O_2^-$  w naczyniach krwionośnych. Nadmierna aktywność tego enzymu prowadzi do stresu oksydacyjnego i unieczynniania przez anion nadadtlenkowy tlenu azotu. Uważa się, że zwiększona aktywność oksydazy NAD(P)H może być przyczyną niedoboru NO prowadzącego do nadciśnienia tętniczego i miażdżycy [18].

#### IV-4. Białka Rab

Białka Rab występujące w liczbie ok. 60-ciu są geranylogeranylowane przez GGTazę II i stanowią

najliczniejszą grupę prenylowanych białek u ssaków [20]. Aktywne białka Rab regulują wewnątrzkomórkowy transport pęcherzyków, biorąc udział w takich procesach jak egzo- i endocytoza. Poszczególne białka Rab są zlokalizowane w błonach określonych organelli komórkowych i regulują specyficzne etapy transportu. Geranylogeranylacja białek Rab związanych z GDI i REP ma miejsce w cytosolu. Izoprenylowane białko jest transportowane do błon plazmatycznych, gdzie oddziałuje z białkiem GDF (ang. *GDI displacement factor*). Powoduje to odłączenie GDI a następnie GDP oraz aktywację białka przez związanie z GTP. Uwalniane jest również białko REP, które powraca do cytosolu gdzie może uczestniczyć w prenylacji kolejnego białka Rab [18, 20, 21].

W melanosomach (zbiorniki melaniny w melanocytach) znajduje się białko Rab27a, które bierze udział w ich transporcie do wypustek melanocytów. Mutacja genu kodującego białko REP1 znajdującego się w chromosomie X, upośledzająca geranylogeranylację białka Rab27a, jest przyczyną choroideremii — choroby dziedzicznej w sposób sprzężony z płcią, charakteryzującej się postępującym zwyrodnieniem nabłonka barwnikowego siatkówki i fotoreceptorów (te warstwy siatkówki zawierają dużo białka Rab27a). Pierwsze objawy (zanik widzenia obwodowego i ślepotą nocną) pojawiają się w drugiej lub trzeciej dekadzie życia, a po 20-30 latach od rozpoczęcia choroby dochodzi do całkowitej ślepoty. Choroideremia jest przyczyną ok. 4% przypadków utraty wzroku u osób dorosłych. Limfoblasty pacjentów z choroideremią zawierają zwiększoną ilość nieprenylowanego białka Rab27a. Mutacja genu podjednostki  $\alpha$  GGTazy II powoduje wystąpienie objawów zespołu Hermansky'ego-Pudlaka, z dysfunkcją melanosomów, ciałek gęstych w płytkach krwi i lizosomów. Choroba manifestuje się hipopigmentacją (częściowy albinizm) wynikającą z zaburzonego transportu melanosomów a także przedłużającymi się krwawieniami oraz nagromadzeniem żółtobrazowego barwnika, ceroidu, w lizosomach [20-22]. Mutacja genu samego białka Rab27a powoduje hipopigmentację i upośledzenie odporności wynikające z zaburzeń wydzielania ziarnistości przez limfocyty cytotoksyczne (zespół Griscelliego typu 2). Zespół Griscelliego typu 1 jest związany z mutacją genu miozyny Va, która jest białkiem efektorowym dla Rab27a i również bierze udział w transporcie melanosomów. Ta postać zespołu także charakteryzuje się częściowym albinizmem, nie ma tutaj jednak upośledzenia odporności komórkowej, natomiast występują zaburzenia neurologiczne. Różnice między obydwoma

postaciami zespołu Griscelliego tłumaczone są tym, że w limfocytach występuje białko Rab27a, ale brak jest miozyny Va, natomiast w komórkach nerwowych występuje miozyna Va, ale nie ma białka Rab27a. W melanocytach obecne są oba te białka, dlatego zaburzenia barwnikowe towarzyszą obydwu zespołom. W zespole Griscelliego nie występują zaburzenia widzenia. Może być to związane z faktem, że pacjenci ci umierają z powodu upośledzonej odporności zanim rozwiną się zmiany zwyrodnieniowe siatkówki. Nie można też wykluczyć, że objawy choroideremii zależą nie tylko od upośledzonej geranylogeranylacji Rab27a, ale i innych białek, których prenylacja wymaga REP1. Z kolei w choroideremii nie ma zaburzeń odporności ani albinizmu, gdyż brak aktywnego REP1 w limfocytach i melanocytach jest kompensowany przez homologiczne białko REP2. Zastanawiający jest fakt, że we wszystkich wymienionych chorobach występują objawy związane przede wszystkim z upośledzoną geranylogeranylacją Rab27a. Ostatnio wykazano, że białko to charakteryzuje się wyjątkowo niską aktywnością GTPazową wśród białek Rab. Ponieważ REP wiąże się wyłącznie z nieaktywnymi, związanymi z GDP białkami Rab, może być to przyczyną wyjątkowej wrażliwości Rab27a na zaburzenia izoprenylacji [23]. Kolejnym przykładem zaburzenia funkcji białek Rab jest niedobór białka Rab7 powodujący neuropatię Charcot-Marie-Tooth typu 2B, objawiającą się postępującym osłabieniem i zanikiem dystalnych mięśni kończyn oraz owrzodzeniami troficznymi. W odróżnieniu od Rab27a, białko Rab7 występuje we wszystkich komórkach i reguluje transport między wczesnymi i późnymi endosomami [24].

U ssaków występują trzy białka GDI:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , z których GDI $\alpha$  znajduje się wyłącznie w ośrodkowym układzie nerwowym. Mutacja genu GDI $\alpha$  znajdującego się w chromosomie X zaburza izoprenylację białka Rab3a uczestniczącego w wydzielaniu neuromediatorów i jest przyczyną łagodnego niedorozwoju umysłowego sprzężonego z płcią [21, 24].

#### IV-5. Inne białka ulegające izoprenylacji

Małe białka G nie są jedynymi białkami ulegającymi izoprenylacji. Kolejnym przykładem tego rodzaju białek są laminy jądrowe. Lamina A jest białkiem filamentów pośrednich jądra, które w czasie mitozy depolimeryzuje i przemieszcza się do cytosolu. Prekursor tego białka, prelamina A, ulega farnezylacji i metylacji, co ułatwia jego wiązanie z błoną jądrową. Następnie dochodzi do odcięcia pięt-

nastu C-końcowych aminokwasów (w tym prenylowanej i metylowanej reszty cysteiny) przez endoproteazę i powstaje lamina A. Dojrzała lamina A nie zawiera więc reszty farnezylowej; farnezyllacja prolaminy A ułatwia jedynie wiązanie tego białka z błoną jądrową i jego dalszą obróbkę. Natomiast lamina B znajduje się w błonie jądrowej i pozostaje z nią ściśle związana także w czasie mitozy za pośrednictwem swego receptora (LBR — ang. *lamin binding receptor*). Farnezyllacja laminy B zwiększa jej powinowactwo do LBR [18].

Farnezyllacji podlega też kilka białek biorących udział w procesach widzenia. Transducyna jest jedynym trimerycznym białkiem G, którego podjednostka  $\gamma$  ulega farnezyllacji (inne trimeryczne białka G są geranylogeranylowane). W nieaktywnej postaci transducyna występuje jako trimer złożony z trzech podjednostek:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ; podjednostka  $\alpha$  jest związana z GDP. Działanie światła na rodopsynę zawierającą *cis*-retinal powoduje jego izomeryzację do formy *trans* — jest to tzw. metarodopsyna 2, która aktywuje reakcję wymiany GDP na GTP w cząsteczce transducyny. Podjednostka  $\alpha$  transducyny związana z GTP odłącza się od podjednostek  $\beta$  i  $\gamma$ , a dimer  $\beta\gamma$  aktywuje fosfodiesterazę rozkładającą cGMP. Spadek stężenia cGMP powoduje zamknięcie kanałów sodowych, hiperpolaryzację błony komórkowej i pobudzenie neuronu wzrokowego. Farnezyllacja podjednostki  $\gamma$  transducyny jest niezbędna do wiązania podjednostki  $\alpha$ . Zastąpienie reszty cysteiny aminokwasem nie zawierającym grupy  $-SH$ , który nie może ulegać izoprenylacji, znosi aktywność biologiczną transducyny. Aktywna postać rodopsyny, metarodopsyna 2, jest unieczynniana w wyniku dysocjacji na opsynę i *trans*-retinal lub jest fosforylowana przez kinazę rodopsyny. Kinaza rodopsyny jest białkiem farnezylowanym; farnezylowany enzym wiąże się z błoną komórkową pod wpływem światła i może fosforylować rodopsynę. Zablokowanie farnezyllacji kinazy rodopsynowej uniemożliwia jej wiązanie z błonami i tym samym hamuje reakcję z rodopsyną. Modyfikacja sekwencji aminokwasowej kinazy rodopsyny sprawiająca, że białko to ulega geranylogeranyllacji a nie farnezyllacji powoduje, że kinaza jest stale związana z błoną nawet przy braku światła. Fosfodiesteraza rozkładająca cGMP w komórkach siatkówki również jest białkiem izoprenylovanym; jedna z jej podjednostek ulega farnezyllacji a druga jest geranylogeranylowana [18].

Kolejnym przykładem białka farnezylowanego jest kinaza fosforylasy glikogenowej aktywująca proces glikogenolizy i uwalnianie glukozy w mięśniach szkieletowych. Co ciekawe, prenylowana

reszta cysteiny tego enzymu nie podlega metylacji [18].

Heterotrimeryczne białka G błon komórkowych biorą udział w przekazywaniu sygnału z receptorów błonowych do enzymów syntetyzujących wtórne przekaźniki (cyklaza adenylova, fosfolipaza C). Białka te składają się z podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . W postaci nieaktywnej związanej z GDP występują jako trimer. Wymiana GDP na GTP powoduje odłączenie podjednostki  $\alpha$  i aktywację efektorowych szlaków sygnałowych. Geranylogeranyllacja podjednostki  $\gamma$  jest niezbędna do jej wiązania z podjednostką  $\alpha$  [18].

## V. Farmakologiczna regulacja izoprenylacji białek

Ponieważ wiele prenylowanych białek ma swój udział w patogenezie różnych jednostek chorobowych, hamowanie izoprenylacji kryje w sobie wielki potencjał terapeutyczny. Istnieją dwa możliwe sposoby wpływania na izoprenylację białek:

- 1) bezpośrednio hamowanie aktywności prenylotransferaz

- 2) hamowanie syntezy izoprenoidów

Pierwszy kierunek dotyczy głównie badań nad swoistymi inhibitorami farnezylotransferazy hamującymi farnezyllację białek Ras, które mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych. Jakkolwiek inhibitory GGTazy I mogłyby mieć potencjalne znaczenie w leczeniu chorób układu krążenia ze względu na rolę białek Rho w regulacji aktywności oksydazy NAD(P)H, wydzielania NO czy kurczliwości mięśni gładkich, istnieje ryzyko ewentualnych działań niepożądanych tych inhibitorów w związku z różnymi funkcjami białek Rho w procesach fizjologicznych. Dlatego uważa się, że większe znaczenie może mieć bardziej swoiste hamowanie szlaków sygnałowych zależnych od białek Rho (np. inhibitory kinazy Rho) [25].

Spośród stosowanych obecnie leków, syntezę izoprenoidów hamują inhibitory reduktazy 3-hydroksy 3-metyloglutarylokoenzymu A (statyny) oraz niektóre ze stosowanych w leczeniu osteoporozy bisfosfonianów, będących inhibitorami syntazy difosforanu farnezylu. Należy zaznaczyć, że oba podejścia (hamowanie syntezy izoprenoidów i hamowanie aktywności prenylotransferaz) nie są w pełni równoważne. Na przykład, statyny zmniejszają stężenie wszystkich pochodnych kwasu mewalonowego, w tym dolicholu i ubichinonu, natomiast inhibitory FTazy mogą zwiększać stężenie substratu, difosforanu farnezylu, który jest w zwiększonej ilości przekształcany w inne izoprenoidy. Ponadto uwalniany z niego farne-

zol wpływa na procesy niezwiązane z izoprenylacją, np. aktywuje receptory jądrowe FXR (ang. *farnesoid X-receptor*) oraz blokuje kanały wapniowe [26].

## VI. Inhibitory farnezylotransferazy (FTI)

Udział białek Ras w regulacji proliferacji i dojrzewania komórek oraz obecność nieprawidłowych białek Ras w komórkach wielu nowotworów złośliwych nasunął przypuszczenie, że hamowanie aktywności tych białek mogłoby znaleźć zastosowanie w leczeniu nowotworów. Zahamowanie farnezytacji białek Ras uniemożliwia ich łączenie z błonami plazmatycznymi i oddziaływanie z białkami efektorowymi oraz hamuje procesy nowotworzenia. Ponadto, pod wpływem tych inhibitorów wzrasta pula niefarnezylowanych białek Ras, które mogą wiązać się z białkami efektorowymi, ale nie mają aktywności biologicznej; zachowują się więc jak kompetycyjne inhibitory aktywnych, farnezylowanych białek Ras [19, 27]. Znane są obecnie cztery grupy inhibitorów farnezylotransferazy. Pierwsza z nich to związki będące analogami difosforanu farnezylu jak manumycyna i L-704272. Drugą grupę stanowią proste peptydy blokujące miejsce wiążące sekwencję CAAX cząsteczki enzymu (inhibitory peptydomimetyczne). Często są one stosowane jako proleki, w których C-końcowa grupa karboksylowa jest metylowana lub występuje w postaci laktonu. Przenikają one przez błony komórkowe łatwiej niż związki zawierające zjonizowaną grupę  $\text{-COO}^-$ , a wewnątrz komórek ulegają hydrolizie do związków aktywnych pod wpływem esteraz. Modyfikacja łańcuchów bocznych aminokwasów  $A_1$  i  $A_2$  może zwiększać zdolność hamowania FTazy oraz zmniejszać wrażliwość peptydu na proteolizę. Niektóre związki tej grupy zawierają zamiast dwóch środkowych reszt aminokwasowych inne związki organiczne (np. pochodna benzodiazepinowa w inhibitorze BZA-5B). Trzecia grupa inhibitorów FTazy np. BMS-186511, to tzw. inhibitory dwusubstratowe — połączenia difosforanu farnezylu i pochodnej peptydu CAAX blokujące miejsca wiązania obu substratów. Ostatnia grupa to związki nie wykazujące podobieństwa strukturalnego do żadnego z substratów FTazy, będące pochodnymi trójpierścieniowych leków przeciwhistaminowych, np. SCH44342. *In vitro* hamują one izolowaną FTazę w większych stężeniach niż inne inhibitory, ale ze względu na łatwiejsze przenikanie przez błony komórkowe oraz oporność na proteolizę mogą być bardziej skuteczne *in vivo* [27-29].

Ważną cechą inhibitorów FTazy jest ich swoistość w stosunku do tego enzymu. Uważa się, że związki,

które działają również na GGTazę I mogą mieć więcej działań toksycznych ze względu na geranylogeranylację wielu białek o istotnym znaczeniu fizjologicznym. Większość badanych obecnie inhibitorów hamuje FTazę w preparatach bezkomórkowych w stężeniach nanomolarnych, natomiast w hodowlach komórkowych konieczne jest stosowanie około 1000-krotnie większych stężeń. *In vitro*, inhibitory FTazy hamują proliferację komórek transformowanych onkogenami Ras oraz komórek wyizolowanych z ludzkich nowotworów zawierających zmutowane białka Ras. Nie działają one na komórki transformowane innymi onkogenami ani na komórki transformowane genami Ras zmodyfikowanymi w ten sposób, aby powstające białka były geranylogeranylowane a nie farnezylowane [27-29].

Pierwsze badania *in vivo* wykonano na myszach transgenicznym, którym wszczepiano onkogen H-Ras. U zwierząt tych dochodzi do spontanicznego rozwoju nowotworów, przede wszystkim ślinianek i gruczołu sutkowego. Podawanie inhibitorów FTazy skutecznie hamuje rozwój tych nowotworów. Natomiast podawanie FTI zwierzętom, u których już doszło do powstania guza, powoduje zahamowanie jego wzrostu i zmniejszenie masy nowotworu [19, 27, 29]. Inne modele doświadczalne, w których wykazano skuteczność FTI to myszy, którym wszczepiano fibroblasty transformowane onkogenem H-Ras lub komórki wyizolowane z nowotworów ludzkich zawierających onkogen H-Ras. W nowotworach uwarunkowanych onkogenami K-Ras lub N-Ras inhibitory FTazy wykazują mniejszą skuteczność. Może to wynikać z faktu, że białka te zawierające na C-końcu metioninę zamiast seryny mają mniejsze powinowactwo do FTazy niż H-Ras, a więc zahamowanie ich farnezytacji wymaga większych stężeń inhibitora. Ponadto, białko K-Ras4B może być zarówno farnezylowane jak i geranylogeranylowane. W warunkach prawidłowych zachodzi tylko ta pierwsza reakcja, jednak po zastosowaniu FTI dochodzi do geranylogeranylacji białka K-Ras4B, tym bardziej, że niewykorzystany w reakcjach farnezytacji difosforan farnezylu jest w większym stopniu przekształcany w difosforan geranylogeranylu. Geranylogeranylowane białko K-Ras4B wykazuje identyczną aktywność jak białko farnezylowane, co może istotnie ograniczać skuteczność inhibitorów FTazy w tych przypadkach. Należy podkreślić, że w ludzkich nowotworach mutacje K-Ras i N-Ras występują znacznie częściej niż mutacje H-Ras [30-33].

Z drugiej strony, inhibitory FTazy działają niekiedy na nowotwory zawierające prawidłowe białka

Ras. Może być to spowodowane dwoma przyczynami. Po pierwsze, w niektórych przypadkach nadmierna proliferacja komórek jest zależna od białek Ras mimo, że są one prawidłowe. Dzieje się tak wówczas, gdy przyczyną nowotworu są zaburzenia szlaków sygnałowych powodujących nadmierną aktywację białek Ras. Np. w wielu przypadkach raka gruczołu sutkowego zwiększona jest ekspresja receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF), który powoduje aktywację białek Ras i nadmierną proliferację komórek. Zahamowanie farnezytacji białek Ras przerywa ten szlak sygnałowy. Neurofibromina I jest inhibitorem białek Ras (zwiększa ich aktywność GTPazową przyspieszając inaktywację). Mutacja genu neurofibrominy I jest przyczyną nerwiakowłókniakowości (choroby Recklinghausena). Inhibitory FTazy mogą hamować proliferację komórek zawierających zmutowany gen neurofibrominy zmniejszając farnezytację białek Ras i zapobiegając w ten sposób ich aktywacji. Ponadto, FTI mogą hamować proliferację komórek blokując farnezytację białek innych niż Ras. W wielu przypadkach aktywne białka Ras działają poprzez białko RhoB, które może być zarówno farnezylowane jak i geranylogeranylowane. O ile farnezylowane białko RhoB nasila proliferację, to jego postać geranylogeranylowana działa przeciwnie. Zahamowanie FTazy nasila geranylogeranylację białka RhoB, co ma działanie antyproliferacyjne. Innym białkiem, które podlega farnezytacji jest białko Rheb (ang. *Ras homologue enriched in brain*). W postaci niefarnezylowanej wiąże ono białka Ras w cytosolu zapobiegając ich transportowi do błony komórkowej, dlatego zahamowanie farnezytacji Rheb ma działanie antyproliferacyjne. Inne białka podlegające farnezytacji to dwie fosfatazy tyrozynowe: PTP/CAAX1 i PTP/CAAX2. Funkcja tych enzymów nie jest znana, ale wiadomo, że ich ekspresja wzrasta w proliferujących komórkach. Farnezytacji ulega też 5-fosfataza trifosforanu inozytolu, która odłącza resztę fosforanową od 1,4,5-trifosforanu inozytolu (1,4,5-IP<sub>3</sub>) przekształcając go do 1,4-difosforanu inozytolu (1,4-IP<sub>2</sub>); działa też na 1,3,4,5-IP<sub>4</sub>, w wyniku czego powstaje 1,3,4-IP<sub>3</sub>. 1,4,5-IP<sub>3</sub> zwiększa uwalnianie wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych, natomiast 1,3,4,5-IP<sub>4</sub> zwiększa powinowactwo białek GAP do wapnia. Zahamowanie farnezytacji 5-fosfatazy zmniejsza jej aktywność, w wyniku czego wzrasta stężenie 1,4,5-IP<sub>3</sub> i 1,3,4,5-IP<sub>4</sub>. Może to prowadzić do zwiększenia zależnej od wapnia aktywności GAP, wzrostu aktywności GTPazowej białek Ras i przyspieszać ich inaktywację. Ponadto farnezytacji

ulega ok. 20 innych białek, których funkcja nie została dotychczas poznana [28-33].

Wzrost guza zależy od proliferacji nowych naczyń krwionośnych. W procesie angiogenezy podstawową rolę odgrywa migracja i proliferacja komórek śródbłonna naczyń. Wykazano, że inhibitory FTazy, np. A-170634, L-744, 832, TR006 hamują ten proces *in vitro* i *in vivo* [34-36].

FTI działają przede wszystkim cytostatycznie a nie cytotoksycznie, dlatego po ich odstawieniu często dochodzi do nawrotu choroby. Ponowne zastosowanie FTI najczęściej okazuje się skuteczne, chociaż w nielicznych przypadkach opisano oporność guza na ich działanie. W hodowlach komórkowych stwierdzono, że mniej więcej jedna na 10<sup>8</sup> komórek staje się odporna na FTI. Mechanizm tej oporności nie został dotychczas wyjaśniony. Może ona wynikać z mutacji genu FTazy, która staje się niewrażliwa na działanie inhibitora, lub też z wytwarzania enzymów skuteczniej metabolizujących stosowany lek. Chociaż oporność komórek na działanie FTI jest zjawiskiem rzadkim, może ona mieć istotne znaczenie w wypadku dużych nowotworów zawierających nawet 10<sup>9</sup> komórek [28, 37, 38].

Zaskakującą cechą FTI, przynajmniej w badaniach na myszach, jest ich bardzo mała toksyczność. U leczonych zwierząt nie stwierdzono praktycznie żadnych objawów ubocznych. Nie dochodziło u nich do zahamowania fizjologicznej proliferacji komórek np. szpiku kostnego czy nabłonka przewodu pokarmowego. Nie stwierdzono też zmian histologicznych w narządach, w których następuje farnezytacja białek innych niż Ras, np. siatkówce czy mięśniach szkieletowych. Należy jednak podkreślić, że wszystkie dotychczasowe badania prowadzone były przez stosunkowo krótki czas. Ewentualna długoterminowa toksyczność FTI pozostaje nadal kwestią otwartą [30].

W ok. 20 dotychczasowych badaniach klinicznych stosowano cztery inhibitory FTI: R115777 i BMS-214662 doustnie, oraz SCH6336 i L-778123 dożylnie. Ten ostatni związek został wycofany z prób klinicznych, gdyż powodował znaczne wydłużenie odstępu QT w EKG, co wiąże się z niebezpieczeństwem groźnego dla życia częstoskurczu komorowego. Leki te badane były u osób z nowotworami jelita grubego, trzustki, gruczołu sutkowego, białaczkami i glejakami. W większości z tych badań uzyskiwano pewne efekty korzystne, chociaż nie tak spektakularne jak w doświadczeniach na zwierzętach. Należy jednak podkreślić, że wszystkie te próby wykonywano w zaawansowanym stadium choro-

by nowotworowej, u pacjentów z bardzo złym rokowaniem, u których zawiodły tradycyjne metody terapii [31, 37-39].

VII. Bisfosfoniany a izoprenylacja białek

Bisfosfoniany należą do podstawowych leków stosowanych w leczeniu osteoporozy. Hamują one zależną od osteoklastów resorpcję tkanki kostnej, zwiększają jej gęstość i wytrzymałość mechaniczną oraz zmniejszają ryzyko złamań. Bisfosfoniany są analogami difosforanów, w których mostek tlenowy P-O-P został zastąpiony przez atom węgla (P-C-P), do którego dodatkowo dołączone są boczne łańcuchy R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub>. Wśród bisfosfonianów wyróżnia się podgrupę związków o wyjątkowo dużej aktywności zawierających grupę aminową w jednym z łańcuchów bocznych. Należą do nich bisfosfoniany najczęściej stosowane w terapii jak alendronian, rizedronian i pamidronian. Dzięki budowie podobnej do difosforanów, bisfosfoniany mają wysokie powinowactwo do tkanki kostnej, a w związku z obecnością wiązania P-C-P zamiast P-O-P nie są rozkładane przez żadne enzymy. Aminobisfosfoniany są inhibitorami syn-

geranylogeranylację białek Rho, a dodanie do środowiska geranylogeraniolu hamuje ich efekt antyresorpcyjny. Wykazano, że rizedronian hamuje wbudowywanie pochodnych znakowanego izotopowo kwasu mewanonowego do białek osteoklastów oraz że aktywność antyresorpcyjna różnych aminobisfosfonianów koreluje ze stopniem zahamowania izoprenylacji białek [40]. Chociaż aminobisfosfoniany hamują też farnezylację białek Ras, inhibitory farnezylotransferazy nie wykazują aktywności antyresorpcyjnej. Niestosowane obecnie u ludzi starsze aminobisfosfoniany, inkadronian i ibandronian, hamują również syntazę skwalenu. Zmniejszają w ten sposób syntezę cholesterolu, ale nie wpływają na syntezę niesterydowych izoprenoidów. Aktywność antyresorpcyjna tych związków jest mniejsza niż nowszych aminobisfosfonianów [40, 41].

W odróżnieniu od aminobisfosfonianów, bisfosfoniany nie zawierające azotu w cząsteczce jak etidronian czy kłodronian są słabszymi inhibitorami demineralizacji tkanki kostnej. Uważa się, że mechanizm ich działania polega na tym, że są wbudowywane zamiast difosforanów do cząsteczki ATP tworząc pochodne, które nie ulegają hydrolizie i działają cy-

Tabela 1.

Właściwości prenylotransferaz białkowych

| Typ                                  | Prenylotransferazy CAAX                                                          |                                               | GGTaza Rab (GGTaza II)                  |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|
|                                      | FTaza                                                                            | GGTaza I                                      |                                         |
| Podjednostki                         | 48 kDa (α)<br>46 kDa (β)                                                         | 48 kDa (α)<br>43 kDa (β)                      | 60 kDa (α)<br>38 kDa (β)                |
| Wymaga obecności jonów               | Zn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>                                              | Zn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>           | Mg <sup>2+</sup>                        |
| Substrat izoprenoidowy               | FPP (C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> )                                           | GGPP (C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> )       | GGPP (C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> ) |
| Substraty białkowe                   | Białka Ras, podj. γ transducyny, kinaza fosforylasy glikogenowej, laminy jądrowe | Białka Rho, podjedn. γ trimerycznych białek G | Białka Rab                              |
| C-końcowy motyw substratu białkowego | -CAAX                                                                            | -CAAX                                         | -CC, -CXC                               |

tazy difosforanu farnezylu, w wyniku czego hamują powstawanie zarówno cholesterolu jak i niesterydowych izoprenoidów. Aminobisfosfoniany trudno przenikają przez błony komórkowe, ulegają jednak endocytozie przez osteoklasty a także makrofagi. Powodują one zmniejszenie aktywności osteoklastów w wyniku zmian struktury cytoszkieletu i zahamowania wydzielania jonów H<sup>+</sup> do przestrzeni pozakomórkowej przez H<sup>+</sup>-ATPazę, co jest pierwszym etapem demineralizacji tkanki kostnej. W większych dawkach indukują apoptozę osteoblastów. W doświadczeniach *in vitro* aminobisfosfoniany hamują

totoksycznie. W wyniku tego dochodzi do spadku aktywności H<sup>+</sup>-ATPazy aktywnie transportującej protony do przestrzeni pozakomórkowej, a w większych stężeniach do nasilenia apoptozy [41-43].

Makrofagi, podobnie jak osteoklasty, podlegają apoptozie pod wpływem leczenia bisfosfonianami [41]. Alendronian, ibandronian i pamidronian zwiększają aktywność kaspazy 3 oraz stymulują procesy apoptozy w hodowli makrofagów, natomiast kłodronian i etidronian nie wykazują takiego działania [42]. Efekt ten koreluje z zahamowaniem izoprenylacji białek makrofagów, a zapobiega mu geranylogera-

niol ale nie farnezoł, co wskazuje na decydującą rolę geranylogeranylacji białek. Wykazano, że bisfosfoniany zawierające azot hamowały rozwój doświadczalnej miażdżycy u zwierząt. Może to wynikać z ich działania na makrofagi obecne w blaszce miażdżycowej. Leczenie aminobisfosfonianami zmniejsza ilość makrofagów i komórek piankowatych (makrofagów obładowanych lipidami) w ścianach tętnic oraz wychwytywanie utlenionych lipoprotein frakcji LDL przez te komórki. Stwierdzono, że bisfosfoniany akumulują się w ludzkich tętnicach, a kłodronian i pamidronian zmniejszają siłę skurczu naczyń w odpowiedzi na bodźce  $\alpha$ -adrenergiczne. Nieoczekiwany wpływ bisfosfonianów na metabolizm lipoprotein został dostrzeżony po dwumiesięcznym dożylnym podawaniu neridronianu kobietom po menopauzie. W ich surowicy wystąpił znaczący statystycznie spadek stężenia cholesterolu LDL i apolipoproteiny B (apoB) oraz wzrost cholesterolu HDL i apoA-I. Podobne efekty stwierdzono u kobiet po menopauzie, którym podawano dożylnie wysokie dawki pamidronianu lub alendronianu, co sugeruje efekt charakterystyczny dla całej klasy leków. Roczne podawanie etidronianu z powodu osteopenii u osób z cukrzycą typu 2 spowodowało spadek ocenianej ultrasonograficznie grubości błony środkowej i wewnętrznej tętnicy szyjnej. Sugeruje to, że bisfosfoniany mogą wykazywać działanie przeciwmiażdżycowe [43].

Bisfosfoniany zawierające azot hamują wzrost komórek nabłonka przelyku powodując akumulację komórek w fazie S cyklu komórkowego. Geranylogeraniol zapobiegał temu działaniu, co wskazuje, że zależy ono od zahamowania geranylogeranylacji białek. Efekt ten może być przyczyną podrażnienia przelyku przez bisfosfoniany w trakcie terapii tymi lekami [44].

Bisfosfoniany zawierające azot wykazują również działanie przeciwnowotworowe. Zmniejszają one proliferację oraz indukują apoptozę linii komórek nowotworowych i zmniejszają objętość guza w wielu modelach zwierzęcych [45]. W jednym z badań indukowały one apoptozę komórek raka gruczołu krokowego poprzez hamowanie błonowej lokalizacji białka Ras w tych komórkach [46]. Również dzięki zahamowaniu prenylacji białek Ras, zoledronian hamował proliferację ludzkich komórek przewlekłej białaczki szpikowej [47].

## VIII. Statyny

Statyny są odwracalnymi, kompetycyjnymi inhibitorami reduktazy HMG-CoA katalizującej przemianę 3-hidroksy 3-metyloglutarylokoenzymu A do

mewalonianu. Stosowane obecnie statyny można podzielić na dwie grupy. Statyny naturalne to lowastatyna będąca metabolitem grzybów oraz jej pochodne: prawastatyna i simvastatyna. Całkowicie syntetycznymi związkami są fluwastatyna i atorwastatyna, charakteryzujące się silniejszym działaniem. Istotną cechą statyn jest ich rozpuszczalność. Spośród stosowanych obecnie statyn jedynie prawastatyna jest hydrofilna, pozostałe są w różnym stopniu lipofilne. Statyny były stosowane początkowo wyłącznie jako leki obniżające stężenie cholesterolu w osoczu. Działanie to wynika z zahamowania reduktazy HMG-CoA w wątrobie, co powoduje wewnątrzkomórkowy niedobór cholesterolu i wzmacnia ekspresję receptorów LDL na powierzchni hepatocytów przyspieszając klirens tych lipoprotein. Badania kliniczne wykazały jednak, że leczenie statynami skutecznie zapobiega ostrym incydentom sercowo-naczyniowym nie tylko u osób z hipercholesterolemią, ale również u pacjentów z prawidłowym stężeniem cholesterolu. Związane jest to z takimi działaniami jak: hamowanie migracji i proliferacji komórek mięśniówki naczyń, stabilizacja blaszki miażdżycowej, działanie przeciwzapalne, przeciwzakrzepowe i przeciwpłytkowe oraz hamowanie stresu oksydacyjnego. Uważa się, że te tzw. plejotropowe działania statyn nie zależą od obniżenia stężenia cholesterolu ale od zahamowania syntezy izoprenoidów i zmniejszenia stopnia izoprenylacji białek w różnych tkankach. Lipofilne statyny łatwo przenikają przez błony komórkowe i mogą działać na różne tkanki. Prawastatyna jest transportowana do komórek wątroby przez specyficzne białko błony komórkowej, natomiast ze względu na słabą rozpuszczalność w tłuszczach nie przenika do innych komórek. Dlatego prawastatyna może mieć słabsze działania plejotropowe od pozostałych statyn. Poniżej wspomniano tylko o niektórych plejotropowych działaniach statyn, które jak wykazano zależą od hamowania izoprenylacji białek (Tab. 2) [48, 49].

Tlenek azotu (NO) produkowany z L-argininy przez śródbłonkową syntazę tlenu azotu (eNOS) rozszerza naczynia krwionośne oraz zapobiega aterogenezie hamując agregację płytek krwi, proliferację miocytów, ekspresję białek adhezyjnych i przyleganie leukocytów do śródbłonka. Dowiedziono, że statyny zwiększają ekspresję eNOS hamując geranylogeranylację białek Rho, które przyspieszają degradację mRNA tego enzymu. Wpływ statyn na eNOS jest odwracalny w obecności geranylogeranylodifosforanu, a nie farnezylodifosforanu czy cholesterolu [50]. Jednym z mechanizmów regulacji aktywności eNOS jest fosforylacja enzymu przez kinazę

białkową Akt (kinazę białkową B). Białka Rho hamują aktywność kinazy B, a statyny hamując geranylogeranylację tych białek zapobiegają temu działaniu i zwiększają aktywność eNOS [51]. Nadmierne wytwarzanie wolnych rodników tlenowych odgrywa istotną rolę w patogenezie miażdżycy. Głównym ich źródłem w ścianie naczynia jest oksydaza NAD(P)H produkująca anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^-$ ), który m. in. unieczynnia tlenek azotu

**Tabela 2.**

Najważniejsze działania statyn zależne od hamowania izoprenylacji białek

|                                                       |
|-------------------------------------------------------|
| <b>Korzystne:</b>                                     |
| Zwiększenie ekspresji i aktywności eNOS               |
| Hamowanie NAD(P)H oksydazy                            |
| Hamowanie syntezy endoteliny-1                        |
| Działanie antykoagulacyjne i profibrynolityczne       |
| Hamowanie proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń |
| Hamowanie ekspresji metaloproteinaz                   |
| Działanie antynowotworowe                             |
| Hamowanie resorpcji tkanki kostnej                    |
| <b>Niekorzystne:</b>                                  |
| Hamowanie działania insuliny                          |
| Miopatia                                              |
| Zmiany zwyrodnieniowe komórek soczewki                |

wiążąc się z nim i tworząc nadtlendioazotyn ( $ONOO^-$ ). Statyny zmniejszają aktywność oksydazy NAD(P)H zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, hamując geranylogeranylację białka Rac aktywującego ten enzym [52]. Dzięki blokowaniu geranylogeranylacji białek Rho, statyny hamują ekspresję endoteliny-1, która jest silnym czynnikiem zwężającym naczynia i ma działanie mitogenne [53].

Statyny wywierają działanie przeciwwzkrzepowe. Zmniejszają one ekspresję tkankowego czynnika krzepnięcia [54, 55], natomiast wzmagają syntezę antykoagulacyjnie działającej trombomoduliny [56]. Aktywują też układ fibrynolityczny zwiększając syntezę tkankowego aktywatora plazminogenu [57] oraz hamując ekspresję inhibitora aktywatora plazminogenu [58]. Działania te wynikają z zahamowania geranylogeranylacji białek Rho, ponieważ zapobiegało im podawanie egzogenego geranylogeraniolu, a podobne do statyn efekty obserwowano po zastosowaniu inhibitorów tych białek lub/i inhibitorów geranylogeranylotransferazy I [48]. Statyny hamują proliferację komórek mięśni gładkich na-

czyń przez zmniejszenie farnezytacji białek Ras. [49, 59].

Statyny stabilizują blaszkę miażdżycową hamując ekspresję metaloproteinaz w aktywowanych makrofagach. Metaloproteinazy są enzymami proteolitycznymi, które rozkładają białka macierzy międzykomórkowej ułatwiając pękanie blaszki miażdżycowej. Prowadzi to do tworzenia zakrzepu i ostrych powikłań miażdżycy jak zawał mięśnia sercowego czy udar mózgowy. Ekspresja tych enzymów ulega zmniejszeniu w wyniku hamowania prenylacji białka RhoA przez statyny. [49].

Ostatnie badania wskazują, że statyny obniżają o 15-25% poziom białka C-reaktywnego (CRP), które jest czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Podwyższony poziom CRP bezpośrednio uszkadza śródbłonek naczyń, stymuluje ekspresję czynnika tkankowego przez monocyty i aktywuje czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B. CRP jest białkiem ostrej fazy syntetyzowanym w wątrobie pod wpływem interleukiny-6, która stymuluje transkrypcję genu CRP poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego STAT3. Działanie STAT3 wymaga fosforylacji reszty Ser-727 katalizowanej przez kinazę białkową C $\delta$ , której aktywacja wymaga białka Rac1. Statyny hamują ekspresję genu CRP zapobiegając geranylogeranylacji tego białka [49, 60].

Niektóre dane wskazują, że statyny hamują onkogenezę. Np. atorwastatyna hamowała przerzuty komórek czerniaka wykazujących zwiększoną ekspresję białka RhoC [61]. Fluwastatyna i lowastatyna redukowały aktywację RhoA i inwazję komórek raka wątroby przez wpływ na izoprenylację tego białka [62]. Lowastatyna indukowała apoptozę w komórkach anaplastycznego raka tarczycy przez hamowanie geranylogeranylacji białek RhoA i Rac1 [63]. Ceriwastatyna, poprzez hamowanie prenylacji białka RhoA, zmniejszała proliferację i inwazję komórek raka gruczołu sutkowego [64].

Wykazano, że statyny zwiększają osteogenezę *in vitro* i *in vivo*. Lowastatyna i simwastatyna podawane podskórnie myszom w okolicę kości czaszki, zwiększały wzrost osteoblastów i tworzenie kości. Doustne podawanie simwastatyny szczurom spowodowało zwiększenie objętości beleczek kostnych i szybkości tworzenia kości. [43].

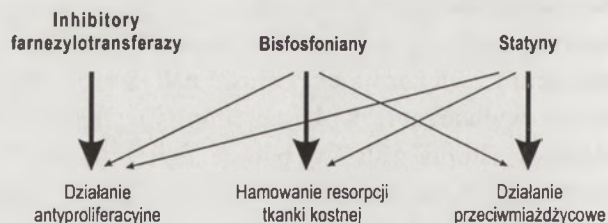
Jednak hamowanie produkcji izoprenoidów przez statyny może być również związane z niekorzystnymi działaniami tych leków. W badaniu *in vitro* wykazano, że lowastatyna powoduje zmniejszenie liczby zależnych od insuliny transporterów glukozy w adipocytach 3T3-L1. Transport glukozy w odpowiedzi

na insulinę był znamienne zmniejszony w komórkach poddanych działaniu lowastatyny, co świadczy o oporności na insulinę. Wpływ lowastatyny był odwracalny przez kwas miewalonowy, wskazując, że oporność na insulinę wynika z hamowania biosyntezy izoprenoidów [65]. Istnieją dane wskazujące, że również *in vivo* statyny mogą zmniejszać wrażliwość na insulinę zarówno u gryzoni [66] jak i u ludzi [67].

Jednym z działań niepożądanych statyn jest miopatia. Miotoksyczność statyn w hodowli komórek mięśni szkieletowych jest związana ze zmniejszeniem powstawania kwasu miewalonowego, farnesolu i geranylogeraniolu, ponieważ suplementacja tymi związkami przeciwdziałała zmniejszeniu syntezy białek mięśniowych i uszkodzeniu miotubul [68, 69]. Należy podkreślić, że tkanka mięśniowa jest jedną z nielicznych, w których zachodzi farnezyllacja białek (kinaza fosforylasy glikogenowej) niezwiązana z proliferacją komórek. Może to tłumaczyć szczególną wrażliwość tej tkanki na działanie toksyczne statyn. Nie opisano dotychczas niekorzystnego wpływu statyn na funkcję siatkówki, w której szereg białek podlega farnezyllacji. Natomiast w hodowli komórek soczewki szczura lowastatyna indukuje zmiany charakterystyczne dla zaćmy, którym zapobiega geranylogeraniol, ale nie farnesol. Podobne zmiany występują w wyniku zwiększonej ekspresji egzotoksyny C3 *Clostridium botulinum*, która hamuje białka Rho [70]. Niektóre badania wskazują na zwiększone ryzyko polineuropatii obwodowej u pacjentów leczonych statynami [71, 72], co może mieć związek z rolą białka Rab7 w transporcie neuronalnym (por. rozdz. IV-4).

## IX. Podsumowanie

Izoprenylacja jest niezbędną modyfikacją posttranslacyjną wielu białek biorącą udział w tak różnorodnych procesach fizjologicznych jak widzenie, regulacja napięcia naczyń, proliferacja komórek i metabolizm tkanki kostnej. Dzięki poznaniu tego procesu, możliwe stało się zrozumienie mechanizmu działania inhibitorów farnezyllotransferazy, bisfosfonianów i statyn. Wielokierunkowe i częściowo pokrywające się działanie tych z pozoru różnych grup leków (Ryc. 4) wskazuje na znaczenie nadmiernej izoprenylacji białek w patogenezie wielu stanów chorobowych. O ile inhibitory farnezyllotransferazy znajdują się w początkowym etapie badań klinicznych, to bisfosfoniany i statyny mają ugruntowane miejsce w terapii. Znaczenie izoprenylacji białek w wielu procesach fizjologicznych nie pozwala jednak zapominać o możliwości niepożądanych działań le-



Ryc. 4. Wielokierunkowe i częściowo pokrywające się działanie leków hamujących izoprenylację białek.

ków hamujących ten proces. Bliższe poznanie aspektów biochemicznych izoprenylacji być może pozwoli na opracowanie leków hamujących izoprenylację poszczególnych białek w sposób bardziej swoisty niż obecnie, co mogłoby zaowocować większą skutecznością i mniejszym ryzykiem działań ubocznych.

Artykuł otrzymano 17 czerwca 2004

Zaakceptowano do druku 6 września 2004

## Piśmiennictwo

- Świeżewska E (1995) *Post Biochem* 41: 51-58
- Houten SM, Frenkel J, Waterham HR (2003) *Cell Mol Life Sci* 60: 1118-1134
- Sosińska G (2003) *Post Biochem* 49: 107-115
- Epstein WW, Lever D, Leining LM, Bruenger E, Riling HC (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9668-9670
- Flint OP, Masters BA, Gregg RE, Durham SK (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 145: 99-110
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (1995) *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, Polska
- Maltese WA (1990) *FASEB J* 4: 3319-3328
- Rando R (1996) *Biochim Biophys Acta* 1300: 5-16
- Goldstein JL, Brown MS (1990) *Nature* 343: 425-430
- Roskoski R Jr (2003) *Biochem Biophys Res Com* 303: 1-7
- Casey PJ, Seabra MC (1996) *J Biol Chem* 271: 5289-5292
- Liang P-H, Ko T-P, Wang AH-J (2002) *Eur J Biochem* 269: 339-3354
- Maurer-Stroh S, Washietl S, Eisenhaber F (2003) *Genome Biol* 4: 212-219
- Casey PJ (1995) *Science* 268: 221-225
- Goalstone ML, Leitner JW, Golovchenko I, Stjernholm MR, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Draznin B (1999) *J Biol Chem* 274: 2880-2884
- Goalstone ML, Leitner JW, Berhanu P, Sharma PM, Olefsky JM, Draznin B (2001) *J Biol Chem* 276: 12805-12812
- Chen HT, Mehan RS, Gupta SD, Goldberg I, Shechter I (1999) *Arch Biochem Biophys* 364: 203-208
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) *Physiol Rev* 81: 153-208
- Oliff A (1999) *Biochim Biophys Acta* 1423: C19-C30
- Miączyńska M (1997) *Post Biochem* 43: 231-237
- Pereira-Leal JB, Hume AN, Seabra MC (2001) *FEBS Lett* 498: 197-200
- Rapak A (2002) *Postepy Hig Med Dosw* 56: 733-740
- Larijani B, Hume AN, Tarafder AK, Seabra MC (2003) *J Biol Chem* 278: 46798-46804

24. Verhoeven K, De Jonghe P, Coen K, Verpoorten N, Auer-Grumbach M, Kwon JM, FitzPatrick D, Schmedding E, De Vriendt E, Jacobs A, Van Gerwen V, Wagner K, Hartung HP, Timmerman V (2003) *Am J Hum Genet* 72: 722-727
25. Cohen LH, Pieterman E, van Leeuwen RE, Du J, Negre-Aminou P, Valentijn AR, Overhand M, van der Marel GA, van Boom JH (1999) *Biochem Pharmacol* 57: 365-373
26. Luft UC, Bychkov R, Gollasch M, Gross V, Roullet JB, McCarron DA, Ried C, Hofmann F, Yagil Y, Yagil C, Haller H, Luft FC (1999) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 959-966
27. Prendergast GC (2000) *Curr Opin Cell Biol* 12: 166-173
28. Cohen LH, Pieterman E, van Leeuwen RE, Overhand M, Burm BE, van der Marel GA, van Boom JH (1999) *Biochem Pharmacol* 60: 1061-1068
29. Nagasu T, Yoshimatsu K, Rowell C, Lewis MD, Garcia AM (1995) *Canc Res* 55: 5310-5314
30. Liu M, Bryant MS, Chen J, Lee S, Yaremkov B, Lipari P, Malkowski M, Ferrari E, Nielsen L, Priolo N, Dell J, Sinha D, Syed J, Korfmacher WA, Nomeir AA, Lin C-C, Wang L, Taveras AG, Doll RJ, Njoroge G, Mallams AK, Remiszewski S, Catino JJ, Grijavallabhan VM, Kirchmeier P, Bishop WR (1998) *Canc Res* 58: 4947-4956
31. Lebowitz PF, Casey PJ, Prendergast GC, Thissen JA (1997) *J Biol Chem* 272: 15591-15594
32. Nfrgaard P, Law B, Joseph H, Page DL, Shyr Y, Mays D, Pietenpol JA, Kohl NE, Oliff A, Coffey RJ, Poulsen HS, Moses HL (1999) *Clin Canc Res* 5: 35-42
33. Manges R, Corral T, Kohl NE, Symmans WF, Lu S, Malumbres M (1998) *Canc Res* 58: 1253-1259
34. Gu WZ, Tahir SK, Wang YC, Zhang HC, Cherian SP, O'Connor S, Leal JA, Rosenberg SH, Ng SC (1999) *Eur J Cancer* 35: 1394-1401
35. Feldkamp MM, Lau N, Guha A (1999) *Oncogene* 18: 7514-7526
36. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, Vermeer MA, Weich Ha, Hanemaaijer R, van Hinsbergh VW (1996) *J Cell Biol* 132: 1177-1188
37. Morgan MA, Ganser A, Reuter CW (2003) *Leukemia* 17: 1482-1498
38. Mazet JL, Padieu M., Osman H, Maume G, Maillet P, Dereu N, Hamilton AD, Lavelle F, Sebti SM, Maume BF (1999) *FEBS Lett* 460: 235-240
39. Caponigro F, Casale M, Bryce J (2003) *Expert Opin Investig Drugs* 12: 943-954
40. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, Ebetino FH, Rogers MJ (2001) *J Pharmacol Exp Ther* 296: 235-242
41. Ciosek CP, Magnin DR, Harrity TW, Logan JVH, Dickson JK, Gordon EM, Hamilton KA, Joblibois KG, Kunselman LK, Lawrence RM, Mokhtiar KA, Rich LC, Slusarchyk DA, Sulsky RB, Biller SA (1993) *J Biol Chem* 268: 24832-24837
42. Benford HL, Frith JC, Auriola S, Monkkonen J, Rogers MJ (1999) *Mol Pharmacol* 56: 131-140
43. Burnett JR, Vasikaran SD (2002) *Ann Clin Biochem* 39: 203-210
44. Reszka AA, Halasy-Nagy J, Rodan GA (2000) *Moll Pharmacol* 59: 193-202
45. Clezardin P (2002) *Semin Oncol* 29 (6 Suppl 21): 33-42
46. Oades GM, Senaratne SG, Clarke IA, Kirby RS, Colston KW (2003) *J Urol* 170: 246-252
47. Kuroda J, Kimura S, Segawa H, Kobayashi Y, Yoshikawa T, Urasaki Y, Ueda T, Enjo F, Tokuda H, Ottmann OG, Maekawa T (2003) *Blood* 102: 2229-2235
48. Mason JC (2003) *Clin Sci* 105: 251-266
49. Takemoto M, Liao JK (2001) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1712-1719
50. Laufs U, Endres M, Custodis F, Gertz K, Nickenig G, Liao JK, Bohm M (2000) *Circulation* 102: 3104-3110
51. Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, Ruffieux J, Kaibuchi K, Rusconi S, Yang Z (2002) *Mol Cell Biol* 22: 8467-8477
52. Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Hecker M (2000) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 61-69
53. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Soria E, Lamas S (2000) *Circ Res* 87: 616-622
54. Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF (2002) *Circulation* 105: 1756-1759
55. Ishibashi T, Sakamoto T, Ohkawara H, Nagata K, Sugimoto K, Sakurada S, Sugimoto N, Watanabe A, Yokoyama K, Sakamoto N, Kurabayashi M, Takuwa Y, Maruyama Y (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 681-687
56. Masamura K, Oida K, Kanehara H, Suzuki J, Horie S, Ishii H, Miyamori I (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 512-517
57. Eto M, Luscher TF (2003) *Endothelium* 10: 35-41
58. Lopez S, Peiretti F, Bonardo B, Juhan-Vague I, Nalbonge G (2000) *Atherosclerosis* 152: 359-366
59. Yamamoto T, Takeda K, Harada S, Nakata T, Azuma A, Sasaki S, Nakagawa M (2003) *Atherosclerosis* 166: 213-222
60. McCarty MF (2002) *Med. Hypoth* 58: 472-475
61. Collisson EA, Kleer C, Wu M, De A, Gambhir SS, Merajver SD, Kolodney MS (2003) *Mol Cancer Ther* 2: 941-948
62. Kusama T, Mukai M, Ayaki M, Imamura F, Tatsuta M, Matsumoto Y, Nakamura H, Inoue M (2003) *Int J Oncol* 23: 1173-1178
63. Zhong WB, Wang CY, Chang TC, Lee WS (2003) *Endocrinology* 144: 3852-3859
64. Denoyelle C, Albanese P, Uzan G, Hong L, Vannier JP, Soria J, Soria C (2003) *Cell Signal* 15: 327-338
65. Chamberlain LH (2001) *FEBS Lett* 507: 357-361
66. Kanda M, Satoh K, Ichihara K (2003) *Biol Pharm Bull* 26: 1681-1684
67. Jula A, Marniemi J, Huupponen R, Virtanen A, Rastas M, Ronnema T (2002) *JAMA* 287: 598-605
68. Masters BA, Palmoski MJ, Flin OP, Gregg RE, Wang-Iverson D, Durham SK (1995) *Toxicol Appl Pharmacol* 131: 163-174
69. Farmer JA (2003) *Curr Atheroscler Rep* 5: 96-100
70. Cheng Q, Gerald Robison W, Samuel Zigler J (2002) *Exp Eye Res* 75: 603-609
71. Backes JM, Howard PA (2003) *Ann Pharmacother* 37: 274-278
72. Gaist D, Jeppesen U, Andersen M, Garcia Rodriguez LA, Hallas J, Sindrup SH (2002) *Neurology* 58: 1333-1337

# Hamowanie procesu apoptozy w komórkach nowotworowych opornych na działanie leków przeciwnowotworowych

## The inhibition of apoptosis in cancer cells resistant to anticancer drugs

ROBERT NOWAK<sup>1</sup>, JOLANTA TARASIUK<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Najczęściej stosowane klinicznie leki przeciwnowotworowe
- III. Apoptoza w komórkach wrażliwych
  - III-1. Inicjacja procesu apoptozy za pośrednictwem mitochondriów
  - III-2. Inicjacja procesu apoptozy za pośrednictwem receptorów śmierci
  - III-3. Rola ceramidów w procesie apoptozy
  - III-4. Rola białka p53 w regulacji procesu apoptozy
- IV. Wykształcanie oporności komórek nowotworowych na stosowane leki
  - IV-1. Oporność wielolekowa komórek nowotworowych
- V. Mechanizmy hamowania apoptozy w komórkach nowotworowych opornych na działanie leków
  - V-1. Hamowanie apoptozy w komórkach nowotworowych o oporności wielolekowej
- VI. Próby przywracania apoptozy w komórkach nowotworowych opornych na działanie leków
  - VI-1. Modulacja aktywności białek eksportujących odpowiedzialnych za wykształcanie oporności wielolekowej
- VII. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Anticancer drugs the most often used in the clinic
- III. Apoptosis in sensitive cells
  - III-1. Initiation of apoptosis process by mitochondria
  - III-2. Initiation of apoptosis process by death receptors
  - III-3. The role of ceramides in apoptosis process
  - III-4. The role of p53 protein in the regulation of apoptosis
- IV. The appearance of the resistance to drugs used in anticancer therapy
  - IV-1. Multidrug resistance of cancer cells
- V. Mechanisms of apoptosis inhibition in cancer cells resistant to anticancer drugs
  - V-1. The inhibition of apoptosis in multidrug resistant cancer cells
- VI. Attempts of apoptosis restoration in cancer cells resistant to drug action
  - VI-1. Modulation of the activity of exporting proteins responsible for the multidrug resistance
- VII. Conclusion

Wykaz stosowanych skrótów: 8-MOP — 8-metoksypsoralen; AIF — czynnik indukcji apoptozy (ang. *apoptosis inducing factor*); AKT — kinaza białkowa B (PKB); ANT — translokaza nukleotydów adeninowych (ang. *adenine nucleotide translocator*); Apaf-1 — czynnik 1 aktywujący proteazy w procesie apoptozy (ang. *apoptosis protease activating factor-1*); Ara-C — cytarabina; DD — domena śmierci (ang. *death domain*); DFF — czynnik fragmentacji DNA (ang. *DNA fragmentation factor*); DIABLO — proteina bezpośrednio wiążąca białko hamujące apoptozę IAP (charakteryzująca się niską wartością punktu izoelektrycznego pI, ang. *direct IAP-binding protein with low pI*);

DR — receptor śmierci (ang. *death receptor*); ER — retikulum endoplazmatyczne; FADD — białko związane z domenami śmierci Fas (ang. *Fas-associated death domain*); FAN — białko aktywujące sfingomielinazę; FAS — receptor powierzchniowy z rodziny receptorów śmierci; FAS-L — ligand receptora FAS; FLIP — białko hamujące aktywność FLICE (kaspazy 8) (ang. *FLICE inhibitory protein*); GSH — glutation w formie zredukowanej; HSP — białko szoku cieplnego (ang. *heat shock protein*); IAP — białko hamujące apoptozę (ang. *inhibitory apoptosis protein*); MDR — oporność wielolekowa (ang. *multidrug resistance*); MORT1 — białko 1 pośredniczące w indukowanej przez receptory toksyczności (ang. *mediator of receptor-induced toxicity*); PARP — polimeraza poli (ADP-rybozy); P-gp — glikoproteina P; PKC — kinaza białkowa C; RFT — reaktywne formy tlenu; SM — sfingomielina; SR — białka bogate w serynę/argininę (ang. *serine/arginine-rich proteins*); SMAC — wtórny aktywator kaspaz (ang. *second mitochondria-derived activator of caspase*); TNF — czynnik martwicy nowotworu

<sup>1</sup>Mgr, <sup>2</sup>dr hab. inż., Katedra Biochemii, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Szczeciński ul. Felczaka 3a, 71-412 Szczecin, e-mail: robnowak@ko.onet.pl, e-mail: tarasiuk@univ.szczecin.pl

(ang. *tumor necrosis factor*); TRAF1, 2 — czynniki związane z receptorem śmierci TNF- $\alpha$  (ang. *TNF- $\alpha$  receptor associated factor*); TRAIL — ligand związany z czynnikiem martwicy nowotworu odpowiedzialny za inicjację procesu apoptozy (ang. *TNF-related apoptosis inducing ligand*); VDAC — kanał anionowy zależny od napięcia (ang. *voltage-dependent anion channel*);  $\Delta\psi_m$  — potencjał błonowy mitochondrium

## I. Wstęp

Choroby nowotworowe stanowią we współczesnym świecie jedną z najczęstszych przyczyn zgonów. Jak podaje O r z e c h o w s k a - J u z - w e n k o, w 1998 roku ok. 20% zgonów spowodowanych było nowotworami złośliwymi [1]. Z tego też powodu walka z nowotworami stanowi tak istotny problem współczesnej medycyny. Problem walki z nowotworami jest tym trudniejszy, że wiele stosowanych klinicznie leków przeciwnowotworowych traci swoją aktywność w wyniku nabycia przez komórki nowotworowe oporności [2]. Warunkiem niezbędnym dla opracowania skutecznych metod leczenia chorób nowotworowych jest dokładne poznanie mechanizmów prowadzących do apoptozy (czyli programowanej śmierci komórki) na skutek działania leków oraz, co ważniejsze, sposobów uchylania się niektórych typów komórek nowotworowych od tego procesu.

Niniejsza praca stanowi próbę zebrania dostępnych danych o mechanizmach hamowania procesu apoptozy w komórkach nowotworowych opornych na działanie leków oraz ukazania kierunków badań mających na celu przywrócenie apoptozy w tych komórkach.

## II. Najczęściej stosowane klinicznie leki przeciwnowotworowe

Związki przeciwnowotworowe stosowane we współczesnej terapii można podzielić na kilka grup, między innymi: związki alkilujące, związki o działaniu antymitotycznym, leki o działaniu cytostaticznym oraz inhibitory topoizomerazy I i topoizomerazy II [2-6].

Przedstawicielami leków alkilujących są cisplatyna i mitomycyna C. Mechanizm ich działania polega na przyłączaniu reaktywnych rodników alkilowych do grup nukleofilowych w cząsteczkach biologicznie czynnych [6]. Najbardziej wrażliwe na alkilowanie są zasady purynowe i pirymidynowe kwasów nukleinowych. W wyniku działania związków alkilujących następuje uszkodzenie DNA prowadzące do śmierci komórki [6]. Aktywacja mitomycyny C pole-

gająca na jej redukcji prowadzi również do alkilowania cząsteczek RNA [3].

Do związków o działaniu antymitotycznym należą między innymi alkaloidy barwinka *Vinca rosea* (winkrystyna, winblastyna), podofilotoksyny i ich analogi (tenipozyd, etopozyd) oraz taksol [3]. Mogą one blokować podziały komórkowe w fazie M, ponieważ oddziałują z mikrotubulami wrzeciona podziałowego [3]. O ile taksol oddziałuje ze spolimeryzowaną tubuliną nie pozwalając na jej depolimeryzację, to alkaloidy barwinka nie dopuszczają do polimeryzacji tubuliny poprzez działanie na jej monomery, co prowadzi ostatecznie do rozpadu mikrotubul [3, 4].

Ważną grupą leków przeciwnowotworowych o działaniu cytostaticznym są antybiotyki antracyklinowe (doksorubicyna, daunorubicyna), ich pochodne (np. epirubicyna, idarubicyna) oraz syntetyczne analogi (ametatron, mitoksantron) [2, 3, 5]. Działanie tych związków polega na interkalacji pomiędzy zasady w dwuniciowym DNA, stabilizacji tej struktury i w konsekwencji zahamowaniu procesów transkrypcji i translacji w komórkach [2, 3]. Stwierdzono także alkilujące i sieciujące działanie antracyklin na cząsteczkę DNA po metabolicznej aktywacji leku [2]. Związki te zakłócają również procesy replikacji i transkrypcji informacji genetycznej działając jako inhibitory topoizomerazy I i topoizomerazy II [2, 3].

Do znanych inhibitorów topoizomerazy I i topoizomerazy II należą też m.in. kamptotecyna, topotekan oraz etopozyd [7, 8].

Celem ostatecznym chemioterapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem wymienionych wyżej leków jest wywołanie apoptozy, czyli programowanej śmierci komórek nowotworowych przy możliwie jak najniższym stopniu narażenia komórek prawidłowych.

## III. Apoptoza w komórkach wrażliwych

Zjawisko oraz mechanizmy apoptozy były niejednokrotnie przedmiotem prac przeglądowych, w tym również na łamach „Postępów Biochemii” [9-17].

Apoptoza jest procesem niezwykle ważnym zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych [18-20]. Apoptoza jest również znaczącym wskaźnikiem oceny skuteczności związków przeciwnowotworowych w badaniach przesiewowych [21, 22]. Uważa się bowiem, że wejście na drogę apoptozy jest faktycznym odzwierciedleniem śmierci komórki, podczas gdy badania krótkoterminowe (ang. *short-term tests*) określające wpływ badanych

związków np. na stopień inkorporacji tymidyny lub poziom ATP wykrywają zaburzenia metaboliczne, które mogą mieć charakter przejściowy i w rezultacie nie zawsze muszą prowadzić do śmierci komórki. W czasie apoptozy następuje w komórce szereg zmian prowadzących ostatecznie do jej śmierci [14, 23]. Dochodzi między innymi do przechodzenia fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony komórkowej [23] oraz zwiększenia poziomu ceramidu tj. cząsteczki, która może aktywować apoptozę. Obserwuje się także zmiany w obrębie chromatyny (kondensacja, zmiana struktury) oraz degradację laminy B. Dochodzi jednocześnie do fragmentacji wielu białek komórkowych, w tym m.in. polimerazy poli (ADP-rybozy) (PARP), topoisomerazy I, histonów H1 oraz fosfolipazy A<sub>2</sub>, co może prowadzić do zmiany ich aktywności [23]. Z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium uwalniana jest również endonukleaza G oraz czynnik indukcji apoptozy AIF (ang. *apoptosis inducing factor*), które po przedostaniu się do jądra komórkowego uczestniczą w degradacji DNA, niezależnej od działania kaspaz. Pod wpływem kaspazy 3 następuje aktywacja DFF, czyli czynnika fragmentacji DNA (ang. *DNA fragmentation factor*). Aktywacja ta zachodzi w jądrze komórkowym i polega na uwolnieniu z nieaktywnego kompleksu DFF40/DFF45 podjednostki katalitycznej DFF40 niezbędnej do wytworzenia aktywnych homooligomerów zdolnych do degradacji DNA [24, 25]. W wyniku tych procesów ujawniają się charakterystyczne dla apoptozy zmiany morfologiczne: obkurczanie się komórek, kondensacja jądrowego DNA, fragmentacja jądra [23-27] i w konsekwencji pojawianie się ciałek apoptotycznych, które są fagocytowane przez makrofagi.

Chociaż charakterystyczny obraz mikroskopowy degradacyjnej fazy apoptozy jest wspólny dla różnych komórek ulegających programowanej śmierci, odkryto różnorodność mechanizmów uruchamiających ten proces. Wymienia się dwa główne szlaki inicjacji apoptozy: i. szlak wymagający sygnału pochodzącego z mitochondrium oraz ii. szlak wymagający przekazania sygnału do wnętrza komórki za pośrednictwem receptorów śmierci [28, 29]. Uważa się powszechnie, że bardzo ważnymi etapami apoptozy indukowanej obydwojema tymi mechanizmami są te zachodzące z udziałem kaspaz, będących częstkami efektorowymi śmierci komórki. Jaattela i Tschopp oraz Ruefli i wsp. wykazali jednak, że programowana śmierć komórki może zachodzić również bez udziału kaspaz [18, 29]. Dlatego też autorzy ci uważają, że nie można traktować określić „apoptoza” i „programowana śmierć ko-

mórki” jako tożsamy. Na podstawie zmian zachodzących w strukturze jądra umierającej komórki wyróżnili oni: 1) klasyczną apoptozę, 2) podobną do apoptozy (ang. *apoptosis-like*) programowaną śmierć komórki oraz 3) podobną do nekrozy (ang. *necrosis-like*) programowaną śmierć komórki [18]. Niezależną od kaspaz apoptozę wywołują m.in. perforyny, granzym B, przeciwciała anty-CD2 oraz staurosporyna będąca inhibitorem kinazy białkowej C [30]. Niezależna od kaspaz apoptoza może być hamowana przez białko Bcl-2 [29].

### III-1. Inicjacja procesu apoptozy za pośrednictwem mitochondriów

Istotne znaczenie w procesie apoptozy odgrywają mitochondria oraz białka z rodziny Bcl-2, do których należą zarówno czynniki proapoptotyczne (zawierające homologiczne domeny BH1, BH2, BH3 (ang. *Bcl-2 homology*, „*multidomain*”): Bax, Bak, Bok (Mtd), Bcl-rambo, oraz wykazujące homologię tylko domeny BH3 („*BH3-only*”): Bad, Bid, Bcl-X<sub>S</sub>, Noxa, Puma, Bik (Nbk), Bim (Bod), Hrk (DP5), Blk, Bmf, Bnip3 (nix), Bnip3L, p193, Bcl-G), jak również czynniki antyapoptotyczne (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Mcl-1, A1/Bfl-1, Boo/Diva, NR-13 ) [32-37].

Białka antyapoptotyczne znajdują się przede wszystkim w zewnętrznej błonie mitochondrium i działają poprzez uniemożliwienie uwolnienia z przestrzeni międzybłonowej różnych białek proapoptotycznych [37]. Białka proapoptotyczne z grupy określanej jako „BH3-only” są natomiast często zlokalizowane poza mitochondrium i dopiero w wyniku zadziałania czynników stresowych dochodzi do ich posttranslacyjnej modyfikacji i przeniesienia do mitochondrium [38, 39], gdzie indukują permeabilizację błony mitochondrialnej poprzez aktywację innych białek proapoptotycznych z podrodziny Bax/Bak lub poprzez hamowanie działania białek antyapoptotycznych [39]. Przykładem może być białko Bid, które po aktywacji z udziałem kaspazy 8 wywołuje w konformacji białka Bax zmiany prowadzące do utworzenia kanałów w błonie mitochondrium [34, 40, 41].

Uwalnianie czynników mitochondrialnych do cytoplazmy jest bardzo ważnym etapem apoptozy. Jednakże mechanizmy uwalniania z mitochondrium w czasie apoptozy cytochromu c i innych białek nie zostały do końca wyjaśnione i pozostają przedmiotem licznych dyskusji [31, 35]. Jeden z proponowanych mechanizmów zakłada otwarcie megakanalu mitochondrialnego obejmującego wewnętrzną i zewnętrzną błonę mitochondrium w miejscach ich zbli-

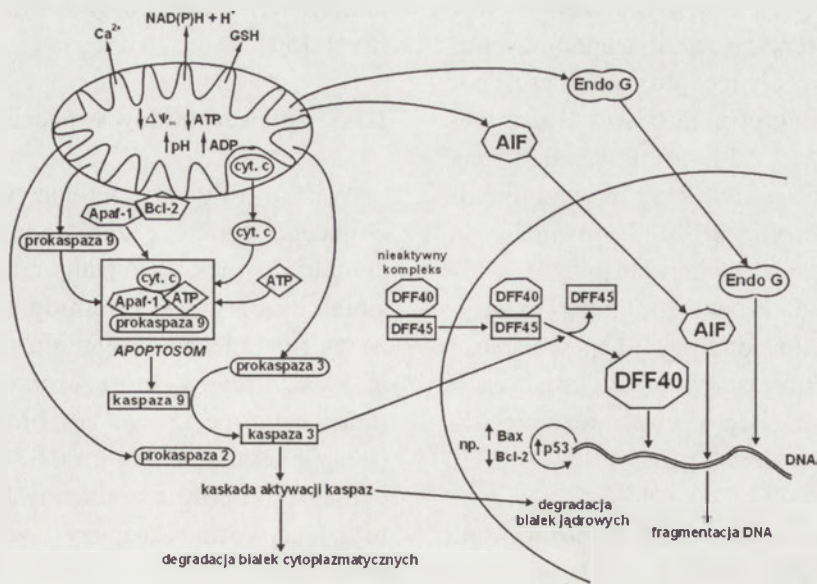
żenia. Przypuszcza się, że głównymi składnikami tego megakanalu są: kanał anionowy zależny od napięcia VDAC (ang. *voltage-dependent anion channel*) znajdujący się w zewnętrznej błonie mitochondrium oraz translokaza nukleotydów adeninowych ANT (ang. *adenine nucleotide translocator*) obecna w wewnętrznej błonie mitochondrium. Sugeruje się, że otwarcie megakanalu następuje przy udziale białka Bax [34, 35, 42]. Inna teoria mówi, że zamknięcie kanału VDAC zaburza wymianę nukleotydów ATP/ADP, co z kolei prowadzi do hiperpolaryzacji wewnętrznej błony mitochondrium i w konsekwencji do pęcznienia matriksu [35, 43] powodując uszkodzenia w zewnętrznej błonie i uwolnienie białek mitochondrialnych do cytoplazmy. Jeszcze inny mechanizm zakłada, że białko Bax, po przedostaniu się do mitochondrium, może w wyniku oligomeryzacji samodzielnie utworzyć kanał w błonie mitochondrialnej [35, 42]. Przypuszcza się również, że białko Bax może uczestniczyć w tworzeniu kanału przepuszczalnego dla cytochromu c poprzez wiązanie z kanałem anionowym VDAC choć jak podają Martinou i wsp., nadal nie ma dowodu na istnienie takiej struktury [35, 44]

Ważnym skutkiem zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej jest spadek potencjału elektrochemicznego w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej wywołujący redukcję potencjału błonowego mitochondrium ( $\Delta\psi_m$ ) oraz utratę mitochondrialnego GSH, NAD(P)H i  $\text{Ca}^{2+}$ , jak również zmianę wewnątrzkomórkowego pH. Zmiany te mogą mieć miejsce we wczesnych etapach apoptozy [45]. Wydaje się, że uwalnianie cytochromu c z mitochon-

drium może zachodzić równolegle z obniżeniem  $\Delta\psi_m$ , [46] lub je poprzedzać [47].

Ponadto może dochodzić do powstawania reaktywnych form tlenu, które mogą uszkadzać błony mitochondrialne, prowadząc wtórnie do drastycznych zmian w ich przepuszczalności oraz niszczyć strukturę DNA [48]. Na skutek stresu oksydacyjnego może także dochodzić do aktywacji kaspazy 12 [40], co dodatkowo przyczynia się do zajścia fazy egzekutorowej apoptozy.

Skutkiem zmian w obrębie mitochondrium jest również uwalnianie do cytoplazmy czynnika indukcji apoptozy AIF (ang. *apoptosis inducing factor*) oraz endonukleazy G, które po przedostaniu się do jądra komórkowego powodują bezpośrednią degradację DNA [37, 49, 50]. Z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium uwalniane są również czynniki proapoptotyczne takie jak cytochrom c, Smac/DIABLO (ang. *second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI*) oraz białko HtrA2/Omi [51]. Uwolniony cytochrom c łączy się z białkiem Apaf-1, obecnym w cytoplazmie. Powstały kompleks, zwany apoptosomem, stymuluje łączenie czynnika Apaf-1 z prokaspazą 9 prowadząc do jej autoaktywacji. Czynnikiem niezbędnym do uzyskania aktywnej kaspazy 9 jest ATP, stąd stan energetyczny komórki ma istotny wpływ na zjawisko apoptozy, w którym uczestniczą kaspazy [30, 52]. Aktywna kaspaza 9 uwalnia dalszą kaskadę aktywacji kaspaz prowadzącą w efekcie do fazy degradacyjnej procesu apoptozy [27, 31, 34, 35, 40, 49, 51, 53, 54] (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat apoptozy indukowanej przez zmiany w obrębie mitochondrium: AIF — czynnik indukcji apoptozy, Apaf-1 — czynnik 1 aktywujący proteazy w procesie apoptozy, DFF — czynnik fragmentacji DNA, EndoG — endonukleaza G, ER — retikulum endoplazmatyczne (wg [14, 24, 27, 31, 40], zmodyfikowano).

Wykazano, że kaspaza 9 może zostać zaktywowana również bez udziału cytochromu c [40], a zatem bez tworzenia apoptosomu. Stwierdzono to w przypadku komórek poddanych stresowi oksydacyjnemu. Działanie reaktywnych form tlenu na retikulum endoplazmatyczne (ER) powoduje wówczas aktywację kaspazy 12, która jest bezpośrednim aktywatorem kaspazy 9 odpowiedzialnej za uczynienie kaspazy 3 (uznawanej za kluczową kaspazę procesu apoptozy) [40]. Nie wyklucza się również, że w przypadku stresu oksydacyjnego komórki może dochodzić do aktywacji kaspazy 9 na obu drogach, zarówno z wytworzeniem apoptosomu, jak i z udziałem kaspazy 12 (Ryc. 1) [40].

Istotną rolę w regulacji inicjacji apoptozy przez czynniki białkowe uwalniane z mitochondrium odgrywają również białka z rodziny Bcl-2. Białko Bcl-2 zlokalizowane jest częściowo w zewnętrznej błonie mitochondrium, częściowo natomiast w przestrzeni międzybłonowej [23]. Może ono hamować uwalnianie cytochromu c z mitochondrium i nie dopuszczać do aktywacji kaspazy 3, podczas gdy białka Bax i Bid mają działanie odwrotne. Zatem oddziaływanie pomiędzy białkami hamującymi i promującymi apoptozę decydują o śmierci lub przeżyciu komórki [31]. Białko Bcl-2 może dodatkowo chronić komórkę przed zmianą pH w cytoplazmie oraz hamować przeniesienie fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony cytoplazmatycznej [55].

Apoptoza inicjowana z udziałem szlaku mitochondrialnego jest często powiązana z przebiegiem tego procesu wywołanego aktywacją receptorów śmierci. Wykazano między innymi, że aktywna forma kaspazy 8 (charakterystyczna dla apoptozy inicjowanej poprzez aktywację receptorów śmierci) powoduje proteolityczną aktywację białka Bid z wytworzeniem formy tBid [32, 34, 40]. Powstała forma tBid, współdziałając z białkiem Bad, może indukować uwalnianie cytochromu c [40] i prowadzić do powstania apoptosomu i aktywacji kaspazy 9, a następnie do uaktywnienia kaspazy 3. Stanowi to istotne wzmocnienie sygnału apoptozy [32]. Obecność białka tBid może również sprzyjać oligomeryzacji zarówno białka Bak jak i Bax, co jest niezbędne do ich proapoptotycznego działania [34].

### III-2. Inicjacja procesu apoptozy za pośrednictwem receptorów śmierci

Sygnał do rozpoczęcia apoptozy może być również związany z aktywacją receptorów śmierci DR (ang. *death receptor*) należących do nadrodziny TNF

(czynnik martwicy nowotworu, ang. *tumor necrosis factor*) [12, 31, 32]. Prowadzi to do bezpośredniej aktywacji kaskady kaspaz: kaspazy 8, kaspazy 3, kaspazy 6 i kaspazy 7 [56]. Do nadrodziny TNF należą takie receptory jak TNF-R1, Fas (Apo-1), DR3, DR4, DR5 i DR6. Wszystkie wymienione receptory zawierają specyficzną domenę śmierci DD (ang. *death domain*) [31, 32]. Związanie liganda powoduje trimeryzację białka receptorowego [19, 31, 32, 57], skutkiem czego jego region cytoplazmatyczny zawierający domeny śmierci przekazuje sygnał poprzez wiązanie białek adaptorowych jak np. FADD [białka związane z domenami śmierci Fas (ang. *Fas-associated death domain*)] [31, 32] lub MORT1 [białka 1 pośredniczącego w toksyczności indukowanej przez receptory (ang. *mediator of receptor-induced toxicity*)] [19]. Białka adaptorowe, przyłączając prokaspazę 8, tworzą kompleks DISC indukujący sygnał śmierci komórki (ang. *Death Inducing Signaling Complex*) [37]. Na skutek zmian konformacyjnych wywołanych oligomeryzacją prokaspazy 8 w tym kompleksie dochodzi do jej proteolitycznej autoaktywacji [31, 32, 36, 37, 40]. W niektórych przypadkach kaspaza ta może być werbowana bezpośrednio przez receptor śmierci [32]. Istotną rolę w aktywacji prokaspazy 8 odgrywa również ATP. Kaspaza 8 uczestniczy bezpośrednio w aktywacji kaspazy 3 [40, 58], co prowadzi do kaskadowej aktywacji kolejnych kaspaz i w efekcie końcowym do opisanych wyżej etapów degradacji komórki (Ryc. 2).

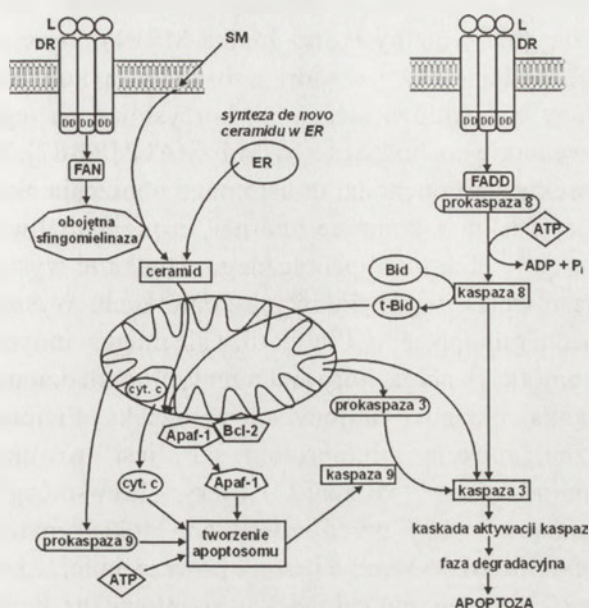
Fulda i wsp. wskazują na rolę systemu: ligand receptora CD95/receptor CD95 jako kluczowego w inicjacji apoptozy indukowanej lekami w niektórych komórkach białaczkowych oraz komórkach guzów litych [59].

### III-3. Rola ceramidów w procesie apoptozy

Ważną rolę w przekazywaniu sygnału inicjującego apoptozę zarówno poprzez szlak mitochondrialny, jak i związany z aktywacją receptorów śmierci, odgrywają ceramidy [20]. Uważane są one za wtórny przekaźnik sygnału apoptozy [60, 61]. Jest to klasa lipidów, które promują ujemne wygięcie (ang. *negative curvature*) błony mitochondrialnej [62], podobnie jak białko tBid [34] oraz uwalnianie cytochromu c do cytoplazmy [62]. Mogą one również aktywować kaspazy, szczególnie kaspazę 3 [20].

Aktywacja kinazy białkowej C osłabia zdolność ceramidu do indukcji apoptozy, ale nie osłabia innych odpowiedzi na ceramidy (np. zdolności do zahamowania cyklu komórkowego) [63].

Ceramidy mogą być syntetyzowane *de novo* (w odpowiedzi na działanie np. TNF- $\alpha$ , aktywacji receptora CD95, ceramidu o sześciowęglowym łańcuchu, cytarabiny Ara-C) (Ryc. 2) lub powstawać na



Ryc. 2. Schemat szlaku indukcji apoptozy poprzez aktywację receptorów śmierci: Apaf-1 — czynnik 1 aktywujący proteazy w procesie apoptozy, ER — retikulum endoplazmatyczne; FADD — białko związane z domenami śmierci Fas, FAN — białko aktywujące sfingomielinazę, DR — receptor powierzchniowy z rodziny receptorów śmierci, L — ligand receptora śmierci, SM — sfingomielina (wg [14, 31], zmodyfikowano).

drodze hydrolizy sfingomielin (obecnych w wewnętrznej warstwie błony cytoplazmatycznej) w odpowiedzi na działanie chemioterapeutyków (np. antracyklin, paklitakselu, etopozytu oraz alkaloidów barwinka) [20] lub w wyniku stresu oksydacyjnego [33].

Chalfant i wsp. podają, że w komórkach Jurkat oraz A549 synteza ceramidu *de novo*, zachodząca wskutek aktywacji receptora Fas, wywołuje defosforylację białek bogatych w serynę/argininę SR (ang. *serine/arginine-rich proteins*), będących specyficznymi substratami fosfatazy białkowej PP1, które biorą udział w syntezie białek uczestniczących w apoptozie [64].

Hydroliza sfingomielin zachodzi poprzez aktywację białka FAN za pośrednictwem zaktywowanego receptora śmierci TNF-R1, co prowadzi do uczynienia sfingomielinazy [20, 61]. Obecność aktywnej sfingomielinazy stwierdzono również w jądrze hepatocytów oraz w błonie komórkowej [65]. Hydroliza sfingomielin obecnych w warstwie wewnętrznej błony cytoplazmatycznej powoduje utratę jej asymetrii, co prowadzi do kolejnych zmian w strukturze dwuwarstwy błony i w dalszej konsekwencji do pojawienia się na powierzchni komórki fosfatydyloseryny, będącej jednym z wyznaczników apoptozy [20].

Nie zawsze jednak tak się dzieje. Opisano bowiem przypadki, gdy hydroliza sfingomielin nie prowadziła do apoptozy [20]. Jak sugerują O g r e t m e n i H a n n u n, istotne znaczenie dla odpowiedzi na powstający ceramid ma umiejscowienie sfingomielinazy w odpowiednim przedziale komórki [20]. Autorzy ci wskazują, że ceramidy syntetyzowane *de novo* na skutek działania takich czynników wywołujących apoptozę jak TNF, zlokalizowane są w retikulum endoplazmatycznym, aparacie Golgiego oraz w błonach jądrowych i wywołują inne mechanizmy efektorowe apoptozy niż ceramidy powstające z hydrolizy sfingomielin.

### III-4. Rola białka p53 w regulacji procesu apoptozy

W regulacji procesu apoptozy istotną rolę odgrywa również białko p53. Jest to czynnik transkrypcyjny modulujący ekspresję genów, kodujących białka uczestniczące w regulacji cyklu komórkowego oraz w procesie apoptozy (np. Fas, Bax, receptorów śmierci) [32, 66]. Na skutek stresu (np. uszkodzenia DNA) następuje fosforylacja i stabilizacja p53 [32]. Wiadomo, że białko p53 odgrywa bardzo ważną rolę w zatrzymaniu cyklu komórkowego w celu naprawy DNA [32] lub skierowaniu komórki na drogę apoptozy w odpowiedzi na jej nieodwracalne uszkodzenia wywołane różnymi czynnikami, zarówno fizycznymi jak i chemicznymi, np. promieniowaniem jonizującym, hipoksją, aktywacją onkogenów czy działaniem leków przeciwnowotworowych [8, 53].

Uważa się, że p53 może hamować ekspresję niektórych ważnych genów procesu apoptozy, jak np. genu kodującego białko Bcl2 oraz genów kodujących cząsteczki proapoptotyczne jak białka Bax i CD95 [58]. Stwierdzono również, że białko p53 może współuczestniczyć w indukowaniu aktywacji kaspaz [53].

Istnieją również doniesienia, że białko p53 działa regulująco nie tylko na białka proapoptotyczne z rodziny Bcl2 (Bax, Bak, Noxa), białko Aip-1 oraz receptory śmierci, ale reguluje również zajście dalszych etapów apoptozy wpływając na regulację ekspresji genów kodujących takie białka jak np. Apaf-1 i kaspaza 6 [67]. p53 uczestniczy również w transporcie receptorów śmierci do zewnętrznej powierzchni błony komórkowej, działa bezpośrednio w mitochondriach oraz reguluje translację [17].

Dogłębne przedstawienie roli białka p53 w procesie apoptozy nie stanowi przedmiotu niniejszej pracy. Istnieje na ten temat bardzo bogate piśmiennictwo, gdzie zainteresowany Czytelnik znajdzie szczegółowe informacje [68-72].

#### IV. Wykształcanie oporności komórek nowotworowych na stosowane leki

Główną przeszkodą w skutecznym leczeniu chorób nowotworowych jest wykształcanie oporności komórek nowotworowych na działanie leków [19, 51, 73]. Opisano kilka mechanizmów wykształcania oporności komórek nowotworowych. Do najważniejszych z nich należą:

- zmiany w transporcie komórkowym, związane z nadekspresją pomp zależnych od ATP, które eksportują związki przeciwnowotworowe poza komórkę [74],
- zmiany w wewnątrzkomórkowej dystrybucji leku, związane ze zwiększonym zatrzymywaniem związków przeciwnowotworowych w organelach wewnątrzkomórkowych (np. lizosomach), co uniemożliwia uzyskanie wystarczającego stężenia leku w okolicy jego celu molekularnego (np. jądrowego DNA) [75],
- zmiany strukturalne celów molekularnych dla związków przeciwnowotworowych, związane m.in. z modyfikacjami konformacyjnymi DNA i topoisomerazy II, zmianami w systemach naprawy uszkodzeń DNA, a także w przepuszczalności otoczki jądrowej [76-78],
- wzrost stężenia enzymów obronnych (głównie zależnych od glutationu), co prowadzi do zwiększenia aktywności szlaków neutralizacji i usuwania związków przeciwnowotworowych poprzez np. zwiększenie aktywności szlaku fosfopentozowego czy zmiany w metabolizmie glutationu [79],
- hamowanie apoptozy [80].

Wyróżnić można oporność pierwotną komórek nowotworowych występującą jeszcze przed ich kontaktem z lekami oraz oporność nabytą tj. pojawiającą się dopiero w trakcie stosowania chemioterapii [73, 81].

##### IV-1. Oporność wielolekowa komórek nowotworowych

Wśród opisanych mechanizmów oporności komórek nowotworowych szczególnie trudnym problemem jest oporność wielolekowa MDR. Jest to bowiem rodzaj oporności, który powoduje utratę aktywności przeciwnowotworowej większości stosowanych leków, często niespokrewnionych chemicznie i o różnych mechanizmach działania. Stwierdzono na przykład, że komórki nowotworowe traktowane aktynomycyną D (mechanizm działania — interkalacja do DNA) wykształcają oporność nie tylko na ten związek, lecz również na dokсорubicynę i dauno-

rubicynę (interkalacja i sieciowanie DNA, hamowanie topoisomerazy II), a także na alkaloidy z barwinka (hamowanie tworzenia mikrotubul) [82, 83].

W komórkach o oporności wielolekowej MDR dochodzi do nadekspresji białek błonowych ABC (m.in. glikoproteiny P oraz białka MRP1), które są odpowiedzialne za eksport substancji z komórki wbrew gradientowi stężeń, wykorzystując do tego celu energię pochodzącą z hydrolizy ATP [84-87]. W konsekwencji dochodzi do istotnego obniżenia akumulacji leku w komórce odpornej, co uniemożliwia uzyskanie efektu terapeutycznego. Białka te występują również w prawidłowych komórkach. Wysoki poziom glikoproteiny P stwierdza się między innymi w komórkach nerek, kory nadnerczy, płuc, śledziony, żołądka, mózgu i limfocytach człowieka. Fizjologiczną funkcją glikoproteiny P jest również współudział w tworzeniu bariery „krew-mózg”, chroniącej mózg przed związkami toksycznymi. Białko MRP1 występuje jeszcze powszechniej w komórkach organizmu człowieka. Fizjologiczną funkcją tego białka jest transport metabolitów i usuwanie z komórek substancji obcych. Są one eksportowane najczęściej w postaci koniugatów z glutationem lub kwasem glukuronowym [88, 89]. W prawidłowych komórkach poziom glikoproteiny P i białka MRP1 nie jest wysoki, natomiast w przypadku komórek nowotworowych o oporności wielolekowej MDR dochodzi do silnej nadekspresji tych białek. Stwierdzono na przykład zwiększoną ekspresję glikoproteiny P w niektórych komórkach białaczek, nowotworów jajnika i piersi oraz w niektórych komórkach mięsaków [81]. Nadekspresję MRP1 wykazano natomiast w komórkach drobnokomórkowego raka płuc [73]. Niedawno wskazano również na rolę innego białka należącego do rodziny transporterów ABC, białka BCRP (ang. *breast cancer resistance protein*), w wykształcaniu oporności wielolekowej komórek nowotworowych. Wysoki poziom białka BCRP stwierdzono w niektórych komórkach nowotworowych opornych na działanie mioksantronu, dokсорubicyny i daunorubicyny, w których nie obserwowano nadekspresji glikoproteiny P oraz białka MRP1 [81, 90]. Badane komórki z nadekspresją białka BCRP były bardziej odporne na mitoksantron i topotekan niż komórki nowotworowe wykazujące nadekspresję glikoproteiny P [81].

Mechanizmy funkcjonowania białek transportujących ABC i sposób wiązania przez nie chemioterapeutyków są mało poznane. Jednym z najbardziej intrygujących pytań pozostaje problem wyjątkowo niskiej specyficzności substratowej pomp eksportujących ABC. Białka te usuwają bowiem z komórki

związki lipofilowe o bardzo zróżnicowanej budowie chemicznej i odmiennych mechanizmach działania [91, 92].

Wyniki badań ostatnich lat wskazały również na rolę innych białek, nie należących do rodziny transporterów ABC, w wykształcaniu oporności wielolekowej komórek nowotworowych. Jednym z nich jest białko LRP (ang. *lung resistance-related protein*), o wysokim stopniu homologii z białkami krypt. Z tego powodu przypuszcza się, że bierze udział w transporcie substancji przez pory jądrowe [73, 81]. Wysoki poziom tego białka jest charakterystyczny dla komórek biorących udział w procesach wydzielania i wydalania oraz tkanek szczególnie narażonych na działanie leków i toksyn [73, 81]. Białko LRP może być zaangażowane w transport wewnątrzkomórkowy receptorów steroidów: progesteronu, estrogeny i glikokortykosteroidów. Nadekspresję LRP stwierdzono również w niektórych komórkach nowotworowych opornych na dokсорubicynę, winkrystynę, etopozyd i taksol [93]. Fenotyp oporności związany z nadekspresją LRP wynika prawdopodobnie ze zmiennej dystrybucji wewnątrzkomórkowej leków przeciwnowotworowych wskutek ich efektywnego transportu z jądra komórkowego.

## V. Mechanizmy hamowania apoptozy w komórkach nowotworowych opornych na działanie leków

Mechanizmy oporności komórek nowotworowych mogą być związane z zaburzeniem prawidłowego działania białka p53 [66]. Dochodzi wówczas do zakłócenia regulacji ekspresji niektórych ważnych genów kodujących cząsteczki proapoptotyczne, jak białka Bax i CD95 [58], oraz genów kodujących czynniki antyapoptotyczne np. białko Bcl-2. Istotną rolę w hamowaniu apoptozy w komórkach nowotworowych odgrywają białka z rodziny Bcl-2. W wielu typach nowotworów dochodzi do nadekspresji białek z tej rodziny prowadzącej do zachwiania równowagi pomiędzy białkami proapoptotycznymi i antyapoptotycznymi [37] na korzyść białek hamujących apoptozę, jak np. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> [94]. Stwierdzono również, że hamowanie apoptozy w komórkach nowotworowych może być związane z mutacjami w genach kodujących białka proapoptotyczne m.in. genu kodującego białko Bax [95] oraz genu kodującego białko Bak [96].

Wśród czynników związanych z opornością komórek nowotworowych na działanie leków wymienia się również białka hamujące apoptozę IAP (ang. *inhibitory of apoptosis proteins*) w tym białka c-IAP.

Wykazano, że c-IAP-1 i c-IAP-2 mogą wiązać się z TRAF1 i TRAF2 tj. czynnikami związanymi z receptorem śmierci TNF- $\alpha$  (ang. *TNF- $\alpha$  receptor associated factor*), co prowadzi do tłumienia sygnału apoptozy [97]. Stwierdzono również, że białka c-IAP mogą oddziaływać z kaspazą 3 i kaspazą 7, hamując ich proteolityczną aktywację [98].

Na inną drogę „ucieczki” komórek nowotworowych przed apoptozą wskazują K i m i wsp. Stwierdzili oni w swoich badaniach, że białka FLIP są silnymi inhibitorami apoptozy indukowanej przez aktywację receptorów śmierci z rodziny TNF. Białka FLIP wiążą się z białkami adaptorowymi (FADD), przez co zakłócają etap aktywacji kaspaz, przede wszystkim etap autoaktywacji kaspazy 8. Stwierdzono, że białka FLIP zakłócają wczesne etapy apoptozy poprzez hamowanie przekazywania sygnału przez receptory TRAIL [99].

Komórki nowotworowe unikają wejścia na drogę apoptozy również poprzez uniemożliwienie aktywacji kaspazy 9, nie dopuszczając do utworzenia apoptosomu. Hamowanie tworzenia się apoptosomu może być spowodowane nadmierną metylacją genu *Apaf-1* [37] oraz wzrostem poziomu białek szoku cieplnego HSP (ang. *heat shock protein*). Stwierdzono bowiem, że białko HSP27 ma zdolność wiązania się z cytochromem c, natomiast HSP70 i HSP90 tworzą kompleksy z białkiem Apaf-1, przez co uniemożliwiają jego oligomeryzację i nie dopuszczają do aktywacji prokaspazy 9 [37]. R a v a g a n i i wsp. wykazali również, że białko HSP70 może hamować aktywność czynnika AIF, a zatem może wpływać na degradacyjną fazę procesu apoptozy niezależną od kaskady aktywacji kaspaz [100].

Hamowanie apoptozy w komórkach nowotworowych może być również związane ze zwiększoną ekspresją kinazy AKT (kinazy białkowej B – PKB), która przeprowadza reakcje fosforylacji prowadząc do hamowania aktywności ważnych białek procesu apoptozy takich jak Bad, prokaspaza 9 oraz p53 [37]. Fosforylacja białka Bad na przykład hamuje tworzenie heterodimerów tego białka z Bcl-2 oraz Bcl-X<sub>L</sub> prowadząc do hamowania apoptozy [37]. Fosforylacja prokaspazy 9 hamuje natomiast jej autoaktywację. Po przedostaniu się kinazy AKT do jądra komórkowego, katalizuje ona fosforylację ligazy ubikwitynowej Mdm2. W wyniku tego dochodzi dołączenia się ufosforylowanej formy ligazy z białkiem p53 przyczyniając się do jego degradacji [37]. AKT aktywuje również czynnik jądrowy  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) [37].

NF- $\kappa$ B jest czynnikiem transkrypcyjnym, który również może odgrywać istotną rolę w hamowaniu apoptozy w niektórych typach komórek nowotworowych.

wych. W komórkach będących w fazie spoczynkowej czynnik ten znajduje się w cytoplazmie, gdzie tworzy kompleks z białkami hamującymi I- $\kappa$ B, co zapobiega wnikanii NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego. Przypuszcza się, że I- $\kappa$ B- $\alpha$  odpowiada również za eksport NF- $\kappa$ B z jądra do cytoplazmy [37].

Stwierdzono, że czynnik NF- $\kappa$ B wiąże się z różnymi miejscami DNA, zwanymi miejscami  $\kappa$ B, stymulując transkrypcję białek odpowiedzialnych za ochronę przed apoptozą jak np. IAP, c-FLIP, białek antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2 (np. Bcl- $X_L$ ), białek adaptorowych (TRAF-1, TRAF-2) i innych [37]. Stwierdzono jednak jednocześnie, że NF- $\kappa$ B może również indukować transkrypcję białek proapoptotycznych takich jak receptor Fas, jego ligand (Fas-L) oraz receptory śmierci DR4, DR5 i DR6 [37].

Aktywacja czynnika jądrowego  $\kappa$ B zwiększa oporność komórek nowotworowych na apoptozę wywołowaną działaniem radioterapii oraz chemioterapii [37]. Czynnik NF- $\kappa$ B jest aktywowany między innymi pod wpływem stosowania takich chemioterapeutyków jak taksol, doksorubicyna, daunorubicyna, etopozyd, wikrystyna, winblastyna oraz kamptotecyna [101]. Zwiększona jego aktywność może również prowadzić w obecności tych leków do zwiększonej ekspresji genu *mdr1* [42].

Pojawiają się również doniesienia, że hamowanie apoptozy w komórkach nowotworowych może być związane ze zmianami metabolizmu ceramidu [102, 103]. Dużą rolę w nabywaniu oporności na apoptozę przez komórki nowotworowe przypisuje się syntezie glukozyloceramidowej (przekształcającej ceramid do glukozyloceramidu) [20]. Wykazano, że nadeks-

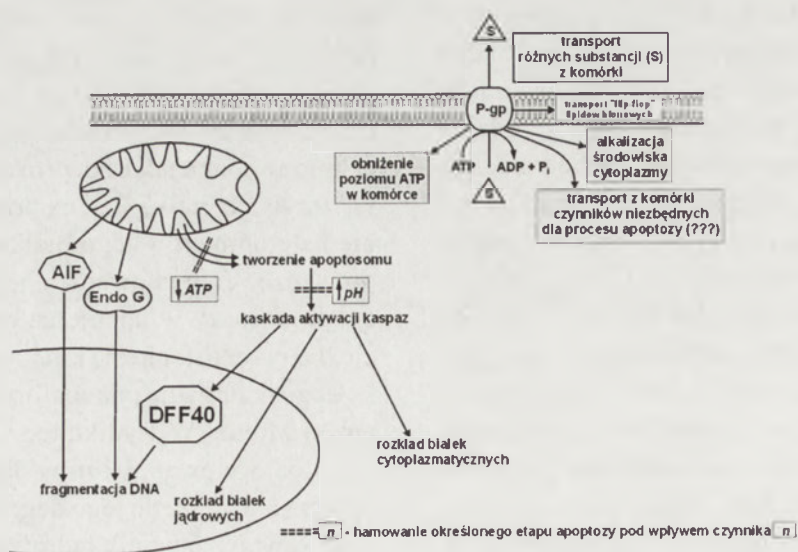
presja tego enzymu wywoływała zjawisko oporności na apoptozę w komórkach nowotworu piersi MCF-7 [94].

Do rzadziej obserwowanych mechanizmów hamowania apoptozy w komórkach nowotworowych należą m.in. brak występowania białka Apaf-1 w komórkach czerniaka, inaktywacja kaspazy 8 w komórkach nerwiaków oraz inaktywacja bądź zmniejszona ekspresja białek receptorowych (receptorów śmierci) [17].

## V-1. Hamowanie apoptozy w komórkach nowotworowych o oporności wielolekowej

Coraz więcej danych wskazuje na istotny udział białek transportujących ABC w hamowaniu apoptozy w komórkach nowotworowych o oporności wielolekowej [19, 29, 30, 52, 90, 97, 104-113]. Niektórzy autorzy sugerują nawet, że rola glikoproteiny P jako inhibitora apoptozy w tych komórkach jest znacznie większa niż jako pompy eksportującej leki przeciwnowotworowe [104].

Sugeruje się, że ze względu na bardzo szerokie spektrum substratów glikoproteiny P i jej udowodnioną zdolność do usuwania białek np. interleukiny-2, interleukiny-4 i interferonu [110], pompa ta może usuwać z komórek opornych bądź to kaspazy, bądź też inne kluczowe czynniki niezbędne do przeprowadzenia fazy egzekutorowej apoptozy [108]. Twierdzi się także, że hamowanie apoptozy w komórkach o oporności wielolekowej może być związane z obniżaniem wewnątrzkomórkowego poziomu ATP, niezbędnego do aktywacji określonych etapów apoptozy, m.in. aktywacji kaspazy 8, tworze-



Ryc. 3. Schemat hamowania procesu apoptozy w komórkach nowotworowych o oporności wielolekowej, związanego z uwalnianiem czynników mitochondrialnych: AIF — czynnik indukcji apoptozy, DFF — czynnik fragmentacji DNA, EndoG — endonukleaza G, P-gp — glikoproteina P (na podstawie [14, 24, 27, 31, 40]).

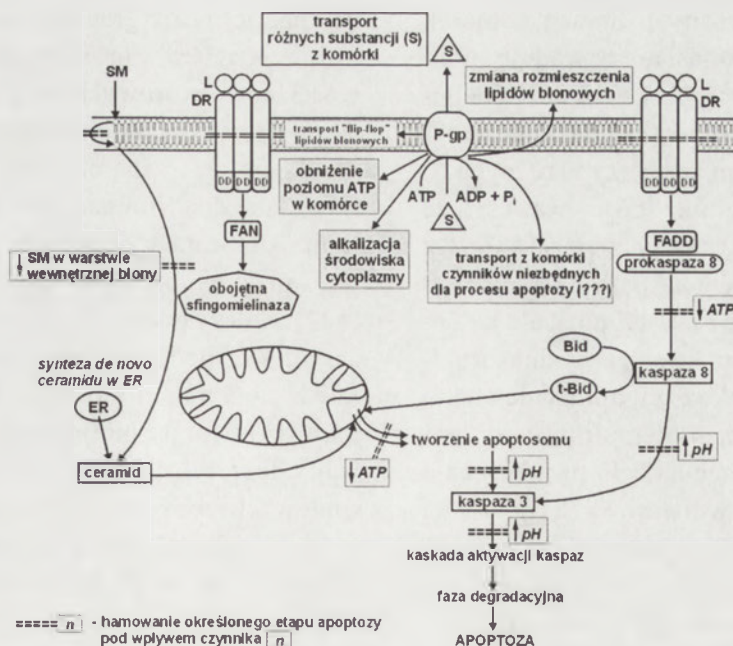
nia aktywnej formy apoptosomu, niezbędnej do aktywacji kaspazy 3, ATP-zależnego transportu czynnika indukcji apoptozy AIF z cytoplazmy do jądra komórkowego oraz aktywacji czynnika fragmentacji DNA (DFF) [111, 112]. Istnieją również doniesienia, że glikoproteina P może indukować wzrost wewnątrzkomórkowego pH, co prowadzi do zahamowania aktywności kaspaz, które są wrażliwe na zmiany pH [112, 113]. Alkalizacja środowiska wewnątrzkomórkowego związana jest z tym, że glikoproteina P indukuje szlak transportu protonów zależny od  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  (Ryc.3) [111]. Stwierdzono jednocześnie, że nadekspresja glikoproteiny P w komórkach nowotworowych o oporności wielolekowej nie chroni przed apoptozą niezależną od kaspaz, wywoływaną przez białka tworzące pory — perforyny, granzym B, przeciwciała anti-CD2 oraz inhibitor kinazy białkowej C — staurosporynę [29, 30].

Udział glikoproteiny P w hamowaniu apoptozy w komórkach nowotworowych o oporności wielolekowej może być również związany z zaangażowaniem tego białka w transport „flip-flop” lipidów błonowych. Prowadzi to do istotnych zmian w dostępności sfingomielin dla sfingomielinazy, odpowiedzialnej za ich hydrolizę do ceramidu tj. czynnika stymulującego apoptozę [107-109]. Ze względu na zmianę rozmieszczenia lipidów w strukturze błony cytoplazmatycznej może również dochodzić do zaburzeń w przekazywaniu sygnału związanego z aktywacją receptorów śmierci (Ryc. 4).

## VI. Próby przywracania apoptozy w komórkach nowotworowych opornych na działanie leków

Jednym z ważniejszych celów chemioterapii nowotworów jest opracowanie skutecznych strategii przywracania komórkom opornym na działanie leków zdolności do wejścia na drogę programowanej śmierci [114]. Jakkolwiek opracowywane i testowane są różnorodne strategie, wiele z nich niestety zawodzi [66, 115]. Próba wpływania bezpośrednio na proces apoptozy wymaga bowiem precyzyjnego „trafienia” we właściwy cel molekularny, by uniknąć niekontrolowanego niszczenia komórek [32].

Prace przeprowadzone w zespole A. Vollm ar wykazały właściwości proapoptotyczne ajoenu występującego w dużych ilościach w naturalnych produktach m.in. w czosnku, cebuli i brokułach [116, 117]. Wykazano, że związek ten był zdolny do wywołania apoptozy w komórkach białaczkowych hodowanych *in vitro* oraz u pacjentów chorych na białaczkę. Jednocześnie stwierdzono, że nie wywoływał on apoptozy w mononuklearnych komórkach krwi obwodowej ludzi zdrowych [116, 117]. Autorzy tych badań sugerują, że działanie ajoenu polega na zwiększaniu przepuszczalności błony mitochondrialnej, co prowadzi do uwolnienia cytochromu c (już po 4 godzinach inkubacji) i kaskady aktywacji kaspaz [117]. Stwierdzili oni jednocześnie, że przywracanie zdolności komórek nowotworo-



**Ryc. 4.** Schemat hamowania procesu apoptozy w komórkach nowotworowych o oporności wielolekowej, związanego z aktywacją receptorów śmierci: Apaf-1 — czynnik 1 aktywujący proteazy w procesie apoptozy, ER — retikulum endoplazmatyczne, FADD — białko związane z domenami śmierci Fas, FAN — białko aktywujące sfingomielinazę, DR — receptor powierzchniowy z rodziny receptorów śmierci, L — ligand receptora śmierci, P-gp — glikoproteina P, SM — sfingomielina (na podstawie [14, 27, 31, 40]).

wych do apoptozy przez ajoen może być specyficzne tylko dla komórek białaczkowych, gdyż zaobserwowano, że komórki mięsaków były niewrażliwe na działanie tego związku [116]. Stwierdzono również podobne działanie helenaliny w przypadku komórek T w białaczce typu Jurkat. Wykazano, że helenalina powoduje permeabilizację błony mitochondrialnej i w konsekwencji stymuluje indukcję apoptozy [114].

Minko i wsp. wskazali również na możliwość zablokowania antyapoptotycznego działania białek z rodziny Bcl-2. Autorzy ci wykazali w swoich badaniach, że krótkie peptydy homologiczne do domeny BH3 białek Bcl-2 zwiększały skuteczność doksorubicyny poprzez hamowanie antyapoptotycznego działania tych białek [51].

Innym kierunkiem prac zmierzających do przywrócenia apoptozy w komórkach opornych na działanie leków przeciwnowotworowych jest znalezienie związków aktywujących kinazę białkową PKC, która bierze udział w przekazywaniu sygnału apoptozy [118]. Przesunięcie PKC do mitochondrium jest niezbędne do uwolnienia cytochromu c do cytoplazmy. Wykazano dla komórek linii HeLa, że ekspresja aktywnej formy PKC była czynnikiem wystarczającym do zapoczątkowania apoptozy [118].

Obiecującą metodą przywracania zdolności do apoptozy może być również wpływ na szlaki aktywacji receptorów śmierci [66, 99]. Zdaniem Cuello i wsp. bardzo zachęcające są dane eksperymentalne świadczące o tym, że ligand TRAIL odpowiadający za aktywację receptora TNF wywołuje programowaną śmierć komórek w różnych liniach komórek nowotworowych [66], natomiast nie powoduje apoptozy w komórkach zdrowych [99]. Jednoczesne podawanie TRAIL i doksorubicyny (DOX) skutkuje synergistycznym pobudzeniem apoptozy w różnych liniach komórkowych raka jajnika [66]. Uważa się, że obserwowany efekt synergistyczny związany jest z jednoczesnym aktywowaniem kaspazy 8, kaspazy 10 i kaspazy 3 przez TRAIL, co z kolei pozwala na obniżenie stosowanego klinicznie stężenia doksorubicyny oraz TRAIL i w konsekwencji obniżenie efektu toksycznego stosowanej chemioterapii [66].

Prace Kim i wsp., mające na celu przywracanie apoptozy w komórkach nowotworowych, oparte są na poznanej funkcji białka FLIP, polegającej na jego wiązaniu się z białkami adaptorowymi i prokaspazami przez co dochodzi do zakłócenia w przekazaniu sygnału śmierci za pośrednictwem TRAIL [99]. Silną nadekspresję genu kodującego białko FLIP wykazano w przypadku niektórych typów komórek nowotworowych. Założono zatem, że obniżenie ilości tego białka mogłoby przywrócić wrażliwość komó-

rek nowotworowych na czynniki indukujące apoptozę poprzez ligand TRAIL. Stwierdzono, że naturalni agoniści PPAR (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*) oraz syntetyczne modulatory białka FLIP (w tym tiazolidienodiony i triterpenoidy), oddziałując z niezidentyfikowanym jeszcze na razie celem komórkowym, obniżają poziom białka FLIP, co przywraca zdolność komórki do wejścia na drogę apoptozy [99].

Prowadzone są również badania mające na celu modyfikowanie metabolizmu sfingolipidów [20]. Wydaje się, że dobre rezultaty może dać połączenie działania chemioterapeutyków z czynnikami hamującymi przekształcanie ceramidu [20]. W przypadku komórek nerwiaka stwierdzono na przykład silny efekt synergistycznego działania cytotoksycznego N-(4-hydroksyfenylo)retinamidu ze związkiem będącym modulatorem metabolizmu ceramidu np. L-treo-dihydrosfingozyną, d,1-treo-1-fenylo-2-heksadekanoiloamino-3-morfolino-1-propanolem lub tamoksifenem [119]. Metha i wsp. wykazali również, że jednoczesne podanie ceramidu C<sub>6</sub> i paklitakselu istotnie zwiększyło ilość komórek płaskokomórkowego raka głowy i szyi będących w fazie S i/lub G2-M cyklu komórkowego [120]. Stwierdzono również, że u myszy, którym wszczepiono ludzkie komórki nowotworowe HT29, dożylnie podawanie sfingomielin podczas terapii 5-fluorouracylem wzmacniało silnie efekt terapeutyczny [121]. Wykazano jednocześnie, że sfingolipidy zawarte w pożywieniu mogą przeciwdziałać rakowi okrężnicy oraz rodzinnej polipozie gruczołakowatej [20].

Innym celem w próbach pokonania oporności komórek nowotworowych na apoptozę jest hamowanie aktywności czynnika jądrowego  $\kappa$ B. Stwierdzono na przykład, że zahamowanie aktywności NF- $\kappa$ B wywołane disulfiramem zwiększało skuteczność terapii 5-fluorouracylem w przypadku linii komórkowej ludzkiego nowotworu okrężniczo-odbytniczego [122]. Należy podkreślić, że w hamowaniu aktywności NF- $\kappa$ B, podejmuje się różne strategie działania, między innymi: i) blokowanie degradacji proteasomów I $\kappa$ B stosując inhibitory proteasomów, ii) blokowanie fosforylacji I $\kappa$ B poprzez działanie np. niesteroidowych środków przeciwzapalnych, trójtlenku arsenu oraz tlenku azotu, iii) hamowanie translokacji NF- $\kappa$ B do jądra, iv) hamowanie wiązania NF- $\kappa$ B z DNA, v) stosowanie związków o działaniu antyutleniającym jak kurkumina, glutation oraz witamina C, vi) modyfikacje białek uczestniczące w szlaku aktywacji NF- $\kappa$ B, vii) hamowanie NF- $\kappa$ B poprzez zwiększanie ekspresji genu I $\kappa$ B wprowadzonego z uży-

ciem wektorów w postaci zmodyfikowanych adeno-wirusów [37].

### VI-1. Modulacja aktywności białek eksportujących odpowiedzialnych za wykształcanie oporności wielolekowej

Wiele badań nad pokonaniem problemu oporności wielolekowej komórek nowotworowych koncentruje się na poszukiwaniu specyficznych modulatorów białek eksportujących MDR. Do chwili obecnej poznano kilka grup związków, które wykazują aktywność w modulowaniu transportu aktywnego z udziałem glikoproteiny P, między innymi grupę blokerów kanałów wapniowych a wśród nich werapamil, immunosupresyjny cykliczny peptyd — cyklosporynę A, inhibitory kalmoduliny (np. trifluoroparazyna, tioridazyna), alkaloidy indolowe (np. chinina, rezerpina), fenotiazyny, chinidynę, diaryloimidazol OC144-093 i inne [123-129]. W literaturze znane są również modulatory funkcjonowania białka MRP1: m.in. analog leukotrienu LTD<sub>4</sub> — MK571, S-decyloglutation, inhibitor białkowej kinazy C — bisindolilomaleimid GF 109203X, analog pirydyny — PAK-104P, benzotiofen LY329146, antagonist receptoru leukotrienu LTC<sub>4</sub> — ONO-1078 oraz związek antyprogestatynowy RU486 [129-133].

Od kilku lat trwają badania z wykorzystaniem pochodnej cyklosporyny, PSC833 w przywracaniu apoptozy w komórkach nowotworowych o oporności wielolekowej [61, 134]. Bezombes i wsp. wykazali, że w obecności PSC833 dochodziło do przywracania apoptozy w komórkach KG1a poddanych działaniu czynnika martwicy nowotworu TNF- $\alpha$  [49]. Należy zaznaczyć, że wybrane do badań komórki KG1a charakteryzowały się wysoką opornością na TNF- $\alpha$ . Wydaje się, że działanie PSC833 może być dwojakie: 1) wpływ na zwiększenie puli zdolnych do hydrolizy sfingomielin w wewnętrznej warstwie błony cytoplazmatycznej oraz 2) przywrócenie stymulacji sfingomielinazy zależnej od TNF- $\alpha$ . Oba te mechanizmy prowadzą w konsekwencji do wejścia komórki na drogę apoptozy [61].

Wykazano także zdolność chininy i jej analogów, znanych modulatorów aktywności glikoproteiny P, do „odwracania” oporności wielolekowej komórek nowotworowych. Stwierdzono również zdolność analogu chininy, cinchoniny do przywracania apoptozy w komórkach białaczki mysiej P388 [57]. Wykazano jednocześnie, że podawanie komórkom 10  $\mu$ M cinchoniny zwiększało cytotoksyczność doksorubicyny wobec linii odpornej na tę antracyklinę,

natomiast nie wywoływało wzrostu aktywności doksorubicyny w stosunku do linii wrażliwej [57].

Ponieważ wykazano istotną rolę kinazy białkowej C (PKC) w fosforylacji glikoproteiny P, co jest niezbędne dla jej zdolności do aktywnego eksportu leków z komórek nowotworowych, wskazuje się również na istotną rolę terapii z wykorzystaniem antysensownych oligonukleotydów hamujących ekspresję genu kodującego PKC jako szansy na przywracanie apoptozy w komórkach opornych [118].

## VII. Podsumowanie

Aby opracować skuteczną metodę przywracania aktywności leków przeciwnowotworowych w stosunku do komórek nowotworowych opornych na ich działanie należy gruntownie poznać mechanizmy hamowania apoptozy w tych komórkach. Ze względu na różnorodność szlaków prowadzących finalnie do programowanej śmierci komórki wydaje się, że najlepsze efekty mogą dać próby stosowania terapii łączonych polegających na jednoczesnym podawaniu kilku czynników wpływających na różne etapy procesu apoptozy.

Obok prac mających na celu przywrócenie aktywności ważnych klinicznie leków przeciwnowotworowych poprzez przywrócenie zdolności komórek nowotworowych do wejścia na drogę apoptozy, równolegle trwają również badania nad opracowaniem nowych leków przeciwnowotworowych zachowujących wysoką aktywność w stosunku do komórek opornych [135-138].

*Artykuł otrzymano 19 kwietnia 2004*

*Zaakceptowano do druku 26 sierpnia 2004*

## Piśmiennictwo

1. Orzechowska-Juzwenko K (2000) W: Orzechowska-Juzwenko K (red) *Zarys chemioterapii nowotworów narządowych i układowych*. Volumed, Wrocław, str. 1-11
2. Tarasiuk J (1999) *Zeszyty Naukowe Politechniki Gdańskiej*, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk
3. Grzelakowska-Sztabert B (1989) *Post Biochem* 35: 513-541
4. Wang L G, Liu X M, Kreis W, Budman D R (1999) *Cancer Chemother Pharmacol* 44: 355-361
5. Krishan A (2002) *Met Cell Sci* 24: 55-60
6. Orzechowska-Juzwenko K (2000) W: Orzechowska-Juzwenko K (red) *Zarys chemioterapii nowotworów narządowych i układowych*. Volumed, Wrocław, str. 13-73
7. Li T-K, Liu L F (2001) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 53-77
8. Bozko P, Larsen A K, Raymond E, Skladanowski A (2002) *Acta Biochim Polon* 49: 109-119
9. Rzepecki R, Szmidziński R, Szopa J (1991) *Post Biochem* 37: 18-23
10. Sikora E (1994) *Post Biochem* 40: 150-160
11. Sikora E (1996) *Post Biochem* 42: 108-113
12. Grzelakowska-Sztabert B (1998) *Post Biochem* 44: 8-21

13. Bartosz G (1998) *Post Biochem* 44: 22-31
14. Widlak P (1998) *Post Biochem* 44: 252-254
15. Gradzka I (2000) *Post Biochem* 46: 2-16
16. Widlak P (1998) *Post Biochem* 44: 252-254
17. Bielak-Żmijewska A (2003) *Kosmos* 52: 157-171
18. Jaattela M, Tschopp J (2003) *Nature Immunology* 4: 416-423
19. Yin F, Shi Y Q, Zhao W P, Xiao B, Miao J Y, Fan D M (2000) *World J Gastroenterol* 6: 664-670
20. Ogretmen B, Hannun Y A (2001) *Drug Resist Update* 4: 368-377
21. Frankfurt O S, Krishan A (2003) *J Biomol Screen* 8: 185-190
22. Frankfurt O S, Krishan A (2003) *Anti-Cancer Drug* 14: 555-561
23. Krippner A, Matsuno-Yagi A, Gottlieb R A, Babior B M (1996) *J Biol Chem* 271: 21629-21636
24. Widlak P (2000) *Acta Biochim Polon* 47: 1037-1044
25. Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Garrard W T, Wang X (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8461-8466
26. Ding Z, Tang S-C, Weerasinghe P, Yang X, Pater A, Liepins A (2002) *Biochem Pharmacol* 63:1415-1421
27. Slee E A, Harte M T, Kluck R M, Wolf B B, Casiano C A, Newmeyer D D, Wang H G, Reed J C, Nicholson D W, Alnemri E S, Green D R, Martin S J (1999) *J Cell Biol* 144: 281-292
28. Ding Z, Zhou J Y, Wei W Z, Baker V V, Wu G S (2002) *Oncogene* 21: 4530-4538
29. Ruefli A A, Smyth M J, Johnstone R W (2000) *Blood* 95: 2378-2385
30. Johnstone R W, Cretney E, Smyth M J (1999) *Blood* 93: 1075-1085
31. Chen Q, Gong B, Mahmoud-Ahmed A S, Zhou A, Hsi E D, Hussein M, Almasan A (2001) *Blood* 98: 2183-2192
32. Sellers W R, Fisher D E (1999) *J Clin Invest* 104:1655-1661
33. Lee Y J, Chen J C, Amoscato A A, Bennouna J, Spitz D R, Suntharalingam M, Rhee J G (2000) *J Cell Science* 114: 677-684
34. Epand R F, Martinou J-C, Fornallaz-Mulhauser M, Huges D W (2002) *J Biol Chem* 277: 32632-32639
35. Martinou J-C, Desagher S, Antonsson B (2000) *Nat Cell Biol* 2: E41-E43
36. Gross A, McDonnell J M, Korsmeyer S J (1999) *Gene Dev* 13: 1899-1911
37. Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward R L, Kohn K W (2004) *Oncogene* 23: 2934-2949
38. Puthalakath H, Strasser A (2002) *Cell Death Differ* 9: 505-512
39. Bouillet P, Strasser A (2002) *J Cell Sci* 115: 1567-1574
40. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y (2002) *J Biol Chem* 277: 34287-34294
41. Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou J C (2000) *Biochem J* 345: 271-278
42. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou J C (2001) *J Biol Chem* 276: 11615-11623
43. Vander Heiden M G, Thompson C B (1999) *Nat Cell Biol* 1: E209-E216
44. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999) *Nature* 399: 483-487
45. Petit P X, Gendron M-C, Schrantz N, Metivier D, Kroemer G, Maciorowska Z, Sureau F, Koester S (2001) *Biochem J* 353: 357-367
46. Heiskanen K M, Bhat M B, Wang H-W, Ma J, Nieminen A-L (1999) *J Biol Chem* 274: 5654-5658
47. Goldstein J C, Waterhouse N J, Juin P, Evan G I, Green D R (2000) *Nat Cell Biol* 2: 156-162
48. Efferth T, Fabry U, Osieka R (2001) *Anticancer Res* 21: 2777-2784
49. Carew J S, Huang P (2002) *Mol Cancer* 1: 1-13
50. Susin S A, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri K F, Irinopoulou T, Prevost M-C, Brothers G, Mak T W, Penninger J, Earnshaw W C, Kroemer G (2000) *J Exp Med* 192: 571-579
51. Minko T, Dharap S S, Fabbriatore A T (2003) *Cancer Detect Prevent* 27: 193-202
52. Smyth M J, Krasovskis E, Sutton V R, Johnstone R W (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7024-7029
53. Wu G S, Ding Z (2002) *Oncogene* 21: 1-8
54. Nutt L K, Pataer A, Pahler J, Fang B, Roth J, McConkey D J, Swisher S G (2002) *J Biol Chem* 277: 9219-9225
55. Meisenholder G W, Martin S J, Green D R, Nordberg J, Babior B M, Gottlieb R A (1996) *J Biol Chem* 271: 16260-16262
56. Stennicke H R, Salvesen G S (1997) *J Biol Chem* 272: 25719-25723
57. Furusawa S, Nakano S, Wu J, Sakaguchi S, Takayanagi M, Sasaki K-I, Satoh S (2001) *J Pharm Pharmacol* 53: 1029-1039
58. Stahnke K, Fulda S, Friesen C, Strauss G, Debatin K-M (2001) *Blood* 98: 3066-3073
59. Fulda S, Scaffidi C, Pietsch T, Krammer P, H, Peter M E, Debatin K-M (1998) *Cell Death Differ* 5: 884-893
60. Gottlieb R A, Nordberg J, Skowronski E, Babior B M (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 654-658
61. Bezombes C, Maestre N, Laurent J, Levade T, Bettaleb A, Jaffrezou J-P (1998) *FASEB J* 12: 101-109
62. Montes L R, Ruiz-Arguello M B, Goni F M, Alonso A (2002) *J Biol Chem* 277: 11788-11794
63. Wang Y M, Seibenhener M L, Vandenplas M L, Wooten M W (1999) *J Neurosci Res* 55: 293-302
64. Chalfant C E, Ogretmen B, Galadari S, Kroesen B J, Pettus B J, Hannun Y A (2001) *J Biol Chem* 276: 44848-44855
65. Chatterjee S (1999) *Chem Phys Lipids* 102: 79-96
66. Cuello M, Ettenberg S A, Nau M M, Lipkowitz S (2001) *Gynecol Oncol* 81: 380-390
67. MacLachlan T K, Deiry W S (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9492-9497
68. Slee E A, O'Connor D J, Lu X (2004) *Oncogene* 23: 2809-2818
69. Gasco M, Crook T (2003) *Drug Resist Updat* 6: 323-328
70. Nakamura Y (2004) *Cancer Sci* 95: 7-11
71. Fridman J S, Lowe S W (2003) *Oncogene* 22: 9030-9040
72. Boyapati A, Kanbe E, Zhang D E (2004) *Acta Haematol* 111: 100-106
73. Krishan A, Fitz C M, Andritsch I (1997) *Cytometry* 29: 279-285
74. Gottesman M M, Pastan I (1993) *Ann Rev Biochem* 62: 385-427
75. Sugawara I, Ohkochi E, Hamada H (1988) *Jpn J Cancer Res* 79: 1101-1110
76. Alton P A (1993) *Br J Haematol* 85: 241-245
77. Dingemans A M C, Pinedo H M, Giaccone G (1998) *Biochim Biophys Acta* 1400: 275-288
78. Fox M, Roberts J J (1987) *Cancer Metast Rev* 6: 261
79. Tew K D (1994) *Cancer Res* 54: 4313-4320
80. Smyth M J, Krasovskis E, Sutton V R, Johnstone R W (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7024-7029
81. Krishan A, Arya P (2002) *Hematol Oncol Clin N Am* 16: 357-372
82. Biedler J L, Riehm H (1970) *Cancer Res* 30: 1174-1184
83. Chaudhary P M, Roninson I B (1993) *J Natl Cancer Inst* 85: 632-639
84. Bradley G, Ling V (1994) *Cancer Metastasis Rev* 13: 223
85. Nielsen D, Skovsgaard T (1992) *Biochim Biophys Acta* 1139: 169, 1992-1983
86. Zaman G J R, Versantvoort C H M, Smit J J M, Eijdens E W H M, de Haas M, Smith A J, Broxterman H J, Mulder N H, de Vries E G E, Bass F, Borst P (1993) *Cancer Res* 53: 1747-1750
87. Loc D W, Deeley R G, Cole S P C (1996) *Eur J Cancer* 32: 945-957

88. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D (1996) *Cancer Res* 56: 988-994
89. Pulaski L, Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Keppler D (1996) *Eur J Biochem* 241: 644-648
90. Vander Kolk DM, de Vries E G E, Muller M, Vellenga E (2002) *Leukemia Lymphoma* 43: 685-701
91. Pearce H L, Safa A R, Bach N J, Winter M A, Citrain M C, Beck W T (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5128-5132
92. Shapiro A B, Ling V (1997) *Eur J Biochem* 250: 130-137
93. Scheffer G L, Wijngaard P L J, Fleus M J, Izquierdo M A, Slovak M L, Pinedo H M, Meijer C J L, Clevers H C, Scheper R J (1995) *Nat Med* 1: 578-582
94. Liu Y Y, Han T Y, Giuliano A E, Cabot M C, (1999) *J Biol Chem* 274: 1140-1146
95. Meijerink J P, Mensink E J, Wang K, Sedlak T W, Sloetjes A W, De Witte T, Waksman G, Korsmeyer S J (1998) *Blood* 91: 2991-2997
96. Kondo S, Shinomura Y, Miyazaki Y, Kiyohara T, Tsutsui S, Kitamura S, Nagasawa Y, Nakahara M, Kanayama S, Matsuzawa Y (2000) *Cancer Res* 60: 4328-4330
97. Notarbartolo M, Cervello M, Dusonchet L, Cusimano A, D'Allessandro N (2002) *Cancer Lett* 180: 91-101
98. Roy N, Deveraux Q L, Takahashi R, Salvesen G S, Reed J C (1997) *Embo J* 16: 6914-6925
99. Kim Y, Suh N, Sporn M, Reed J C (2002) *J Biol Chem* 277: 22320-22329
100. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin S A, Maisse C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger J M, Garrido C, Kroemer G (2001) *Nat Cell Biol* 3: 839-843
101. Pahl H L (1999) *Oncogene* 18: 6853-6866
102. Senchenkov A, Litvak D A, Cabot M C (2001) *J Natl Cancer Inst* 93: 347-357
103. Sietsma H, Veldman R J, Kok J W (2001) *J Membrane Biol* 181: 153-162
104. Pallis M, Russell N (2000) *Blood* 95: 2897-2904
105. Gollapudi S, Gupta S (2001) *J Clin Immunol* 21: 420-430
106. Kuczynski A, Etievant C, Perrin D, Chansard N, Duflos A, Hill B T (2002) *Br J Cancer* 86: 143-150
107. Ogretmen B, Hannun Y A (2001) *Drug Resist Update* 4: 368-377
108. Vander Kalk DM, de Vries E G E, Muller M, Vellenga E (2002) *Leukemia Lymphoma* 43: 685-701
109. Gollapudi S, Gupta S (2001) *J Clin Immunol* 21: 420-430
110. Drach J, Gsur A, Hamilton G, Zhao S, Angerler J, Fiegl M, Zojer N, Raderer M, Haberl I, Andreff M, Huber H (1996) *Blood* 88: 1747-1754
111. Johnstone R W, Cretney E, Smyth M J (1999) *Blood* 93: 1075-1085
112. Smyth M J, Krasovskis E, Sutton V R, Johnstone R W (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7024-7029
113. Stennicke H R, Salvesen G S (1997) *J Biol Chem* 272: 25719-25723
114. Dirsch V M, Stuppner H, Vollmar A M (2001) *Cancer Res* 61: 5817-5823
115. Lopes E C, Garcia M G, Vellon L, Alvarez E, Hajos S E (2001) *Leukemia Lymphoma* 42: 775-787
116. Dirsch V M, Gerbes A L, Vollmar A M (1998) *Mol Pharmacol* 53: 402-407
117. Dirsch V M, Antlsperger D S M, Hentze H, Vollmar A M (2002) *Leukemia* 16: 74-83
118. O'Brian K A, Ward N E, Steward J R, Chu F (2001) *Cancer Metast Rev* 20: 95-100
119. Maurer B J, Melton L, Billups C, Cabot M C, Reynolds C P (2000) *J Natl Cancer Inst* 92: 1897-1909
120. Metha S, Blackinton D, Omar I, Kouttab N, Myrick D, Klostergaard J, Wanebo H (2000) *Cancer Chemother Pharmacol* 46: 85-92
121. Mordak D E, Lew W, Goldenberg D M, Blumenthal R (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 268: 603-606
122. Ling M T, Wang X, Ouyang X S, Xu K, Tsao S W, Wong Y C (2003) *Oncogene* 22: 4498-4508
123. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y (1981) *Cancer Res* 41: 1967-1972
124. Akiyama S, Shiraishi N, Kuratomi Y, Nakagawa M, Kuwano M (1986) *J Natl Cancer Inst* 76: 839-844
125. Ganapathi R, Grabowski D (1983) *Cancer Res* 43: 3696-3699
126. Ganapathi R, Grabowski D, Turinic R, Valenzuela R (1984) *Eur J Cancer Clin Oncol* 20: 799-806
127. Twentyman P R (1992) *Biochem Pharmacol* 43: 109-117
128. Newman M J, Rodarte J C, Benbatoul K D, Romano S J, Zhang C, Krane S, Moran E J, Uyeda R T, Dixon R, Guns A S, Mayer L D (2000) *Cancer Res* 60: 2964-2972
129. Dale I L, Tuffley W, Callaghan R, Holmes J A, Martin K, Luscombe M, Mistry P, Ryder H, Stewart A J, Charlton P, Twentyman P R, Bevan P (1988) *Br J Cancer* 78: 885-892
130. Sumizawa T, Chen Z-S, Chuman Y, Seto K, Furukawa T, Haraguchi M, Tani A, Shudo N, Akiyama S I (1997) *Mol Pharmacol* 51: 399-405
131. Norman B H, Dantzig A H, Kroin J S, Law K L, Tabas L B, Shepard R L, Palkowitz A D, Hanser K L, Winter M A, Sluka J P, Starling J J (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9: 3381-3386
132. Nakano R, Oka M, Nakamura T, Fukuda M, Kawabata S, Terashi K, Tsukamoto K, Noguchi Y, Soda H, Kohno S (1998) *Biochem Biophys Res Commun* 251: 307-312
133. Payen L, Delugin L, Courtois A, Trinquart Y, Guillouzo A, Fardel O (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 258: 513-518
134. Thevenod F, Friedmann J M, Katsen A D, Hauser I A (2000) *J Biol Chem* 275: 1887-1896
135. Kanzawa F, Nishio K, Ishida T, Fukuda M, Kurokawa H, Fukumoto H, Nomoto Y, Fukuoka K, Bojanowski K, Saijo N (1997) *Br J Cancer* 76(5): 571-81
136. Faderl S, Estrov Z, Kantarjian H M, Harris D, Van Q, Fokt I, Przewlocka T, Godlewski C, Woynarowski J M, Priebe W (2001) *Anticancer Res* 21: 3777-3784
137. Tarasiuk J, Stefanska B, Plodzich I, Tkaczyk-Gobis K, Seksek O, Martelli S, Garnier-Suillerot A, Borowski E (2002) *Br J Pharmacol* 135: 1513-1523
138. Tarasiuk J (2000) W: Koroniak H, Barciszewski J (red) *Na pograniczu chemii i biologii tom IV*. Wydawnictwo Naukowe UAM, str. 255-296

# Apolipoproteina E — rola polimorfizmu w patogenezie licznych chorób

## Apolipoprotein E — the role of polymorphism in pathogenesis of many diseases

ANNA BALCERZYK<sup>1</sup>, IWONA ŻAK<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Występowanie i podstawowe funkcje apolipoproteiny E
- III. Budowa i polimorfizm apo E — znaczenie funkcjonalne
- IV. Związek apo E z zaburzeniami patologicznymi
- V. Mechanizmy działania apo E — znaczenie w patogenezie chorób
  - V-1. Wpływ apo E na transport i metabolizm lipidów
  - V-2. Związek apo E ze stresem oksydacyjnym
  - V-3. Wpływ apo E na proces apoptozy
  - V-4. Wpływ apo E na modulowanie odpowiedzi zapalnej
  - V-5. Apo E a funkcja płytek krwi
- V. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Localization and basic functions of apolipoprotein E
- III. The structure and polymorphism of apo E — its functional significance
- IV. Apo E and its relation to pathological disorders
- V. Mechanisms of apo E action — relation to pathogenesis of diseases
  - V-1. The influence of apo E on transport and metabolism of lipids
  - V-2. The relation between apo E and oxidative stress
  - V-3. The influence of apo E on the process of apoptosis
  - V-4. The influence of apo E on the modulation of inflammation
  - V-5. Apo E and platelet function
- V. Summary

**Wykaz stosowanych skrótów:** AD — choroba Alzheimera; ADP — adenozyndifosforan; Apo B100 — apolipoproteina B100; Apo E — apolipoproteina E; *APOE* — gen kodujący apolipoproteinę E; cGMP — cykliczny 3',5'-guanozynomonofosforan; ChNS — choroba niedokrwienna serca; HDL — lipoproteiny o dużej gęstości; HDL-E — HDL bogate w apo E; HNE — 4-hydroksynonenal; IDL — lipoproteiny o pośredniej gęstości; IL-6 — interleukina 6; LCAT — acylotransferaza lecytyna-cholesterol; LDL — lipoproteiny o małej gęstości; LRP — białko pokrewne receptorowi LDL (ang. *LDL-receptor related protein*); TNF $\alpha$  — czynnik martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor*); VLDL — lipoproteiny o bardzo małej gęstości

### I. Wstęp

Apolipoproteina E (apo E) jest białkowym składnikiem licznych lipoprotein osocza (chylomikronów, VLDL-i, remnantów chylomikronów, IDL-i, HDL-i) oraz obecna jest w płynie mózgowo-rdzeniowym. Pełni ważną rolę w regulacji metabolizmu lipidów

osocza. Główna jej funkcja fizjologiczna polega na umożliwianiu „wypływu” nadmiaru cholesterolu z wnętrza komórek obwodowych i warunkowaniu wprowadzania niektórych lipoprotein (szczególnie remnantów chylomikronów i VLDL-i) do wnętrza komórek.

Funkcje apo E wykraczają jednak znacznie poza jej udział w regulacji metabolizmu lipidów. Liczne prace dowodzą, że apo E jest zaangażowana w modulowanie odpowiedzi zapalnej, regulację funkcji płytek krwi, zjawisko apoptozy i stresu oksydacyjnego. Tak szeroki wpływ apo E na procesy zachodzące w organizmie może wyjaśniać jej związek z licznymi zaburzeniami, takimi jak: choroba Alzheimera (AD), miażdżyca, choroba niedokrwienna serca i mózgu, niektóre typy nowotworów czy powstawanie kamieni żółciowych [1, 2]. Poznanie szczegółów roli apo E może pomóc w zrozumieniu złożonej patogenetyki tych chorób.

### II. Występowanie i podstawowe funkcje apo E

Głównym miejscem syntezy apo E są komórki wątroby, gdzie powstaje większość apoprotein E obecnych w osoczu (66-75%). Mniejsze ilości apo E

<sup>1</sup>Mgr, <sup>2</sup>dr hab, n. med.; Katedra i Zakład Biochemii i Genetyki Medycznej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice; e-mail: abalcerzyk@slam.katowice.pl, izak@slam.katowice.pl

syntetyzowane są poza wątrobą, w wielu różnych komórkach obwodowych, głównie makrofagach, astrocytach, ale również w płucach, nerkach, śledzionie, mięśniach.

Stężenie apolipoproteiny E w osoczu osób zdrowych mieści się w granicach 0.016-0.17 g/l. W niektórych stanach patologicznych, np. w niedoczynności tarczycy, hiperlipoproteinemii typu III, przy niedoborze acylotransferazy lecytyna-cholesterol (LCAT), stężenie apo E może być podwyższone [3].

Podstawowa funkcja apo E, polegająca na usuwaniu remnantów lipoprotein z osocza realizowana jest dzięki zdolności apoE do wiązania się z receptorem LDL oraz receptorem LRP (ang. *LDL-receptor related protein*). Apo E jest również ligandem dla obecnych na powierzchni komórek proteoglikanów heparanosiarczanowych. Remnanty lipoprotein zawierające apo E oddziałując bezpośrednio z receptorem LDL mogą być pobierane przez komórki na drodze klasycznej endocytozy zależnej od receptora. Alternatywny szlak internalizacji remnantów przebiega z udziałem proteoglikanów powierzchni komórkowej oraz receptora LRP [4]. Znaczna ilość pobieranej przez hepatocyty apo E nie ulega degradacji wewnątrz komórki, ale jest powtórnie wydzielana. Prawdopodobnie apo E pełni w komórce znaczącą rolę w metabolizmie triglicerydów i estrów cholesterolu, gromadzeniu lipidów i tworzeniu cząstek lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL) [5, 6]. Apo E jest również ligandem dla receptora SR-BI (ang. *scavenger receptor class B type I*), będącego receptorem HDL, receptora VLDL (w komórkach serca, mięśni szkieletowych, tkance tłuszczowej) oraz dla receptora 2 apo E obecnego na powierzchni komórek mózgu [7, 8, 9]. W mózgu i płynie mózgowo-rdzeniowym brak jest głównych osoczowych transporterów lipidów endogennych, lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), bardzo niskie jest też stężenie apoprotein B 100. Przypuszczalnie apoE, która jest podstawową apoproteiną płynu mózgowo-rdzeniowego, pełni funkcję białkowego transportera lipidów na terenie mózgu, podobnie jak to czyni apo B100 w osoczu [10].

### III. Budowa i polimorfizm apo E — znaczenie funkcjonalne

Apolipoproteina E jest glikoproteiną, której bogaty w reszty argininy liniowy łańcuch polipeptydowy utworzony jest przez 299 reszt aminokwasowych, a składnik cukrowy może mieć zmienną zawartość reszt kwasów sjałowych. Apo E występuje powszechnie w trzech izoformach, E2, E3, E4, które

różnią się resztami aminokwasowymi w pozycjach 112 i 158 łańcucha polipeptydowego. Izofорма E3 charakteryzuje się obecnością reszty cysteiny w pozycji 112 i reszty argininy w pozycji 158, izofорма E4 zawiera reszty argininy zarówno w pozycji 112 jak i 158, natomiast izofорма apo E2 w obu tych pozycjach łańcucha polipeptydowego ma reszty cysteiny [11].

Gen *APOE* zlokalizowany jest w chromosomie 19q13.2, jego allele wielokrotne ε 2, 3, 4 kodują poszczególne izoformy, odpowiednio apo E2, apo E3 i apo E4. Obecność trzech alleli genu *APOE* warunkuje występowanie sześciu genotypów w populacji ludzkiej, w tym trzech homozygotycznych (2/2; 3/3; 4/4) i trzech heterozygotycznych (2/3; 2/4; 3/4). W populacji ludzkiej dominuje genotyp homozygotyczny 3/3 (około 60%), natomiast heterozygoty apo 3/4 stanowią około 20%, a apo 3/2 około 13%. Pozostałe genotypy homozygotyczne i heterozygotyczne stanowią mniejszość, apo 4/4 2-3%, apo 2/2 1%, apo 2/4 1-2% [12]. Poszczególne izoformy apo E nie występują równomiernie wśród ludności świata. Izofорма E4 i E2 częściej występują w Afryce, a stosunkowo rzadko w Azji [13]. W Europie izofорма E4 występuje częściej u ludności krajów północnych, w przeciwieństwie do krajów rejonu basenu Morza Śródziemnego, gdzie występowanie jej jest rzadkie [14].

Apo E zawiera dwie domeny strukturalne, domenę N-kończową polipeptydu o masie 22 kDa i domenę C-kończową polipeptydu o masie 10 kDa. Domeny te są połączone krótkim regionem wrażliwym na proteolizę [15]. Domena N-kończowa ma strukturę globularną utworzoną przez 4 amfipatyczne helisy zorientowane powierzchnią hydrofobową do wnętrza. Domena ta uczestniczy w wiązaniu apo E z receptorem dla LDL. Bezpośrednie miejsce interakcji zlokalizowane jest w helisie czwartej, w rejonie reszt aminokwasowych zajmujących pozycje od 136 do 150, który jest bogaty w aminokwasy zasadowe. Chemiczne modyfikacje reszt aminokwasów zasadowych prowadzą do osłabienia zdolności interakcji apo E z receptorem [16]. Miejsce wiązania receptora LDL pokrywa się z regionem wiązania proteoglikanów. W odróżnieniu jednak od receptora LDL, proteoglikany mają także swoje miejsce wiązania w domenie C-kończowej polipeptydu [17]. Poszczególne izoformy apo E różnią się powinowactwem do receptorów rodziny LDL. Izofорма E2 charakteryzuje się znacznie mniejszym powinowactwem niż izofорма E3. Mniej jednoznaczne są dane dotyczące powinowactwa apo E4. Wykazano, że cząsteczki VLDL pochodzące od osób o fenotypie E4E4 mają większe powinowactwo do receptora LDL na hepatocytach w porównaniu z

cząsteczkami pochodzącymi od osób E3E3 [18]. Jednak może to być związane zarówno z większym powinowactwem izoformy E4 do receptora, jak i z różną zawartością apolipoproteiny w cząsteczkach VLDL, w zależności od fenotypu. Zmniejszone powinowactwo izoformy E2 do receptora LDL jest wynikiem zmian w oddziaływaniach pomiędzy resztami aminokwasowymi. W izoformie E3 pomiędzy Arg<sup>158</sup> a Asp<sup>154</sup> występują oddziaływania jonowe, których brak w izoformie E2 ze względu na zastąpienie reszty argininy przez resztę cysteiny w pozycji 158. W konsekwencji Asp<sup>154</sup> apo E2 oddziałuje jonowo z Arg<sup>150</sup> znajdującą się w obrębie miejsca wiązania receptora. Oddziaływanie to powoduje zmianę przestrzennego ułożenia reszty Arg<sup>150</sup>, zmieniając równocześnie właściwości regionu wiążącego receptor [19].

Sama domena N-końcowa polipeptydu nie jest wystarczająca do funkcjonalnego oddziaływania tej apolipoproteiny z receptorem LDL. Wymagane są zmiany konformacyjne apoproteiny E indukowane przez składnik lipidowy, które przyczyniają się do ujawnienia funkcji liganda dla receptorów lipoprotein w procesie endocytozy zależnej od receptorów. Podstawowe miejsca wiązania lipidów znajdują się w domenie C-końcowej, w rejonie reszt aminokwasowych zajmujących pozycje 244-272 [20]. Wiązanie lipidów przez apo E przebiega prawdopodobnie dwuetapowo. Początkowo apo E oddziałuje z powierzchnią lipidów poprzez miejsca na helisach domeny C-końcowej. Następnym etapem jest otwarcie cztero-helikalnej struktury domeny N-końcowej i przyjęcie konformacji, która jest rozpoznawana przez receptor.

Poszczególne izoformy apo E różnią się nie tylko powinowactwem do receptorów, ale także powinowactwem do lipidów. Związane jest to przede wszystkim z obecnością lub brakiem argininy w pozycji 112. W izoformie E4 stwierdzono oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy Arg<sup>61</sup> w domenie N-końcowej, a Glu<sup>255</sup> w domenie C-końcowej. Oddziaływanie to wynika z wpływu Arg<sup>112</sup> na zmianę ułożenia łańcucha bocznego Arg<sup>61</sup>. W izoformach E3 i E2 pozycję 112 zajmuje cysteina, a łańcuch boczny Arg<sup>61</sup> ułożony jest w taki sposób, który uniemożliwia oddziaływanie z Glu<sup>255</sup>. Oddziaływanie pomiędzy domenami charakterystyczne dla izoformy E4, a także mniej zorganizowana struktura domeny C-końcowej z bardziej eksponowaną powierzchnią hydrofobową decydują o zwiększonym powinowactwie tej izoformy do lipidów i preferencyjnym wiązaniu z VLDL. Niższe powinowactwo do lipidów izoform

E2 i E3 wpływa na ich większe powinowactwo do HDL niż do VLDL [20].

#### IV. Związek apo E z zaburzeniami patologicznymi

Obecność allelu  $\epsilon 4$  jest uznanym czynnikiem ryzyka choroby Alzheimera (ang. *Alzheimer disease, AD*) [21 - 23]. Obecność przynajmniej jednego allelu  $\epsilon 4$  stwierdzono w 80% przypadków rodzinnej i 64% sporadycznej choroby Alzheimera, podczas gdy wśród ludzi zdrowych nosicielami  $\epsilon 4$  jest ok. 31% osób. Szacuje się, że u osób homozygotycznych  $\epsilon 4\epsilon 4$  objawy choroby pojawiają się średnio o 16 lat wcześniej niż u osób niebędących nosicielami tego allelu [24]. Zwiększoną częstość allelu  $\epsilon 4$  stwierdzono również u osób chorych na inne choroby neurodegeneracyjne m.in. AD z ciałami Lewy'ego, demencję mieszaną oraz łagodne zaburzenia poznawcze [25-27].

Liczne doniesienia dotyczą także związku allelu  $\epsilon 4$  z miażdżycą i chorobą niedokrwienną serca (ChNS). W grupie osób będących nosicielami allelu  $\epsilon 4$  obserwuje się zwiększoną ilość blaszek miażdżycowych na powierzchni ścian tętnic wieńcowych w porównaniu z homozygotami  $\epsilon 3\epsilon 3$  [28]. Genotyp *APOE4* przyspiesza również rozwój miażdżycy tętnic szyjnych [29]. Liczba nosicieli allelu  $\epsilon 4$  wśród chorych na ChNS jest średnio o 26% wyższa w porównaniu z grupą osób zdrowych. [30]. Obecność allelu  $\epsilon 4$  jest ponadto związana z obniżoną przeżywalnością po zawale mięśnia sercowego, a jednocześnie ze zwiększoną podatnością na prewencyjne leczenie niektórymi lekami [31]. Obserwuje się również częstsze występowanie allelu  $\epsilon 4$  wśród osób z rodzinną historią ChNS [32]. W Europie rozpowszechnienie allelu  $\epsilon 4$  jest wyższe w krajach północnych, gdzie częściej występują również choroby sercowo-naczyniowe, natomiast niższe w krajach południowych, gdzie występowanie ChNS jest rzadsze [14]. W niektórych populacjach obserwuje się niższą częstość allelu  $\epsilon 2$  w grupie chorych z ChNS w porównaniu z grupą osób zdrowych, może to sugerować jego protekcyjne działanie [33].

Uważa się, że z nosicielstwem allelu  $\epsilon 2$  związane są również predyspozycje do osiągania zaawansowanego wieku, a polimorfizm genu *APOE* jest prawdopodobnie podstawowym czynnikiem genetycznym związanym z długowiecznością [34].

Obecność allelu  $\epsilon 4$  jest natomiast czynnikiem promującym tworzenie kamieni żółciowych [35], a jego protekcyjne działanie obserwowano w przypadku

nowotworów i gruczolaków okrężnicy proksymalnej [36] oraz nefropatii cukrzycowej i innych chorób nerek [37, 38].

Apo E jest podstawową apolipoproteiną w mózgu, gdzie pełni ważne funkcje w transporcie lipidów i utrzymaniu homeostazy. Prawdopodobnie bierze udział w oczyszczaniu ognisk niedokrwienia z produktów martwiczych [39]. W wielu pracach stwierdzono związek nosicielstwa allelu  $\epsilon 4$  z udarem niedokrwinnym mózgu, jednak związek ten nie jest tak silny jak w przypadku choroby niedokrwiennej serca [40]. Niektórzy autorzy sugerują ponadto, że allel  $\epsilon 4$  może mieć korzystny wpływ na przeżywalność po udarze niedokrwinnym mózgu [41].

## V. Mechanizmy działania apo E — znaczenie w patogenezie chorób

### V-1. Wpływ apoE na transport i metabolizm lipidów

W zdrowym organizmie chylomikrony i VLDL po przekształceniu w bogate w cholesterol cząstki resztkowe są szybko usuwane z krążenia do wątroby na drodze endocytozy zależnej od receptorów, z udziałem receptorów LDL, LRP i proteoglikanów siarczanoheparanowych. U chorych z rodzinną dysbetalipoproteinemią (hyperlipoproteinemią typu III) obserwuje się podwyższony poziom cholesterolu i triglicerydów na skutek osłabionego usuwania remnantów chylomikronów i VLDL. Genetyczną przyczyną dysbetalipoproteinemii jest obecność allelu  $\epsilon 2$  w stanie homozygotycznym, rzadziej choroba ma związek z występowaniem innych mutacyjnych form apo E. Genotyp  $\epsilon 2\epsilon 2$  ma 91% chorych na dysbetalipoproteinemię rodzinną [42]. Jednak tylko ok. 20% osobników homozygotycznych pod względem  $\epsilon 2$  wykazuje objawy choroby [43]. Sugeruje to, że do rozwoju choroby niezbędne są również inne czynniki genetyczne lub środowiskowe np. dieta, otyłość, cukrzyca, poziom estrogenów. Większość nosicieli  $\epsilon 2$  charakteryzuje się niższym poziomem cholesterolu całkowitego i LDL od homozygot  $\epsilon 3\epsilon 3$ . U nosicieli allelu  $\epsilon 4$  obserwuje się wyższe stężenia cholesterolu całkowitego oraz LDL niż u osobników  $\epsilon 3\epsilon 3$ . Z obecnością zarówno allelu  $\epsilon 2$ , jak i  $\epsilon 4$ , związany jest ponadto wyższy poziom triglicerydów osocza w porównaniu do homozygot  $\epsilon 3\epsilon 3$  [44]. Wpływ polimorfizmu w genie *APOE* na poziom lipidów w osoczu wynika przede wszystkim z różnic w powinowactwie poszczególnych izoform do receptora LDL i LRP, które jest znacznie niższe dla izoformy E2 niż dla E3 i E4. Ze względu na słabe wiązanie się apo E2 z receptorem internalizacja remnantów chylomikronów

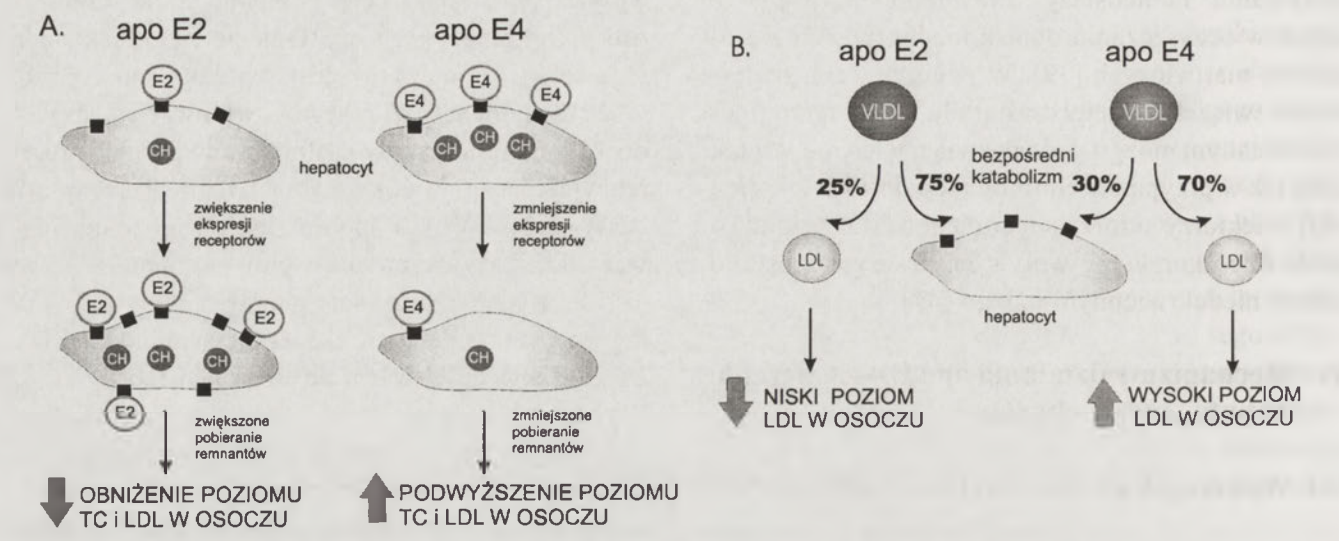
i VLDL zachodzi wolniej, w konsekwencji niski jest napływ cholesterolu do komórek wątroby. Prowadzić to może do zwiększenia ekspresji receptora LDL na powierzchni błon hepatocytów i przyspieszenia internalizacji cząstek LDL, w ten sposób wpływając na obniżenie poziomu cholesterolu w osoczu u homozygot  $\epsilon 2\epsilon 2$ . U nosicieli  $\epsilon 4$  usuwanie remnantów lipoprotein jest bardziej efektywne, może to wynikać z wyższego powinowactwa apo E4 do VLDL, podczas gdy izoformy apo E2 i E3 preferencyjnie łączą się z cząstkami HDL. Większe wysycenie cząstek VLDL apoproteiną E4 może decydować o efektywnym usuwaniu remnantów tych cząstek z osocza, wzroście poziomu cholesterolu w hepatocytach, obniżeniu ekspresji receptora dla LDL i w konsekwencji o wzroście poziomu LDL w osoczu (Ryc. 1A).

Niski poziom cholesterolu LDL u osobników z genotypem  $\epsilon 2\epsilon 2$  może również wynikać z wpływu izoformy E2 na proces lipolizy, prowadzący do przekształcenia VLDL w LDL. Osobniki homozygotyczne  $\epsilon 2\epsilon 2$  charakteryzują się zwiększonym bezpośrednim katabolizmem VLDL. U osobników tych tylko ok. 25% VLDL ulega przekształceniu do LDL, podczas gdy u osób  $\epsilon 3\epsilon 3$  ok. 50%, a u osób z genotypem  $\epsilon 4\epsilon 4$  aż 70% VLDL jest przekształcanych w LDL [45]. Wzmoczone przekształcanie VLDL w LDL u nosicieli  $\epsilon 4$  powoduje wzrost poziomu LDL, a zwiększenie jego stężenia w hepatocytach przyczynia się do obniżenia ekspresji receptora LDL na powierzchni hepatocytów i prowadzi do dalszej akumulacji cholesterolu LDL w osoczu krwi (Ryc. 1B).

Poza udziałem w regulacji usuwania remnantów lipoprotein z osocza, apo E odgrywa także znaczącą rolę w autokrynnym mechanizmie usuwania cholesterolu z makrofagów. Badania na myszach transgenicznych wykazały, że apo E syntetyzowana przez makrofagi ma znaczenie antymiażdżycowe, które jest uzależnione od izoformy [46]. Efekt ten ma być związany ze zdolnością apoE do stymulacji wpływu cholesterolu z makrofagów i zapobiegania w ten sposób powstawaniu komórek piankowatych [47]. Mechanizm, poprzez który endogenna ekspresja apo E umożliwia efektywny wpływ cholesterolu z komórek, związany jest z retencją apoprotein na powierzchni komórki w postaci związanej z proteoglikanami [48] lub receptorami LDL [49]. Metabolizm cholesterolu oraz apo E w makrofagach ludzkich różni się znacząco w zależności od fenotypu. Makrofagi pochodzące od osób o fenotypie E2E2 charakteryzują się najbardziej skutecznym wpływem cholesterolu, w porównaniu z makrofagami osób E3E3 i E4E4. Prawdopodobnie zjawisko to może być

związane ze zmniejszonym pobieraniem zwrotnym bogatych w cholesterol cząstek zawierających apo E2, na skutek zmniejszonego powinowactwa tej izoformy do receptorów. W makrofagach pochodzących od osób z fenotypem E4E4 obserwuje się zwiększone

loidowych (Aβ). Peptydy te oddziałują prawdopodobnie z komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych, czemu towarzyszy produkcja wolnych rodników nadtlenkowych, wpływających na zmiany w strukturze i funkcji endotelium [53]. Stwierdzono, że



Ryc. 1. Możliwy wpływ polimorfizmu apo E na poziom lipidów osocza: A, związany z niższym powinowactwem apo E2 do receptora LDL; B, związany ze zróżnicowanym katabolizmem VLDL (opis w tekście). ■ Receptor dla LDL; CH, cholesterol; E, remnant lipoprotein zawierające apo E.

wiązanie się apolipoproteiny E z proteoglikanami siarczanoheparanowymi na powierzchni komórki, może to świadczyć o zwiększonym pobieraniu zwrotnym cząstek zawierających apo E4. Konsekwencją tego zjawiska może być obserwowany najmniej efektywny wpływ cholesterolu z komórek pochodzących od osób o fenotypie E4E4 w porównaniu z E2E2 i E3E3. Różnica w skuteczności usuwania cholesterolu może wyjaśniać związek allelu ε4 z rozwojem procesów miażdżycowych [50].

V-2. Związek apo E ze stresem oksydacyjnym

Zgodnie z hipotezą Offermana i Medford'a [51] modyfikacja LDL do utlenionych LDL (oksyLDL) przez reaktywne związki tlenowe jest najważniejszym wydarzeniem, które inicjuje i propaguje procesy miażdżycowe. Promiażdżycowe działanie oksyLDL polega nie tylko na indukcji akumulacji cholesterolu w makrofagach, prowadzącej do powstawania komórek piankowatych, ale również wpływa na adhezję i migrację monocytów i limfocytów oraz dysfunkcję śródbłonna [52]. Cytotoksyczny efekt rodników tlenowych odgrywa prawdopodobnie istotną rolę także w patogenezie choroby Alzheimera. Stres oksydacyjny w AD przynajmniej częściowo wynika z obecności hipokampalnych i kortykalnych płytek, zbudowanych głównie z peptydów β-amy-

uszkodzenia mózgu spowodowane przez wolne rodniki u osób chorych na AD mają związek z genotypem APOE. W tkankach osób z AD homozygotycznych pod względem allelu ε4 stwierdza się wyższy poziom oksydacji lipidów niż u chorych o genotypie ε3ε3 i u osobników zdrowych [54]. Fakty te mogą świadczyć o właściwościach antyoksydacyjnych apo E, przy czym najbardziej efektywnym przeciwutleniaczem byłaby izoforma E2, natomiast najsłabszym — izoforma E4 [55].

Obserwowany związek poszczególnych izoform apo E z poziomem tlenu azotu może wyjaśniać molekularny mechanizm wpływu apo E na status oksydacyjny komórki. Zarówno u ludzi jak i zwierząt stwierdzono, że makrofagi pochodzące z monocytów osobników posiadających allel ε4 produkują znacząco więcej tlenu azotu niż te, które pochodzą od osobników zdrowych lub chorych o genotypie ε3ε3 [56]. Tlenek azotu jest potencjalnym antyoksydantem i może mieć znaczenie przeciwmiażdżycowe. Jednak w tkankach z płytkami miażdżycowymi stężenie NO jest 3-krotnie wyższe, a poziom peroksydacji lipidów 10-krotnie wyższy niż w tkankach bez zmian miażdżycowych [57]. Tę pozorną sprzeczność może wyjaśnić specyficzna natura tlenu azotu. NO jest wolnym rodnikiem z niesparowanym elektronem na najwyższym orbitalu, dlatego zachowuje się jak potencjalny czynnik antyoksydacyjny. Jednak

w szczególnych warunkach, np. w obecności anionu nadtlenkowego, tlenek azotu ulega przekształceniu w nadtlenoazotyn  $\text{ONOO}^-$ , który jest prooksydantem, zwiększającym peroksydację lipidów [58]. Tak więc zwiększona produkcja NO w pewnych warunkach może być powodem wzmożonego utleniania lipidów i wpływać na progresję zmian miażdżycowych lub chorób neurodegeneracyjnych.

### V-3. Wpływ ApoE na proces apoptozy

Wzmożona apoptoza czyli programowana śmierć komórek obserwowana jest w przypadku wielu chorób. Na drodze apoptozy giną liczne komórki obecne w zaawansowanych blaszkach miażdżycowych, proces ten ma duże znaczenie dla stabilności blaszki. Wykazano, że apoptoza dotyczy głównie komórek mięśni gładkich, makrofagów i limfocytów [59, 60]. Postępująca utrata komórek specyficznych populacji neuronów jest cechą charakterystyczną również chorób neurodegeneracyjnych. W mózgach osób chorych na AD obserwuje się znacznie więcej komórek z pofragmentowanym DNA jądrowym niż u osób zdrowych, co wskazywałoby na wzmożoną apoptozę u ludzi z AD [61]. Z drugiej jednak strony, w wielu badaniach nie stwierdzono innych cech morfologicznych będących znakiem rozpoznawczym apoptozy, takich jak kondensacja chromatyny lub obecność ciał apoptotycznych [62, 63]. Fakt ten może wskazywać, że śmierć komórek nerwowych w AD może zachodzić na drodze programowanej śmierci, której mechanizm prawdopodobnie różni się od klasycznej apoptozy.

Wśród czynników antyapoptotycznych wymienia się ostatnio m.in. lipoproteiny klasy HDL. De Kroon i wsp. [64] stwierdzili, że genotyp *APOE* decyduje o hamowaniu aktywności antyapoptotycznej HDL przez cząsteczki VLDL. Wykazano, że tylko lipoproteiny VLDL z apo E o fenotypie E4E4 ograniczają znacząco zdolność antyapoptotyczną HDL. Ta właściwość apo E4E4 VLDL związana jest z przyłączaniem apo E do receptora rodziny LDL. Udowodniono doświadczalnie, że białka hamujące łączenie się apoE z receptorem pozbawiają VLDL zdolności do supresji aktywności antyapoptotycznej HDL [64]. Niskie powinowactwo apo E2 do receptora LDL mogłoby wyjaśniać brak znaczącego hamowania aktywności antyapoptotycznej HDL przez apo E2E2 VLDL. W przypadku fenotypu apo E3E3 ze względu na podobne powinowactwo izoform E3 i E4 do receptora, wyjaśnienia należy raczej szukać w niskim wysyceniu cząstek VLDL apolipoproteinami E u osobników o fenotypie apo E3E3.

Pedersen i wsp. [65] sugerują natomiast, że apoE może chronić komórki przed apoptozą dzięki zdolności do detoksyfikacji 4-hydroksynonenalu (HNE) — jednego z produktów peroksydacji lipidów, który może indukować apoptozę. HNE ma zdolność kowalencyjnego łączenia się z białkami poprzez ich reszty cysteinowe. Poszczególne izoformy apoE różnią się liczbą cząsteczek HNE, które mogą przyłączyć, ze względu na odmienne ilości reszt cystein w ich łańcuchach polipeptydowych ( $E2 > E3 > E4$ ). Odmienne zdolności do wiązania HNE dobrze korelują z różną aktywnością antyoksydacyjną i antyapoptotyczną poszczególnych izoform.

Bezpośredni wpływ apolipoproteiny E na proces apoptozy udowodniły badania Hashimoto i wsp. [66], które wykazały, że apo E aktywuje specyficzny dla komórki program apoptozy, w który zaangażowane są receptory LRP oraz podrodzina  $G_i$  białek G.

### V-4. Wpływ ApoE na modulowanie odpowiedzi zapalnej

Zgodnie z hipotezą Rossa [67] miażdżycą jest chorobą zapalną. Procesy zapalne wydają się też odgrywać znaczącą rolę w patogenezie choroby Alzheimera [68, 69]. Apolipoproteina E syntetyzowana jest poza wątrobą m. in. przez makrofagi. Makrofagi poprzez prezentację antygeny aktywują limfocyty T, które wydzielają cytokiny i interferon gamma, hamujące ekspresję apoE w makrofagach. Liczne badania potwierdzają rolę apo E w modyfikacji odpowiedzi zapalnej. U myszy pozbawionych genu *APOE* (ang. *knock-out*) obserwuje się zwiększoną odpowiedź zapalną indukowaną lipopolisacharydem. Podanie egzogennej apolipoproteiny E obniża syntezę cytokin prozapalnych [70]. Wpływ apo E na modulowanie odpowiedzi zapalnej jest zależny od izoformy apo E. Myszy wykazujące ekspresję allelu  $\epsilon 4$  mają znacząco podwyższony poziom cytokin prozapalnych  $\text{TNF}\alpha$  i IL-6 w porównaniu z osobnikami  $\epsilon 3\epsilon 3$ . Sugeruje to, że allel  $\epsilon 4$  wykazuje słabszy efekt supresji uwalniania czynników prozapalnych [71]. Obniżanie poziomu cytokin zapalnych przez apo E może być związane z jej wpływem na proces namnażania limfocytów T. Wykazano bowiem, że apoE ma zdolność hamowania proliferacji limfocytów T, prawdopodobnie częściowo poprzez wpływ na aktywność interleukiny 2, która stymuluje namnażanie i dojrzewanie limfocytów T [72].

Wpływ apo E na modulowanie odpowiedzi zapalnej może być związany z uruchamianiem szlaku sygnalizacji w komórkach układu odpornościowego. Misra i wsp. [73] dowiedli, że apoE inicjuje kaska-

dę sygnalizacyjną w mysich makrofagach, która prowadzi do zwiększonej produkcji inozytolotrifosforanu i mobilizacji wewnątrzkomórkowych zapasów wapnia  $\text{Ca}^{2+}$ .

## V-5. ApoE a funkcja płytek krwi

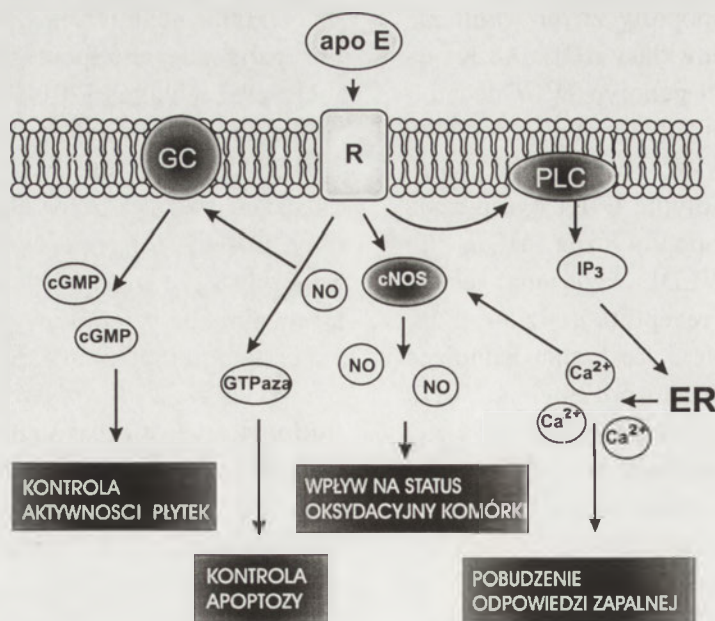
Płytki krwi odgrywają znaczącą rolę w inicjacji procesów miażdżycowych. Przyleganie płytek do endotelium naczyń, czemu towarzyszy ekspresja genów prozapalnych, poprzedza pojawienie się blaszek miażdżycowych [74]. Jednym z czynników hamujących agregację płytek jest podklasa lipoprotein HDL bogata w apoE (HDL-E) [75]. Ze względu na brak aktywności antyagregacyjnych innych podklas HDL o niskiej zawartości apoE, wydaje się prawdopodobne, że właśnie apoE jest tym komponentem HDL-E, który hamuje agregację płytek. Przypuszczenie to potwierdzono doświadczalnie dokonując chemicznych modyfikacji cząsteczek HDL-E w pozycji reszt argininy i lizyny, co spowodowało zniesienie efektu inhibicji [76]. Doświadczenie to może sugerować jednocześnie, że aktywność antyagregacyjna HDL-E związana jest z oddziaływaniem apoE z jej receptorem błonowym, gdyż aminokwasy zasadowe pełnią tu kluczową rolę.

Inne badania sugerują, że hamowanie agregacji płytek przez apoE związane jest z jej wpływem na szlak sygnalizacyjny wewnątrz płytek [77]. Stwierdzono, że apoE w płytkach stymulowanych adenyliną zwiększa znacząco poziom cyklicznego 3',5'-guanozynomonofosforanu (cGMP), który stanowi ważny element kontroli hamowania

aktywności płytek. Jednym z mechanizmów prowadzących do wzrostu stężenia cGMP jest stymulacja syntazy tlenu azotu i produkcja NO, który aktywuje cyklazę guanylanową. Związek apoE z syntezą NO potwierdza dodatkowo fakt, że inhibitory syntazy tlenu azotu znoszą antyagregacyjne działanie apoE.

## V. Podsumowanie

Ścieżka prowadząca od genu *APOE* poprzez jego produkt do zaistnienia zmian patologicznych zawiera wiele elementów regulowanych przez inne geny i ich produkty. Dlatego trudno określić jednoznacznie mechanizm wpływu tego genu na poszczególne choroby. Znaczenie apoE w regulacji metabolizmu lipidów, statusie oksydacyjnym komórki, odpowiedzi zapalnej czy apoptozie, a więc w zjawiskach obserwowanych w przypadku wielu chorób, sugeruje, że w patofizjologii tych zaburzeń, mimo ich wyraźnej odmienności, mogą brać udział pewne wspólne mechanizmy, w których znaczącą rolę może odgrywać apoE. Możliwe, że decydujące znaczenie w tak szerokim wpływie apo E na metabolizm komórki ma jej udział w przekaźnictwie wewnątrzkomórkowym. W ostatnich latach dostarczono licznych dowodów na to, że receptory rodziny LDL, dla których apo E jest ligandem, oprócz roli transportowej mają ważne znaczenie w inicjacji kaskad sygnalizacyjnych w komórce [78], natomiast większość efektów biologicznych wywoływanych przez apo E wymaga jej związania z receptorem (Ryc. 2). Dokładne poznanie funkcji apo E może być początkiem badań nad jej te-



**Ryc. 2.** Udział apo E i receptorów dla apo E w inicjacji wewnątrzkomórkowych kaskad sygnalizacyjnych związanych z patogenezą chorób. R — receptor dla apo E; GC — cyklaza guanylanowa; cGMP — cykliczny guanozynomonofosforan; GTPaza — guanozynotrifosfataza; cNOS — konstytutywna syntaza tlenu azotu; NO — tlenek azotu; IP 3 — trifosforan inozytolu; ER — retikulum endoplazmatyczne; PLC — fosfolipaza C.

rapeutycznym wykorzystaniem, którego próby już są podejmowane. Egzogenna apo E oraz peptydy wprowadzone z regionu apo E wiążącego receptor są efektywne w obniżaniu stężenia cholesterolu LDL i VLDL [79] oraz hamowaniu procesów zapalnych [71]. Liczne badania potwierdzają też związek genotypu *APOE* z odpowiedzią na leczenie farmakologiczne. Określenie genotypu *APOE* może więc być pomocne w ustaleniu odpowiednich dawek leku [80].

Artykuł otrzymano 31 maja 2004  
Zaakceptowano do druku 13 września 2004

## Piśmiennictwo

- Horsburgh K, McCarron MO, White F, Nicoll JA (2000) *Neurobiol Aging* 21: 245-255
- Smith JD (2000) *Ann Med* 32: 118-127
- Vincent-Viry M, Schiele F, Gueguen R, Bohnet K, Visvikis S, Siest G (1998) *Clin Chem* 44: 957-965
- Mahley RW, Ji ZS (1999) *J Lipid Res* 40: 1-16
- Rensen PC, Jong MC, van Vark LC, van der Boom H, Hendriks WL, van Berkel TJ, Biessen EA, Havekes LM (2000) *J Biol Chem* 275: 8564-8571
- Schwiegelshohn B, Presley JF, Gorecki M, Vogel T, Carpentier YA, Maxfield FR, Deckelbaum RJ (1995) *J Biol Chem* 270: 1761-1769
- Bultel-Brienne S, Lestavel S, Pilon A, Laffont I, Tailleux A, Fruchart JC, Siest G, Clavey V (2002) *J Biol Chem* 277: 36092-36099
- Jingami H, Yamamoto T (1995) *Curr Opin Lipidol* 6: 104-108
- Kim DH, Iijima H, Goto K, Sakai J, Ishii H, Kim HJ, Suzuki H, Kondo H, Saeki S, Yamamoto T (1996) *J Biol Chem* 271: 8373-8380
- Simons M, Keller P, Dichgans J, Schulz JB (2001) *Neurology* 57: 1089-1093
- Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW (1981) *J Biol Chem* 256: 9077-9083
- Wilson PW, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ (1994) *JAMA* 272: 666-671
- Willis F, Graff-Radford N, Pinto M, Lawson L, Adamson J, Epstein D, Parfitt F, Hutton M, O'Brien PC (2003) *J Natl Med Assoc* 95: 71-76
- Gerdes LU, Klausen IC, Sihm I, Faergeman O (1992) *Genet Epidemiol* 9: 155-167
- Wetterau JR, Aggerbeck LP, Rall SC Jr, Weisgraber KH (1988) *J Biol Chem* 263: 6240-6248
- Lalazar A, Weisgraber KH, Rall Jr SC, Giladi H, Innerarity TL, Levanon AZ, Boyles JK, Amit B, Gorecki M, Mahley RW (1988) *J Biol Chem* 263: 3542-3545
- Saito H, Dhanasekaran P, Nguyen D, Baldwin F, Weisgraber KH, Wehrli S, Phillips MC, Lund-Katz S (2003) *J Biol Chem* 278: 14782-14787
- Mamotte CD, Sturm M, Foo JI, van Bockxmeer FM, Taylor RR (1999) *Am J Physiol* 276: 553-557
- Mahley RW, Huang Y, Rall SC Jr (1999) *J Lipid Res* 40: 1933-1949
- Saito H, Dhanasekaran P, Baldwin F, Weisgraber KH, Phillips MC, Lund-Katz S (2003) *J Biol Chem* 278: 40723-40729
- Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S (1993) *Lancet* 342: 697-699
- Nunomura A, Chiba S, Eto M, Saito M, Makino I, Miyagishi T (1996) *Neurosci Lett* 206: 17-20
- Nalbantoglu J, Gilfix BM, Bertrand P, Robitaille Y, Gauthier S, Rosenblatt DS, Poirier J (1994) *Ann Neurol* 36: 889-895
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) *Science* 261: 921-923
- Nielsen AS, Ravid R, Kamphorst W, Jorgensen OS (2003) *J Alzheimers Dis* 5: 119-125
- Engelborghs S, Dermaut B, Goeman J, Saerens J, Marien P, Pickut BA, Van den Broeck M, Serneels S, Cruts M, Van Broeckhoven C, De Deyn PP (2003) *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 1148-1151
- Bang OY, Kwak YT, Joo IS, Huh K (2003) *Yonsei Med J* 44: 401-413
- Hixson JE (1991) *Arterioscler Thromb* 11: 1237-1244
- Cattin L, Fisicaro M, Tonizzo M, Valenti M, Danek GM, Fonda M, Da Col PG, Casagrande S, Pincettri E, Bovenzi M, Baralle F (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 91-94
- Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM (1996) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 1250-1255
- Gerdes LU, Gerdes C, Kervinen K, Savolainen M, Klausen IC, Hansen PS, Kesaniemi YA, Faergeman O (2000) *Circulation* 101: 1366-1371
- Tiret L, de Knijff P, Menzel HJ, Ehnholm C, Niccaud V, Havekes LM (1994) *Arterioscler Thromb* 14: 1617-1624
- Kolovou GD, Daskalova DCh, Hatzivassiliou M, Yiannakouris N, Pilatis ND, Elisaf M, Mikhailidis DP, Cariolou MA, Cokkinos DV (2003) *Angiology* 54: 51-58
- Blanche H (2003) *Presse Med* 32: 365-369
- Juvonen T, Kervinen K, Kairaluoma MI, Lajunen LH, Kesaniemi YA (1993) *Gastroenterology* 104: 1806-1813
- Kervinen K, Sodervik H, Makela J, Lehtola J, Niemi M, Kairaluoma MI, Kesaniemi YA (1996) *Gastroenterology* 110: 1785-1790
- Kimura H, Suzuki Y, Gejyo F, Karasawa R, Miyazaki R, Suzuki S, Arakawa M (1998) *Am J Kidney Dis* 31: 666-673
- Oda H, Yorioka N, Ueda C, Kushihata S, Yamakido M (1999) *Kidney Int Suppl* 71: 25-27
- Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, Ohtsuki T, Hori M (2001) *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 1199-1207
- McCarron MO, Delong D, Alberts MJ (1999) *Neurology* 53: 1308-1311
- McCarron MO, Muir KW, Weir CJ, Dyker AG, Bone I, Nicoll JA, Lees KR (1998) *Stroke* 29: 1882-1887
- Zannis VI (1986) *Methods Enzymol* 128: 823-851
- Smelt AH (2003) *Ned Tijdschr Geneesk* 147: 157-159
- Eto M, Watanabe K, Ishii K (1986) *Clin Genet* 29: 477-484
- Demant T, Bedford D, Packard CJ, Shepherd J (1991) *J Clin Invest* 88: 1490-1501
- Yoshida H, Hasty AH, Major AS, Ishiguro H, Su YR, Gleaves LA, Babaev VR, Linton MF, Fazio S (2001) *Circulation* 104: 2820-2825
- Lin CY, Duan H, Mazzone T (1999) *J Lipid Res* 40: 1618-1627
- Lin CY, Huang ZH, Mazzone T (2001) *J Lipid Res* 42: 1125-1133
- Zhao Y, Mazzone T (1999) *J Lipid Res* 40: 1029-1035
- Cullen P, Cignarella A, Brennhansen B, Mohr S, Assmann G, von Eckardstein A (1998) *J Clin Invest* 101: 1670-1677
- Offermann MK, Medford RM (1994) *Heart Dis Stroke* 3: 52-57
- Siennicka A, Zapolska-Downar D (2003) *Post Hig* 57: 219-237
- Thomas T, Thomas G, McLendon C, Sutton T, Mullan M (1996) *Nature* 380: 168-171

54. Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Bastianetto S, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS, Christen Y, Davignon J, Quirion R, Poirier J (1999) *Free Radic Biol Med* 27: 544-553.
55. Tamaoka A, Miyatake F, Matsuno S, Ishii K, Nagase S, Sahara N, Ono S, Mori H, Wakabayashi K, Tsuji S, Takahashi H, Shoji S (2000) *Neurology* 54: 2319-2321
56. Colton CA, Needham LK, Brown C, Cook D, Rasheed K, Burke JR, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Vitek MP (2004) *J Neuroimmunol* 147: 62-67
57. Baskin Y, Baskin H, Guner G, Tuzun E, Oto O (2003) *Int J Cardiol* 91: 53-57
58. Violi F, Marino R, Milite MT, Loffredo L (1999) *Diabetes Metab Res Rev* 15: 283-288
59. Bjorkerud S, Bjorkerud B (1996) *Am J Pathol* 149: 367-380
60. Kockx MM (1998) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1519-1522
61. Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, Horton WE Jr (1995) *Exp Neurol* 133: 225-230.
62. Velez-Pardo C, Lopera F, Jimenez Del Rio M (2000) *J Alzheimers Dis* 2: 47-57
63. Baner C, Lassmann H, Breitschopf H, Jellinger KA (1997) *J Neural Transm Suppl* 50: 141-152
64. DeKroon RM, Mihovilovic M, Goodger ZV, Robinette JB, Sullivan PM, Saunders AM, Strittmatter WJ (2003) *J Lipid Res* 44: 1566-1573
65. Pedersen WA, Chan SL, Mattson MP (2000) *J Neurochem* 74: 1426-1433
66. Hashimoto Y, Jiang H, Niikura T, Ito Y, Hagiwara A, Umezawa K, Abe Y, Murayama Y, Nishimoto I (2000) *J Neurosci* 20: 8401-8409
67. Ross R (1999) *Am Heart J* 138: 419-420.
68. Rogers J, Webster S, Lue LF, Brachova L, Civin WH, Emmerling M, Shivers B, Walker D, McGeer P (1996) *Neurobiol Aging* 17: 681-686
69. Aisen PS (1996) *Mol Chem Neuropathol* 28: 83-88
70. Van Oosten M, Rensen PC, Van Amersfoort ES, Van Eck M, Van Dam AM, Breve JJ, Vogel T, Pannet A, Van Berkel TJ, Kuiper J (2001) *J Biol Chem* 276: 8820-8824
71. Lynch JR, Tang W, Wang H, Vitek MP, Bennett ER, Sullivan PM, Warner DS, Laskowitz DT (2003) *J Biol Chem* 278: 48529-48533
72. Kelly ME, Clay MA, Mistry MJ, Hsieh-Li HM, Harmony JA (1994) *Cell Immunol* 159: 124-139.
73. Misra UK, Adlakha CL, Gawdi G, McMillian MK, Pizzo SV, Laskowitz DT (2001) *J Leukoc Biol* 70: 677-683
74. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M (2002) *J Exp Med* 196: 887-896
75. Higashihara M, Kinoshita M, Teramoto T, Kume S, Kurokawa K (1991) *FEBS Lett* 282: 82-86
76. Desai K, Bruckdorfer KR, Hutton RA, Owen JS (1989) *J Lipid Res* 30: 831-840
77. Riddell DR, Graham A, Owen JS (1997) *J Biol Chem* 272: 89-95
78. Wehr H, Bednarska-Makaruk M (2001) *Czyn Ryz* 1/2: 5-9
79. Van Eck M, Van Dijk KW, Herijgers N, Hofker MH, Groot PH, Van Berkel TJ (2001) *Atherosclerosis* 154: 103-112
80. Kolovou G, Daskalova D, Mikhailidis DP (2003) *Angiology* 54: 59-71

# Nukleotydy purynowe erytrocytów ludzkich — metabolizm i regulacja

## Purine nucleotides of human erythrocytes — metabolism and regulation

WIOLETA DUDZIŃSKA<sup>1</sup>, ALINA JOANNA HŁYŃCZAK<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Resynteza nukleotydów purynowych w krwinkach czerwonych
  - II-1. Zasady azotowe jako substraty w resyntezie mononukleotydów
    - II-1.1. Synteza PRPP
    - II-1.2. Resynteza AMP
    - II-1.3. Resynteza IMP i GMP
  - II-2. Nukleozydy jako substraty w resyntezie mononukleotydów
  - II-3. Źródła adeniny i adenozyne jako bezpośrednie substraty w resyntezie nukleotydów adeninowych
- III. Przemiany nukleotydów
- IV. Katabolizm nukleotydów purynowych w krwinkach czerwonych
  - IV-1. Katabolizm mononukleotydów
  - IV-2. Katabolizm nukleotydów

### Contents:

- I. Introduction
- II. Purine nucleotide resynthesis in red blood cells
  - II-1. Nitric bases as mononucleotide resynthesis substrates
    - II-1.1. PRPP synthesis
    - II-1.2. AMP resynthesis
    - II-1.3. IMP and GMP resynthesis
  - II-2. Nucleosides as mononucleotide resynthesis substrates
  - II-3. Sources of adenine and adenosine as direct substrates of adenine nucleotide resynthesis
- III. Nucleotide conversions
- IV. Purine nucleotide catabolism in red blood cells
  - IV-1. Mononucleotide catabolism
  - IV-2. Nucleoside catabolism

**Wykaz stosowanych skrótów:** ADA — deaminaza adenozyne (EC 3.5.4.4); Ade — adenina; Ado — adenozyne; AdoK — kinaza adenozynowa (EC 2.7.1.20); ADP — adenozyne-5'-difosforan; AEC — ładunek energetyczny adenylanów; AK — kinaza adenylanowa (EC 2.7.4.3); AMP — adenozyne-5'-monofosforan; AMPD — deaminaza AMP (EC 3.5.4.6); APRT — fosforibozylotransferaza adeninowa (EC 2.4.2.7); ATP — adenozyne-5'-trifosforan; 2,3-BPG — 2,3-bisfosfoglicerynian; cN-I — cytosolowa 5'-nukleotydaza specyficzna wobec AMP (EC 3.1.3.5); cN-II — cytosolowa 5'-nukleotydaza specyficzna wobec IMP i GMP (EC 3.1.3.5); 5'-NT — 5'-nukleotydaza (EC 3.1.3.5); GEC — ładunek energetyczny guanylanów; GMP — guanozyne-5'-monofosforan; Gua — guanina; Guo — guanozyne; GuoK — kinaza guanozynowa (EC 2.7.1.73); HGPR — fosforibozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa (EC 2.4.2.8); HK — heksokinaza; Hyp — hipoksantyna; IMP — inozyne-5'-monofosforan; Ino — inozyne; InoK — kinaza inozy-

nowa (EC 2.7.1.73); MT-Ado — metyloioadenozyne; NAD<sup>+</sup> — dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (forma utleniona); PFK — fosfofruktokinaza (EC 2.7.1.11); PGK — kinaza fosfoglicerynianowa (EC 2.7.2.3); P<sub>i</sub> — fosforan nieorganiczny; PI — fosfatydyloinozytol; PIP — fosfatydyloinozytolo-4-fosforan; PK — kinaza pirogronianowa (EC 2.7.1.40); PNP — fosforylaza nukleotydów purynowych (EC 2.4.2.1); PRPP — 5-fosforibozyl-1-pirofosforan; Ryb-1-P — rybozo-1-fosforan; Ryb-5-P — rybozo-5-fosforan; SAH — S-adenozylohomocysteina; SAHH — hydrolaza S-adenozylohomocysteinowa (EC 3.3.1.1); SAM — S-adenozylometionina; TA — transaldolaza (EC 2.2.1.2); TAN — pula nukleotydów adeninowych; TGN — pula nukleotydów guaninowych; TK — transketolaza (EC 2.2.1.1); XMP — ksantozyne-5'-monofosforan

### I. Wstęp

Wyjątkowe znaczenie związków purynowych dla organizmów żywych związane jest z licznymi pełnionymi przez nie funkcjami: są one składnikami kwasów nukleinowych, jako związki wysokoenergetyczne dostarczają energii dla wielu reakcji biochemicznych, wchodzą w skład koenzymów i aktywnych związków pośrednich, które uczestniczą w wielu biosyntezach, ponadto pełnią rolę drugiego prze-

<sup>1</sup>Dr,<sup>2</sup> prof. zw. dr hab., Uniwersytet Szczeciński, Wydział Nauk Przyrodniczych, Katedra Biochemii, Szczecin 71-412, ul. Felczaka 3a, tel: 0914441554; e-mail: wiola@univ.szczecin.pl

każnika sygnału, a także są mediatorami oddziałującymi z receptorami błonowymi.

Związkiem o podstawowym znaczeniu dla metabolizmu krwinek czerwonych jest nukleotyd purynowy — adenozyno-5'-trifosforan (ATP). Stanowi on około 80% wszystkich nukleotydów erytrocytarnych. Energia uwalniana w procesie enzymatycznej hydrolizy wysokoenergetycznego wiązania fosfo-bezwodnikowego zużywana jest w procesie tworzenia estrów fosforanowych cukrów w reakcjach katalizowanych przez heksokinazę (HK; EC 2.7.1.1) i fosfofruktokinazę (PFK; EC 2.7.1.11), a także w reakcjach fosforylacji białek enzymatycznych i błonowych — zwłaszcza spektryny, z czym wiąże się utrzymanie kształtu krwinki oraz możliwość odwracalnych zmian tego kształtu [1]. Ponieważ dojrzałe erytrocyty nie syntetyzują fosfatydyloinozytoli, odnowa fosforanów tych związków jest wyłącznie wynikiem równowagi między procesem ich fosforylacji i defosforylacji [2]. Reakcje fosforylacji przebiegające z udziałem kinaz PI i PIP utylizują około 20 % erytrocytarnego ATP, podczas gdy fosforylacja spektryny wiąże się z utylizacją 5 % tego nukleotydu [3]. Ponadto, ATP jest niezbędny do utrzymania jonów żelaza w stanie zredukowanym, syntezy glutationu i nukleotydów pirymidynowych oraz aktywnego transportu jonów. Ten ostatni proces przebiegający z udziałem ATPazy typu P: Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPazy i Ca<sup>2+</sup>-ATPazy wykorzystuje około 30 % erytrocytarnego ATP warunkując utrzymanie stałego składu jonowego komórki [3].

Obrót metaboliczny ATP w erytrocytach wynosi około 2 mmol/L komórek/1h. Przy erytrocytarnym stężeniu ATP (Tab. 1) czas połowicznego rozpadu tego nukleotydu szacuje się na 60 min [3].

Nukleotydy purynowe syntetyzowane są w komórkach *de novo* w postaci mononukleotydów: AMP, IMP, GMP. Związkiem macierzystym, z którego powstaje AMP oraz GMP jest IMP. Biosynteza tego nukleotydu jest procesem wieloetapowym, rozpoczynającym się pirofosforylacją rybozo-5-fosforanu (Ryb-5-P). Produktem reakcji katalizowanej przez syntetazę PRPP (syntetaza 5-fosforybozyl-1-

-pirofosforanowa, EC 2.7.6.1) jest 5-fosforybozyl-1-pirofosforan (PRPP), który po przyłączeniu grupy -NH<sub>2</sub> glutaminy w reakcji katalizowanej przez amidotransferazę glutamyl-PRPP tworzy 5-fosforybozylaminę.

Unikatowa budowa erytrocytów i odmienność ich metabolizmu związana jest między innymi z brakiem aktywności amidotransferazy glutamyl-PRPP i możliwości syntezy nukleotydów purynowych na szlaku *de novo*. Stąd, w erytrocytach związki te powstają w reakcjach reutilizacji (ang. *salvage*), a więc ponownego wykorzystania istniejących już zasad purynowych: adeniny (Ade), hipoksantyny (Hyp) i guaniny (Gua) oraz nukleozydów: adenozyny (Ado), inozyny (Ino) i guanozyny (Guo). Te ostatnie jako produkty defosforylacji mononukleotydów (AMP→Ado; IMP→Ino; GMP→Guo) ulegają deaminacji (Ado→Ino) i fosforolizie (Ino→Hyp; Guo→Gua) uwalniając Hyp i Gua jako końcowe produkty katabolizmu nukleotydów purynowych w erytrocytach.

**II. Resynteza nukleotydów purynowych w krwinkach czerwonych**

**II-1. Zasady azotowe jako substraty w resyntezie mononukleotydów**

**II-1.1. Synteza PRPP**

Przekształcenie zasad purynowych (Ade, Hyp, Gua) w ich mononukleotydy (AMP, IMP, GMP) wymaga dostarczenia substratu dla reakcji katalizowanych przez fosforybozylotransferazy. Substratem tym jest PRPP, który powstaje w wyniku przyłączenia grupy β-γ-pirofosforanowej pochodzącej z ATP do C-1 rybozo-5-fosforanu (Ryb-5-P). Reakcję katalizuje syntetaza PRPP (syntetaza 5-fosforybozyl-1-pirofosforanowa, EC 2.7.6.1).

Szlak pentozofosforanowy jest źródłem erytrocytarnego Ryb-5-P. Metabolit ten powstaje zarówno w części oksydacyjnej szlaku, jak i w wyniku reakcji katalizowanych przez transketolazę (TK; EC 2.2.1.1) i transaldolazę (TA; EC 2.2.1.2). W erytrocytach źródłem Ryb-5-P są również Ino i Guo, które

**Tabela 1**

Średnie stężenia nukleotydów purynowych w erytrocytach ludzkich. Sporządzono na podstawie [4-6]

| ATP (μM) | ADP (μM) | AMP (μM) | GTP (μM) | GDP (μM) | GMP (μM) |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1519 [4] | 171 [4]  | 12 [4]   | 86 [4]   | 14 [4]   | 17 [6]   |
| 1625 [4] | 191 [4]  | 17 [4]   | 64 [4]   | 16 [4]   |          |
| 1570 [5] | 137 [5]  |          | 66 [5]   | 17 [5]   |          |

przy udziale PNP przekształcane są w Hyp i Gua. Fosforoliza wiązań glikozydowych nukleozydów prowadzi do uwolnienia rybozo-1-fosforanu (Ryb-1-P), który w reakcji katalizowanej przez mutazę rybozofosforanową (EC 5.4.2.7) ulega izomeryzacji do Ryb-5-P.

Badając strukturę syntetazy PRPP wykazano, że enzym może funkcjonować w kompleksie złożonym z od 2 do 32 monomerów, których masa cząsteczkowa wynosi 32-34 kDa. Agregacja do form złożonych z 16 lub 32 podjednostek prowadzi do powstania aktywnej formy enzymu [7].

Szybkość syntezy PRPP zależy zarówno od dostępności Ryb-5-P, jak i aktywności syntetazy PRPP, która ulega częściowemu hamowaniu w obecności dużych stężeń nukleotydów purynowych i produktów reakcji. Ponieważ PRPP uczestniczy również w syntezie nukleotydów pirymidynowych i  $\text{NAD}^+$ , powstanie tego związku podlega skumulowanej inhibicji zwrotnej przez metabolity powstające na różnych szlakach przemian z jego udziałem [8, 9].

Regulacja syntezy PRPP przez  $\text{P}_i$  jest ważnym mechanizmem kontroli metabolizmu związków purynowych w erytrocytach, bowiem synteza PRPP i syntetaza PRPP są znane z wrażliwości nawet na niewielkie różnice stężenia  $\text{P}_i$  w komórce [10, 11]. Wykazano także, że w erytrocytach z niedoborem kinazy pirogronianowej (PK; EC 2.7.1.40) wzrost stężenia 2,3-BPG prowadzi do zahamowania aktywności heksokinazy (HK; EC 2.7.1.1), dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G-6-PD; EC 1.1.1.49), dehydrogenazy 6-fosfoglukonianowej (EC 3.1.1.31) [12], a także transaldolazy (TA; EC 2.2.1.2) i transketolazy (TK; EC 2.2.1.1) [13]. Obniżenie aktywności enzymów szlaku pentozofosforanowego może ograniczać ilość tworzonego PRPP w erytrocytach i w konsekwencji decydować o stężeniu ATP w komórce [14]. Ponadto wykazano, że 2,3-BPG może prowadzić do dysocjacji syntetazy PRPP do mniejszych agregatów bądź jej form monomerycznych co może być przyczyną obniżenia aktywności enzymu i stężenia PRPP w komórce [15].

W wyniku reakcji reutilizacji reszta fosforybozylowa pochodząca z PRPP zostaje przeniesiona na odpowiednią zasadę purynową. Reakcje katalizowane są przez fosforybozylotransferazę adeninową ( $\text{Ade} \rightarrow \text{AMP}$ ) oraz hipoksantynowo-guaninową ( $\text{Hyp} \rightarrow \text{IMP}$ ;  $\text{Gua} \rightarrow \text{GMP}$ ).

## II-1.2. Resynteza AMP

Fosforybozylotransferaza adeninowa (APRT) jest enzymem cytoplazmatycznym wykazującym aktywność w zakresie pH 7,4-9,5 [16]. Enzym ten katalizuje

reakcję przeniesienia reszty fosforybozylowej PRPP na Ade, efektem czego jest powstanie AMP i  $\text{PP}_i$ . Ten ostatni rozkładany jest do  $\text{P}_i$  przez pirofosfatazę nieorganiczną, co przesunęła równowagę reakcji fosforybozylacji Ade w prawo, czyniąc ją nieodwracalną.

Aktywatorami APRT są dwuwartościowe kationy, z których najefektywniejszym jest  $\text{Mg}^{2+}$  [16]. Inhibitorami są produkty reakcji katalizowanej przez ten enzym (AMP — inhibitor kompetycyjny,  $\text{PP}_i$  — inhibitor niekompetycyjny), a także ADP i ATP (inhibitory kompetycyjne), które łączą się zarówno z miejscem wiązania Ade, jak i AMP. GMP jest inhibitorem allosterycznym, aczkolwiek nie jest pewne, czy ze względu na małe stężenie wewnątrzkomórkowe odgrywa rolę regulacyjną *in vivo* [16].

Wykazano, że erytrocytarna APRT jest białkiem enzymatycznym o masie cząsteczkowej 19 kDa, które funkcjonuje w postaci homodimeru [17, 18]. Wykazano także, że część aktywności APRT związana jest z błoną erytrocytarną, tworząc szybko wysycający się system transportu zasad purynowych do krwinek [19].

Najistotniejszym parametrem decydującym o szybkości reakcji, przy określonym stężeniu Ade, jest stosunek  $[\text{PRPP}]/[\text{AMP}]$ , bowiem reakcja jest zwrotnie hamowana przez AMP na zasadzie wzajemnej wyłączoneści wiązania AMP i PRPP przez APRT [16, 18].

Reakcja katalizowana przez APRT jest jedyną drogą, poprzez którą wolna adenina ulega inkorporacji do nukleotydów adeninowych.

Deficyt APRT prowadzi do wzrostu stężenia adeniny i 2,8-dihydroksyadeniny. Oznaczenie aktywności APRT w erytrocytach ma znaczenie w diagnostyce dihydroksyadeninurii [16]. Przy prawidłowej aktywności APRT (w zhemolizowanych erytrocytach aktywność APRT wynosi  $24,5 \pm 4,8$  nmol/mg Hb/h) enzym przekształca prawie całą pulę adeniny do AMP. Ilość Ade wydalonej z moczem jest wówczas bardzo mała [16].

Erytrocytarna aktywność APRT wzrasta w deficycie PNP i HGPRT [17].

## II-1.3. Resynteza IMP i GMP

Fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa (HGPRT) katalizuje reakcję fosforybozylacji Hyp do IMP i Gua do GMP, wykorzystując jako substrat również PRPP [17]. Erytrocytarna aktywność HGPRT w stosunku do Hyp i Gua wynosi odpowiednio  $2,14 \pm 0,15$   $\mu\text{mol/mg}$  białka/min i  $2,49 \pm 0,24$   $\mu\text{mol/mg}$  białka/min [20].

W erytrocytach HGPRT występuje w postaci kilku izoenzymów. Aktywna postać enzymu ma formę dimeru o masie cząsteczkowej 24 kDa [21].

HGPRT jest enzymem cytoplazmatycznym wykazującym aktywność w pH 7,1-9,1. Badania kinetyczne wpływu jonów magnezu pozwoliły stwierdzić, że magnez aktywuje enzym poprzez kompleksowanie z PRPP. PRPP w formie soli dimagnezowej jest najkorzystniejszym substratem dla HGPRT [22].

Całkowity deficyt HGPRT w erytrocytach występuje w zespole Lesch-Nyhana (ciężkie zaburzenia neurologiczne, hiperurykemia, nefropatia), natomiast częściowy — w zespole Kelley-Seegmiller (hiperurykemia, nefropatia i dna moczanowa, bez zaburzeń neurologicznych).

## II-2. Nukleozydy jako substraty w resyntezie mononukleotydów

Źródłem nukleotydów purynowych w erytrocytach są również nukleozydy (Ado, Ino, Guo). Te w obecności kinaz o różnej swoistości substratowej i ATP ulegają fosforylacji do odpowiednich mononukleotydów.

Kinaza adenozyńska (AdoK) katalizuje reakcję fosforylacji Ado do AMP, wykorzystując jako substrat ATP lub GTP. Jest ona kluczowym enzymem regulującym wewnątrzkomórkową pulę adenylanów [23-25]. Wykazano, że egzogenna Ado zwiększa stężenie ATP w krwinkach czerwonych, prowadząc do wzrostu puli nukleotydów adeninowych [26]. Spadek aktywności AdoK może powodować wzrost stężenia nukleozydu w komórce, co prowadzi do zmian różnicy stężeń Ado między przestrzenią pozakomórkową a wnętrzem komórki. Wynikiem tych zmian może być zmniejszony napływ nukleozydu do komórki i wzrost jego stężenia w przestrzeni pozakomórkowej. Reakcja katalizowana przez AdoK zapobiega nadmiernemu katabolizmowi AMP, chroniąc w ten sposób wewnątrzkomórkową pulę adenylanów [24].

Kinaza inozynowa (InoK) i guanozynowa (GuoK) katalizują reakcje fosforylacji Ino i Guo odpowiednio do IMP i GMP.

Tak więc, resynteza nukleotydów adeninowych, które stanowią 85% wszystkich wolnych nukleotydów erytrocytarnych [27], może odbywać się zarówno na:

- szlaku zależnym od PRPP, wymagającym aktywności APRT i substratu w postaci Ade,
- szlaku adenozyńskiego, wymagającym aktywności AdoK i substratu w postaci Ado.

Stała Michaelisa APRT dla Ade wynosi 1-5  $\mu\text{M}$ , a AdoK dla Ado 2  $\mu\text{M}$ . Oznaczone stężenia Ade i Ado w erytrocytach wynoszą odpowiednio 13  $\mu\text{M}$  i 1  $\mu\text{M}$  [28].

Wykazano, że obniżenie aktywności PK prowadzi do 50% spadku stężenia ATP, któremu nie towarzyszy jednak wzrost stężenia ADP i AMP [28]. Zmiany takie można wyjaśnić zaburzeniami na szlaku resyntezy tych nukleotydów. Wykazano bowiem, że w krwinkach czerwonych z niedoborem tego enzymu powstają mniejsze ilości PRPP — bezpośredniego substratu w reakcjach katalizowanych przez APRT i HGPRT, upośledzony jest również szlak adenozyński na etapie AdoK [28]. Spadek stężenia PRPP prowadzi do obniżenia stężeń nukleotydów adeninowych i  $\text{NAD}^+$ , zahamowania aktywności kinazy pirogronianowej, a także dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego i w konsekwencji hamuje przebieg glikolizy. Drastyczne obniżenie stężenia ATP może prowadzić do zaburzeń aktywnego transportu  $\text{K}^+$  do wnętrza krwinki. Ubytki elektrolitów pociągają za sobą utratę wody osmotycznej, utratę plastyczności krwinek i w konsekwencji przedwczesne ich niszczenie w śledzionie.

## II-3. Źródła adeniny i adenozyne jako bezpośrednich substratów w resyntezie nukleotydów adeninowych

Reakcje reutilizacji Ade i Ado są źródłem erytrocytarnych nukleotydów adeninowych (ATP, ADP, AMP). Metabolicznym celem fosforylacji Ade i fosforylacji Ado jest wprowadzenie tych związków na szlak syntezy wysokoenergetycznych nukleotydów adeninowych (ATP, ADP).

Szlak poliamin jest podstawowym źródłem Ade. 5-deoksy-5-metylotioadenozyna (MT-Ado, MTAR) powstająca po dekarboksylacji SAM na szlaku poliamin jest substratem dla fosforylasy 5 MT-Ado (EC 2.4.2.28). Produktami reakcji katalizowanej przez ten enzym jest Ade i 5 MT-Ryb-1-P [16]. Ten sam enzym — fosforylaza 5 MT-Ado — może również uwalniać Ade i Ryb-1-P z adenozyne w przypadku wzrostu stężenia tego nukleozydu np. w czasie niedokrwienia tkanek [16].

W przeciwieństwie do Gua i Hyp, Ade nie powstaje jako produkt działania PNP — enzymu, który katalizuje fosforolityczne rozszczepienie nukleotydów (nie wykazuje aktywności wobec Ado) do zasad purynowych i rybozo-1-fosforanu (Ryb-1-P). Badania nad oczyszczoną SAHH wykazały, że w reakcji katalizowanej przez ten enzym (odwracalna hydroliza SAH do Ado i L-homocysteiny) powstaje niestabilny

metabolit pośredni — 3-ketoadenozyna, której wiązanie glikozydowe ulega samoistnej, nieenzymatycznej hydrolizie z uwolnieniem Ade [23]. W ten sposób w erytrocytach Ade uwolniona podczas wiązania nukleozydów z SAHH, może uczestniczyć w syntezie nukleotydów purynowych dzięki reakcji katalizowanej przez APRT [23].

W komórkach Ado powstaje jako produkt rozpadu nukleotydów adeninowych (zwiększona hydroliza ATP i obniżony stosunek [ATP]/[ADP] prowadzą do defosforylacji AMP), jak również w reakcji katalizowanej przez SAHH (odwracalna hydroliza SAH do Ado i L-homocysteiny) [29]. Ze względu na dużą wydajność transportu błonowego (dyfuzja ułatwiona za pośrednictwem specyficznych Na<sup>+</sup>-niezależnych lub Na<sup>+</sup>-zależnych transporterów nukleozydowych [30, 31]) uwalnianie Ado z komórek i (albo) jej wychwyt są limitowane stężeniem Ado w cytoplazmie, dzięki czemu występuje niewielki gradient chemiczny między środowiskiem wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym. Stężenie Ado w płynie komórkowym i pozakomórkowym jest wypadkową aktywności enzymów ją metabolizujących i (jej) transportu przez błony cytoplazmatyczne.

W osoczu głównym źródłem Ado są komórki śródbłonna naczyń [32-34]. Stężenie Ado w osoczu jest określone na 0,02-2,0 μM [4, 31]. Jej okres półtrwania wynosi zaledwie kilka sekund, bowiem Ado eliminowana z osocza przez krwinki czerwone jest bardzo szybko deaminowana do Ino przez wewnątrzkomórkową ADA (izoenzym ADA<sub>1</sub>) lub fosforylowana do AMP przez AdoK [24, 34]. Stała Michaelisa AdoK w porównaniu z ADA jest niższa dla Ado stąd przy niższych stężeniach substratu reakcją dominującą jest jego fosforylacja [31, 35]. W deaminacji Ado we krwi dużą rolę odgrywa również aktywność osoczowa ADA (izoenzym ADA<sub>2</sub>) [36]. Zwiększony wychwyt Ado przez krwinki czerwone może prowadzić do wzrostu puli nukleotydów adeninowych co wykazano w badaniach *in vitro* [25, 31, 37].

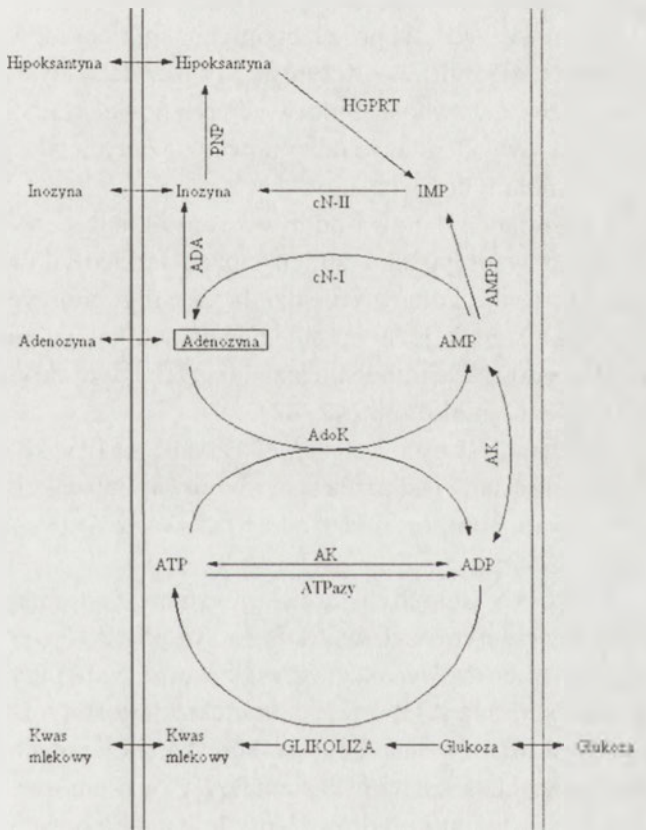
Metabolizm Ado w powiązaniu z metabolizmem energetycznym krwinki czerwonej przedstawiono na Ryc. 1.

### III. Przemiany mononukleotydów

Najprawdopodobniej w dojrzałych erytrocytach IMP nie jest istotnym źródłem AMP, ponieważ komórki te nie wykazują aktywności syntetazy adenilobursztynianowej (EC 6.3.4.4), kluczowego enzymu cyklu nukleotydów purynowych [26, 38]. Stąd w erytrocytach reakcja prowadząca do nieodwracalnej,

hydrolitycznej deaminacji AMP do IMP powinna być ściśle kontrolowana z powodu konieczności chronienia komórkowego ATP.

Powstały w erytrocytach AMP jest fosforylowany do ADP w reakcji katalizowanej przez kinazę adenylanową (AK, EC 2.7.4.3) [39]. Resynteza ATP z ADP odbywa się w reakcjach fosforylacji substratowej z udziałem kinazy fosfoglicerynianowej (PGK; EC 2.7.2.3) i kinazy pirogronianowej (PK, EC 2.7.1.40). Reakcje te są jedynym źródłem ATP w tych komórkach.



Ryc. 1. Metabolizm Ado w powiązaniu z metabolizmem energetycznym krwinki czerwonej.

GMP w reakcjach katalizowanych przez kinazy guanylanowe: kinazę monofosforanów nukleozydów (EC 2.7.4.8) i kinazę difosforanów nukleozydów (EC 2.7.4.6) jest fosforylowany odpowiednio do GDP i GTP [40]. Źródłem GMP w erytrocytach może być także IMP, który przy udziale dehydrogenazy IMP (EC 1.2.1.14) i NAD<sup>+</sup> jest utleniany do ksantyno-5'-monofosforanu (XMP). XMP po przyłączeniu grupy -NH<sub>2</sub> glutaminy w obecności ATP daje ostatecznie GMP. Ostatnia reakcja katalizowana jest przez syntetazę GMP (EC 6.3.5.2) współdziałającą z ATP [5].

Aktywność kinazy monofosforanów nukleotydów w ludzkich krwinkach czerwonych wynosi 0,35 U/mL komórek, co stanowi tylko ¼ aktywności AK, natomiast aktywność kinazy difosforanów nukleotydów (76,0 U/mL komórek) jest 60-krotną aktywnością AK i 200-krotną aktywnością kinazy GMP [41].

Pula nukleotydów adeninowych ( $TAN = [ATP] + [ADP] + [AMP]$ ), a także guaninowych ( $TGN = [GTP] + [GDP] + [GMP]$ ) w warunkach prawidłowych utrzymywana jest na stałym poziomie. Zachowanie stosunku stężeń  $[ATP]/[ADP]$  i  $[GTP]/[GDP]$  jest możliwe dzięki stałym przemianom nukleotydów purynowych (Ryc. 1).

Stosunek stężeń poszczególnych nukleotydów wewnątrz tej puli jest utrzymywany przede wszystkim przez aktywność kinazy adenylanowej, kinaz guanylanowych, a także enzymów związanych z katabolizmem tych związków.

Kinaza adenylanowa odgrywa rolę układu buforującego w przypadku zmian stężeń nukleotydów adeninowych. Jednocześnie działa jako regulator we wszystkich reakcjach przebiegających z udziałem nukleotydów adeninowych działających jako aktywatory bądź inhibitory [42, 43].

Wzajemny stosunek stężeń ATP, ADP, AMP w komórce określany jest przez stan równowagi w reakcji katalizowanej przez kinazę adenylanową:  $2 ADP \leftrightarrow ATP + AMP$

Reakcje te umożliwiają wykorzystanie fosforanu bogatoenergetycznego w ADP do syntezy ATP, refosforylację AMP, a także wzrost stężenia AMP przy spadku stężenia ATP. AMP jako efektor allosteryczny prowadzi do nasilenia reakcji katabolicznych skutkujących wzrostem stężenia ATP w komórce. Tak więc, składniki puli nukleotydów adeninowych są wzajemnie przekształcane w reakcjach katalizowanych przez AK, których stałe równowagi zbliżone są do jedności.

W warunkach fizjologicznych suma stężeń nukleotydów adeninowych nie ulega dużym zmianom, jednak skład puli nukleotydów zmienia się w zależności od aktywności różnych dróg metabolicznych.

W latach sześćdziesiątych A t k i n s o n wysunął hipotezę, według której pula nukleotydów adeninowych odzwierciedla poziom energii w komórce i decyduje o kierunku reakcji enzymatycznych [44].

Utrzymanie wysokiego potencjału fosforylacji wyrażonego bądź jako stosunek stężenia ATP (GTP) do iloczynu stężeń ADP (GDP) i  $P_i$ , bądź za pomocą wzoru Atkinsona, określającego ładunek energetyczny adenylanów (AEC) i guanylanów (GEC), jest wa-

runkiem wykorzystania energii zgromadzonej w postaci ATP i GTP [44].

$$AEC = \frac{[ATP] + 0,5[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

$$GEC = \frac{[GTP] + 0,5[GDP]}{[GTP] + [GDP] + [GMP]}$$

Teoretycznie wartości AEC i GEC mieszczą się w zakresie od 0 (gdy w układzie obecny jest tylko AMP bądź GMP) do 1 (gdy w układzie obecny jest tylko ATP bądź GTP). W warunkach homeostazy organizmu AEC i GEC krwinek czerwonych przyjmuje wartości 0,85-0,95 [45-47].

Wartość ładunku energetycznego adenylanów odzwierciedla najogólniej zdolność komórki do przeprowadzania procesów anabolicznych zależnych od ATP.

Stosunki stężeń nukleotydów adeninowych regulowane są bezpośrednio równowagą reakcji katalizowanej przez AK.

Ponieważ wartość AEC zależy od równowagi między ciągami reakcji wykorzystującymi ATP i szlakami metabolicznymi wytwarzającymi ATP, aktywność poszczególnych dróg metabolicznych jest regulowana wielkością AEC. Komórki stabilizują wartość AEC dostosowując szybkość reakcji wykorzystujących ATP do stanu zapotrzebowania na energię. Obniżenie wartości AEC prowadzi do wzrostu stężenia ATP. Zatem, jeśli procesy związane z zużyciem energii są aktywowane do stopnia, w którym wartość AEC obniża się, produkcja ATP jest gwałtownie przyspieszana by pokryć wzrost wydatkowanej energii [42].

W erytrocytach szybkość glikolizy, która jest jedynym źródłem ATP, kontrolowana jest przez PFK. W warunkach fizjologicznych przy prawidłowym stężeniu ATP i fruktozo-6-fosforanu enzym wykazuje tylko 0,1% swojej aktywności [48]. Aktywność erytrocytarnej PFK podlega regulacji przez efekторы, spośród których ATP jest najważniejszym inhibitorem, a AMP i  $P_i$  najsilniejszymi aktywatorami [49]. Wzrost stężenia ATP w komórce obniża powinowactwo enzymu do substratu [48]. Hamujące działanie ATP jest znoszone przez AMP, stąd aktywność PFK wzrasta w momencie obniżenia stosunku  $[ATP]/[AMP]$  i wzrostu stężenia  $P_i$ . Tak więc spadek stężenia ATP w komórce prowadzi do wzrostu aktywności PFK. Równocześnie dzięki reakcji katalizowanej przez AK wzrasta stężenie AMP — aktywatora PFK.

## IV. Katabolizm nukleotydów purynowych w krwinkach czerwonych

### IV-1. Katabolizm mononukleotydów

Szlaki przemian katabolicznych nukleotydów purynowych w pierwszych etapach przebiegają różnymi torami i rozpoczynają się defosforylacją mononukleotydów (AMP, IMP, GMP) do odpowiednich nukleozydów (Ado, Ino, Guo).

Hydrolityczne odszczepienie reszty fosforanowej z pozycji 5'-mononukleotydów odbywa się przy udziale wewnątrzkomórkowych 5'-NT (w odróżnieniu od ekto-5'-NT związanej z zewnętrzną powierzchnią błony komórkowej). Erytrocytarna, cytosolowa 5'-NT występuje w postaci kilku izoenzymów, które wyróżniono na podstawie preferencji substratowej [50]. Dowodem odrębności katalizowanych reakcji są badania kinetyczne wykazujące, że to cytosolowa 5'-NT specyficzna wobec AMP (cN-I) jest odpowiedzialna za uwolnienie Ado z AMP, podczas gdy cytosolowa 5'-NT specyficzna wobec IMP i GMP (cN-II) uwalnia Ino i Guo odpowiednio z IMP i GMP [51, 52].

Badania nad oczyszczoną, erytrocytarną cN-I wykazały, że jest ona białkiem o masie cząsteczkowej 36 kDa, w punkcie izoelektrycznym ( $pH=5,1$ ) monomerem, którego aktywność zależy od  $Mg^{2+}$ . Inhibitorami są jony metali ciężkich i związki z reaktywną grupą tiolową, aktywatorem zaś ADP, lecz nie ATP [53]. Wykazano również, że erytrocytarna cN-I wykazuje swoją aktywność przy wzroście stężenia AMP. Aktywność enzymu nie zależy od stężenia  $P_i$  [50, 52].

W prawidłowych erytrocytach rybosomalny RNA ulega degradacji do nukleotydów 5'-purynowych i 5'-pirymidynowych. Te są następnie defosforylowane przez 5'-NT. W retikulocytach z niedoborem cN-I rozkład rybosomalnego RNA jest zaburzony, co prowadzi do wzrostu stężenia nukleotydów — wśród nich 80% stanowią nukleotydy pirymidynowe. Deficyt cN-I związany jest z hemolityczną niedokrwistością niesferocytową [54, 55].

Erytrocytarna cN-II jest odpowiedzialna za uwolnienie Ino z IMP oraz Guo z GMP. Jest to białko enzymatyczne o masie cząsteczkowej 65 kDa [56], aktywowane przez ATP w obecności IMP jako substratu i hamowane przez  $P_i$  [51, 57]. Tak więc, aktywacja enzymu przez ATP zależy od stężenia substratu i  $P_i$ . Wykazano również, że cN-II nukleotydaza jest aktywowana przez 2,3-BPG [51, 58]. Ponadto stwierdzono, że ADP i 2,3-BPG mogą działać synergistycznie. Razem stymulują enzym 4-krotnie silniej, niż gdyby

wystąpił jedynie efekt addytywnego działania tych związków [58].

W warunkach fizjologicznych katabolizm AMP w erytrocytach przebiega głównie drogą deaminacji do IMP i  $NH_3$  w reakcji katalizowanej przez AMPD — enzym cytoplazmatyczny o wysokiej specyficzności substratowej w stosunku do AMP [30]. W badaniach *in vitro* wykazano, że erytrocyty inkubowane w płynie Ringera-Krebsa, w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (5 mM glukozy, 1,2 mM  $P_i$ ,  $pH=7,7$ ) utrzymują niezmiennie stężenia nukleotydów adeninowych przez kilka godzin. W warunkach tych szybkość powstawania Hyp jako końcowego produktu katabolizmu nukleotydów adeninowych w erytrocytach wynosi około 4 mmol/h/mL komórek i nie ulega zmianie po dodaniu inhibitorów ADA i AdoK. Wyniki tego eksperymentu wskazują na udział reakcji deaminacji AMP, a następnie defosforylacji IMP w powstawaniu Hyp w warunkach fizjologicznych [50].

Deaminaza AMP występuje w postaci kilku izoenzymów. W największych ilościach w wątrobie (izoenzym L), mięśniach szkieletowych (izoenzym M) i erytrocytach (izoenzym E) [59]. Izoenzym erytrocytarny występuje w dwóch formach molekularnych ( $E_1$  i  $E_2$ ) różniących się właściwościami kinetycznymi i będących potranskrypcyjnie zmodyfikowanymi produktami jednego genu *AMPD<sub>3</sub>*. Gen ten koduje białko o masie cząsteczkowej 89 kDa [60, 61]. Aktywna postać enzymu jest tetramerem o masie cząsteczkowej 285 kDa [62]. Punkt izoelektryczny dla tego enzymu określono w  $pH=5,0$ , a optymalne  $pH=7,0$  [62].

Krwinki czerwone cechują się wysoką aktywnością AMPD ( $V_{max}$  200 mmol/h/L komórek), stąd efektywna kontrola deaminacji AMP odgrywa istotną rolę w regulacji stężenia nukleotydów adeninowych w komórce (szczególnie ATP). Wykazano, że deaminaza AMP ma właściwości białka allosterycznego. Głównymi dotychczas rozpoznanymi aktywatorami erytrocytarnej deaminazy są jony metali:  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  oraz ATP i ADP. Natomiast  $P_i$ , IMP i 2,3-BPG hamują aktywność enzymu [61]. Znane są również doniesienia o aktywacji enzymu przez IMP. Dodanie 2-5 mM IMP do hemolizatów krwinek czerwonych zawierających 1 mM ATP i 3 mM 2,3-BPG prowadzi do 3-krotnego wzrostu szybkości deaminacji AMP [63]. W warunkach fizjologicznych niskie stężenie jonów  $Ca^{2+}$  i wysokie 2,3-BPG są przyczyną niewielkiej aktywności deaminazy AMP w krwinkach czerwonych [51, 61, 63]. Jon potasowy w stężeniu 100-150 mM, zbliżonym do fizjologicznych stężeń w komórkach, stabilizuje cząsteczkę deaminazy AMP w takiej konformacji, w której jest ona zdolna

do przyłączenia fizjologicznych ligandów — AMP, ATP i  $P_i$ . Enzym jest aktywowany przez substrat i hamowany przez produkt reakcji. Wykazano, że w obecności fizjologicznych stężeń efektorów (100 mM KCl, 3 mM 2,3-BPG, 1 mM  $P_i$ ) erythrocyty inkubowane w płynie Ringera-Krebsa (pH=7,4) z zawartością 5 mM glukozy i AMP w stężeniu 5-10  $\mu$ M cechują się niską aktywnością AMPD. Wzrost stężenia AMP do 50  $\mu$ M prowadzi do 15-krotnego wzrostu aktywności enzymu [50].

Pula nukleotydów adeninowych w komórce w istotny sposób zależy od reakcji katalizowanej przez AMPD. Znaczenie tej reakcji związane jest głównie z regulacją stężeń komponentów TAN i buforowaniem zmian wartości ładunku energetycznego adenylanów [42].

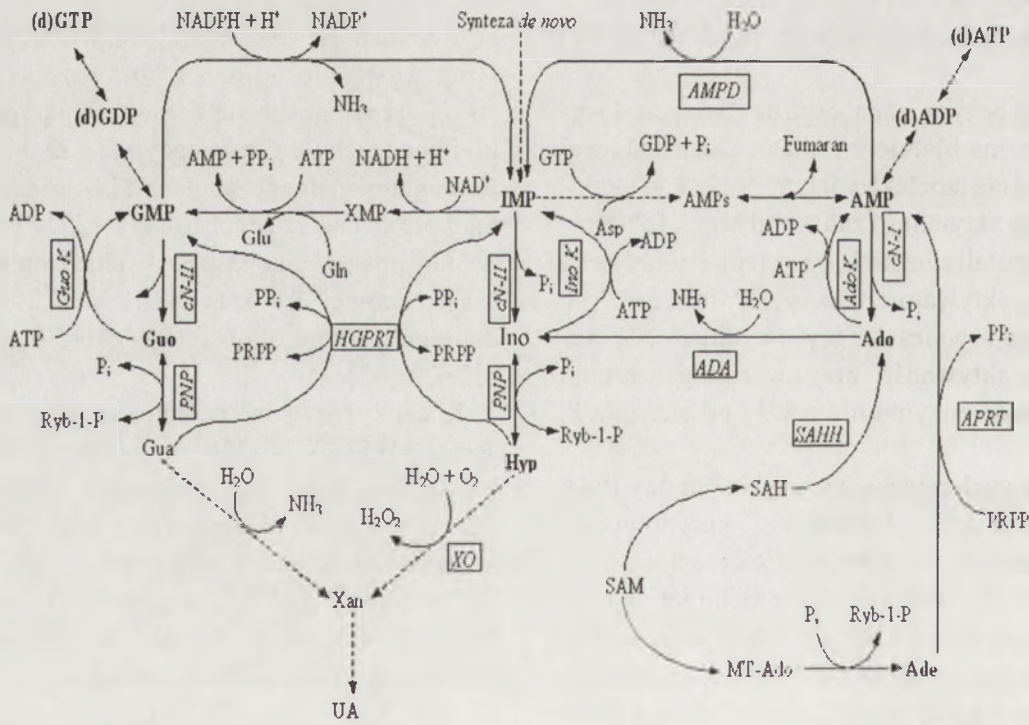
Wzrost stężenia AMP w komórce prowadzi do spadku wartości AEC. Zachodząca w wyniku działania AMPD deaminacja AMP przesuwą równowagę reakcji katalizowanej przez AK w kierunku

Działanie mechanizmu stabilizującego wartość ładunku energetycznego adenylanów jest szczególnie istotne w przypadku, kiedy w komórce zapotrzebowanie na energię przewyższa jej aktualną podaż [42]. Wykazano również, że działanie stabilizujące wartość AEC odbywa się kosztem obniżenia całkowitego stężenia nukleotydów adeninowych i całkowitego stężenia ATP. Badania doświadczalne wykazały, że obniżeniu wartości AEC erythrocytów towarzyszy spadek TAN [42, 45, 64].

Aktywność deaminazy AMP maleje w miarę wzrostu ładunku energetycznego adenylanów i w zakresie wartości fizjologicznych ma charakter liniowy.

IV-2. Katabolizm nukleozydów

Wiązanie glikozydowe Ino oraz wiązanie glikozydowe Guo może ulegać fosforolizie w reakcji katalizowanej przez PNP. Ino zostaje przekształcona w



Ryc. 2. Szlaki metabolizmu puryn w erythrocytach (linia ciągła) i poza nimi (linia przerywana).

syntezy ATP, co zapobiega drastycznemu obniżeniu wartości AEC. Wzrost stężenia ATP jest sygnałem do nasilenia przemian anabolicznych, co w konsekwencji prowadzi do uwolnienia znacznych ilości  $P_i$ , zahamowania aktywności deaminazy AMP oraz obniżenia bezwzględnej ilości ATP. Tak więc,  $P_i$  i ATP w niskich stężeniach hamują aktywność AMPD zapobiegając nadmiernemu obniżeniu puli nukleotydów adeninowych [50].

Hyp i Ryb-1-P, a Guo w Gua i Ryb-1-P. Badania nad aktywnością PNP ludzkich erythrocytów pozwoliły wykryć przypadki niedoboru tego enzymu prowadzące do wzrostu stężenia PRPP, Ino oraz  $NAD^+$ . Wykazano także zależność pomiędzy aktywnością PNP a stężeniem 2,3-BPG w krwinkach czerwonych. Przy wzroście aktywności PNP (wzrost stężenia Hyp i Ryb-1-P) dochodzi do wzrostu stężenia tego metabolitu.

Ado nie ulega fosforolizie do Ade, lecz jest metabolizowana albo przez refosforylację przy udziale AdoK do AMP, albo przez deaminację przy udziale ADA do Ino [65]. Przy niskich stężeniach Ado przeważającą przemianą jest jej fosforylacja do AMP, przy wyższych stężeniach przeważa procentowo deaminacja, mimo że następuje bezwzględny wzrost wydajności procesu fosforylacji [31]. Spośród dwóch izoenzymów ADA, izoenzym ADA<sub>1</sub> występuje wewnątrzkomórkowo m. in. w erytrocytach. Km dla ADA<sub>1</sub> wynosi  $5,2 \times 10^{-5}$ , a optimum pH 7-7,7. Dzięki jej aktywności komórki sprawnie wychwytyują adenozyne i 2'-deoksyadenozyne deaminując substraty odpowiednio do inozyny i 2'-deoksyinozyny. Tą drogą chronią komórki jądrzaste przed nadmiarem zewnątrzpochoźnej 2'-deoksyadenozyne [32]. Katalitycznie aktywne białko enzymu jest metaloenzymem (1 mol Zn<sup>2+</sup> przypada na 1 mol białka [66]). ADA<sub>1</sub> może funkcjonować w formie monomeru o masie cząsteczkowej 30-47 kDa i dimeru dwóch cząsteczek ADA<sub>1</sub> połączonych glikoproteiną w kompleks o masie cząsteczkowej 230-440 kDa [67].

Ze względu na to, że erytrocyty nie wykazują aktywności oksydoreduktazy ksantynowej (Hyp → Xan) i guanazy (Gua → Xan) (EC 3.5.4.3), Hyp i Gua są końcowymi produktami katabolizmu nukleotydów purynowych. Zasady te mogą być włączone w szlaki przemian jako substraty dla HGPRT (reakcje reutilizacji), a Ryb-1-P po izomeryzacji do Ryb-5-P może stać się substratem w syntezie PRPP, bądź może być włączony w przemiany na szlaku pentozofosforanowym, dostarczając produktów pośrednich glikolizie (aldehyd-3-fosfoglicerynowy i fruktozo-6-fosforan).

Szlaki metabolizmu puryn w erytrocytach przedstawiono na Ryc. 2.

Artykuł otrzymano 18 marca 2004

Zaakceptowano do druku 6 września 2004

## Piśmiennictwo

- Herzyk E (1982) *Post Biochem* 3: 251-273
- Bucki R, Sulpice JC, Giraud F, Górski J (1997) *Post Hig Med Dośw* 51: 637-650
- Siems WG, Sommerburg O, Grune T (2000) *Clin Nephrol* 53: 9-17
- Traut TW (1994) *Mol Cell Biochem* 140: 1-22
- Simmonds HA, Fairbank LD, Morris GS, Webster DR, Harley EH (1988) *Clin Chim Acta* 171: 197-210
- Baranowska-Bosiacka I, Hlynczak AJ (2003) *Com Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 134: 403-416
- Strumia MM, Strumia (1972) *Transfusion* 12: 68-73
- Becker MA, Meyer LJ, Huisman WH, Lazar C, Adams MB (1977) *J Biol Chem* 252: 3911-3918
- Meyer LJ, Becker MA (1977) *J Biol Chem* 252: 3919-3925
- Planet G, Fox IH (1976) *J Biol Chem* 251: 5839-5845
- Planet G, Fox IH (1977) *Adv Exp Med Biol* 76A: 64-69
- Tomoda A, Lachant NA, Noble NA (1983) *Br J Hematol* 54: 475-484
- Dische Z, Igals D (1963) *Arch Biochem Biophys* 101: 489-493
- Tanaka KR, Zerez CR (1990) *Hematol* 27: 165-185
- Yip LC, Roome S, Balis ME (1978) *Biochemistry* 17: 3286-3291
- Safranow K (1998) *Post Hig Med Dośw* 52: 89-104
- Crespillo J, Pilar L, Argomanzi L, Montero C (2003) *Mol Cell Biochem* 254: 359-363
- Wilson JM, Toole TE, Argos P, Shewach DS, Daddona PE, Kelley WN (1986) *J Biol Chem* 261: 13677-13683
- Bruyn CH, Oei TL (1977) *Adv Exp Med Biol* 76B: 139-144
- Chow DC, Kawahara FS, Saunders T, Sorensen LB (1970) *J Lab Clin Med* 76: 733-740
- Wilson JM, Landa LE, Kobayashi R, Kelley WN (1982) *J Biol Chem* 257: 14830-14834
- Krenitsky TA, Papaioannou R, Elion GB (1969) *J Biol Chem* 244: 1263-1269
- Smolenski RT, Fabianowska-Majewska K, Montero C, Duley JA, Fairbanks LD, Marlewski M, Simmonds HA (1992) *Biochem Pharmacol* 43: 2053-2057
- Mathews II, Erion MD, Ealick SE (1998) *Biochemistry* 37: 15607-15620
- Komarova S, Mosharov EV, Vitvitskii V, Ataullakhanov FI (1999) *Blood Cell* 25: 170-179
- Bontemps F, Vanden Berghe G, Hers G (1986) *J Clin Invest* 77: 824-830
- Jóźwiak Z (1985) *Post Hig Med Dośw* 39: 116-121
- Dąbrowska A (1997) *Post Hig Med Dośw* 51: 305-318
- Moser GH, Schrader J, Deussen A (1989) *Am J Physiol* 256: 799-806
- Paglia DE, Valentine WN, Nakatani M, Brockway RA (1986) *Blood* 67: 988-992
- Kim H.D (1990) *Biochim Biophys Acta* 1036: 113-120
- Rutkiewicz J (1991) *Pol Tyg Lek* 46: 5003-5006
- Deussen A (1993) *Am J Physiol* 264: 692-701
- Guieu R, Brunet P, Sampol J, Beckis G, Fenowillet E, Mege I, Capo C, Vitte J, Ibrahim Z, Carvega L, Lerda D, Rockat H, Berland Y, Dusol B (2001) *J Invest Med* 49: 56-67
- Plageman PG, Wohlhueter RM, Kraupp M (1985) *J Cell Physiol* 125: 330-335
- Cordero O, Salgado F, Nogueira M (1997) *Eur Respir J* 10: 2186-2187
- Olson R A, Pearson JD (1990) *Physiol Rev* 70: 761-815
- Smolenski RT, Montero C, Duley JA, Simmonds HA (1991) *Biochem Pharmacol* 42: 1767-1773
- Dzeja PP, Zeleznikar RJ, Goldberg ND (1998) *Mol Cell Biochem* 184: 169-182
- Carlucci F, Tabucchi A, Pagani R, Marinello E (1999) *Biochim Biophys Acta* 1454: 106-114
- Hochstadt-Ozer J, Stadtman ER (1971) *J Biol Chem* 246: 5294-5301
- Ataullakhanov FI, Vitvitskii VM (2002) *Bios Reports* 22: 501-511
- Kotelnikova AV (2001) *Biochemistry (Moscow)* 66: 816-817
- Atkinson DE, Walton GM (1967) *J Biol Chem* 242: 3239-3241
- Ataullakhanov FI, Vitvitskii VM, Komarova SV, Mosharov EV (1996) *Biochemistry (Moscow)* 61: 197-203
- English TE, Storey KB (2000) *Arch Biochem Biophys* 376: 91-100
- MacDonald JA, Storey KB (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 254: 244-249
- Fujii BS, Matsuda M, Okuya S, Yoshizaki Y, Mimura-Kora Y, Kaneko T (1987) *Blood* 70: 1211-1213
- Schirmer T, Evans PR (1990) *Nature* 343: 140-145
- Vanden Berghe G, Bontemps F (1990) *Biomed Biochim Acta* 49: 117-122

51. Bontemps F, Van den Berghe G, Hers WG (1988) *Biochem J* **250**: 687-696
52. Van den Berghe G, Bontemps F, Vincent MF (1988) *Adv Enzyme Regul* **27**: 297-311
53. Amici A, Magini G (2002) *Arch Biochem Biophys* **397**: 184-190
54. Valentine W, Finck K, Paglia DE, Harris SR, Adams WS (1974) *J Clin Invest* **54**: 866-879
55. Tomoda A, Noble N, Lachaut N (1982) *Blood* **60**: 1212-1218
56. Oka J, Matsumoto A, Hosokawa Y, Inolls S (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **205**: 917-922
57. Itoh R (1993) *Comp Biochem Physiol* **105**: 13-19
58. Pesi R, Baiocchi C, Tozzi MG, Carnici M (1996) *Biochim Biophys Acta* **1294**: 191-194
59. Ogasawara N, Goto H, Yamada Y, Watanabe T, Asano T (1982) *Biochim Biophys Acta* **714**: 298-306
60. Kaletha K, Gross M (1995) *Post Biochem* **41**: 183-187
61. Tavazzi B, Amorini AM, Fazzina G, Di Pierro D, Tuttobene M, Giardina B, Lazzarino G (2001) *J Biol Chem* **276**: 48083-48092
62. Yun SL, Suelter CH (1978) *J Biol Chem* **253**: 404-408
63. Engstrom I, Waldenstrom A, Ronguist G (1996) *Scand J Clin Lab Invest* **56**: 345-350
64. Joshi A, Palsson BO (1990) *J Theor Biol* **142**: 515-545
65. Mardanian SS, Sharoyan SG, Antonyan AA, Lupidy G, Cristalli G (2002) *Mol Cell Biochem* **67**: 930-938
66. Wilson DK, Rudolph FB, Quioch FA (1991) *Science* **252**: 1278-1284
67. Singh IS, Sharma R (2000) *Mol Cell Biochem* **204**: 127-134

# Transport glutaminy w ośrodkowym układzie nerwowym

## Glutamine transport in the central nervous system

MARTA SIDORYK

### Spis treści:

- I. Rola glutaminy w ośrodkowym układzie nerwowym
- II. Układy transportujące aminokwasy i ich rola w transporcie glutaminy
- III. Transport glutaminy w OUN: historia badań
- IV. Szczegółowa charakterystyka układów transportujących aminokwasy
  - IV-1. Układ A
  - IV-2. Układ N
    - IV-2.1. Białka układu N obecne w mózgu gryzoni i człowieka
    - IV-2.2. Regulacja układu N na poziomie białka
  - IV-3. Układ ASC
  - IV-4. Układ L
- V. Transport glutaminy przez barierę krew-mózg
- VI. Transport glutaminy a nowotwory OUN
- VII. Transport glutaminy a neuroprzekaznictwo
- VIII. Uwagi ogólne

### Contents:

- I. The role of glutamine in the central nervous system
- II. Systems transporting amino acids and their role in glutamine transport
- III. Glutamine transport in CNS: history of research
- IV. A detailed characteristic of the systems involved in amino acids transport
  - IV-1. System A
  - IV-2. System N
    - IV-2.1. System N proteins present in brain of rodents and human
    - IV-2.2. Regulation of System N at the protein level
  - IV-3. System ASC
  - IV-4. System L
- V. Glutamine transport at the blood-brain barrier
- VI. Glutamine transport and CNS tumors
- VII. Glutamine transport and neurotransmission
- VIII. Concluding remarks

**Wykaz stosowanych skrótów:** Ala — alanina; Asp — asparagina; BCH — kwas 2-aminobicyklokarboksylowy; Cys — cysteina; GABA — kwas  $\gamma$ -aminomasłowy; Gln — glutamina; Glu — kwas glutaminowy; Gly — glicyna; GS — syntetaza glutaminowa; His — histydyna; Leu — leucyna; MeAIB — kwas metyloizomasłowy; MSO — metionylosulfoksymina; Nedd4 — 2-ligaza ubikwitynowa; OUN — ośrodkowy układ nerwowy; PAG — glutaminaza aktywowana fosforanem; PKB — kinaza białkowa B; Pro — prolina; Ser — seryna; SGK — kinaza indukowana glikokortykoidami; Thr — treonina

### I. Rola glutaminy w ośrodkowym układzie nerwowym

L-Glutamina (Gln) jest ważnym substratem energetycznym i metabolitem zaangażowanym w szereg procesów komórkowych w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Stężenie Gln w komórkach mó-

zgu waha się w granicach 6-11 mM [1], z nieznacznymi różnicami w poszczególnych jego regionach [2]. Zewnątrzkomórkowe stężenie Gln mierzone w mikrodializatach różnych regionów mózgu wynosi od 0,13 mM do 0,5 mM [3]. Wysoka zawartość Gln w OUN [1] wskazuje na jej szczególne znaczenie w mózgu.

Gln pełni kluczową rolę w szeregu dróg metabolicznych w OUN. Bierze ona udział w metabolizmie amoniaku, przemianach energetycznych i syntezie neuroprzekazników aminokwasowych: pobudzającego kwasu glutaminowego (Glu) oraz hamującego kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA). Każda z tych funkcji wymaga kontrolowanego transportu Gln pomiędzy komórkami i wewnątrz komórek. Wobec braku w OUN pełnego cyklu mocznikowego, amoniak neutralizowany jest na drodze syntezy Gln z Glu i amoniaku. Synteza ta odbywa się wyłącznie w astrocytach, w reakcji katalizowanej przez syntetazę glutaminianową (GS) [4, 5]. Nowo zsyntetyzowana Gln bierze udział w wielu procesach w obszarze OUN (patrz poniżej), a jej nadmiar jest częściowo wyprowadzany przez barierę krew-mózg. Rola Gln jako substratu w metabolizmie energetycznym ko-

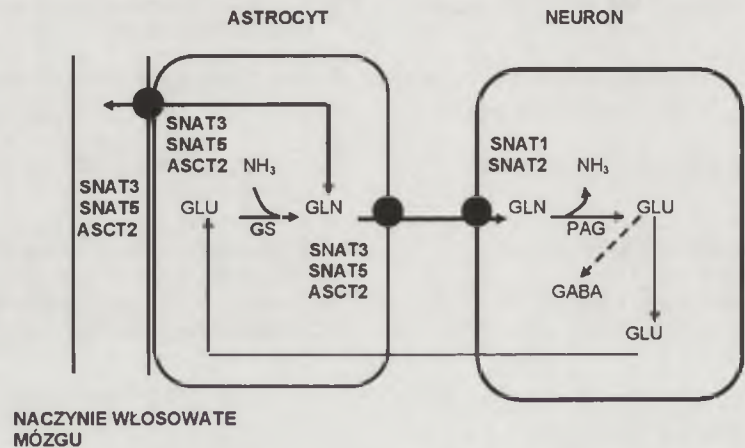
Mgr, Polska Akademia Nauk, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, Zakład Neurotoksykologii, ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa, e-mail: marthas@cmdik.pan.pl

mórki wiąże się z jej aktywnym transportem do wnętrza mitochondriów [6]. Proces ten jest silnie hamowany przez szereg aminokwasów, pełniących funkcję naturalnych modulatorów transportu Gln [7]. Kolejna funkcja Gln, wymagająca jej transportu, to udział w neuroprzekąźnictwie komórkowym. Gln ulega uwolnieniu z astrocytów i następnie jest transportowana do neuronów. W wyniku hydrolizy z udziałem glutaminazy aktywowanej fosforanem (PAG), z Gln powstaje pobudzający neuroprzekaznik – kwas glutaminowy [8]. Z kolei dekarboksylacja Glu prowadzi do tworzenia się neuroprzekaznika hamującego — kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego [9]. Uwolniony z neuronalnych zakończeń presynaptycznych Glu, po wychwycie przez astrocyty, jest następnie metabolizowany do Gln, co zamyka cykl Gln-Glu (Ryc. 1).

przez błony komórkowe uczestniczą przede wszystkim układy A, ASC, N oraz L.

### III. Transport glutaminy w OUN: historia badań

Transport aminokwasów w mózgu stanowi przedmiot zainteresowania badaczy już od ponad 30 lat. Przez długi czas panował pogląd, że Gln przechodzi przez błony komórkowe OUN na drodze prostej dyfuzji. Doniesienia kilku badaczy przemawiały za tym, że Gln po wypływie z astrocytów ulega następnie wychwytowi przez neurony [12, 13], ale nie wiadomo było, czy Gln przemieszcza się aktywnie pomiędzy tymi komórkami. Pierwszych danych charakteryzujących aktywny transport Gln dostarczyła praca wykonana przez Balcara i Johnstone'a



Ryc. 1. Współdziałanie astrocytów, neuronów i naczyń włosowatych tworzących barierę krew- mózg w szlaku przemian Glu-Gln oraz syntezie neuroprzekazników aminokwasowych. Udział w tych procesach białek transportujących glutaminę.

### II. Układy transportujące aminokwasy i ich rola w transporcie glutaminy

Przy tak dużej liczbie reakcji i zdarzeń komórkowych, w których uczestniczy glutamina, jej transport musi podlegać kontroli, stąd mnogość układów aktywnego transportu, a także mechanizmów kontrolujących ten proces.

Za transport aminokwasów przez błony komórkowe odpowiedzialne są integralne błonowe białka transportujące [10]. Klasyfikacja transporterów opiera się przede wszystkim na ich swoistości substratowej, zależności od pH, zależności od jonów i energii, zastępowalności Na<sup>+</sup> przez Li<sup>+</sup>, kinetyki transportu, czy wreszcie regulacji przez czynniki zewnętrzne. Pierwotnym kryterium podziału transporterów jest ich zależność od jonów Na<sup>+</sup>. Wyróżniamy zatem układy zależne od Na<sup>+</sup>, takie jak A, ASC, N, B<sup>0</sup> i niezależne, jak np. L, y<sup>+</sup>, b<sup>0</sup> [11]. W transporcie Gln

na skrawkach mózgu [14]. W tych czasach utrzymywano, że zakończenia nerwowe nie są zdolne do wychwytu Gln [15, 16]. Pogląd ten w późniejszych czasach skorygowano. Kolejno wykazano aktywny transport w izolowanych z mózgu błonach komórkowych [17], skrawkach kory mózgu [18, 19], hodowli pierwotnej astrocytów i neuronów [20, 21] oraz we frakcji astrocytarnej izolowanej z mózgu dorosłego szczura [22]. Już wcześniej nie było jasności co do zależności transportu od jonów Na<sup>+</sup>. Opisano zarówno transport niezależny [23, 24], jak i zależny od jonów Na<sup>+</sup> [14, 17]. Dopiero ostatnie lata przyniosły długą listę sklonowanych transporterów Gln, na której pokaźne miejsce zajmują transportery występujące w komórkach człowieka (Tab. 1). Badania transportu z ich udziałem wykazały cechy swoiste zarówno dla uprzednio opisanych układów transportowych, jak i dla Gln w stosunku do innych aminokwasów.

Tabela 1.

Białka transportujące glutaminę w komórkach OUN w hodowli i *in situ*

| Układ i poznane warianty (organizm) | Lokalizacja         | Odnośniki literaturowe |
|-------------------------------------|---------------------|------------------------|
| A                                   |                     |                        |
| SNAT1 (szczur)                      | neurony (hodowla)   | [30]                   |
| SNAT1 (człowiek)                    | mózg                | [32]                   |
|                                     | glejaki             | [63]                   |
| SNAT2 (szczur)                      | neurony (hodowla)   | [35]                   |
|                                     | mózg                | [34]                   |
| SNAT2 (człowiek)                    | mózg                | [39]                   |
| ASC                                 |                     |                        |
| ASCT1 (człowiek)                    | mózg                | [57]                   |
| ASCT1 (szczur)                      | neurony (hodowla)   | [58]                   |
| ASCT2 (szczur)                      | astrocyty (hodowla) | [60]                   |
| ATB <sup>o</sup> (człowiek)         | glejaki             | [63]                   |
| N                                   |                     |                        |
| SNAT3 (szczur)                      | astrocyty (hodowla) | [37]                   |
|                                     | śródbłonek naczyń   | [43]                   |
| NAT (mysz)                          | mózg                | [48]                   |
| NAT2 (mysz)                         | mózg                | [49]                   |
| SNAT3 (człowiek)                    | mózg                | [50]                   |
|                                     | glejaki             | [63]                   |
| SNAT5 (człowiek)                    | mózg                | [51]                   |
|                                     | glejaki             | [63]                   |
| L                                   |                     |                        |
| LAT1 (szczur)                       | glejak C6           | [69]                   |
|                                     | śródbłonek naczyń   | [76, 77]               |
| LAT1 (człowiek)                     | mózg                | [68]                   |
| LAT2 (szczur)                       | mózg                | [71]                   |
| LAT2 (człowiek)                     | mózg                | [72]                   |
| LAT2 (mysz)                         | mózg                | [72]                   |
| LAT2 (królik)                       | mózg                | [73]                   |

IV. Szczegółowa charakterystyka układów transportujących aminokwasy

IV-1. Układ A

Układ A jest jednym z pierwszych opisanych układów transportujących aminokwasy [25]. Układ ten jest aktywny wyłącznie w obecności jonów Na<sup>+</sup>. Poza glutaminą wykazuje on powinowactwo do krótkich obojętnych aminokwasów, takich jak alanina (Ala), seryna (Ser), prolina (Pro) i glicyna (Gly). Transport aminokwasów przez układ A jest stymulowany w środowisku zasadowym i w przeciwieństwie do układu N (por. następny podrozdział) nie jest sprzężony z wymianą na jony H<sup>+</sup> [26]. Unikalną cechą układu A jest zdolność do transportu amino-

kwasów N-metylowanych, których modelowym przedstawicielem jest kwas N-metyloizomastłowy (MeAiB) [27]. Istotną cechą omawianego układu jest jego regulacja przez czynniki zewnętrzne: jest on aktywowany przez hormony i niedobór aminokwasów [28, 29].

Pierwszym dobrze opisanym wariantem układu A na poziomie molekularnym był otrzymany z neuronów szczura transporter SNAT1 (SA2, GlnT, ATA1)\* [30-33]. Izoforma ta preferencyjnie rozpoznaje glutaminę i występuje głównie w sercu i mózgu. U człowieka SNAT1 (ATA1) został wyizolowany z łożyska [32]. Transporter ten występuje poza mózgiem w sercu i wątrobie. SNAT1 człowieka wykazuje 93% identyczności i 95% podobieństwa do SNAT1 szczura.

\*Przyjęto ostatnio ujednoliconą nomenklaturę transporterów (33). W nawiasach podano nazwy układów obowiązujące wcześniej.

Innym przedstawicielem systemu A jest SNAT2 (ATA2, SA1) wyizolowany z hodowli szczurzych neuronów glutaminianergicznych [33-35]. Izoforma ta wykazuje 55% identyczności z omawianym już SNAT1 szczura i w przeciwieństwie do niego rozpoznaje glutaminę w równym bądź mniejszym stopniu jak inne aminokwasy obojętne. Inną cechą odróżniającą oba transportery jest powszechność występowania wariantu SNAT2 w wielu tkankach. Izoforma ta wykazuje silne pokrewieństwo na poziomie sekwencji i właściwości transportowych do przedstawiciela układu N — SNAT3. Główną cechą odróżniającą oba transportery jest brak translokacji aminokwasów z jonami  $H^+$  w przypadku SNAT2 [36-38]. SNAT2 człowieka wyizolowany został z linii komórkowej wątrobiaka HepG2 [39]. Transporter ten wykazuje 88% identyczność i 93% podobieństwo sekwencji aminokwasowej ze SNAT2 u szczura. Podobnie jak SNAT2 szczura, transporter ludzki występuje powszechnie w różnych tkankach, takich jak m.in. łożysko, serce, śledziona, mięśnie, płuca, mózg. Wariant ten wykazuje wiele cech wspólnych z transporterem SNAT1, takich jak brak tolerancji na jony  $Li^+$  oraz zależność od jonów  $Na^+$  i pH.

## IV-2. Układ N

### IV-2.1. Białka układu N obecne w mózgu gryzoni i człowieka

Układ N wydaje się być najbardziej swoisty dla glutaminy. Układ ten wykazuje wąską specyficzność substratową rozpoznając aminokwasy z azotem w łańcuchu bocznym, a zatem obok glutaminy, histydynę (His) i asparaginę (Asp). Po raz pierwszy układ ten opisano na w hepatocytach [40], a następnie w mięśniach [41] i neuronach szczurów [42].

Pierwszym wyizolowanym z mózgu transporterem układu N jest SNAT3 (SN1) szczura [33, 37]. Izoforma ta odpowiedzialna jest za transport glutaminy w obu kierunkach: na zewnątrz i do wnętrza astrocytu [43]. Aktywność transportowa SNAT3 jest zależna od jonów  $Na^+$ , toleruje  $Li^+$  i pH. Transport Gln związany jest z wymianą na jony  $H^+$  i może odbywać się w sposób elektroobojętny bądź elektrogeny [37, 44]. W mózgu SNAT3 występuje swoicie w astrocytach. Ponadto spotyka się go w dużych stężeniach w nerce i wątrobie [45]. Najnowsze badania immunohistochemiczne pozwoliły zlokalizować SNAT3 w komórkach endotelialnych i splotach naczyń mózgu [43, 46]. Badania nad lokalizacją wykazały wysokie stężenie tego transportera we wszystkich fazach rozwojowych mózgu szczura. Za-

obserwowano również wyraźną korelację między podwyższonym poziomem SNAT3 a wzrostem stężenia neuroprzekazników aminokwasowych: GABA i Glu. W trakcie rozwoju embrionalnego mózgu ekspresja genu kodującego ten transporter wykazuje korelację ze zmieniającym się stężeniem glutaminy [43]. SNAT3 uczestniczy w transporcie Gln przez barierę krew-mózg [46, 47].

Innym wariantem układu N jest wyizolowany z wątroby myszy NAT. Izoforma ta występuje również w mózgu. NAT wykazuje silne powinowactwo do His i Gln [48]. Kolejnym transporterem przynależnym do układu N jest NAT2 myszy [49]. Transporter ten swą nazwę zyskał z powodu silnej homologii z NAT. NAT2 wykazuje silne powinowactwo do Gln, częściowo toleruje  $Li^+$ . Transporter ten występuje przede wszystkim w siatkówce i w nieco mniejszym stężeniu w mózgu.

Pierwszym znanym transporterem przynależnym do omawianego układu u człowieka jest wyizolowany z linii komórkowej wątrobiaka HepG2 SNAT3 (SN1) [33, 50]. SNAT3 człowieka wykazuje 90% identyczności i 91% podobieństwa w składzie aminokwasowym ze SNAT3 szczura, a także silną homologię z omawianymi już transporterami SNAT1 i SNAT2. Transport Gln przez ludzki SNAT3 sprzężony jest z transportem dwu jonów  $Na^+$  i przeniesieniem w odwrotnym kierunku jednego jonu  $H^+$ . Transporter ten wykazuje powinowactwo do His, Asp, Ala, a ponadto jest zależny od pH i jonów  $Na^+$ , toleruje zastąpienie  $Na^+$  jonami  $Li^+$ . SNAT3 występuje u człowieka głównie w wątrobie, nerce i mózgu.

Kolejnym przedstawicielem układu N jest wyizolowany z linii komórek wątrobowych człowieka SNAT5 (SN2) [33, 51]. Wariant ten wykazuje 62% identyczność składu aminokwasowego ze SNAT3 szczura. Oprócz aminokwasów transportowanych przez SNAT3, SNAT5 dodatkowo rozpoznaje Ser i Gly, a także wykazuje silniejsze powinowactwo do His niż do Gln. SNAT5 w przeciwieństwie do SNAT3 występuje powszechnie w wielu narządach. Obecność obu wariantów stwierdzono we wszystkich badanych regionach mózgu, takich jak m.in. mózdzek, kora, płaty czołowe, płaty boczne.

### IV-2.2. Regulacja układu N na poziomie białka

Najnowsze prace donoszą o mechanizmie regulującym aktywność układu N. Znany jest wpływ liganzy ubikwitynowej (Nedd 4-2), kinazy indukowanej glikokortykoidami (SGK) oraz kinazy białkowej B (PKB) na aktywność transportera SNAT3 [52]. Nedd4-2 jako regulator białek kanałów błonowych

[53] silnie hamuje transport glutaminy przez SNAT3. Efekt ten jest znoszony przez kinazy SGK i PKB. Wydaje się, że fosforylacja Nedd4-2 przez kinazę SGK osłabia powinowactwo ligazy ubikwitynowej do białka docelowego, jakim jest SNAT3. W konsekwencji nie dochodzi do ubikwitynizacji, internalizacji i degradacji transportera. Kontrola SNAT3 przez SGK może okazać się istotna w regulacji transportu glutaminy, szczególnie w warunkach jej nadmiaru bądź niedoboru. W dodatku wiadomo, że aktywacja kinazy SGK odbywa się przy braku aminokwasów w środowisku [54], a także pod wpływem hormonów i cytokin [55].

#### IV-3. Układ ASC

**Układ ASC** swą nazwę pozyskał z uwagi na to, że transportuje on Ala, Ser, cysteinę (Cys), treoninę (Thr). Wiadomo jednak, że ma również silne powinowactwo do glutaminy. Układ ten wykazuje cechy zależności od jonów  $\text{Na}^+$ , jest mało wrażliwy na pH, nie toleruje  $\text{Li}^+$  [56].

Pierwszą poznaną izoformą tego układu jest ASCT1. Transporter ten wyizolowano zarówno z mózgu ludzkiego [57], jak i szczurzego [58]. ASCT1 człowieka i szczura nie ma jednak powinowactwa do Gln.

Kolejny transporter przynależny do omawianego układu — ASCT2, został wyizolowany z jąder myszy. Transporter ten powszechnie występuje w wielu tkankach, jakkolwiek wydaje się być nieobecny w mózgu myszy [59]. Z kolei ASCT2 szczura wykazuje silną ekspresję genu kodującego ten transporter w hodowli astrocytów. Nie wykazano natomiast ekspresji genu kodującego ASCT2 w hodowanych neuronach. U szczurów ASCT2 występuje w mózgu, zarówno we wczesnych stadiach rozwojowych, jak i u osobników dojrzałych [60]. Transporter ten odpowiedzialny jest za wyrzut Gln z astrocytów na zasadzie wymiany z zewnątrzkomórkowymi aminokwasami obojętnymi. ASCT2 może katalizować zarówno napływ, jak i wypływ Gln. Transport aminokwasów odbywa się w sposób elektrooobojętny. Kolejnym transporterem przynależnym do układu ASCT jest wyizolowany z jelita królika ATB<sup>0</sup>. Transporter ten występuje w mózgu [61].

Znany jest również transporter należący do omawianego systemu, ATB<sup>0</sup> wyizolowany z nabłonka kosmówkowego łożyska ludzkiego [62]. Transporter ten wykazuje 76% homologię z omawianym już ASCT2 szczura i występuje w wielu tkankach, przede wszystkim w nerce, łożysku, jelicie, mózgu [62, 63]. ATB<sup>0</sup> człowieka wykazuje silne powinow-

actwo do Ala, Ser, Cys, Thr. Transport Gln z jego udziałem odbywa się w sposób elektrooobojętny.

#### IV-4. Układ L

**Układ L** cechuje wysokie powinowactwo do leucyny (Leu) i słabsze do glutaminy [25]. Pomimo tego obserwowano transport Gln przez układ L zarówno w neuronach, jak i astrocytach [64, 65]. Inną cechą odróżniającą ten układ od uprzednio omawianych jest jego niezależność od jonów  $\text{Na}^+$  [66] oraz hamowanie przez niemetabolizowalny analog aminokwasowy, kwas 2-aminobicyklokarboksylowy (BCH) [27].

Cechy czynnościowe pierwszej poznanej izoformy LAT1 tego układu opisano u człowieka [67, 68] i szczura [69]. Kolejnym poznany u człowieka [70], szczura [71], myszy [72], królika [73] przedstawicielem układu L jest wariant LAT2. Obie izoformy, pomimo wysokiej homologii sekwencji aminokwasowych, silnie różnią się między sobą właściwościami kinetycznymi i lokalizacją narządową. LAT2 wykazuje zdecydowanie silniejsze powinowactwo do Gln [69, 71] i występuje powszechniej w różnych tkankach niż LAT1 [70, 73]. Oba warianty różni także wrażliwość na pH środowiska. Transporter LAT1 nie jest zależny od pH, natomiast aktywność transportowa LAT2 jest stymulowana przy niskim pH [73].

Bardzo istotną cechą omawianego układu jest jego udział w transporcie glutaminy przez barierę krew-mózg.

#### V. Transport glutaminy przez barierę krew-mózg

Utworzona przez komórki endotelialne naczyń mózgu i ich ścisłe połączenia bariera krew-mózg stanowi fizyczną przeszkodę dla cząstek nierozpuszczalnych w tłuszczach, w tym aminokwasów. W efekcie stężenie aminokwasów na obwodzie jest znacząco wyższe niż w OUN. Wyjątek stanowi L-Gln, której aktywna synteza w mózgu sprawia, że jej stężenie w tej tkance jest bliskie stężeniu w płynie mózgowo-rdzeniowym i we krwi [46]. Przez długie lata transport glutaminy przez barierę krew-mózg przypisywano głównie układowi L [71, 74-76]. Co prawda w komórkach endotelialnych mózgu występuje transporter LAT1 [77], nie rozpoznaje on jednak preferencyjnie Gln. Najnowsze badania transportu glutaminy przez barierę krew-mózg wykazały cechy typowe dla aktywności układu N. Stwierdzono zależność transportu od jonów  $\text{Na}^+$  i pH, a co więcej — niewrażliwość na substraty układów A, ASC, L [47,

78, 79]. W dodatku najnowsze badania wykazały obecność transportera SNAT3 i SNAT5 w komórkach endotelialnych i epitelialnych mózgu [43]. Wydaje się, że system N w największym stopniu uczestniczy w transporcie glutaminy przez barierę krew-mózg. Układ ten może pełnić funkcję regulatora poziomu Gln, a co za tym idzie również azotu w mózgu.

## VI. Transport glutaminy a nowotwory OUN

Istnieje wiele danych przemawiających za szczególnym znaczeniem glutaminy dla wzrostu, migracji i różnicowania nowotworów tak w OUN, jak i w tkankach obwodowych. L-glutamina jest głównym substratem energetycznym w wielu liniach nowotworowych [80, 81]. Zaobserwowano też zależność między tempem syntezy DNA i białek w hodowli komórek wyprowadzonych z tkanki nowotworowej a stężeniem tego aminokwasu w pożywce [82]. Komórki nowotworowe cechuje duża aktywność dokomórkowego transportu Gln. Stwierdzono to w homogenatach nowotworów oraz unieśmiertelniczonych liniach nowotworowych [83-85].

Cechą wspólną nowotworów obwodowych i występujących w OUN jest zwiększona ekspresja genu kodującego transporter ASCT2 w stosunku do odpowiednich tkanek nietransformowanych. Nowotwory cechuje również wzrost udziału ASCT2 w transporcie glutaminy do wnętrza komórek. Dotyczy to nowotworów okrężnicy [86], wątroby, proliferujących *in vitro* komórek wątroby [87] czy też linii wyprowadzonych z nowotworów OUN [82, 88, 89].

Wyraźne różnice w ekspresji mRNA genów kodujących białka transportujące Gln w stosunku do tkanki zdrowej zaobserwowano w złośliwych guzach mózgu. W przypadku guzów o najwyższym stopniu złośliwości, takich jak *glioblastoma multiforme* i *astrocytoma anaplasticum* wykazano silną ekspresję genu kodującego transporter SNAT3 oraz ASCT2. Co ciekawe, zwiększona ekspresja genu kodującego SNAT3 była swoista dla glejaków złośliwych, podczas gdy podwyższoną ekspresję genu kodującego ASCT2 obserwowano również w przerzutach i guzach o niższej złośliwości. Z kolei w linii wyprowadzonej z glejaków uzyskanych podczas zabiegów operacyjnych następował swoisty zanik ekspresji genu kodującego transporter SNAT3. SNAT3 należy zatem uznać za marker glejaków złośliwych *in situ* [63].

## VII. Transport glutaminy a neuroprzeżywalność

W przeciwieństwie do kwasu glutaminowego, którego transport i rola w cyklu Glu-Gln zostały dość dokładnie przebadane [90], tylko nieliczne prace mówią o transporcie glutaminy w kontekście regulacji neuroprzeżywalności aminokwasowego. W niedawno opublikowanej pracy [91] badano wychwyt glutaminy i jej kompartmentację w cyklu Glu-Gln w skrawkach kory mózgu za pomocą znakowanych izotopowo substratów, z użyciem inhibitorów układów zaangażowanych w transport Gln. Aktywność transportową układu N hamowano histydyną, natomiast układu A — kwasem metyloizomasłowym. Zawartość substratów oznaczano metodą chromatografii cieczowej oraz spektroskopii masowej. Podanie egzogennej glutaminy wiązało się ze wzrostem jej względnej zawartości w ogólnej puli metabolitów komórkowych. Traktowanie MeAIB bądź His hamowało wychwyt glutaminy, a jednocześnie obniżało zawartość nowo zsyntetyzowanych neuroprzeżywalności aminokwasowych Glu i GABA. Nie wykazano kompensacji puli tych neuroprzeżywalności na drodze neuronalnej syntezy *de novo* z metabolitów pośrednich cyklu Krebsa [91].

Ciekawych danych dostarczyły badania elektrofizjologiczne w modelu padaczki *in vitro* [92]. Badania prowadzono na skrawkach i hodowli pierwotnej hipokampa, w warunkach imitujących schorzenie przez hamowanie neurotransmisji z udziałem GABA. W celu zablokowania cyklu Glu-Gln użyto inhibitora układu A — MeAIB oraz swoistego inhibitora GS, metionylsulfoksyminy (MSO). Zarówno hamowanie wychwytu glutaminy przez neurony, jak i zablokowanie jej syntezy, w wyraźny sposób osłabiało wyładowania, co świadczyło o zahamowaniu neuroprzeżywalności glutaminianergicznego.

## VIII. Uwagi ogólne

Wiedza uzyskana dotąd na temat transportu glutaminy w ośrodkowym układzie nerwowym wskazuje na jego szczególną rolę w regulacji syntezy neuroprzeżywalności aminokwasowych. Udział poszczególnych transporterów zilustrowano na Ryc. 1. SNAT3, a w pewnym stopniu także SNAT5 i ASCT2 katalizują transport nowo zsyntetyzowanej glutaminy z astrocytów do przestrzeni pozakomórkowej. Stąd za pośrednictwem SNAT1, a częściowo SNAT2, Gln przenoszona jest do neuronów, stając się

źródłem Glu i GABA. Nadmiar glutaminy przechodzi przez stanowiące barierę krew-mózg komórki śródbłonna naczyń do łożyska naczyniowego, a proces ten katalizowany jest głównie przez SNAT3 i SNAT5.

Inne zagadnienie to rola aktywnego transportu glutaminy w procesach nowotworzenia. Jeżeli okaże się, że zwiększona ekspresja i aktywność SNAT3 w glejakach jest czynnikiem determinującym proliferację czy migrację guza, transporter ten może w przyszłości stać się celem interwencji terapeutycznych.

## Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Panu Prof. dr hab. Janowi Albrechtowi za cenne wskazówki i pomoc w trakcie powstawania niniejszej pracy.

Artykuł otrzymano 27 maja 2004

Zaakceptowano do druku 13 września 2004

## Piśmiennictwo

- Erecińska M, Silver I A (1990) *Progr Neurobiol* 35: 245-296
- Zachin G, Rigotti P, Dussini N, Vassanelli P, Battistin L (1979) *J Neurosci Res* 4: 301-310
- Bröer S, Brookes N (2001) *J Neurochemistry* 77: 705-719
- Norenberg MD (1979) *Histochem Cytochem* 27: 756-762
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) *Brain Res* 161: 303-310
- Minn A (1982) *Neuroscience* 7: 2859-2865
- Albrecht J, Dolińska M, Hilgier W, Lipkowski AW, Nowacki J (2000) *Neurochem Int* 36: 341-347
- Laake JH, Slyngstad TA, Haug FM, Ottersen OP (1995) *J Neurochem* 65: 871-881
- Sonnwald U, Westergaard N, Schousboe A, Svendes JS, Unsgard G, Petersen SB (1993) *Neurochem Int* 22: 19-29
- Palacin M, Estevez R, Betran J, Zorzano A (1998) *Physiol Rev* 78: 969-1054
- Bode BP (2001) *J Nutr* 131: 2475S-2485S
- Vanden Berg CJ, Garfinkel D (1971) *Biochem J* 123: 211-218
- Bradford HF, Ward HK (1976) *Brain Res* 110: 115-125
- Balcar VJ, Johnston GA (1975) *J Neurochem* 2: 875-879
- Roberts PJ, Keen P (1974) *Brain Res* 67: 352-357
- Baldessarini RJ, Yorke C (1974) *J Neurochem* 23: 839-848
- Roon RJ, Shofner SA, Koerner JF (1989) *Biochem* 28: 8083-8087
- Duce IR, Keen P (1983) *Neuroscience* 8: 861-866
- Benjamin AM, Verjee ZH, Quastel JH (1980) *J Neurochem* 35: 78-87
- Brookers NJ (1993) *Neurochem* 60: 1923-1928
- Su TZ, Campbell GW, Oxender DL (1997) *Brain Res* 16: 69-78
- Albrecht J (1989) *Neuropharmacology* 28: 885-887
- Hertz L, Yu A, Svenneby G, Kvamme E, Fosmark H, Schousboe A (1980) *Neurosci Lett* 16: 103-109
- Ramaharoband N, Borg J, Mandel P, Mark J (1982) *Brain Res* 244: 113-121
- Oxender DL, Christensen HN (1963) *Nature* 197: 765-767
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Edwards RH (2002) *J Cell Biol* 157: 349-355
- Christensen HN, Liang M (1965) *J Biol Chem* 240: 3601-3608
- Dall'Asta V, Bussolati O, Sala R, Parolari A, Alamanni F, Biglioli P, Gazzola GC (1999) *Am J Physiol* 276: C865-872
- Kilberg MS, Barber EF, Handlogten ME (1985) *Curr Top Cell Reg* 25: 133-163
- Mackenzie B, Schafer MK, Erickson JD, Hediger M A, Weihe E, Varoqui H (2003) *J Biol Chem* 278: 23720-23730
- Varoqui H, Zhu H, Yao D, Ming H, Erickson JD (2000) *J Biol Chem* 275: 4049-4054
- Wang H, Huang W, Sugawara M, Devoe LD, Leibach F H, Prasad PD, Ganapathy V (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 273: 1175-1179
- Mackenzie B, Erickson JD (2004) *Pflugers Arch* 447: 784-95
- Sugawara M, Nakanishi T, Fei YJ, Huang W, Ganapathy ME, Leibach FH, Ganapathy V (2000) *J Biol Chem* 275: 16473-16477
- Yao D, Mackenzie B, Ming H, Varoqui H, Zhu H, Hediger M A, Erickson JD (2000) *J Biol Chem* 275: 22790-22797
- Reimer RJ, Chaudhry FA, Gray AT, Edwards RH (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 7: 7715-7720
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Krizaj D, Barber D, Strom-Mathisen J, Copenhagen DR, Edwards RH (1999) *Cell* 99: 769-780
- Chaudhry FA, Schmittz D, Reimer RJ, Larsson P, Gray AT, Nicoll R, Kavanaugh M, Edwards RH (2002) *J Neuroscience* 22: 62-72
- Hatanaka T, Huang W, Wang H, Sugawara M, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V (2000) *Biochim Biophys Acta* 1467: 1-6
- Kilberg MS, Handlogten ME, Christensen HN (1980) *J Biol Chem* 255: 4011-4019
- Hundal HS, Rennie MJ, Watt PW (1987) *J Physiol* 393: 283-305
- Tamarapparo BK, Raizada MK, Kilberg MS (1997) *J Neurochem* 68: 954-960
- Boulland JI, Rafiki A, Levy LM, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA (2003) *Glia* 41: 260-75
- Bröer A, Albers A, Setawan I, Edwards RH, Chaudhry FA, Lang F, Wagner CA, Bröer S (2002) *J Physiol* 539: 3-14
- Boulland JI, Osen KK, Levy LM, Danbolt NCh, Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA (2002) *Eur J Neurosci* 15: 1615-1631
- Xiang J, Ennis SR, Abdelkarim GE, Fujisawa M, Kawai N, Keep RF (2003) *Neurochem Intern* 43: 279-28878
- Ennis SR, Kawai N, Ren X-d, Abdelkarim GE, Keep (1998) *J Neurochem* 71: 2565-73
- Gu S, Roderick HL, Camacho P, Jiang JX (2000) *Proc Natl Acad Sci* 97: 3230-3235
- Gu S, Roderick HL, Camacho P, Jiang JX (2001) *J Biol Chem* 276: 24137-24144
- Fei YJ, Sugawara M, Nakanishi T, Huang W, Wang H, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V (2000) *J Biol Chem* 275: 23707-23717
- Nakanishi T, Sugawara M, Huang W, Martindale R G, Leibach FH, Ganapathy M E, Prasad PD, Ganapathy V (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 281: 1343-1348
- Boehmer Ch, Okur F, Setiawan I, Bröer S, Lang F (2003) *Biochem Biophys Research Commun* 306: 156-162
- Anan T, Nagata Y, Koga H, Honda Y, Yabuki N, Miyamoto C, Kuwano A, Matsuda I, Endo F, Saya H, Nakao M (1998) *Genes Cells* 3: 751-763
- Waklegger S, Barth P, Raber G, Lang F (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1440-1445
- Lang F, Cohen P (2001) *Sci STKE* 108: RE 17
- Medina V, Lorenzo A, Diaz M (2001) *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R612-622

57. Arriza JL, Kavanaugh MP, Fairman WA, Wu YN, Murdoch GH, North RA, Amara SG (1993) *J Biol Chem* **268**: 15329-15332
58. Yamamoto T, Nishizaki I, Nukada T, Kamegaya E, Furuya S, Hirabayashi Y, Ikeda K, Hata H, Kobayashi H, Sora I, Yamamoto H (2004) *Neurosci Res* **49**: 101-111
59. Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y (1996) *J Biol Chem* **271**: 14883-14890
60. Bröer A, Brookes N, Ganapathy V, Dimer KS, Wagner CA, Lang F, Bröer S (1999) *J Neurochem* **73**: 2184-2194
61. Kekuda R, Torres-Zamorano V, Fei YJ, Prasad PD, Li HW, Mader LD, Leibach FH, Ganapathy V (1997) *Am J Physiol* **272**: G1463-G1472
62. Kekuda R, Prasad PD, Fei YJ, Torres-Zamorano V, Sinha S, Yang Feng TL, Leibach FH, Ganapathy V (1996) *J Biol Chem* **271**: 18657-18661
63. Sidoryk M, Matyja E, Dybel A, Zielinska M, Bogucki J, Jaskólski DJ, Liberski PP, Kowalczyk P, Albrecht J (2004) *Neuroreport* **15**: 575-579
64. Nagaraja TN, Brookes N (1996) *J Neurochem* **66**: 1665-1674
65. Su TZ, Campbell GW, Oxender DL (1997) *Brain Res* **757**: 16473-6477
66. Brookes N (1992) *J Neurochem* **59**: 227-235
67. Mastroberardino L, Spindler B, Pfeiffer R, Skelly P J, Loffing J, Shoemaker CB, Verrey F (1998) *Nature* **395**: 288-291
68. Prasad PD, Wang H, Huang W, Kekuda R, Rajan DP, Leibach FH, Ganapathy V (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **255**: 283-288
69. Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H (1998) *J Biol Chem* **273**: 23629-23632
70. Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacin M (1999) *J Biol Chem* **274**: 19738-19744
71. Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y (1999) *J Biol Chem* **274**: 19745-19751
72. Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, Kuhn LC (1999) *J Biol Chem* **274**: 34948-34954
73. Rajan DP, Kekuda R, Huang W, Devoe LD, Leibach F H, Prasad PD, Ganapathy V (2000) *Biochim Biophys Acta* **1463**: 6-14
74. Smith QR (2000) *J Nutr* **130**: 1016S-1022S
75. Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12079-12084
76. Matsuo H, Tsukada S, Nakata T, Chairoungdua A, Kim DK, Cha SH, Inatomi J, Yorifuji H, Fukuda J, Endou H, Kanai Y (2000) *Neuroreport* **9**: 11:35073511
77. Duelli R, Enerson BE, Gerhart DZ, Drewes LR (2000) *J Cereb Blood Flow Metab* **20**: 1557-62.
78. Ennis SR, Ren XD, Betz AL (1994) *Brain Res* **643**: 100-10779.
79. Benrabh H, Lefauconnier J-M (1995) *Neurochem Res* **21**: 1221-1235
80. Reitzer L J, Wice BM, Kennell D (1979) *J Biochem* **249**: 2669-2676
81. Moreadith RW, Lehninger AL (1984) *J Biol Chem.* **259**: 6215-6221.
82. Wasa M, Bode BP, Abcouwer SF, Collins CL, Tanabe KK, Souba WW (1996) *Ann Surg* **224**: 186-197
83. Medina MA, Quesada AR, Nunez de Castro I (1991) *J Bioenerg Biomembr* **23**: 689-697
84. Medina MA, Sanchez-Jimenez F, Quesada AR, Marquez J, Nunez de Castro I (1992) *Mol Cell Biochem* **113**: 1-15
85. Souba WW (1993) *Ann Surg* **218**: 715-728
86. Witte D, Ali N, Carlson N, Younes M (2002) *Anicaner Res* **22**: 2555-2558
87. Bode BP, Fuchs BC, Hurley BP, Conroy JL, Suetterlin JE, Tanabe KK, Rhoads DB, Abcouwer S F, Souba WW (2002) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**: G1062-G1073
88. Dolińska M, Dybel A, Zabłocka B, Albrecht J (2003) *Neurochem Int* **43**: 501-507
89. Bröer A, Brookes N, Ganapathy V, Dimer KS, Wagner CA, Lang F (1999) *J Biol Chem* **271**: 14883-90
90. Rae C, Lawrance ML, Dias LS, Provis T, Bubb WA, Balcar VJ (2000) *Brain Res Bull* **53**: 373-381
91. Rae C, Hare N, Bubb WA, McEwan SR, Bröer A, McQuillan JA, Balcar VJ, Conigrave AD, Broer S (2003) *J Neurochem* **85**: 503-514
92. Bacci A, Sancini G, Verderio C, Armano S, Pravettoni E, Fesce R, Franceschetti S, Matteoli M (2001) *J Neurophysiol* **88**: 2302-2310

# Technika mikromacierzy DNA w analizie wielkoskalowych zmian ekspresji genów roślinnych w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiskowe

## DNA microarray technology in large-scale analysis of changes in plant gene expression profile in response to changing environmental conditions

MAŁGORZATA SOLIŃSKA<sup>1</sup>, ANNA JASIŃSKA<sup>2</sup>,  
GRZEGORZ JACKOWSKI<sup>3</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Opis metody
  - II-1. Sondy
  - II-2. Materiał do hybrydyzacji
  - II-3. Znakowanie próby
  - II-4. Analiza porównawcza
- III. Wykorzystanie techniki mikromacierzy DNA do badań nad regulacją ekspresji genów roślinnych w odpowiedzi na podwyższone natężenie światła
  - III-1. Geny kodujące białka związane z odpowiedzią na wysokie natężenie światła
    - III-1.1. Geny kodujące białka opiekuńcze
    - III-1.2. Geny kodujące białka związane z fotosyntezą i fotoprotekcją
    - III-1.3. Geny związane z ogólną odpowiedzią na stres
  - III-2. Geny kodujące specyficzne czynniki transkrypcyjne
  - III-3. Analiza motywów promotorowych występujących w genach podlegających regulacji ekspresji w odpowiedzi na podwyższone natężenie światła

Ciąg dalszy na str 372

### Contents:

- I. Introduction
- II. Description of the method
  - II-1. Microarray probes
  - II-2. Material for hybridization
  - II-3. cRNA labelling
  - II-4. Comparative analysis
- III. The application of DNA microarray technology to study regulation of expression of plant genes in response to elevated irradiance
  - III-1. Genes coding for proteins related to response to elevated irradiance
    - III-1.1. Genes coding for heat shock proteins
    - III-1.2. Genes coding for proteins related to photosynthesis and photoprotection
    - III-1.3. Genes coding for proteins related to general stress response
  - III-2. Genes coding for specific transcription factors
  - III-3. The analysis of promoter sequences present in genes the expression of which is modulated in response to elevated irradiance

Continued on the page 372

Wykaz stosowanych skrótów: ABRE — element odpowiedzi na kwas abscysynowy (ang. *abscisic acid responsive element*); *ACX* — gen kodujący jedną z izoform oksydazy acylo-CoA (ang. *acyl-CoA oxidase*); *APX* — gen kodujący peroksydazę askrobinianową (ang. *L-ascorbate peroxidase*); aRNA — zam-

plikowany RNA; CAD — dehydrogenaza alkoholu cynamonowego (ang. *cinnamyl-alcohol dehydrogenase*); cDNA — komplementarny DNA; cRNA — komplementarny RNA; CRT/DRE — element odpowiedzi na suszę (ang. *C-repeat/dehydration-responsive element*); DHAR — gen kodujący reduktazę dehydroaskrobinianową (ang. *dehydroascorbate reductase*); DREB/CBF — białko wiążące się z motywem CRT/DRE (ang. *CRT/DRE-binding factor*); ELIP — białko gromadzące się we wczesnej fazie odpowiedzi na światło (ang. *early-light induced protein*); Erd — białka gromadzące się we wczesnej fazie odpowiedzi na suszę (ang. *early-responsive to dehydration*); EREBP — białko wiążące się do elementów odpowiedzi na etylen (ang. *ethylene responsive element binding protein*); EST — etykiety sekwencji kodującej (ang. *expressed sequence tag*);

<sup>1</sup>Mgr, <sup>2</sup>dr, <sup>3</sup>dr hab., <sup>1,3</sup>Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Wydział Biologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Zakład Fizjologii Roślin, Al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań; e-mail: gocha\_sol@o2.pl, e-mail: grzesiek@amu.edu.pl, <sup>2</sup>Pracownia Genetyki Nowotworów, Instytut Chemii Bioorganicznej, PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, e-mail: aniaj@rose.man.poznan.pl

#### IV. Wykorzystanie techniki mikromacierzy DNA do badań nad regulacją ekspresji genów roślinnych w odpowiedzi na suszę glebową

##### IV-1. Geny kodujące białka związane z odpowiedzią na suszę

IV-1.1. Geny kodujące białka gromadzące się w czasie późnej embriogenezy (LEA)

IV-1.2. Geny kodujące białka związane z gospodarką wapniową komórki

IV-1.3. Geny związane z transportem i metabolizmem lipidów

IV-1.4. Geny kodujące białka opiekuńcze

IV-1.5. Geny kodujące białka związane z ogólną odpowiedzią na stres

IV-1.6. Geny kodujące białka chloroplastowe, w tym związane z fotosyntezą

IV-1.7. Geny związane z metabolizmem węglowodanów

IV-1.8. Geny kodujące białka związane z biosyntezą i degradacją białek

##### IV-2. Geny kodujące specyficzne czynniki transkrypcyjne

##### IV-3. Analiza motywów promotorowych występujących w genach podlegających regulacji w odpowiedzi na suszę

#### V. Podsumowanie

fHL — światło o wysokim natężeniu pozbawione około 50% energii promienistej z zakresu podczerwieni; *GolS2* — gen kodujący syntazę galaktinolu (ang. *galactinol synthase*); GST — S-transferaza glutationowa (ang. *glutathione S-transferase*); HL — światło o wysokim natężeniu (ang. *high light*); *HPPD* — gen kodujący dioksygenazę hydroksyfenylopirogroonianową (ang. *hydroxyphenylpyruvate dioxygenase*); HSE — element odpowiedzi na szok cieplny (ang. *heat stress responsive element*); Hsp — białko szoku cieplnego (ang. *heat shock protein*); IVT — transkrypcja *in vitro* (ang. *in vitro transcription*); LEA — białka gromadzące się w czasie późnej embriogenezy (ang. *late embryogenesis abundant*); Lox — lipoksygenaza (ang. *lipoxygenase*); LRE — element odpowiedzi na światło (ang. *light responsive elements*); LTP — białko związane z transportem lipidów (ang. *lipid transport protein*); ML — światło o umiarkowanym natężeniu (ang. *medium light*); MM — sonda partnerska (ang. *mis-match*); PCR — reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*); PM — sonda specyficzna (ang. *perfect-match*); *PorB* — gen kodujący reduktazę protochlorofilidu B (ang. *protochlorophyllide reductase B*); PS I — fotosystem I; PS II — fotosystem II; pz — pary zasad; ROS — reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*); RT — odwrotna transkrypcja (ang. *reverse transcription*); RT-PCR — reakcja łańcuchowa polimerazy sprzężona z odwrotną transkrypcją (ang. *reverse transcription polymerase chain reaction*); SAGE — metoda seryjnej analizy transkryptów (ang. *serial analysis of gene expression*); SOM — mapa samoorganizująca się (ang. *self-organizing map*); *VDE* — gen kodujący deepoksydazę wiolaksantyny (ang. *violaxanthin de-epoxidase*); *XTH* — gen kodujący jedną z form transferazy ksyloglukan: ksyloglukozyl (ang. *xyloglucan endotransglucosylase*); *XTR* — gen kodujący jedną z form transferazy ksyloglukan: ksyloglukozyl (ang. *xyloglucan endotransglucosylase*)

#### IV. The application of DNA microarray technology to study regulation of expression of plant genes in response to drought

##### IV-1. Genes coding for proteins related to response to drought

IV-1.1. Genes coding for LEA (late embryogenesis abundant) proteins

IV-1.2. Genes coding for proteins related to calcium metabolism

IV-1.3. Genes coding for proteins related to transport and metabolism of lipids

IV-1.4. Genes coding for heat shock proteins

IV-1.5. Genes coding for proteins related to general stress response

IV-1.6. Genes coding for chloroplastic proteins, including the ones related to photosynthesis

IV-1.7. Genes coding for proteins related to carbohydrates metabolism

IV-1.8. Genes coding for proteins related to biosynthesis and degradation of proteins

##### IV-2. Genes coding for specific transcription factors

##### IV-3. The analysis of promoter sequences present in genes the expression of which is modulated in response to drought

#### V. Summary

### I. Wstęp — Analiza profili ekspresji

Analizy ekspresji są szeroko stosowane w poznawaniu biologicznych funkcji genów oraz związanych z nimi procesów komórkowych. Jednym z najczęstszych zastosowań badań ekspresji jest obserwowanie zmian aktywności genów pod wpływem warunków środowiskowych. W ten sposób poznawane są mechanizmy komórkowe uruchamiane w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne, w tym egzogenne substancje stosowane w eksperymentach w celu indukcji lub supresji specyficznych procesów komórkowych.

Tradycyjne badania ekspresji genów na poziomie RNA wykorzystują techniki hybrydyzacyjne i wiedzę o sekwencji mRNA. Do określenia poziomu ekspresji poszczególnych genów powszechnie wykorzystywana jest hybrydyzacja typu „Northern blot”. W metodzie tej całkowity RNA lub wzbogacony we frakcję poli(A) wyizolowany z materiału biologicznego poddawany jest rozdzielowi elektroforetycznemu, a następnie hybrydyzacji na stałym podłożu ze znakowaną sondą DNA lub RNA, która wiąże się proporcjonalnie do ilości badanych transkryptów [1]. Identyfikacja transkryptu odbywa się na podstawie jego długości i komplementarności jego sekwencji do specyficznej sondy. Analogicznie przeprowadza się hybrydyzację kropkową (ang. *dot blot*) z tym, że całkowity RNA nie jest uprzednio poddawany roz-

działowi elektroforetycznemu. Metody te, podobnie jak test ochrony przed nukleazą czy RT-PCR [2,3], służą do określania ilości poszczególnych transkryptów. Ze względu na ograniczone możliwości automatyzacji i zwiększenia skali analiz z pojedynczych transkryptów do całego transkryptomu, metody te nie pozwalają na charakterystykę szerszych profili ekspresyjnych.

Poznanie szerokich wzorów ekspresji genów umożliwiło sekwencjonowanie cDNA z bibliotek przygotowanych z próbek różnych komórek lub tkanek [4]. W podejściu tym zakłada się, że poziom transkryptu w tkance znajduje odzwierciedlenie w częstości występowania reprezentującej go etykiety sekwencji kodującej (EST) w bibliotece cDNA. Metoda ta jest niezależna od znajomości sekwencji, ale wymaga prowadzenia procesu sekwencjonowania na bardzo dużą skalę. Znaczne ograniczenie kosztów sekwencjonowania uzyskano w seryjnej analizie transkryptów, SAGE (ang. *Serial Analysis of Gene Expression*), w której jednocześnie sekwencjonowane są zligowane krótkie (9-14pz) sekwencje losowych cDNA [5-7]. Sekwencjonowanie wyłącznie krótkich fragmentów wymaga jednak skomplikowanego przygotowania próby, co powoduje obniżenie powtarzalności uzyskanych wyników.

Obecnie, gdy poznawane są pełne sekwencje genomów różnych organizmów, w tym modelowej rośliny kwiatowej — *Arabidopsis thaliana*, pojawia się możliwość kompleksowej analizy ekspresji jednocześnie dla tysięcy genów w pojedynczym eksperymencie hybrydacyjnym. Narzędziem dającym taką możliwość są tak zwane mikromacierze DNA. Każda mikromacierz zawiera zdefiniowany pod względem sekwencji zestaw sond DNA, rozlokowanych na stałym podłożu w określonych pozycjach, zdolnych do hybrydyzacji z komplementarnymi sekwencjami cDNA (komplementarny DNA) lub cRNA (komplementarny RNA) reprezentującymi badane transkrypty. Materiałem wyjściowym do analizy jest RNA wyizolowany z badanego materiału biologicznego. Zostaje on przekształcony w znakowany cDNA lub cRNA, a następnie poddany procesowi hybrydyzacji [8, 9]. Główna techniczna różnica w badaniu ekspresji między tradycyjnymi technikami hybrydacyjnymi a systemami mikromacierzowymi polega na odwróceniu ról sondy i próby. W analizach mikromacierzowych duża liczba sond związanych z podłożem jest hybrydyzowana ze znakowaną próbą badanego RNA [10]. Sygnał hybrydacyjny uzyskiwany jest z mikromacierzy zwykle poprzez wzbudzenie światłem o długości fali odpowiedniej dla użytego fluorochromu. Wówczas znakowane frag-

menty cDNA lub cRNA emitują ilość światła proporcjonalną do ilości zhybrydyzowanej próby w każdym miejscu na mikromacierzy, co powinno teoretycznie odpowiadać poziomowi ekspresji danego transkryptu [11]. Dzięki temu można określić wzór ekspresji genów i porównać go między badanymi próbkami. Największą zaletą badań profili ekspresji z wykorzystaniem mikromacierzy jest możliwość badań ekspresji na skalę całego genomu, czyli w wymiarze nieosiągalnym za pomocą tradycyjnych analiz.

Obecnie mikromacierze konstruowane są na gładkim, homogenym podłożu. Sondy o znanej sekwencji są albo uzyskiwane poza mikromacierzą, a następnie w określonej ilości i stężeniu nanoszone na jej powierzchnię, albo syntetyzowane bezpośrednio na powierzchni mikromacierzy. Kierowana światłem synteza sond na mikromacierzy stosowana jest w produkcji mikromacierzy typu „GeneChip” (produkowanych przez firmę Affymetrix, USA). Zastosowanie tej technologii umożliwia komercyjną konstrukcję mikromacierzy o tak wysokiej gęstości, że może się znaleźć na niej reprezentacja całego genomu wraz z zestawem sond kontrolnych, co pozwala na ilościowe wykrywanie transkryptów obecnych w komórkach od kilku kopii do kilku tysięcy kopii na komórkę [12]. Od niedawna dostępne są np. mikromacierze, na których znajdują się sondy dla około 24000 spośród 26100 genów *A. thaliana* — ich dostępność stwarza możliwość prawdziwie „globalnej” analizy zmian profilu ekspresji genów tego organizmu w odpowiedzi na zmiany czynników środowiskowych i kontekstu ontogenetycznego, chociaż nie ma jeszcze tego typu doniesień ani dla *A. thaliana* ani dla innych gatunków roślin. Pojawiły się prace prezentujące wyniki analizy modulacji poziomu ekspresji znacznej liczby genów roślinnych (1300-7000 u *A. thaliana* [13-15], 1500 u jęczmienia [16]) do jakich dochodzi w trakcie ekspozycji roślin na podwyższone natężenie światła i suszę glebową. Ważniejsze wyniki tych analiz zostaną przedstawione w dalszej części niniejszej pracy.

## II. Opis metody

### II-1. Sondy

Najpowszechniej stosowanymi mikromacierzami są mikromacierze cDNA i oligonukleotydowe nazywane tak w zależności od typu sondy prezentowanej na podłożu. Stosowane sondy mają zwykle znaną sekwencję. Planując sekwencje sond preferuje się sondy komplementarne do końca 3' transkryptu, gdyż ten region jest najefektywniej uzyskiwany w reakcji

odwrotnej transkrypcji z zastosowaniem startera oligo dT komplementarnego do ogona poli(A) transkryptu. W projektowaniu sond unika się również sekwencji palindromowych, które mogą tworzyć strukturę tzw. „spinki do włosów” (ang. *hairpin*) uniemożliwiającą hybrydyzację z próbką. Poprzez wybór sond reprezentujących najbardziej charakterystyczne części transkryptu możliwe jest selektywne rozróżnienie oraz określenie ilości transkryptów nieznacznie różniących się od siebie sekwencją [17]. W ten sposób rozróżniane mogą być geny blisko „spokrewnione” ze sobą lub należące do jednej rodziny genowej. Do identyfikacji wariantów alternatywnego składowania mRNA ulegających ekspresji w różnych tkankach dobierane są specyficzne sondy zlokalizowane w różnych eksonach [9, 18].

Sondy cDNA umieszczane na mikromacierzach są najczęściej produktami amplifikacji PCR uzyskanymi z bibliotek cDNA lub zbioru klonów w reakcji ze starterami specyficznymi dla wektora lub genu. Zwykle mają długość 0,6-2,4kpz [18]. Najczęściej pojedyncza sonda, rzadziej kilka sond, reprezentuje pojedynczy gen. Sondy cDNA z powodu dużych rozmiarów mogą nie w pełni ulegać denaturacji i pozostawać częściowo w formie dwuniciowej niezdolnej do hybrydyzacji. Długość sond powoduje także ryzyko, że ich sekwencje mogą zawierać motywy obecne z innych genów i sekwencje powtarzające się. Sondy cDNA są na ogół uzyskiwane poza mikromacierzą, a następnie po oczyszczeniu i doprowadzeniu do określonego stężenia są w sposób zautomatyzowany nanoszone na mikromacierz [19].

Do najczęściej stosowanych technik syntezy sond *in situ* należy technika fotolitograficzna, która pozwala na bardzo gęste upakowanie 25-merowych sond na mikromacierzy typu „GeneChip” [9, 20]. Dzięki temu na powierzchni mikromacierzy, poza sondami dla badanych genów, może być umieszczony szeroki system kontroli eksperymentu. Każda z sond oligonukleotydowych syntetyzowana jest w liczbie  $10^6$ - $10^7$  kopii. Poszczególne sondy znajdują się na kwadratowych polach zwykle o boku 18  $\mu$ m pokrywających powierzchnie mikromacierzy. W badaniach profili ekspresji z wykorzystaniem mikromacierzy typu „GeneChip” nie stosuje się pojedynczej sondy dla transkryptu, lecz zestaw sond. Aby odróżnić rzeczywistą ekspresję od tła, dla każdej z 11 sond specyficznych dla transkryptu PM (ang. *perfect-match*), syntetyzowana jest, jako kontrola negatywna, sonda partnerska MM (ang. *mismatch*) zawierająca w 13 pozycji niekomplementarny do badanego transkryptu nukleotyd. Stosowanie takiego zestawu sond dla transkryptu pozwala uwzględnić w wyni-

kach naturalny polimorfizm sekwencji, warianty splicingowe, podobieństwo sekwencji, błędy w bazach danych [11, 21].

## II-2. Materiał do hybrydyzacji

Analizy mikromacierzowe są stosowane w celu określenia zmian poziomów ekspresji genów względem odpowiedniej kontroli. Analizy porównawcze profili ekspresji dotyczą najczęściej zmian wywołanych mutacjami lub czynnikami środowiskowymi, zarówno fizycznymi (np. temperatura), chemicznymi (np. woda, poziom zasolenia) jak biologicznymi (np. infekcja patogenem) w różnych dawkach i w różnym czasie od ich zadziałania. Materiałem do analiz mikromacierzowych może być zarówno całkowity RNA (5-30  $\mu$ g), jak i poli(A)mRNA (1-5  $\mu$ g). Stosunek absorpcji badanej próbki  $A_{260/280}$  powinien mieścić się w granicach 1,7-2,1 [22, 23]. Dobra jakość RNA, czyli brak oznak degradacji, powinna zostać potwierdzona poprzez wyraźne wyodrębnienie się po rozdziale w elektroforezie agarozowej prążków rybosomalnego RNA, dla *Eukaryota* prążek 18S rRNA powinien być około dwukrotnie intensywniejszy od 28S rRNA.

Do hybrydyzacji z mikromacierzą wykorzystuje się albo cDNA zsyntetyzowany w reakcji odwrotnej transkrypcji (RT), albo antysensowy komplementarny RNA (cRNA), czyli produkt transkrypcji *in vitro* (IVT) uzyskany na matrycy cDNA. Ponieważ na etapie transkrypcji *in vitro* na matrycy dwuniciowego cDNA powstaje szereg kopii aRNA, jest to etap amplifikacji zwiększający ilość powstającego materiału.

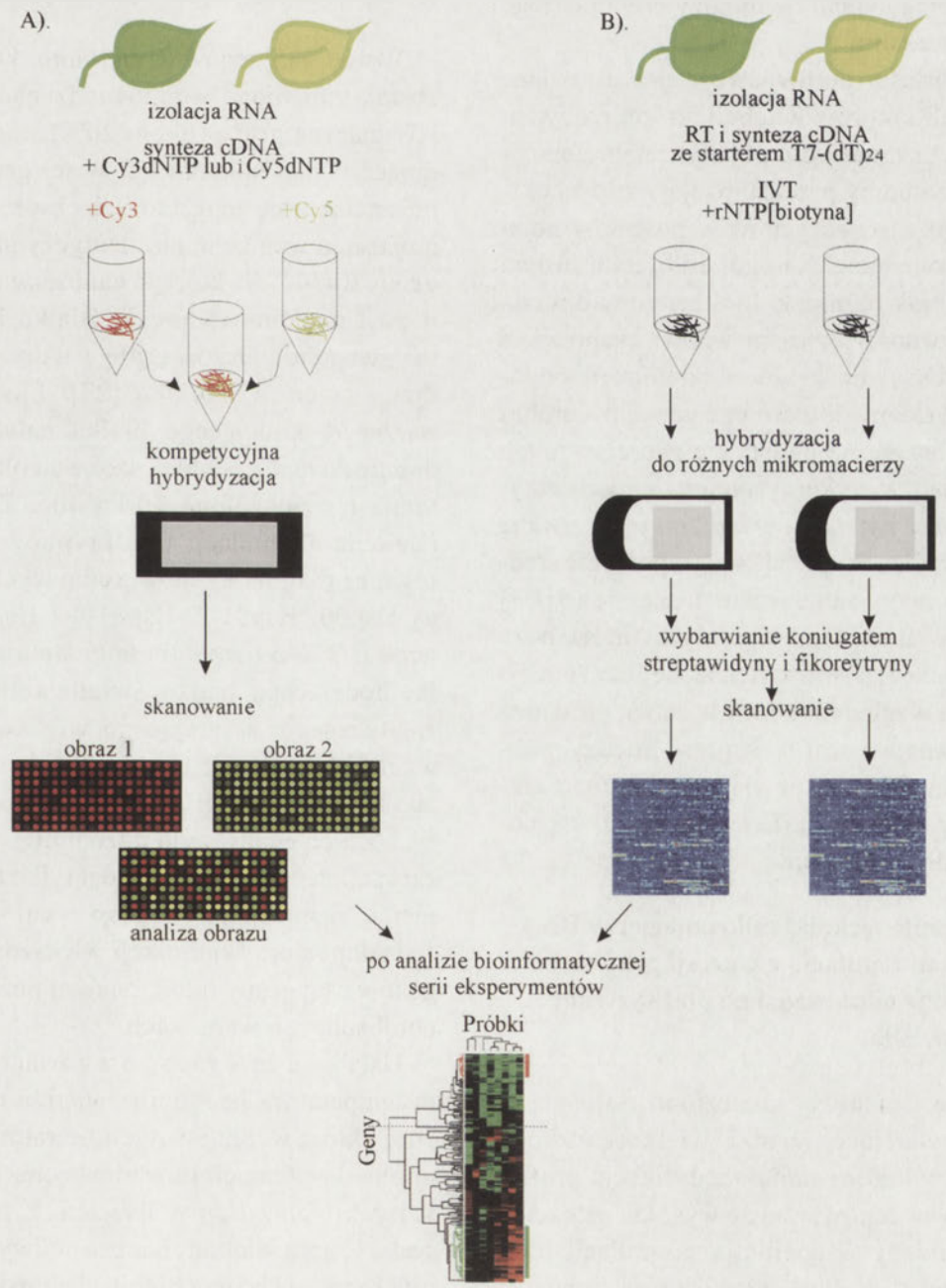
Aby uzyskać próbkę cRNA, na etapie odwrotnej transkrypcji do syntezy pierwszej nici cDNA stosowany jest starter wprowadzający promotor polimerazy RNA. Jego sekwencja składa się zwykle z ciągu 24 dT na końcu 3' umożliwiającego specyficznie wiązanie się z ogonem poli(A) mRNA oraz z regionu wprowadzającego do pierwszej nici cDNA promotor polimerazy RNA faga T7 lub T3 na końcu 5'. Po syntezie pierwszej nici, mRNA poddawany jest trawieniu przez RNazę H z *E. coli*, której endonukleolityczne działanie wprowadza duże luki w nici RNA hybrydy RNA-DNA. Powstałe w ten sposób krótkie fragmenty RNA stanowią startery do syntezy drugiej nici prowadzonej przez polimerazę DNA I z *E. coli*. Liga DNA *E. coli* łączy końce fragmentów zsyntetyzowanej drugiej nici cDNA. Powstały dwuniciowy cDNA, po oczyszczeniu z rRNA, fragmentów mRNA i starterów, jest stosowany jako matryca do

transkrypcji *in vitro* prowadzonej przez polimerazę RNA zależną od DNA.

II-3. Znakowanie próby

Istnieją dwie kategorie metod znakowania materiału do hybrydyzacji z mikromacierzami: znakowanie bezpośrednie i pośrednie. Znakowanie bezpośrednie polega na wprowadzaniu podczas syntezy cDNA cyjaninowych znaczników fluorescencyjnych Cy3 i Cy5 związanych z nukleotydami dUTP lub dCTP [23]. Ten rodzaj znakowania jest na ogół stosowany w eksperymentach z mikromacierzami cDNA. W znakowaniu pośrednim do próbki wbudowywane są epitopy, które po hybrydyzacji wybarwiane są

wiązującymi się z nimi białkami. Najpowszechniej stosowanym epitopem jest biotyna, którą można wybarwiać fluorescencyjnym koniugatem streptawidyny i fikoerytryny. Taką techniką znakowany jest cRNA do hybrydyzacji z mikromacierzami typu „Gene-Chip”. Aby uzyskać znakowany biotyną cRNA, przeprowadza się reakcję transkrypcji *in vitro* z biotynyłowymi nukleotydami (biotylo-16UTP i biotynylo-11CTP) na matrycy cDNA powstałego w reakcji odwrotnej transkrypcji. Zhybrydyzowana z mikromacierzą znakowana próbka poddawana jest wybarwianiu koniugatem streptawidyny i fikoerytryny, który wiąże się z resztą biotyny i emituje sygnał fluorescencyjny po wzbudzeniu przez światło lasera odpowiedniej długości (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat eksperymentu mikromacierzowego z wykorzystaniem A, mikromacierzy cDNA; B, mikromacierzy oligonukleotydowych o wysokiej gęstości (typu GeneChip).

## II-4. Analiza porównawcza

Materiałem do hybrydyzacji z mikromacierzami pokrytymi sondami cDNA jest znakowany różnymi barwnikami cyjaninowymi cDNA uzyskany z próbek kontrolnej i badanej. Przed hybrydyzacją oba odmiennie wyznakowane cDNA są łączone ze sobą, aby kompetycyjnie wiązały się z sondami na mikromacierzy. Dane z pojedynczej mikromacierzy cDNA są przedstawiane dla każdej sondy jako znormalizowana proporcja Cy3/Cy5 [18]. Natomiast w przypadku mikromacierzy typu „GeneChip” z sondami syntetyzowanymi *in situ* pojedyncza mikromacierz hybrydyzowana jest z jedną próbką znakowaną biotyną, a szeroki zestaw kontroli pozwala na normalizację i porównanie sygnałów między wieloma tego typu mikromacierzami.

Uzyskane wartości porównawcze przedstawiane są w formie skali kolorów w tabeli, której rzędy zawierają wartości sygnału dla pojedynczego genu w serii próbek, a kolumny przedstawiają wartości ekspresji dla całego zastawu genów w próbce w pojedynczym eksperymencie. Na ogół kolorem czarnym oznaczany jest brak różnic, kolor czerwony o wzrastającej intensywności oznacza wzrost ekspresji, a wzrastająca intensywność koloru zielonego odpowiada spadkowi ekspresji. Zarówno geny jak i próbki mogą być grupowane na podstawie skorelowanych wzorów ekspresji z wykorzystaniem metod statystycznych, takich jak najpowszechniej stosowane hierarchiczna analiza skupień [24], grupowanie średnich *k* [25] czy mapy samoorganizujące się (SOM) [26]. Z zastosowaniem tego typu algorytmów, poza selekcjonowaniem genów o zwiększonej lub zmniejszonej ekspresji względem kontroli, można również określić podobieństwo profili ekspresji między próbkami oraz zidentyfikować powiązane ze sobą funkcjonalnie grupy genów charakteryzujących się podobnymi profilami ekspresji.

## III. Wykorzystanie techniki mikromacierzy DNA do badań nad regulacją ekspresji genów roślinnych w odpowiedzi na podwyższone natężenie światła

W literaturze światowej znaleziono pojedyncze doniesienie zawierające wyniki wielkoskalowego (6000 genów) monitorowania modyfikacji profilu ekspresji genów w odpowiedzi na wysokie natężenie światła [13]. Zmiany w poziomie akumulacji transkryptów genów *A. thaliana* oceniano po trwającej 1h ekspozycji roślin wyhodowanych w warunkach kontaktu ze światłem o umiarkowanym natężeniu

100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$  (ang. *medium light* — ML), na światło o wysokim natężeniu 1000  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$  (ang. *high light* — HL). ML posłużyło także jako natężenie referencyjne do analizy zmian profilu ekspresji tej samej grupy genów w odpowiedzi na jednogodzinną ekspozycję roślin na światło o natężeniu 1000  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$  pozbawione około 50% energii promienistej z zakresu podczerwieni (fHL).

Geny podlegające zależności od światła regulacji poziomu ekspresji należały do różnych grup funkcjonalnych.

### III-1. Geny kodujące białka związane z odpowiedzią na wysokie natężenie światła

#### III-1.1. Geny kodujące białka opiekuńcze

Wśród 185 genów *A. thaliana*, których ekspresja została zmieniona w odpowiedzi na kontakt rośliny z HL znaczną grupę (około 20%) stanowiły geny kodujące białka opiekuńcze. W tej grupie funkcjonalnej znalazły się geny, których ekspresja uległa najsilniejszemu wzmocnieniu. Dotyczy to między innymi genu *Hsp101*, dla którego zaobserwowano 11-krotny wzrost poziomu ekspresji. Białko kodowane przez ten gen pełni kluczową rolę w nabywaniu termotolerancji przez *A. thaliana* [27]. Ekspresja genu *put smHsp20*, kodującego białko należące prawdopodobnie do małych białek szoku cieplnego, została natomiast wzmocniona 10-krotnie. Znaczący wzrost poziomu akumulacji transkryptów zaobserwowano również dla kilku genów kodujących białka z rodziny Hsp90: Hsp81-2, Hsp81-4 i Hsp90, a także dla genu *Hsp70-3* oraz *Bip* (ang. *luminal binding protein*) kodującego białko światła retikulum endoplazmatycznego, asystującego w prawidłowym fałdowaniu i transporcie białek [28]. W warunkach kontaktu ze światłem fHL wzmocnienie ekspresji niektórych z tych genów było dużo mniejsze. Poziom transkrypcji genu *Hsp 101* wzrósł tylko 6 razy, a wzmocnienie ekspresji *put smHsp* wyniosło jedynie 2,5. Jednak poziom akumulacji większości transkryptów genów z tej grupy funkcjonalnej pozostał zbliżony w obu badanych warunkach.

Ustalono, że w żadnym z wariantów eksperymentu temperatura liści ani powietrza nie przekroczyła 34°C, które według danych literaturowych stanowią minimalną temperaturę niezbędną do indukcji niektórych białek Hsp w liściach *A. thaliana* [29,30]. Jest więc prawdopodobne, że podwyższona temperatura sprzyjała wzmocnieniu ekspresji genów HSP nie poprzez szok termiczny, ale raczej poprzez tworzenie w komórkach środowiska oksydacyjnego.

### III-1.2. Geny kodujące białka związane z fotosyntezą i fotoprotekcją

Spośród genów *A. thaliana* należących do tej grupy funkcjonalnej w warunkach HL najsilniej wzmocniona była ekspresja *BCH II*, kodującego hydroksylazę  $\beta$ -karotenową II (enzym katalizujący syntezę zeaksantyny i luteiny) oraz *HPPD* kodującego dioksygenazę hydroksyfenylopirogronianową (jeden z enzymów szlaku biosyntezy plastochinonu i tokof roli). Ekspresja genu kodującego deepoksydazę wio laksantyny (*VDE*) uległa natomiast osłabieniu, podobnie jak biorącego udział w biosyntezie chlorofilu genu *PorB*, kodującego reduktazę protochlorofilidu B. Ekspozycja roślin na fHL miała znikomy wpływ na poziom ekspresji tych genów. Transkrypcja *HPPD*, *VDE* i *PorB* pozostała na poziomie zbliżonym do warunków kontrolnych, a ekspresja genu *BCH II* uległa jedynie nieznaczniemu wzmocnieniu. Oznacza to, że poziom ekspresji wymienionych genów jest zmieniany raczej w odpowiedzi na podwyższenie temperatury otoczenia roślin towarzyszące ekspozycji na HL niż przez HL *per se*.

### III-1.3. Geny związane z ogólną odpowiedzią na stres

Spośród tej grupy genów *A. thaliana* pod wpływem HL zwiększony poziom ekspresji wykazywały między innymi gen kodujący białko rodziny ELIP (ang. *early-light induced proteins*), a także geny kodujące białka uczestniczące w usuwaniu reaktywnych form tlenu (ROS): *APX1* i *APX2* (kodujące dwie formy peroksydazy askrobinianowej), *GST6* (kodujący białko podobne do S-transferazy glutationowej) oraz *DHAR* (kodujący reduktazę dehydroaskrobinianową).

W wyniku ekspozycji badanych roślin na fHL ekspresja genów *APX1* i *DHAR* została wzmocniona do poziomu obserwowanego w warunkach ekspozycji na HL. Jednak ekspresja genów *ELIP* i *GST6* została wzbudzona słabiej, a poziom transkrypcji genu *APX2* w warunkach fHL zbliżony był do wartości kontrolnej. Oznacza to, że zmiany poziomu ekspresji tych genów mogą być związane raczej z podwyższoną temperaturą otoczenia roślin, która towarzyszy ekspozycji na HL, niż z samą zmianą natężenia światła.

### III-2. Geny kodujące specyficzne czynniki transkrypcyjne

U roślin *A. thaliana* w odpowiedzi na HL wzmocniona była ekspresja genu kodującego czynnik tran-

skrypcyjny Maf-4 (Flc14), spadała natomiast akumulacja transkryptu genu kodującego czynnik Obf4. Z kolei w wyniku ekspozycji na fHL wzmocniona była ekspresja genu kodującego nieznany czynnik transkrypcyjny zawierający motyw palca cynkowego. W obu testowanych warunkach (HL i fHL) osłabieniu uległa natomiast ekspresja genu kodującego białko wiążące się do elementów odpowiedzi na etylen — EREBP (ang. *Ethylene Responsive Element Binding Protein*). Rejony promotorowe wszystkich wymienionych powyżej genów zawierają sekwencje regulatorowe charakterystyczne dla genów podlegających zależności od światła regulacji (patrz podrozdział III-3). Sugeruje to, że wymienione czynniki transkrypcyjne mogą pełnić funkcje drugiego rzędu w szlakach transdukcji sygnału prowadzących do adaptacji do wysokiego natężenia światła.

### III-3. Analiza motywów promotorowych występujących w genach *A. thaliana* podlegających regulacji ekspresji w odpowiedzi na podwyższone natężenie światła

Dane uzyskane z analizy zmian profilu ekspresji genów *A. thaliana* pod wpływem HL i fHL, zostały wykorzystane do identyfikacji motywów sekwencyjnych statystycznie nadreprezentowanych w grupach genów, których poziom ekspresji zmieniał się w podobny sposób w odpowiedzi na kontakt rośliny ze światłem HL i fHL [13]. Analizie poddano fragmenty sekwencji o długości 500bp, położone bezpośrednio powyżej kodonu inicjującego transkrypcję.

W grupie genów, których ekspresja została wzmocniona zarówno w wyniku ekspozycji na HL, jak i na fHL, jednym z najczęściej występujących motywów był element odpowiedzi na szok cieplny — HSE (ang. *Heat Stress responsive Element*): CTTCTC. Sekwencję tą znaleziono między innymi w analizowanych fragmentach genów *Hsp101*, *Hsp90*, *Hsp70-3*, a także w genie *ELIP*. Statystycznie nadreprezentowana była też kaseta AE (GAAACT), również należąca do HSE. Motyw ten występował między innymi w genach *Hsp70-3*, *Hsp81-4* oraz *BiP*. Sekwencja ta została również znaleziona w analizowanym fragmencie genu *APX1*, co stanowi potwierdzenie wcześniejszych doniesień o wzmocnieniu ekspresji tego genu w warunkach szoku cieplnego [31]. Sekwencje HSE spotykane są powszechnie w promotorach genów kodujących białka szoku cieplnego, gdzie zlokalizowane są najczęściej w obszarze sąsiadującym z rejonem 5' sekwencji TATA.

W grupie genów, których ekspresja została wzmocniona zarówno w wyniku ekspozycji na HL,

jak i na fHL, często występował również motyw TCCC (<sup>A</sup>/<sub>T</sub>TCTCCTTC<sup>C</sup>/<sub>G</sub>) zidentyfikowany między innymi dla *Hsp70-3*, *Hsp101* oraz *BiP*. Motyw ten należy do grupy elementów odpowiedzi na światło — LRE (ang. *Light Responsive Elements*). Sekwencje należące do LRE zidentyfikowano również w grupie genów, których ekspresja uległa osłabieniu zarówno w wyniku ekspozycji na HL jak i na fHL. Dotyczy to między innymi sekwencji określanej jako „kasetę 1” (TAAATAAAN<sup>C</sup>/<sub>A</sub> (N= A, T, C lub G)), a także motywu ACA (ACCATA) oraz sekwencji TCTTCTTC określanej jako spbCMA1a. Kasetę CAAT (NA<sup>C</sup>/<sub>A</sub>GTTGG T<sup>C</sup>/<sub>T</sub><sup>G</sup>/<sub>A</sub>) i sekwencję SbpCMA1 (CTATCT), również należące do LRE, znaleziono natomiast w grupie genów, których ekspresja uległa wzmocnieniu tylko w warunkach HL. Zróżnicowanie elementów LRE występujące w analizowanych genach nie jest faktem zaskakującym. Sekwencje związane z regulacją ekspresji genów w odpowiedzi na zmiany natężenia światła stanowią wciąż słabo poznaną grupę elementów regulatorowych. Wiadomo jednak, że obejmuje ona wiele różnorodnych elementów, z których żaden nie występuje we wszystkich genach podlegających zależnej od światła regulacji poziomu ekspresji. Pozwala to sądzić, że sposób regulacji transkrypcji indywidualnych genów przez światło jest zdeterminowany przez charakterystyczną dla danego genu kombinację LRE, wzajemne położenie różnych motywów oraz długość i skład rozdzielaających je sekwencji [32].

Obok motywów LRE i HSE w analizowanych fragmentach genów *A. thaliana* stwierdzono także obecność sekwencji związanych z odpowiedzią na kwas abscysynowy. Sekwencję ABRE (*Abscisic Acid Responsive Element*): NACGTGT<sup>C</sup>/<sub>A</sub><sup>C</sup>/<sub>A</sub> zidentyfikowano w genach, których poziom ekspresji wzrastał w odpowiedzi na ekspozycję roślin na HL. Sekwencja ta zawiera silnie konserwatywny motyw ACGT określanej jako kasetę G [33] i należy do tak zwanych G/ABRE, które występują powszechnie w genach podlegających regulacji ekspresji zależnej od kwasu abscysynowego, ale również w wielu genach związanych z odpowiedzią roślin na stres.

#### IV. Wykorzystanie techniki mikromacierzy DNA do badań nad regulacją ekspresji genów roślinnych w odpowiedzi na suszę glebową

W literaturze światowej znaleziono trzy doniesienia prezentujące rezultaty wielkoskalowej analizy zmian zachodzących w profilu ekspresji genów pod wpływem suszy glebowej. Dwie publikacje dotyczą *A. thaliana* (1300 genów — [15] i 7000 genów —

[14]), trzecia zaś jęczmienia (*Hordeum vulgare*) — 1500 genów [16]. W doświadczeniach dotyczących genów *A. thaliana* do monitorowania zmian w profilu ekspresji genów wykorzystano mRNA wyizolowane z dojrzałych roślin, a w pracy dotyczącej genów jęczmienia analiza oparta została na mRNA wyizolowanym osobno z liści i z korzeni. Różnice pomiędzy omawianymi pracami dotyczą również czasu ekspozycji roślin na czynnik stresowy — 2h i 10h [15] oraz 1-24h w przypadku *A. thaliana*, 6 i 10h dla jęczmienia [16].

#### IV-1. Geny kodujące białka związane z odpowiedzią na suszę

##### IV-1.1. Geny kodujące białka gromadzące się w czasie późnej embriogenezy (LEA)

Istotną rolę w procesie adaptacji rośliny do suszy odgrywają silnie hydrofilowe białka gromadzące się w okresie późnej embriogenezy, określane jako LEA (ang. *Late Embryogenesis Abundant*). Ich funkcja nie została jeszcze w pełni wyjaśniona, sądzi się, że mogą brać udział w utrzymaniu struktury błon, usuwaniu wolnych jonów, wiązać wodę lub pełnić funkcje białek opiekuńczych [34].

Badania z wykorzystaniem techniki mikromacierzy DNA potwierdziły doniesienia o udziale białek LEA w procesie adaptacji do suszy [35]. Wśród genów *A. thaliana*, których poziom ekspresji był wzmacniany w odpowiedzi na suszę, znajdowało się aż 12 genów kodujących białka LEA, a mianowicie: *Cor78*, *Cor15a*, *Cor6.6*, *kin1*, *Cor47*, *Erd7*, *Erd10* (ang. *early-responsive to dehydration*) *Sag21* (ang. *senescence-associated gene 21*), *Cor403-PM*, *Rab18* (ang. *responsive to aba* 18), *Lea76* i *Lea14* [14,15]. Podwyższoną akumulację transkryptu genu *Lea14* obserwowano również w liściach jęczmienia poddanego działaniu suszy [16], a zarówno w liściach jak i w korzeniach jęczmienia wzmacniana była ekspresja genu kodującego dehydrynę 9 należącą do białek LEA.

##### IV-1.2. Geny kodujące białka związane z gospodarką wapniową komórki

Istnieją doniesienia świadczące, że pewną rolę w adaptacji do niedoboru wody pełni sygnał wapniowy [36]. W zgodzie z tymi doniesieniami pozostaje fakt, że wśród genów, których ekspresja podlegała zmianom w wyniku ekspozycji roślin na suszę znalazło się kilka genów kodujących białka związane z sygnalizacją wapniową. Mianowicie w przypadku *A. thaliana* wzrastał poziom ekspresji genu *rd20*, ko-

dującego białko wiążące jony wapnia i dwóch genów kodujących białka wiążące kalmodulinę [14], a w korzeniach jęczmienia — po dłuższym okresie ekspozycji na suszę (10h) — spadał poziom transkrypcji genu kodującego zależną od wapnia kinazę białkową 7 [16].

#### IV-1.3. Geny związane z transportem i metabolizmem lipidów

U *A. thaliana* w odpowiedzi na suszę zaobserwowano podwyższoną akumulację transkryptów genów, kodujących białka związane z transportem lipidów: LTP1 i LTP3 (ang. *Lipid Transport Protein*), a także trzech innych genów kodujących białka z rodziny LTP [14, 15]. Analiza zmian profilu ekspresji genów w korzeniach jęczmienia wykazała natomiast, że po dłuższym (10 h) okresie ekspozycji na suszę spada poziom akumulacji transkryptów dwóch genów kodujących białka z rodziny LTP [16].

W przypadku *A. thaliana* obserwowano zależny od ekspozycji na suszę wzrost poziomu transkrypcji genów kodujących niektóre enzymy uczestniczące w szlaku  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych. Dotyczy to genu *ACX1* kodującego jedną z izoform oksydazy acylo-CoA oraz genu kodującego acylotransferazę acylo-CoA. Wzrastał również poziom transkrypcji dwóch genów kodujących lipazy [14].

W początkowym okresie ekspozycji na suszę (po 6h) w korzeniach jęczmienia akumulował się w ilościach znacznie przewyższających to, co obserwowano u roślin kontrolnych transkrypt genu kodującego desaturazę  $\omega$ -3-kwasów tłuszczowych, a w tkankach liścia spadał poziom akumulacji transkryptów genu kodującego desaturazę  $\omega$ -6-kwasów tłuszczowych. Dłuższy okres ekspozycji na suszę (10h) powodował podwyższenie akumulacji transkryptu genu kodującego  $\alpha$ -oksydazę kwasów tłuszczowych w tkankach korzenia.

#### IV-1.4. Geny kodujące białka opiekuńcze

Wśród genów *A. thaliana*, których ekspresja była zmieniana w odpowiedzi na poddanie roślin stresowi suszy zidentyfikowano kilka genów kodujących białka opiekuńcze. W przypadku genu kodującego białko homologiczne do DnaJ i jedno z białek rodziny Hsp70 obserwowano silne wzmocnienie ekspresji stosownych genów, a w przypadku genów *Cpn60* i *Roc4* (kodującego cyklofilinę) wyraźny spadek ekspresji [14].

W liściach jęczmienia po krótkim okresie ekspozycji na suszę (6h) spadał poziom akumulacji transkryptu genu kodującego homolog DnaJ — Pfj4;

dłuższa, trwająca 10h ekspozycja skutkowała natomiast spadkiem poziomu ekspresji genu kodującego białko MsJ1, podobne do DnaJ [16].

#### IV-1.5. Geny kodujące białka związane z ogólną odpowiedzią na stres

Spośród genów *A. thaliana* kodujących białka biorące udział w ogólnej odpowiedzi stres wzrost poziomu ekspresji w odpowiedzi na suszę dotyczy  $\alpha$ -Dox1 (kodującego dioksygenazę kwasów tłuszczowych), *Nhl3*, *Pox* (kodującego potencjalną peroksydazę), *Lox* (kodującego lipoksygenazę), *Rd22* (ang. *dehydration-responsive*) i *Mt2* (kodującego metalotioneinę biorącą udział w detoksyfikacji i utrzymywaniu homeostazy cynku i miedzi) [14]. Poziom transkrypcji lipoksygenazy 2 wzrastał także w liściach i w korzeniach jęczmienia po krótkim okresie ekspozycji na suszę (6 h) [16]. W korzeniach jęczmienia akumulował się transkrypt genu *PR-10* (kodującego białko 10 związane z patogenezą), spadał natomiast poziom ekspresji genu kodującego tioneinę.

Zmiany poziomu ekspresji zaobserwowano także w przypadku genów kodujących białka uczestniczące w usuwaniu reaktywnych form tlenu. Wzmocnienie ekspresji dotyczyło genów *A. thaliana*: *Apx1* (kodującego peroksydazę askorbinianową) i *Cat3* (kodującego katalazę 3), a osłabienie — ekspresji genów reduktazy monodehydroaskorbinianowej i reduktazy glutationowej [37]. Po 10 h ekspozycji na suszę w korzeniach jęczmienia spadał poziom akumulacji transkryptów genu peroksydazy ATP9a, a także genu kodującego peroksydazę askorbinianową [16].

#### IV-1.6. Geny kodujące białka chloroplastowe, w tym związane z fotosyntezą

Susza jest jednym z czynników środowiskowych, które mogą naruszać stan równowagi pomiędzy ilością pobranej i przeniesionej przez aparat anten energetycznych fotosyntezy energii promienistej, a ilością energii, która może zostać spożytkowana w formie fotosyntetycznego transportu elektronów, reakcji ciemniowych fotosyntezy i procesów metabolicznych zależnych od produktów reakcji ciemniowych. Naruszenie stanu równowagi energetycznej polega na obniżeniu ilości energii spożytkowanej poniżej poziomu ilości energii przenoszonej przez aparat anten energetycznych fotosyntezy na skutek spadku tempa reakcji ciemniowych fotosyntezy [38] i tempa procesów metabolicznych zależnych od reakcji ciemniowych fotosyntezy. Wywołana przez suszę nierównowaga grozi zatem roślinom takimi samymi

niekorzystnymi konsekwencjami jakie wiążą się z ekspozycją na stresująco silne światło, tzn. fotouszkodzeniem centrów reakcji fotosystemu II (PSII). Można zatem oczekiwać, że jedną z odpowiedzi na stres suszy powinno być uruchomienie mechanizmów fotoprotekcyjnych obejmujących wyciszenie genów kodujących białka związane z procesem zbierania energii promienistej światła (ang. *light harvesting*) czy wzmocnienie ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w fotosyntetycznym transporcie elektronów, reakcjach ciemniowych fotosyntezy i procesach metabolicznych zależnych od reakcji ciemniowych fotosyntezy. Zasadność takich oczekiwań tylko częściowo znajduje potwierdzenie w wyniku studiów nad wielkoskalowymi zmianami ekspresji genów roślinnych następującymi w odpowiedzi na stres suszy. O ile zaobserwowany u *A. thaliana* poddawanego stresowi suszy spadek ekspresji genów wielu białek PSI i PSII (w tym także apobiałek kompleksów zbierających światło) — Lhcb4, Lhcb5, Lhcb6, PsbQ, PsbP, PsbS, PsbY, Psd1, PsdH, PsdG, PsdN [14, 37] są z tymi oczekiwaniami w pełni zgodne o tyle trudno zrozumieć fizjologiczny sens osłabienia ekspresji genów kodujących *Rubisco* (*RbcL*, *RbcS-1A* oraz *RbcS-1B*), jej aktywazę (*Rca*) oraz apobiałka chloroplastowej syntazy ATP u *A. thaliana* i jęczmienia eksponowanych na suszę [14, 16]. Zrozumienie sensu adaptacyjnego tych zmian wymaga dalszych badań.

Niektóre spośród genów kodujących białka chloroplastowe niezwiązane bezpośrednio z fotosyntezą także podlegają wyraźnym zmianom poziomu ekspresji w odpowiedzi na ekspozycję rośliny na suszę np. w liściach jęczmienia wzmacniana była ekspresja genu kodującego podjednostkę ClpD chloroplastowej proteazy ClpDP [16], a w tkankach *A. thaliana* ekspresja dwóch genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy karotenoidów [14].

#### IV-1.7. Geny związane z metabolizmem węglowodanów

Wydaje się, że jednym z kluczowych elementów zespołu mechanizmów wiodących do adaptacji do suszy jest akumulacja węglowodanów o charakterze osmotitów w tym trehalozy, rafinozy, fruktanów i galaktinolu. Przypuszcza się, że funkcja osmotitów w warunkach suszy polega na zapewnieniu w komórce odpowiednio niskiego potencjału wody komórek [39]. U *A. thaliana* zaobserwowano wzrost poziomu transkrypcji genów kodujących: prawdopodobną syntazę 6-fosfotrehalazy (*TPS11*), białko podobne do syntazy rafinozy, oraz potencjalną syntazę galaktinolu (*GolS2*) [14, 15]. Doświadczenia z wykorzy-

staniem techniki mikromacierzy DNA potwierdziły udział produktów wielu innych genów kodujących białka związane z metabolizmem węglowodanów w mechanizmach adaptacyjnych uruchamianych w warunkach suszy. Dotyczy to np. genów, które, kodują białka biorące udział w procesach glikolizy i glukoneogenezy, a także metabolizmie skrobi i sacharozy. U *A. thaliana* wzrastała ekspresja genów kodujących enolazę,  $\beta$ -glukozydazę, syntazę sacharozy i  $\alpha$ -amylazę, spadał natomiast poziom ekspresji genów kodujących: potencjalną  $\beta$ -glukozydazę (*BGL1*), bisfosfatazę fruktozy, dehydrogenazę 3-fosfogliceroaldehydu (*GapA*), oraz aldolazę fruktozo-1,6-bisfosforanu [14].

Zmiany poziomu ekspresji w odpowiedzi na stres suszy dotyczyły również genów związanych z biosyntezą ściany komórkowej. W liściach *A. thaliana* wzrastał poziom ekspresji trzech genów kodujących różne formy dehydrogenazy alkoholu cynamonowego (CAD), a także genów kodujących: potencjalną reduktazę cynamono-CoA, genów transferazy ksyloglukan: ksyloglukozyl (*XTH22* i *XTR3*), chitynazę, białko z rodziny pektynoesteraz i homolog białka DC 1.2, wykazujący aktywność inhibitorową dla pektynoesteraz [14]. Spadał natomiast poziom akumulacji transkryptu genu *Exgt-A1* kodującego jedną z form transferazy ksyloglukan: ksyloglukozyl [14]. Po dłuższym okresie ekspozycji na suszę w liściach jęczmienia zaobserwowano również spadek poziomu transkrypcji genu kodującego syntazę celulozy 7 [16].

#### IV-1.8. Geny kodujące białka związane z biosyntezą i degradacją białek

W wyniku ekspozycji na suszę spada poziom ekspresji wielu genów kodujących białka związane z aparatem biosyntezy białek. Dotyczy to między innymi genów kodujących białka rybosomalne wchodzące w skład podjednostki rybosomu 50S u *A. thaliana*: *RPL12-A*, *RPL12-C* oraz *RPL27* [14]. Z kolei w liściach jęczmienia po 10h ekspozycji na suszę spadał poziom akumulacji transkryptu białka L6 wchodzącego w skład podjednostki rybosomalnej 60S, zaobserwowano także wzrost poziomu ekspresji genu kodującego białko z rodziny Rip, biorące udział w negatywnej regulacji biosyntezy białek [16].

Zmiany poziomu ekspresji zaobserwowano również w grupie genów kodujących białka związane z degradacją białek zachodzącą na terenie cytoplazmy. U *A. thaliana* wzrastał poziom ekspresji genu kodującego białko z rodziny proteaz aspartylowych,

spadał natomiast poziom ekspresji genu kodującego kodującego inhibitor proteaz Dr4 [14].

#### IV-2. Geny kodujące specyficzne czynniki transkrypcyjne

Eksperymenty z wykorzystaniem techniki mikromacierzy DNA dostarczyły również informacji o szerokiej gamie czynników transkrypcyjnych biorących udział w adaptacji roślin do niedoboru wody. U *A. thaliana* w odpowiedzi na suszę wzrastał między innymi poziom ekspresji genów kodujących białka z rodziny DREB/CBF. Białka te zawierają domenę AP2, która wiąże się z motywem DNA określanym jako CRT/DRE (ang. *C-repeat/dehydration-responsive element*). Dotyczy to genu kodującego Dreb2a, a także trzech innych genów kodujących białka zawierające domenę AP2. Wzmocniony był także poziom ekspresji kilku genów kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny Myb (Myb74, Zat10), a także genów kodujących czynniki transkrypcyjne WRKY28, WRKY39 i ATAF3. Zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji genów kodujących białka Rap2.6, HsfA6B, GBF3 (ang. *g-box binding factor*), Col1 (białko zawierające motyw palca cynkowego), bHLH017, ATHB-7, ABF3 (ang. *ABA-responsive elements-binding factor*) i RD22BP1. Spadał natomiast poziom ekspresji genów kodujących takie czynniki transkrypcyjne jak BLH2, ZIGA2 (ang. *GAP-like zinc finger-containing protein*) i Lil3 [14].

#### IV-3. Analiza motywów promotorowych występujących w genach podlegających regulacji w odpowiedzi na suszę

Promotory genów *A. thaliana* podlegających zmianom ekspresji w odpowiedzi na suszę zostały poddane analizie w poszukiwaniu charakterystycznych motywów. W promotorach wielu genów, których ekspresja ulegała wzmocnieniu w odpowiedzi na suszę znaleziono elementy biorące udział w odpowiedzi na kwas abscysynowy — ABRE ((Py-ACGTG(T/G)C). Nie jest to faktem zaskakującym, gdyż rola kwasu abscysynowego w mechanizmach adaptacyjnych do suszy została dobrze udokumentowana, chociaż dokładny mechanizm transdukcji sygnału nie został jeszcze poznany [40, 41].

W genach *Cor78*, *kin1* i *COR403-PM* znaleziono także motywy CRT/DRE (ang. *C-repeat/dehydration-responsive element*): TACCGACAT, które wiążą białka zawierające domenę AP2. Innym często występującym motywem była sekwencja rdzeniowa motywu CRT/DRE (CCGAC). Również w tym przy-

padku potwierdzone zostały wcześniejsze informacje o udziale tych elementów w zależnych od deficytu wody mechanizmach adaptacyjnych roślin [42]. Żadnego z wyżej wymienionych motywów nie znaleziono natomiast w promotorach genów *ABF3*, *CAD*, *ATHB-7*, *XTR*, a także genu kodującego  $\alpha$ -amylazę [14].

Analiza motywów promotorowych występujących w genach, których ekspresja podlega zmianom w odpowiedzi na stres suszy potwierdziła więc dotychczasowe doniesienia o co najmniej dwóch szlakach transdukcji sygnału uruchamianych w wyniku ekspozycji roślin na stres suszy: jednej — zależnej od ABRE i drugiej — zależnej od białek Dreb. Istnieją jednak dane sugerujące możliwość udziału w mechanizmach adaptacyjnych do suszy także innych szlaków transdukcji sygnału [40].

#### V. Podsumowanie

Zaprezentowane w niniejszym opracowaniu dane potwierdzają, jak znaczącym rozszerzeniem i uszczegółowieniem wiedzy odnoszącej się do ekspresji genów roślinnych w odpowiedzi na zmieniający się kontekst środowiskowy zaowocowało wprowadzenie do arsenału metod biologii molekularnej techniki mikromacierzy DNA.

Ze względu na ogromną ilość danych, jakich dostarcza nawet pojedynczy eksperyment mikromacierzowy, najpoważniejszym wyzwaniem stojącym przed producentami i użytkownikami aparatury mikromacierzowej jest udoskonalenie metod obróbki gromadzonych danych, tak, aby niosły one większy potencjał „interpretowalności fizjologicznej”. Niemniej poważnym wyzwaniem jest projektowanie i realizacja eksperymentów zmierzających do wyjaśnienia istoty szlaków sygnalizacyjnych wiążących bodziec środowiskowy z odpowiedzią rośliny na poziomie akumulacji transkryptów. Można oczekiwać, że stworzenie opartych na wynikach analiz mikromacierzowych baz danych kompilujących informacje o profilach ekspresji genów zmieniających się wraz ze zmianami warunków środowiskowych i odpowiednich szlakach sygnalizacyjnych, jak również informacje o zmianach profilu ekspresji genów towarzyszących realizacji programu ontogenetycznego przyniesie wręcz rewolucyjny postęp biologii komórki roślin.

Artykuł otrzymano 6 maja 2004

Zaakceptowano do druku 20 września 2004

1. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5350-5354
2. Berk AJ, Sharp PA (1977) *Cell* 12: 721-32
3. Saiki RK, Schraf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, Arnheim N (1985) *Science* 230: 1350-1354
4. Ewing RM, Kahla AB, Poirot O, Lopez F, Audic S, Claverie JM (1999) *Genome Res* 9: 950-59
5. Donson J, Fang Y, Espiritu-Santo G, Xing W, Salazar A, Miyamoto S, Armendarez V, Volkmuth W (2002) *Plant Mol Biol* 48: 75-97
6. Ishii M, Hashimoto S, Tsutsumi S, Wada Y, Matsushima K, Kodama T, Aburatani H (2000) *Genomics* 68: 136-43
7. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995) *Science* 270: 484-487
8. Brown PO, Botstein D (1999) *Nat Genet* 21(1 Suppl): 33-37
9. Lipshutz R, Fodor SPA, Gingeras TR, Lockhart DJ (1999) *Nat Genet* 21: 20-24
10. Triche TJ, Schofield D, Buckley J (2001) *Cancer J* 7: 2-15
11. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL (1996) *Nat Biotechnol* 14: 1675-80
12. Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH, Lockhart DJ (1997) *Nat Biotechnol* 15: 1359-1367
13. Rossel JB, Wilson IW, Pogson BJ (2002) *Plant Physiol* 130: 1109-1120 ([www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.005595](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.005595))
14. Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002) *Plant J* 31: 279-292
15. Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2001) *Plant Cell* 13: 61-72
16. Ozturk ZN, Talame V, Deyholos M, Michalowski CB, Galbraith DW, Gozukirmizi N, Tuberosa R, Bohnert HJ (2002) *Plant Mol Biol* 48: 551-573
17. Schulze A, Downward J (2001) *Nat Cell Biol* 8: 190-195
18. Southern E, Mir K, Shchepinov M (1999) *Nat Genet* 21: 5-9
19. Mace ML, Montagu J, Rose, McGuinness G (2000) W: Schena M (red.) *Novel Microarray Biochip Technology*, Eaton Publishing, BioTechniques, Natick, MA, str. 39-64
20. Fodor SPA, Read JL, Pirrung MC, Stryer LT, LU A, Solas D (1991) *Science* 251: 767-773
21. Warrington JA, Dee S, Trulson M (2000) W: Schena M (red.) *Biochip Technology*, BioTechniques Books, Natick, MA, str. 119-148
22. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM (1999) *Nat Genet* 21: 10-14
23. Hegde P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Hughes JE, Snesrud E, Lee N, Quackenbush J (2000) *Biotechniques* 2: 548-550, 552-554
24. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14863-14868
25. Bowcock AM, Shannon W, DU F, Duncan J, Cao K, Aftergut K, Catier J, Fernandez-Vina MA, Menter A (2001) *Hum Mol Genet* 10: 1793-1805
26. Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitarcewan S, Dmitrovsky E, Lander ES, Golub TR (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2907-2912
27. Queitsch CH, Hong SW, Vierling E, Lindquist S (2000) *Plant Cell* 12: 479-492
28. Denecke J (1996) *Plant Physiol Biochem* 34: 197-205.
29. Conner TW, Lafayette PR, Nagao RT, Key JL (1990) *Plant Physiol* 94: 1689-1695
30. Wu CH, Capar T, Browse J, Lindquist S, Somerville C (1988) *Plant Physiol* 88: 731-740.
31. Sato Y, Murakami T, Funatsuki H, Matsuba S, Saruyama H, Tanida M (2001) *J Exp Bot* 52: 145-51.
32. Chattopadhyay S, Puente P, Deng XW, Wei N. (1998) *Plant J* 15: 69-77
33. Giuliano G, Pichersky E, Malik VS, Timko MP, Scolnik PA, Cashmore AR (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7089-93.
34. Close TJ (1996) *Physiol Plant* 97: 795-803
35. Close TJ (1997) *Physiol Plant* 100: 291-296
36. Knight H, Trewavas AJ, Knight MR (1997) *Plant J* 12: 1067-1078
37. Rizhsky L, Liang H, Mittler R (2002) *Plant Physiol* 130: 1143-1151
38. Ivanov AG, Morgan RM, Gray GR, Velitchkova MY, Huner NP (1998) *FEBS Lett* 430: 288-292
39. Hare PD, Cress WA, Staden J (1998) *Plant Cell and Environ* 21: 535-553
40. Bray AE (1997) *Trends Plant Sci* 2: 48-54
41. Zeevaart JAD, Creelman RA (1988) *Annu Rev Plant Physiol* 39: 439-473
42. Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow M (1994) *Plant Mol Biol* 5: 701-713

# Akwaporyny — nowe spojrzenie na transport wody w roślinach

## Aquaporins — new entry into plants water movement

GRAŻYNA DĄBROWSKA, BEATA GŁOWACKA

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Identyfikacja pierwszej akwaporyny
- III. Budowa kanałów wodnych
- IV. Funkcje i podział akwaporyn
- V. Ekspresja i regulacja aktywności akwaporyn
- VI. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Discovery of first aquaporin
- III. Structure of water channels
- IV. Functional characteristic and classification of aquaporins
- V. Expression and regulation of activity of aquaporins
- VII. Summary

**Wykaz stosowanych skrótów:** CDPK — kinaza białkowa zależna od jonów wapnia (ang. *calcium-dependent protein kinase*); MIP — integralne białka błonowe (ang. *membrane integral protein*); NLM — białka MIP błon peribakterioidu (ang. *nodulin-26-like MIP*);  $P_f$  — współczynnik przewodnictwa wody; PIP — białka błonowe plazmalemy (ang. *plasma — membrane-intrinsic proteins*); TIP — białka błonowe tonoplastu (ang. *tonoplast intrinsic proteins*)

### I. Wprowadzenie

Woda jest podstawowym składnikiem żywych organizmów. Zasadniczą rolę w przewodzeniu wody i kontrolowaniu poziomu transpiracji w organizmach roślinnych odgrywają tkanki naczyniowe i komórki ochronne.

Ustawiczna wymiana cząsteczek pomiędzy komórkami a ich otoczeniem jest niezbędnym elementem dla prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Niezwykle istotną dla tego procesu jest wysoka specyficzność mechanizmów biorących udział w transporcie substancji zarówno do, jak i z wnętrza komórki, co jest możliwe dzięki istnieniu selektywnie przepuszczalnej bariery jaką jest błona komórkowa. Substancje odżywcze jak np. cukry czy aminokwasy są pobierane, a produkty takie jak  $\text{CO}_2$  usuwa-

ne, natomiast stężenie wewnątrzkomórkowe jonów  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  musi być utrzymane na określonym poziomie. Plazmalemma i tonoplast zapewniają zachowanie wewnątrzkomórkowej homeostazy. Jak wszystkie błony, są one zbudowane z hydrofobowej dwuwarstwy lipidowej oraz białek transbłonowych. Taka budowa umożliwia przepływ wody, jonów i metabolitów a także pozwala na utrzymanie stałego pH cytoplazmy, które jest wyższe o trzy jednostki od pH wakuolarnego. Dwuwarstwa fosfolipidowa jest przepuszczalna dla gazów takich jak  $\text{O}_2$  i  $\text{CO}_2$ , które mogą przenikać przez nią na drodze prostej dyfuzji, a jednocześnie słabo przepuszczalna dla wody i prawie całkowicie nieprzepuszczalna dla substancji hydrofilnych (cukrów, aminokwasów), których przeniesienie jest uzależnione od transportu błonowego. Białka transbłonowe stanowią specyficzne kanały dla poszczególnych substancji i są zaangażowane w transport protonów, nieorganicznych jonów, substancji organicznych przez plazmalemmę i tonoplast w tempie optymalnym dla potrzeb komórki [1]. W błonach biologicznych występują trzy typy białek transportowych, różniących się zarówno rodzajem transportowanych substancji jak i mechanizmem transportu. Są nimi pompy zależne od ATP, kanały białkowe i kointerportery [2].

Transport wody wewnątrz i pomiędzy tkankami roślinnymi zachodzi zarówno na drodze apoplastycznej jak i symplastycznej, przy czym ściśle określone ilości cząsteczek wody muszą przekroczyć barierę, jaką stanowią liczne błony komórkowe [3].

<sup>1</sup>Dr, <sup>2</sup>dr, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Pracownia Genetyki, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń, tel. 056 6114576, fax. 056 6114772, e-mail: browsk@uni.torun.pl, e-mail: beataglowacka2000@yahoo.com

Woda przemieszcza się szlakiem apoplastycznym pod wpływem sił fizycznych i jest regulowana głównie przez gradient potencjału wodnego pomiędzy glebą, rośliną a atmosferą [4], ta droga transportu jest sprzężona z transpiracją [5]. Szlak symplastyczny tworzy większy opór dla strumienia wodnego, dla którego barierą są błony lipidowe [6]. Ruch wody przez błony biologiczne jest określany przez zmiany ciśnienia osmotycznego i hydrostatycznego, co pozwala na zachowanie wewnątrzkomórkowej homeostazy [7]. Obecnie uważa się, że transport szlakiem symplastycznym jest drogą regulowaną przez dużą rodzinę kanałów wodnych — akwaporyn [8].

## II. Identyfikacja pierwszej akwaporyny

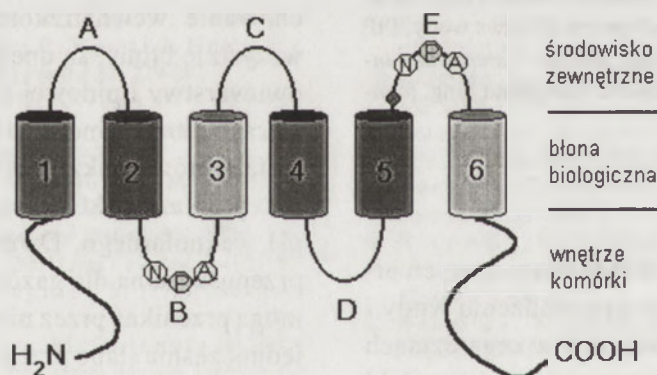
Badania zespołu Petera Agre [9] dotyczące analizy ludzkich grup krwi Rh, niespodziewanie doprowadziły do zidentyfikowania białka o masie 28 kDa. Nowo odkryte białko wykazywało tetrameryczną budowę i transmembranowy charakter, specyficzny dla kanałów błonowych. W wyniku poszukiwań tegoż białka w innych ludzkich tkankach oka-

dziewanemu rozerwaniu. Wówczas to stwierdzono zaskakującą możliwość transportu wody poprzez omawiane białka [11]. Wykazano, że silnymi inhibitorami nowo odkrytego białka są jony rtęci oraz jony innych metali ciężkich [12]. W związku ze scharakteryzowanymi funkcjonalnymi właściwościami białko nazwano akwaporyną 1 (AQP1) [13]. O znaczeniu odkrycia akwaporyn może świadczyć przyznana w 2003 roku P. Agre i M.K. Roderick Nagroda Nobla w dziedzinie chemii.

Obecnie akwaporyny zostały zidentyfikowane niemal we wszystkich znanych, żywych organizmach, włączając wyższe ssaki, pozostałe kręgowce, bezkręgowce, rośliny, bakterie, archebakterie, pierwotniaki [14-16], co wskazuje na zaangażowanie tych białek w różnorodne procesy biologiczne lub też ich udział w podstawowych procesach życiowych.

## III. Budowa kanałów wodnych

Akwaporyny są białkami tetramerycznymi o wielkości od 27 do 29 kDa. W przeciwieństwie do kanałów jonowych, gdzie 4 łańcuchy polipeptydowe



**Ryc. 1.** Model strukturalny akwaporyny. Liczbami 1-6 oznaczono kolejne domeny transmembranowe. Części pomiędzy domenami oznaczono jako pętle A-E. Pętla B i E zawierają konserwowany motyw NPA będący częścią poru. Pomiedzy domeną 5 a motywem NPA pętli E zaznaczono miejsce odpowiedzialne za inhibicję jonami metali ciężkich.

zało się, że występuje ono nie tylko w erytrocytach, ale także w ogromnych ilościach w plazmalemmie komórek kanalików proksymalnych nerek (komórki charakteryzujące się najwyższą znaną przepuszczalnością wody przez plazmalemmę u organizmów zwierzęcych) [10]. Przeszukanie sekwencji znajdujących się w bankach genów doprowadziło do znalezienia homologicznych sekwencji u mikroorganizmów, roślin i zwierząt, jakkolwiek ich funkcja nadal pozostawała nieznana. W dalszym etapie badań sprawdzano rolę odkrytego genu w oocytach *Xenopus laevis*, transfekowanych cDNA kodującym 28 kDa białko. Transfektowane komórki po przeniesieniu do hipotonicznego roztworu ulegały niespo-

budując jeden kanał, w akwaporynach każdy pojedynczy łańcuch tworzy oddzielny por wodny. Każdy por wodny przepuszcza pojedynczy strumień cząsteczek wody, jednocześnie stanowiąc nieprzepuszczalną barierę dla protonów. Pojedynczy łańcuch polipeptydowy akwaporyny sześciokrotnie przechodzi przez błonę tak, że zarówno C-koniec jak i N-koniec znajdują się po wewnętrznej stronie błony. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała niespotykaną wcześniej topologię: pojedynczy polipeptyd akwaporyn charakteryzuje się obecnością dwóch tandemowych powtórzeń odwróconych o 180 względem siebie. Każde z nich jest tworzone przez trzy transmembranowe domeny i łączące je pętle. Dwie z pię-

ciu pętli (pętla B i E) zawierają charakterystyczny motyw asparagina — prolina — alanina (NPA) [11]. Pierwsza i druga oraz trzecia i czwarta domena transmembranowa wykazują silnie hydrofobowy charakter, a w motywach NPA Asn-76 i Asn-192 zawierają spolaryzowane reszty umożliwiające wiązanie cząsteczek wody. Pętla B i E wyścielające kanał zawierają krótkie odcinki  $\alpha$ -helis, tworzące cząstkowo dodatni ładunek wewnątrz błony. Ich obecność nadaje akwaporynom zdolność do zablokowania transportu protonów, a to wyjaśnia, w jaki sposób w nerkach następuje resorpcja setek litrów wody dziennie, a jednocześnie wydalone są kwasy i ich pochodne [11]. Natomiast miejsce odpowiedzialne za inhibicję jonami metali ciężkich zostało zidentyfikowane w pozycji Cys-189, w pobliżu motywu NPA pętli E [17].

Opierając się na powyższych danych i analizach zdjęć z mikroskopu elektronowego, A g r e i wsp. zaproponowali trójwymiarowy model akwaporyny, nazwany modelem klepsydry [11]. Pętla zawierająca motyw NPA, z których jedna znajduje się po wewnętrznej stronie błony, a druga na zewnątrz składają się do wewnątrz błony i zachodzą na siebie w miejscu sekwencji NPA tworząc przewężenie w błonie plazmatycznej i pojedynczy kanał pomiędzy utworzoną strukturą. Tetrameryczna struktura AQP jest prawdopodobnie niezbędna do stabilizacji pozycji indywidualnych monomerów. Przestrzeń pomiędzy poszczególnymi monomerami zawiera cztery niezależne pory, każdy o średnicy około 3 Å tj. wielkość pojedynczej cząsteczki wody [18].

#### IV. Funkcje i podział akwaporyn

Akwaporyny są filogenetycznie starą rodziną białek kanałowych, które transportują wodę i niektóre metabolity poprzez błony biologiczne [19]. Wiele spośród nich reguluje przewodnictwo hydrauliczne błon, w których się znajdują i powoduje 10- do 20-krotny wzrost współczynnika przewodnictwa wody ( $P_f$ ) tych struktur. Najbardziej aktywne są akwaporyny wysoce specyficzne dla wody, które mogą transportować przez pojedynczą podjednostkę białkową do miliarda cząsteczek wody na sekundę [20]. Niemal wszystkie białka rodziny akwaporyn należą do integralnych białek błonowych nazwanych białkami MIP (ang. *Membrane Integral Protein*) [21]. Jednak niektóre białka z rodziny MIP nie transportują wody, lecz stanowią kanały dla mocznika [22] czy glicerolu, jak np. wyizolowane z *E. coli* białko GlpF [23]. U niektórych ssaków zidentyfikowano wielofunkcyjne białka MIP, takie jak AQP 7

transportujące zarówno wodę jak i glicerol [24]. Innym przykładem może być *Chara corallina*, modelowa roślina w badaniach nad interakcjami pomiędzy transportem wody i innymi substancjami, u której zaobserwowano, iż niskocząsteczkowe substancje organiczne takie jak alkohole, mogą być również przenoszone przez kanały wodne [6, 25].

Badania M. E. B l a n k i H. E h m k e [26] wykazały, że akwaporyna 1 (AQP1) może być zaangażowana w transport  $\text{CO}_2$  poprzez błony biologiczne, lecz fizjologiczne znaczenie transportu tego gazu pozostaje niewyjaśnione. Natomiast akwaporyna z *Nicotiana tabacum* ułatwia transport błonowy  $\text{CO}_2$  w roślinie na poziomie komórkowym i ma istotne znaczenie dla fotosyntezy i otwierania aparatów szparkowych. Przepuszczalność  $\text{CO}_2$  związana z NtAQP1 ma znaczenie fizjologiczne w warunkach gdy gradient  $\text{CO}_2$  przez błonę komórkową jest mały, taki jak pomiędzy wnętrzem komórki roślinnej a atmosferą [27].

Biorąc pod uwagę stosunkowo wysoką specyficzność akwaporyn zaskakująca jest ich ogromna różnorodność u organizmów zwierzęcych, a przede wszystkim u roślin [11, 28]. W badaniach genomu *A. thaliana* wykazano istnienie 38 sekwencji o rozmiarach od 2 do 3 kpz, homologicznych do różnych podrodzin akwaporyn [3], natomiast u człowieka scharakteryzowano, zarówno na poziomie molekularnym jak i funkcjonalnym, 11 członków rodziny akwaporyn [11].

Bogactwo akwaporyn, mnogość pełnionych przez nie funkcji oraz różnorodna lokalizacja zarówno w licznych organach jak i na poziomie subkomórkowym sprawia, że w zależności od rozpatrywanych aspektów badacze dzielą rodzinę akwaporyn na różne sposoby.

Roślinne akwaporyny na podstawie homologii sekwencji oraz ze względu na ich subkomórkową lokalizację, klasyfikuje się w dwie podstawowe podrodziny:

- akwaporyny błon komórkowych PIP (ang. *Plasma — membrane- Intrinsic Proteins*) obejmujące dwie grupy PIP1 i PIP2
- akwaporyny tonoplastowe TIP (ang. *Tonoplast Intrinsic Proteins*) [21].

Dodatkowo wyróżnia się grupę akwaporyn błon peribakterioidu NLM (ang. *Nodulin-26-Like MIP*) znajdujących się w brodawkach korzeniowych wiążących azot u roślin motykowych [29].

Ze względu na specyfikę transportu kanały wodne dzieli się na akwaporyny i gliceroakwaporyny [11]. Jednak mechanizm wielofunkcyjnego transportu przez akwaporyny nie jest do końca poznany, dlatego

wyduje się, iż najbardziej uzasadniony podział opiera się na wewnątrzkomórkowej lokalizacji akwaporyn.

Podrodziny TIP i PIP posiadają odmienną lokalizację subkomórkową. Integralne białka tonoplastowe (TIP) są głównie zlokalizowane w błonach wakuolarnych, natomiast integralne białka plazmalemy znajdują się przede wszystkim w błonie komórkowej. Pomimo, że białka PIP nie zawsze są zlokalizowane w plazmalemmie, a białka TIP w tonoplaście, wydaje się oczywiste, że różne izoformy akwaporyn korespondują z wewnątrzkomórkową kompartmentacją, a same akwaporyny stanowią istotny marker w biologii molekularnej dla identyfikacji pochodzenia roślinnych błon biologicznych [7].

Akwaporyny różnią się między sobą także efektywnością w przepustowości dla cząsteczek wody. Analiza 23 genów MIP *Arabidopsis* oparta na badaniach ich ekspresji w oocytach *X. laevis* i obserwacjach zmian przepuszczalności plazmalemy dla wody, zweryfikowała tylko kilka z nich jako akwaporyny. Nadal niewyjaśnionym pozostaje fakt, czy wszystkie 23 produkty genów MIP poddane analizie są akwaporynami, czy też część z nich obok wody transportuje inne substancje, lub też pełni zupełnie odmienne funkcje [21, 28].

## V. Ekspresja i regulacja aktywności akwaporyn

Ze względu na elementarną funkcję wody, jej transport w organizmach żywych musi podlegać ścisłej kontroli. Różnice w ekspresji genów akwaporyn między różnymi komórkami i tkankami wykazało wiele zespołów badawczych [15, 30, 31]. Akwaporyny ulegają silnej ekspresji w tkankach, gdzie ma miejsce intensywniejszy przepływ metabolitów i gdzie powinny być dostarczone duże ilości wody. Obecnie wiadomo, że większość poznanych akwaporyn występuje głównie w tkankach przewodzących. Natomiast niektóre tonoplastowe akwaporyny ulegają silnej ekspresji w merystemach, w miejscu biogenezy wakuolarniej. Zróżnicowana ekspresja genów kodujących odmienne izoformy akwaporyn podczas rozwoju organizmów roślinnych została powiązana z różnorodnymi procesami fizjologicznymi, włączając zamykanie i otwieranie aparatów szparkowych, ruchy organów, wzrost wydłużeniowy komórek, podziały komórkowe [13, 14, 32-34]. Ekspresja niektórych genów z grupy PIP, jak na przykład RD28 u *A. thaliana* czy NeMip2 i NeMip3 u *Nicotiana excelsior*, jest stymulowana suszą [35, 36] a u *Mesembryanthemum crystallinum* ekspresja MIPA — akwapo-

ryny zlokalizowanej w plazmalemmie, jest hamowana podczas stresu solnego [37]. Ponadto u *Arabidopsis* scharakteryzowano akwaporynę z grupy PIP1, której ekspresja nie zmienia się w znaczący sposób pod wpływem warunków stresowych [38]. Przypuszczalne powiązania pomiędzy funkcją akwaporyn w regulacji gospodarki wodnej roślin, a regulacją ekspresji kodujących je genów pozostają niewyjaśnione.

Poza regulacją przepuszczalności błon dla wody na drodze zróżnicowanej ekspresji genów kodujących akwaporyny, możliwy jest dodatkowy poziom kontroli tego procesu. Kjelbom i inni [19] sugerują, że aktywność akwaporyn regulowana jest poprzez ich fosforylację i defosforylację. Endogenna regulacja aktywności akwaporyn jest sterowana hormonami, które indukują wewnątrzkomórkową kaskadę fosforylacji. Przepuszczalność akwaporyn dla wody jest regulowana w wyniku fosforylacji reszt serynowych znajdujących się w cytoplazmatycznych odcinkach tego białka. Zlokalizowana w pierwszej cytoplazmatycznej pętli seryna 115, konserwowana u wszystkich poznanych akwaporyn, ulega fosforylacji kinazą A lub C. W przypadku kanałów wodnych z grupy PIP2 fosforylowana jest seryna 274, natomiast w akwaporynach peribakteroidu seryna 264 w rejonie C końca. Zidentyfikowano też miejsca fosforylacji dla większości akwaporyn tonoplastowych, przy czym w przeciwieństwie do akwaporyn błon komórkowych w akwaporynach wakuolarnych modyfikacji ulega treonina.

Poziom cytoplazmatycznego stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w komórkach o dużym potencjale osmotycznym jest wysoki, co jest efektem stałego napływu  $\text{Ca}^{2+}$  do wnętrza komórki przez kanały wapniowe. Jednocześnie utrzymywany jest wysoki poziom kinazy białkowej zależnej od jonów wapnia — CDPK (ang. *Calcium-Dependent Protein Kinase*), katalizującej fosforylację reszt serynowych [39]. Obniżenie potencjału osmotycznego komórki pociąga za sobą spadek cytoplazmatycznego stężenia jonów wapnia, co prowadzi do zahamowania aktywności CDPK i jest sygnałem dla defosforylacji akwaporyn z grupy PIP. Spadkowi przepuszczalności błony komórkowej dla wody towarzyszy aktywacja akwaporyn tonoplastowych i wydostanie się wody z wakuoli do cytoplazmy podstawowej [19].

## VI. Podsumowanie

Badania genetyczne dostarczają wciąż nowych danych na temat funkcji akwaporyn. Transgeniczne rośliny *Arabidopsis* transfekowane antysensowną

kopię genu *pip1* wykazywały obniżoną ekspresję kilku homologów PIP1, a ich komórki cechował niski potencjał wodny, co dostarczyło dowodów na to, że akwaporyny umożliwiają transport wody poprzez błonę komórkową [7]. Badanie transportu wody na poziomie komórkowym i tkankowym jest utrudnione z powodu dużej różnorodności białek transbłonowych i niemożnością wykluczenia ich aktywności w badaniach *in vivo*, wynikającą z blokującego działania jonów metali ciężkich na niemal wszystkie kanały błonowe. Dalsze badania nad transgenicznymi roślinami *Arabidopsis* zawierającymi antysensowną kopię genu *pip1* wykazały zwiększenie masy korzeniowej, podczas gdy rozwój łodygi pozostawał bez zmian w stosunku do kontroli [7]. Fenotyp tych roślin może być związany ze znaną wcześniej zależnością, że stosunek wielkości korzeni/łodyga kształtuje się w odpowiedzi na ich status wodny, co bezpośrednio pokazuje wpływ transportu błonowego na plastyczność rozwoju roślin. W najbliższej przyszłości analiza mutantów poszczególnych genów kodujących akwaporyny będzie dostarczała nowych danych na temat funkcji kanałów wodnych podczas wzrostu i rozwoju roślin, a także ich adaptacyjnej odpowiedzi na stresy.

Już na obecnym poziomie badań akwaporyny dostarczyły wyjątkowych molekularnych danych nawiązujących do fascynujących połączeń pomiędzy transportem wody a rozwojem roślin i odpowiedzią adaptacyjną do ich wciąż zmieniającego się środowiska zewnętrznego.

## Podziękowania

Praca finansowana z funduszu Uniwersytetu Mikołaja Kopernika — Badania własne

Artykuł otrzymano 15 lipca 2004

Zaakceptowano do druku 7 października 2004

## Piśmiennictwo

- Chrispeels MJ, Crawford NM, Schroeder JJ (1999) *Plant Cell* 11: 661-676
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM (1999) *Plant Cell* 11: 707-726
- Quigley F, Rosenberg JM, Shachar-Hill Y, Bohnert HJ (2001) *Genome Biol* 3: 1-17
- Maurel C (1997) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 399-429
- Frensch J, Hsiao TC, Steudle E (1996) *Planta* 198: 348-355
- Clarkson DT, Carvajal M, Henzler T, Waterhouse RN, Smyth AJ, Cooke DT, Steudle E (2000) *J Exp Bot* 51: 61-70
- Maurel C, Chrispeels MJ (2001) *Plant Physiol* 125: 135-138
- Silberstein C, Kierbel A, Amodeo G, Zotta E, Bigi F, Berkowski D, Ibarra C (1999) *Braz J Med Biol Res* 32: 1303-1313
- Agre P, Saboori AM, Asimos A, Smith BL (1987) *J Biol Chem* 262: 17497-17503
- Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP, Agre P (1988) *J Biol Chem* 263: 15634-15642
- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S (2002) *J Physiol* 542: 3-16
- Preston GM, Piazza-Carroll T, Guggino WB, Agre P (1992) *Science* 256: 385-387
- Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, Guggino WB, Nielsen S (1993) *Am J Physiol* 265: F463-476
- Chrispeels MJ, Maurel C (1994) *Plant Physiol* 105: 9-13
- Kirch HH, Vera-Estrella R, Golldack D, Quigley F, Michalowski CB, Barkla BJ, Bohnert HJ (2000) *Plant Physiol* 123: 111-124
- Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H (2002) *Plant Cell Environ* 25: 173-194
- Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 13052-13056
- Chou CL, Knepper MA, Hoek AN, Brown D, Yang B, Ma T, Verkman AS (1999) *J Clin Invest* 103: 491-496
- Kjellbom P, Larsson C, Johansson II, Karlsson M, Johanson U (1999) *Trends Plant Sci* 4: 308-314
- Fu D, Libson A, Miercke J.W, Weitzman C, Nollet P, Krucinski J, Stround RM (2000) *Science* 290: 481-486
- Barrieu F, Chrispeels MJ (1999) *Plant Physiol* 120: 961-968
- Eckert M, Biela A, Siefritz F, Kaldenhoff R (1999) *J Exp Bot* 50: 1541-1545
- Biela A, Grote K, Otto B, Hoth S, Herdich R, Kaldenhoff R (1999) *Plant J* 18: 565-570
- Nejsum LN, Kwon TH, Jensen UB, Fumagalli O, Frokiaer J, Krane CM, Menon AG, King LS, Agre PC, Nielsen S (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 511-516
- Hertel A, Steudle E (1997) *Planta* 202: 324-335
- Blank ME, Ehmke H (2003) *J Physiol* 550: 419-429
- Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, Kaldenhoff R (2003) *Nature* 435: 734-737
- Weig A, Deswarte C, Chrispeels MJ (1997) *Plant Physiol* 114: 1347-1357
- Johansson I, Karlsson M, Johanson U, Larsson C, Kjellbom P (2000) *Biochim Biophys Acta* 1465: 324-342
- Barrieu F, Chaumont F, Chrispeels MJ (1998) *Plant Physiol* 117: 1153-1163
- Hakman I, Olaviusson P (2002) *J Exp Bot* 53: 639-649
- Morillon R, Lienard D, Chrispeels MJ, Lassalles JP (2001) *Plant Physiol* 127: 720-723
- Moshelion M, Becker D, Biela A, Uehlein N, Herdich R, Otto B, Levi H, Moran N, Kaldenhoff R (2002) *Plant Cell* 14: 727-739
- Suleyman IA, Atsushi A, Yoshitaka N, Murata N (2000) *Plant Physiol* 122: 1201-1208
- Yamada S, Komori T, Myers PN, Kuwata S, Kubo T, Imaseki H (1997) *Plant Cell Physiol* 38: 1226-1231
- Yamaguchi K, Koizumi M, Urao S, Shinozaki K (1992) *Plant Cell Physiol* 33: 217-224
- Yamada S, Katsuhara M, Kelly WB, Michalowski CB, Bohnert HJ (1995) *Plant Cell* 7: 1129-1142
- Grote K, Trzebiatowski P, Kaldenhoff R (1998) *Protoplasma* 204: 139-144
- Johansson I, Larsson C, Ek B, Kjellbom P (1996) *Plant Cell* 8: 1181-1191

# Sesja poświęcona pamięci profesora Witolda Drabikowskiego i profesor Marii Gabrieli Sarzały-Drabikowskiej

## Muscle And Cell Motility: From Cell Physiology To Human Pathology\*

W dniach 5-6 listopada 2004 roku w Warszawie, odbyła się wspólna sesja Komisji Patologii Nerwowo-Mięśniowej PAN i Zakładu Biochemii Mięśni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, poświęcona pamięci profesora Witolda Drabikowskiego (1925-1983), założyciela Zakładu Biochemii Mięśni i twórcy szkoły biochemii białek mięśniowych, oraz profesor Marii Gabrieli Sarzały-Drabikowskiej (1936-1987), kierownika Pracowni Błon Komórek Kurczliwych w tym

Sesji odbyły się w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN, a 6 listopada (sobota) — w Instytucie Biologii Doświadczalnej. Do udziału w Sesji zaproszono byłych wychowanków i współpracowników Państwa Drabikowskich. W piątkowej sesji głos zabrali: profesor Irena Hausmanowa-Petrusewicz wraz z współpracowniczkami, profesor Anną Fidziańską i profesor Ireną Niebrój-Dobosz z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, profesor John Ger-



Zakładzie. Organizatorkami Sesji były profesor Irena Hausmanowa-Petrusewicz (Komisja Patologii Nerwowo-Mięśniowej) oraz docent Anna Jakubiec-Puka i docent Maria Jolanta Rędowicz (Instytut Biologii Doświadczalnej). W dniu 5 listopada obrady

gely i doktor Zenon Grabarek z Boston Biomedical Research Institute (USA), profesor Reinhardt Ruedel z Uniwersytetu w Ulm (Niemcy), profesor Ernesto Carafoli z Venetian Institute of Molecular Medicine w Padwie (Włochy), profesor Felix M. Goni z Uni-

\*Sesja została sfinansowana przez Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, Komisję Patologii Nerwowo-Mięśniowej oraz Polską Sieć Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN.

wersytetu w Bilbao (Hiszpania), profesor Marek Michalak z University of Alberta w Edmonton (Kanada), doktor Hanna Brzeska z National Heart, Lung and Blood Institute, NIH w Bethesda (USA) oraz profesorowie Hanna Strzelecka-Gołaszewska, Jacek

nek profesor M. Gabrieli Sarzały-Drabikowskiej — zaprezentował biografię swojej mentorki. Przedstawiono także list-wspomnienie, który na ręce organizatorek przesłał profesor Samuel V. Perry, przyjaciel profesora Witolda Drabikowskiego z Uniwersytetu



Kuźnicki i Sławomir Pikula oraz docent Anna Jakubiec-Puka i doktor Antoni Wrzosek z Instytutu Biologii Doświadczalnej. W Sesji uczestniczył również syn Państwa Drabikowskich, Krzysztof, który kończy obecnie staż podoktorski w Friedrich Miescher-Institut w Bazylei (Szwajcaria). Piątkowe obrady rozpoczęła profesor Irena Hausmanowa-Petrusewicz, która we wzruszającym wystąpieniu nakre-

w w Birmingham (Wielka Brytania). W czasie obrad wykładowcy przedstawiali najnowsze poglądy na mechanizmy regulacji mięśni (J. Gergely, Z. Grabarek, H. Strzelecka-Gołaszewska, A. Wrzosek) i systemów niemięśniowych (H. Brzeska, J. Kuźnicki, M. Michalak, K. Drabikowski). Omówiono także badania dotyczące mechanizmów prowadzących do patologii mięśniowych (A. Fidziańska, I. Niebrój-Do-



śliła sylwetkę naukową profesora Witolda Drabikowskiego (treść wystąpienia poniżej). Podczas obrad profesor Hanna Strzelecka-Gołaszewska — pierwsza doktorantka Witolda Drabikowskiego — przedstawiła bardziej szczegółowo jego karierę naukową, zaś profesor Sławomir Pikula — wychowa-

bosz wraz z I. Hausmanową-Petrusewicz, A. Jakubiec-Puka i R. Ruedel). Zajmowano się również białkami związanymi z błoną komórkową (E. Carafoli, S. Pikula), a także omówiono problematykę mikrodomen błony komórkowej (F.M. Goni). Słuchaczami i dyskutantami podczas obrad byli nie tylko

badacze z warszawskich placówek naukowych (m.in. z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Uniwersytetu Warszawskiego, Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN i Akademii Medycznej), ale także goście spoza Warszawy, z Uniwersytetu Wrocławskiego i Akademii Medycznej w Bydgoszczy oraz licznie reprezentowane środowisko medyczne. Na obrady przybyły również były asystentki techniczne Państwa Drabikowskich, Elżbieta Dąbkowska, Józefina Hertel, Urszula Koperska i Teresa Kośmicka.

Sobotnie obrady były dużo mniej formalne. Poza uczestnikami piątkowej Sesji brali w nich udział m.in. profesor Leszek Kuźnicki, przyjaciel profesora Witolda Drabikowskiego, zarówno z czasu studiów, jak i późniejszej pracy w Instytucie Biologii Doświadczalnej, a także syn i wnuk profesora Witolda Drabikowskiego, Marek i Michał Drabikowscy. Wszyscy uczestnicy dyskusji podkreślali zasługi

obojga Państwa Drabikowskich dla rozwoju biochemii mięśni nie tylko w Polsce, ale i na świecie, a także ich wielki wkład w rozwój naukowy wszystkich uczestników obrad. Profesor Ernesto Carafoli przypomniał, że to profesor Witold Drabikowski był inicjatorem i organizatorem pierwszej międzynarodowej konferencji dotyczącej białek wiążących jony wapnia. Nie obyło się bez wspomnień, anegdot, ale i dużego wzruszenia; wyrażano żal z tak niespodziewanej śmierci Obojga w ich szczytowym okresie pracy twórczej. Ponadto, docent Maria Jolanta Rędownicz, kierownik Zakładu Biochemii Mięśni i prowadząca obrady Sesji, przedstawiła obecny stan kierowanego przez siebie Zakładu, kierunki prowadzonych badań i plany na przyszłość. Na zakończenie obrad postanowiono podjąć kroki zmierzające do uczczenia pamięci profesora Witolda Drabikowskiego i jego Żony na forum ogólnokrajowym.

*Maria Jolanta Rędownicz,  
Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii  
Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN*

W imieniu Komitetu Organizacyjnego witam bardzo serdecznie wszystkich uczestników, szczególnie współpracowników, przyjaciół, kolegów i uczniów Witolda Drabikowskiego i jego żony Gabrieli. Będzie to spotkanie z nimi i ich spuścizną naukową, a więc i ludźmi, których wychowali i którzy, w ten czy inny sposób, w różnych miejscach (w kraju i poza nim) kontynuują ich dzieło.

Czuję się trochę nieswojo w roli przewodniczącego — jestem „outsiderem” zarówno w biochemii, jak i w Instytucie im. Marcelego Nenckiego — a Witold Drabikowski niewątpliwie przynależał całkowicie tak do biochemii, jak i do tego Instytutu. Mam jednak od czasu Jego niespodziewanego odejścia uczucie niespłaconego długu i to było jednym z motorów mego działania.

I ja, i grupa moich najbliższych współpracowników, byliśmy zafascynowani Witoldem od pierwszego z Nim spotkania — od międzynarodowej konferencji w Jabłonie w 1973 r., poświęconej białkom wiążącym wapń. Przyciągały nas nowe spojrzenie, nowe rozumienie mięśnia, a to wszystko w kolorystyce Jego niezwykłej osobowości. Słyszeliśmy przedtem o „najgłośniejszym biochemiku”, ale od tej konferencji rozpoczęły się nasze kontakty naukowe, i osobiste, i rodzaj współpracy. Dla neuromiologów Witold otwierał świat nowopoznanych białek, ich funk-

cji, nowego rozumienia mięśnia, w naszej pracy interesowało go „jak to jest u ludzi”, a przede wszystkim różnorodność patologicznych stanów mięśnia, bogactwo możliwych zaburzeń, zwłaszcza w ludzkiej miogenecie.

Było niezwykle przyjemnością dzielenie się z Nim nowościami — miał tyle entuzjazmu, ciekawości, zadawał tyle istotnych pytań i miał mnóstwo koncepcji, nawet w obcej sobie dziedzinie.

Jego osiągnięcia naukowe będą omawiane dzisiaj w trakcie naszego posiedzenia.

Tu przywołam moje osobiste wrażenia człowieka z boku, ale bardzo profesorem Drabikowskim zainteresowanego, wrażenia które towarzyszyły mi wtedy i przetrwały do dziś. Uderzała jego witalność, energia, pasja badacza, ciekawość prawie dziecka. Pasją tą potrafił zarazić cały zespół, ale pasją skoncentrowaną i to stanowiło o jej kreatywności. Podziwiałam również zdolność pobudzania samodzielności u członków grupy i jednocześnie ich zainteresowanie nawzajem swoimi wynikami pracy i zainteresowanie szefa wynikami każdego z nich.

Na spotkaniach międzynarodowych widoczny był ogromny prestiż naukowy, jakim się cieszył sam Drabikowski, ale także jego grupa; wyróżniała się liźzebnością (w porównaniu z tzw. Europą Wschodnią), aktywnością, umiejętnością prowadzenia dys-

kusji, oryginalnością własnych badań. Był więc badaczem z pasją, zamięłowanym nauczycielem, a także organizatorem życia naukowego, tak w kraju, jak i w skali międzynarodowej, umacniając kontakty z wszystkimi liczącymi się ośrodkami badawczymi i kreując naukowe związki międzynarodowe.

Jeśli ktoś pamięta trudności aparaturowe, odczynnikowe i stypendialne tamtego okresu w Polsce, to zrozumie, że warunki stworzone przez Drabikowskiego Jego grupie graniczyły z cudem – kosztowało to ogromnie dużo wysiłku kierownika grupy.

Nie chciałabym pisać laurki ani żywotów świętych. Witold stworzył to co stworzył, bo miał wrodzoną zdolność „leadera”; musiał też zdolność tę wykorzystać w życiu, aby stworzyć to co stworzył, nie unikając przy tym konfliktów i błędów.

Profesor Kuźnicki, w artykule napisanym bezpośrednio po śmierci Witolda napisał o Jego szkole. To prawda – Witold Drabikowski stworzył polską szkołę biochemii mięśni. Stworzył ją jako względnie młody człowiek z młodymi zapaleńcami. Była to autentycznie wielka szkoła, bez cienia zaściankowości i prowincjonalizmu, uznana na świecie, twórcza, już za życia Witolda dwupokoleniowa, do dziś żywotna. Wszedł do nauki europejskiej (i nie tylko) znacznie wcześniej niż Polska do Unii Europejskiej. Był „modelowym prekursorem” integracji nauki europejskiej.

*Irena Hausmanowa-Petrusewicz  
Przewodnicząca Komisji Patologii Nerwowo-Mięśniowej PAN*

# Stulecie urodzin Profesora Bronisława Filipowicza — Sprawozdanie z Konferencji „Modyfikowane Kwasy Nukleinowe”

W dniach 5 i 6 listopada 2004 r. w Łodzi odbyła się Konferencja „Modyfikowane Kwasy Nukleinowe”. Była ona poświęcona pamięci Profesora Bronisława Filipowicza, doktora honoris causa Akademii Medycznej w Łodzi i członka honorowego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w setną rocznicę Jego urodzin. Spotkanie, pod protektoratem JM Rektora Uniwersytetu prof. Andrzeja Lewińskiego, zorganizowane zostało przez Zakład Chemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i przez Łódzki Oddział PTBioch. Tytuł konferencji nawiązywał do tej sprzed sześciu lat (por. *Post Biochem* (1999) 45: 151-152).



Po otwarciu konferencji Prezes Towarzystwa, prof. J. Barańska przedstawiła tegorocznego laureata nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego im. Bronisława Filipowicza za popularyzację biochemii i nauk pokrewnych, którym został prof. Tomasz Twardowski z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu i z Politechniki Łódzkiej. Prof. Barańska i syn patrona nagrody, prof. Witold Filipowicz, wręczyli laureatowi medal i dyplom. Po wystąpieniach przedstawicieli Łódzkiego Towarzystwa Naukowego (ŁTN) i Towarzystwa Przyrodników im. Kopernika, z którymi również Profesor Fili-

powicz aktywnie współpracował, po wystąpieniach JM Rektora i Dziekana Wydziału Lekarskiego o Profesorze mówili wieloletni współpracownicy doc. Henryk Panusz i dr Gerhard Gnauck, wnuk Profesora, korespondent „Die Welt” w Warszawie. Pierwszy dzielił się wspomnieniami z lat pięćdziesiątych i sześćdziesiątych, lat budowy warsztatu badawczego w szczególnych warunkach politycznych. Drugi omawiał pozostawione w maszynopisie wspomnienia Profesora z lat okupacji obejmujące pracę konspiracyjną w laboratorium chemicznym i udział w powstaniu warszawskim. Z Woli na Czerniaków wiódł Jego szlak powstańczy.

Bronisław Filipowicz (1904-1988) pracę naukową rozpoczął w Zakładzie Chemii Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Warszawskiego kierowanym przez Prof. Stanisława Przyłęckiego (por. *Post Biochem* (1989) 35: 205-207). Tamże obronił rozprawę doktorską (1933) nt. hydrolizy enzymatycznej skrobi. Wyniki rozprawy opublikowane były w ówczesnych czołowych czasopismach biochemicznych: *Biochemical Journal* i *Biochemische Zeitschrift*. W r. 1945 rozpoczyna pracę w Katedrze Chemii Ogólnej i Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Łódzkiego. W r. 1949 z rąk prof. Antoniego Dmochowskiego przejmuje kierownictwo Katedry, która znalazła się wkrótce potem w strukturze nowej uczelni, Akademii Medycznej w Łodzi. Katedrą tą kieruje do przejścia na emeryturę w roku 1974. Przedmiotem Jego zainteresowań i wykonywanych z Jego inspiracji prac doświadczalnych, rozpraw doktorskich i habilitacyjnych były kwasy nukleinowe i przemiana węglowodanowa. Obok pracy wykładowcy i badacza bardzo ważna była dla niego działalność popularyzatorska. Wyrazem jej były artykuły i książki z dziedziny biochemii, wśród nich „Z tajemnic biochemii” i „Chemia i życie” a także liczne referaty. Wielu ludzi, znaczących dziś w naukach biologicznych wyznaje, że książki te leżały u początków ich fascynacji biologią. Świadcstwo takie dawało też wielu uczestników tego spotkania. Profesor Bronisław Filipowicz należał do grona członków-założycieli Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i był drugim w jego historii prezesem (1961-63). Dla środowiska łódzkiego pozostaje obok

Prof. Antoniego Dmochowskiego jednym z pionierów biochemii w naszym mieście. W 2001 r. PT Bioch ustanowił nagrodę imienia Bronisława Filipowicza przyznawaną co trzy lata. Prof. T. Twardowski jest drugim, po prof. Magdalenie Fikus (2001) jej laureatem.



Przedłużeniem sesji otwierającej konferencję było odsłonięcie wieczorem tablicy ku czci Profesora ufundowanej przez przyjaciół i uczniów Profesora w niedawno oddanym do użytku budynku Instytutu Fizjologii i Biochemii UM, a następnego dnia rano Msza św. w akademickim kościele św. Teresy.

Sylwetkę i działalność Profesora przybliżyły także krótkie wprowadzenia przewodniczących poszczególnych sesji (C.S. Cierniewski, R. Adamiak, J. Bartkowiak, M. Choraży) i prelegentów a także świadectwa przybyłych córki i syna, dawnych współpracowników oraz zaproszonych gości i nadesłane listy. Było w tych publicznych wystąpieniach i osobistych rozmowach wiele o uznaniu dla roli Profesora, Jego wierności przyjaźniom i było wiele o tych cechach charakteru, które jednały mu sympatię — o wrodzonym optymizmie, pogodzie ducha i poczuciu humoru.

Część naukową spotkania otworzył wykład laureata Nagrody im. Bronisława Filipowicza, T. Twardowskiego nt. „RNA: Jak informować społeczeństwo o dynamice zmian konformacyjnych domeny  $\alpha$ -sarycyny?” poświęcony m.in. analizie funkcji katalitycznej rRNA za pomocą antysensowych oligonukleotydów. Licząca około stu miejsc sala okazała się zbyt mała by pomieścić pragnących wysłuchać referat W. Filipowicza (Bazylea) o interferujących RNA (iRNA) regulujących ekspresję genów na poziomie transkrypcji lub poprzez oddziaływania z informacyjnym RNA. Prelegent skupił się przede

wszystkim na mikro iRNA (mi RNA), które odgrywają istotną rolę w komórkach eukariotycznych m.in. w procesach różnicowania, apoptozy i ulegają specyficznemu ekspresji w poszczególnych typach komórek (p. także Król i wsp., *Post Bioch* (2003) 49: 214-228). Z perspektywy historycznej mechanizmy regulacji poprzez RNA były przeczuwane przez Brittena i Davidsona gdy przed 35 laty formułowali oni hipotezę aktywowanego RNA (*Science* (1969) 165: 349-57). Referat był wygłoszony na zaproszenie Centrum Doskonałości Mol Med przy UM w Łodzi. Trzy dalsze referaty również dotyczyły RNA. R. Adamiak (Poznań) mówił o ostatnich badaniach swego zespołu nad lewoskrętną strukturą helisy RNA - analogiczną choć nieidentyczną ze strukturą Z DNA (por. także M. Popena i wsp., *Nucleic Acid Res* (2004) 32: 4044-54). J. Barciszewski (Poznań) przedstawił doświadczenia wykazujące oddziaływanie jonów Pb(II) z kilkunukleotydową pętlą w strukturze dwuniciowego RNA o określonej sekwencji i specyficzną hydrolizę łańcucha w obrębie tej pętli. Ponieważ występowanie takich pętli jest możliwe m.in. w sekwencjach mRNA człowieka, a działanie jonów Pb(II) jest katalityczne (nazywa się ten kompleks zymem ołowiowym), reakcja ta może być jednym z mechanizmów toksyczności ołowiu.



O syntetycznych analogach końca 5' mRNA (t.zw. kapu) mówił E. Darżynkiewicz (Warszawa). Systematyczne modyfikacje tej struktury pozwalają z jednej strony wyjaśnić mechanizmy oddziaływań czynników białkowych ze strukturą kapu, z drugiej określić znaczenie poszczególnych fragmentów struktury dla trwałości mRNA. Może to być ważne w biotechnologii lub w terapii. Trzy kolejne wystąpienia dotyczyły syntetycznych oligonukleotydów, w założeniu czynników modulujących ekspresję genów. Jednym z podstawowych warunków powodzenia tej strategii

w terapii jest oporność oligonukleotydów na enzymy degradujące, które czyhają na nie w drodze do komórki docelowej. Stąd badania wpływu modyfikacji oligonukleotydów na działanie enzymów rozbijających wiązania fosfodiesterowe i trwałość wiązań w modelowym płynie ustrojowym jakim jest osocze oraz charakterystyka enzymu odpowiedzialnego za aktywność 3'-egzonukleazy (nukleotydowa pirofosfataza/fosfodiesteraza) były tematami referatów Barbary Nawrot i Marii Koziółkiewicz z pracowni W.J. Steca (Łódź). W trzecim wystąpieniu przedstawiono syntezę antysensowych oligonukleotydów zmodyfikowanych klasterami boru komplementarnych do fragmentu mRNA kodującego białko IRS-1 ulegające nadekspresji w nowotworach piersi (A. Olejniczak, Z.J. Leśnikowski, Łódź).

Drugi dzień obrad, poświęcony DNA, otworzył referat P. Borowicza (Warszawa) nt. polskiej metody otrzymywania rekombinowanej insuliny ludzkiej (Gensulin). W referacie i ożywionej dyskusji po nim mówiono zarówno o podstawach technologii jak i meandrach zmagania o uznanie dla tego preparatu. Biotechnologię w fazie eksperymentu reprezentował jeden z dalszych referatów. J. Szemraj i wsp. (Łódź) przedstawili wyniki udanych prób otrzymywania rekombinowanych białek o właściwościach trombolityczno — przeciwwakrzepowych. Referat (J. Spychała, Chapel Hill) dotyczył regulacji 5'ekto-nukleotydu w raku piersi oraz efektu inhibitora deacetylaz histonów, który wpływa na procesy odwrotne do progresji nowotworowej. R. Oliński (Bydgoszcz) omawiając oksydacyjne uszkodzenia DNA powstające zarówno w procesie kancerogenezy jak i w zaawansowanej chorobie nowotworowej (por. Gackowski i wsp. *Int J Cancer* (2002) 101: 395-397) zwrócił m.in. uwagę na to, że osobnicza podatność na reaktywne formy tlenu może wynikać z uwarunkowań dziedzicznych — obniżonej zdolności do naprawy DNA. J. Kuśmierek (Warszawa) zajmuje się mechanizmami mutacji, o których mówi się rzadziej — mutacji przebiegającej na poziomie substratów. Modyfikacji mogą ulegać zasady deoksynukleozydotrifosforanów (dNTP) i te zmienione zasady (np. 8-oksoguanina lub pochodne etenowe) w formie monomerów są włączane do DNA. Istotnym mechanizmem obronnym są enzymy hydrolizujące niektóre zmodyfikowane dNTP do dNMP, a więc usuwające je z puli substratów polimeraz DNA. Agnieszka Bartoszek (Gdańsk) przedstawiła metodę opartą o zastosowanie enzymów restrykcyjnych do charakterystyki leku związanego kowalencyjnie z DNA opraco-

waną na przykładzie związków o odmiennej specyficzności: cisplatyny i CC-1065 (*Analyt Biochem* (2003) 313: 53-59). Nowe metody typowania bakterii opracowane przez A. Płucienniczaka i A. Masnego (Warszawa) oparte są o różnice w topnieniu poszczególnych fragmentów DNA i powielanie tych fragmentów za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) lub o wydłużanie trawionych określoną nukleazą restrykcyjną o takie same oligonukleotydy. Obydwie metody (*Biotechniques* (2001) 31: 930-934 i *Nucleic Acid Res* (2003) 31: e114) pozwalają na odróżnianie blisko spokrewnionych szczepów. Rozpoznawaniu przez białka uszkodzeń DNA, powstających zarówno pod wpływem środowiskowych czynników genotoksycznych jak i leków przeciwnowotworowych poświęcił swój referat P. Widłak (Gliwice). Znaczenie oddziaływania tych białek z DNA może stanowić wstęp do naprawy, ale może też polegać na maskowaniu uszkodzonej sekwencji DNA, jak to ma miejsce w przypadku białka HMGB1 wiążącego się m.in. z adduktami cisplatyny, benzo(a)pirenu i aminofluorenu. Ostatni referat (A. Bednarek, Łódź) dotyczył charakterystyki powszechnie łamliwych miejsc chromosomów, które mają szczególne znaczenie w procesach kancerogenezy.

Równolegle na konferencji przedstawiono 25 komunikatów w formie plakatowej, z których wiele uzupełniało tematykę referatów. Zorganizowany *ad hoc* konkurs na najlepszy plakat prezentowany przez uczestnika w wieku poniżej 35 lat przyniósł w głosowaniu powszechnym nagrodę, książkę ufundowaną przez firmę Sigma-Aldrich, p. Iwone Kaweckiej (Łódź). Konferencja o dość specjalistycznej tematyce i kameralna w założeniu cieszyła się dużym zainteresowaniem.

Powodzenie konferencji zawdzięczać należy wsparciu finansowemu Komitetu Biochemii i Biofizyki PAN, Centrum Doskonałości Mol Med., Doc. H.T. Panusza (Łódź) oraz firm: ABO Grażyny Boreyszy (Gdańsk), Olympus (Warszawa), Kucharczyk, techniki elektroforetyczne (Nadarzyn), Prospekt (Warszawa) i Sigma-Aldrich (Poznań). Konferencja odbywała się w gościnnych progach Wydziału Farmaceutycznego UM.

Marek Gniazdowski  
Leszek Szmigiero  
Dorota Wilmańska

# Roczny spis treści tom 50, nr 1,2,3,4, 2004

## ARTYKUŁY

- Kamilla Bąkowska, Beata Dudzińska-Bajorek, Tomasz Twardowski** — Mini-tRNA jako narzędzie identyfikacji elementów struktury tRNA odpowiedzialnych za aminocacylację . . . . . 2
- Marek Langner, Andrzej Okruszek** — Biofizyczne podstawy skuteczności syntetycznych nośników materiału genetycznego . . . . . 11
- Michał Łęgiewicz, Jerzy Ciesiołka** — Rybozomy wirusa zapalenia wątroby typu D (HDV) . . . . . 19
- Alicja Trębińska, Paweł Golik** — Choroby mitochondrialne wywołane zaburzeniami w komunikacji między genomem jądrowym i organellarnym . . . . . 45
- Lidia Zabrocka, Jerzy Klimek** — Molekularny mechanizm działania hormonów tar czycy . . . . . 57
- Marta Sawczak, Zofia Szeykowska-Kulińska** — O inteinach: ich budowie, ewolucji i zastosowaniach . . . . . 69
- Anna Stypułkowska, Piotr Zwierz, Krzysztof Zwierz** — Endoglikozydazy i gli koamidazy . . . . . 82
- Marek Żywicki, Maciej Szymański, Jan Barciszewski** — Różnorodność i funkcje niekodujących regulatorowych RNA . . . . . 90
- Anna M. Zawilak, Jolanta Zakrzewska-Czerwińska** — Inicjacja replikacji chromosomu — podobieństwa i różnice między eubakteriami, archebakteriami i eu kariontami . . . . . 103
- Beata M. Gruber** — Czynn timeranskrypcyjny NF6B — nowa perspektywa w leczeniu nowotworów . . . . . 118
- .....
- .....
- Milena Sokołowska, Marek L. Kowalski, Rafał Pawliczak** — Receptory leukotrie nów cysteinylowych . . . . . 131
- Beata Olas** — Czy błonowe tratwy lipidowe biorą udział w aktywacji płytek krwi? . . . . 144
- Joanna Mikulska** — Transport białek mię dzy cytoplazmą a jądrem komórkowym: rola białka Ran . . . . . 153
- Tadeusz Pietras, Piotr Wierzbński, Paweł Górski** — Preseniliny i ich funkcja w patogenezie choroby Alzheimer a . . . . 162
- Andrzej Głowacki, Ewa M. Koźma, Kry styna Olczyk** — Biosynteza proteoglika nów keratanosiarczanowych, chondroityno siarczanowych i dermatanosiarczanowych 170
- Dominika Malińska, Anna Kiersztan** — Flawonoidy — charakterystyka i znaczenie w terapii . . . . . 182
- Jacek Turyn** — Mikrosatelitarny DNA . . . 198
- Paweł Karpiński, Dorota Dziadkowiec** — Nowopoznane bakteryjne polimerazy DNA — ich rola w tolerancji uszkodzeń genomu 209
- Andrzej Lewandowicz** — Silnie wiążące analogi stanu przejściowego fosforylasy nukleotydów purynowych — znaczenie, projektowanie i właściwości . . . . . 219
- Janusz Piechota, Roman Szczęśny** — Wybrane aspekty biogenezy białek łańcu cha oddechowego w mitochondriach ssa ków. . . . . 228
- Jolanta Wiejak, Elżbieta Wyroba** — Struk tura i funkcja dynaminy i białek dynamino podobnych . . . . . 240
- Joanna Kołodziejczyk, Paweł Nowak** — Układ fibrynolityczny w rozwoju miażdżycy 248

**Zdzisław Kochan, Joanna Karbowska** — Wydzielnicza funkcja tkanki tłuszczowej . . . . . 256

**Jolanta Zuwała-Jagiełło** — Rola kaweoli śródbłonna w endocytozie późnych produktów glikacji . . . . . 273

**Mateusz Wydro, Przemysław Lehman** — Białko zielonej fluorescencji (GFP) — struktura, własności i zastosowanie w biologii molekularnej roślin . . . . . 281

**Teresa Żołądek** — Nagroda Nobla z chemii, czyli o systemie degradacji białek . . . . . 294

**Ryszard Smolarczyk, Stanisław Szala** — Immunostymulacyjne właściwości sekwencji CpG w bakteryjnym DNA . . . . . 296

**Joanna Zawadzka-Skomiał** — Białka wiążące penicylinę oraz ich rola w procesach fizjologicznych bakterii gramujemnych na przykładzie *Escherichia coli* . . . . . 304

**Anna Jamroz-Wiśniewska, Jerzy Bełtowski** — Izoprenylacja białek . . . . . 316

**Robert Nowak, Joanna Tarasiuk** — Hamowanie procesu apoptozy w komórkach nowotworowych opornych na działanie leków przeciwnowotworowych. . . . . 330

**Anna Balcerzyk, Iwona Żak** — Apolipoproteina E — rola polimorfizmu w patogenezie licznych chorób . . . . . 344

**Wioletta Dudzińska, Alicja Joanna Hłyńczak** — Nukleotydy purynowe erytrocytów ludzkich — metabolizm i regulacja. . . . . 353

**Marta Sidoryk** — Transport glutaminy w ośrodkowym układzie nerwowym . . . . . 363

**Malgorzata Solińska, Anna Jasińska, Grzegorz Jackowski** — Technika mikromacierzy DNA w analizie wielkoskalowych zmian ekspresji genów roślinnych w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiskowe . . . . . 371

**Grażyna Dąbrowska, Beata Głowacka** — Akwaporyny — nowe spojrzenie na transport wody w roślinach . . . . . 383

## INNE

Komunikat . . . . .

Profesor Michael Laskowski — wspomnienie . . . . .

Sprawozdanie z sesji poświęconej pamięci profesora Witolda Drabikowskiego . . . . . 388

Sprawozdanie z Konferencji "Modyfikowane kwasy nukleinowe" . . . . . 392

## Indeks autorów prac przeglądowych, tom 48, 2002

### B

**Balcerzyk A** — Śląska Akademia Medyczna, Katedra i Zakład Biochemii i Genetyki Medycznej, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice, abalcerzyk@slam.katowice.pl

**Barciszewski J** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, jan.barciszewski@ibch.poznan.pl

**Bąkowska K** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

**Bełtowski J** — Akademia Medyczna im. Prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie, Katedra i Zakład Patofizjologii, ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin, jerzybel@hotmail.com

### C

**Ciesiołka J** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Pracownia Chemii i Biochemii RNA, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, ciesiolk@man.poznan.pl

## D

**Dąbrowska G** — Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Pracownia Genetyki, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń, [browsk@uni.torun.pl](mailto:browsk@uni.torun.pl)

**Dudzińska-Bajorek B** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

**Dudzińska W** — Uniwersytet Szczeciński, Wydział Nauk Przyrodniczych, Katedra Biochemii, ul. Felczaka 3a, 71-412 Szczecin, [wio-la@univ.szczecin.pl](mailto:wio-la@univ.szczecin.pl)

**Dziadkowiec D** — Uniwersytet Wrocławski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław, [dorota@microb.uni.wroc.pl](mailto:dorota@microb.uni.wroc.pl)

## G

**Głowacka B** — Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Pracownia Genetyki, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń,

**Głowacki A** — Śląska Akademia Medyczna, Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, [chem\\_klin@slam.katowice.pl](mailto:chem_klin@slam.katowice.pl)

**Golik P** — Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Genetyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, [pgolik@poczta.ibb.waw.pl](mailto:pgolik@poczta.ibb.waw.pl)

**Górski P** — Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Instytut Medycyny Wewnętrznej, Pracownia Gerontologii, ul. Kopcińskiego 22, 91-153 Łódź

**Gruber B M** — Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego, Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa, [b-gruber@il.waw.pl](mailto:b-gruber@il.waw.pl)

## H

**Hłyńczak AJ** — Uniwersytet Szczeciński, Wydział Nauk Przyrodniczych, Katedra Biochemii, ul. Felczaka 3a, 71-412 Szczecin

## J

**Jackowski G** — Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Wydział Biologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Zakład Fizjologii Roślin, Al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań, [grzesiek@amu.edu.pl](mailto:grzesiek@amu.edu.pl)

**Jamroz-Wiśniewska A** — Akademia Medyczna im. Prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie, Katedra i Zakład Patofizjologii, ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin

**Jasińska A** — Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Wydział Biologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Zakład Fizjologii Roślin, Al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań, [aniaj@rose.man.poznan.pl](mailto:aniaj@rose.man.poznan.pl)

## K

**Karbowska J** — Akademia Medyczna w Gdańsku, Katedra Biochemii, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

**Karpiński P** — Uniwersytet Wrocławski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

**Kaufman A** — Politechnika Łódzka, Instytut Biochemii Technicznej, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź, [akauf@w-s.pl](mailto:akauf@w-s.pl)

**Kiersztan A** — Uniwersytet Warszawski, Instytut Biochemii, Zakład Regulacji Metabolizmu, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, [akiersztan@biol.uw.edu.pl](mailto:akiersztan@biol.uw.edu.pl)

**Klimek J** — Akademia Medyczna w Gdańsku, Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, [li-dzab@wp.pl](mailto:li-dzab@wp.pl)

**Kochan Z** — Akademia Medyczna w Gdańsku, Katedra Biochemii, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, [kochanz@amg.gda.pl](mailto:kochanz@amg.gda.pl)

**Kołodziejczyk J** — Uniwersytet Łódzki, Katedra Biochemii Ogólnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, [joannak@biol.uni.lodz.pl](mailto:joannak@biol.uni.lodz.pl)

**Kowalski M L** — Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, ul. Pomorska 251, 91-213 Łódź

**Koźma E M** — Śląska Akademia Medyczna, Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, [chem\\_klin@slam.katowice.pl](mailto:chem_klin@slam.katowice.pl)

## L

**Langner M** — Politechnika Wrocławska, Instytut Fizyki, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław

**Lehman P** — Instytut Genetyki Roślin PAN, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, [pleh@igr.poznan.pl](mailto:pleh@igr.poznan.pl)

**Lewandowicz A** — Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa, alewand@pf.pl

## Ł

**Łęgiewicz M** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Pracownia Chemii i Biochemii RNA, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

## M

**Malińska D** — Uniwersytet Warszawski, Instytut Biochemii, Zakład Regulacji Metabolizmu, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

**Mikulska J E** — Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, Zakład Immunochemii, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław, mikulska@immuno.iitd.pan.wroc.pl

## N

**Nowak P** — Uniwersytet Łódzki, Katedra Biochemii Ogólnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

**Nowak R** — Uniwersytet Szczeciński, Wydział Nauk Przyrodniczych, ul. Felczaka 3a, 71-412 Szczecin

## O

**Okruszek A** — Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN

**Olas B** — Uniwersytet Łódzki, Katedra Biochemii Ogólnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, olasb@biol.uni.lodz.pl

**Olczyk K** — Śląska Akademia Medyczna, Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, chem\_klin@slam.katowice.pl

## P

**Pawliczak R** — Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, ul. Pomorska 251, 91-213 Łódź, rafal.pawliczak@csk.am.lodz.pl

**Piechota J** — Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Genetyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, piechota@poczta.ibb.waw.pl

**Pietras T** — Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Instytut Medycyny Wewnętrznej, Pracownia Ge-

rontologii, ul. Kopcińskiego 22, 91-153 Łódź, tad200@poczta.onet.pl

## S

**Sawczak M** — Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Zakład Ekspresji Genów, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań, msawczak@op.pl

**Sidoryk M** — Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa, marthas@cmdik.pan.pl

**Smolarczyk R** — Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice, rsmolarczyk@io.gliwice.pl

**Sokołowska M** — Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, ul. Pomorska 251, 91-213 Łódź

**Solińska M** — Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Wydział Biologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Zakład Fizjologii Roślin, Al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań, gocha\_sol@o2.pl

**Stypułkowska A** — Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2a, 15-222 Białystok 8

**Szala S** — Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice, sszala@io.gliwice.pl

**Szczęsny R** — Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Genetyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

**Szweykowska-Kulińska Z** — Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Zakład Ekspresji Genów, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań, zofszwey@main.amu.edu.pl

**Szymański M** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, mszyman@ibch.poznan.pl

## T

**Tarasiuk J** — Uniwersytet Szczeciński, Wydział Nauk Przyrodniczych, ul. Felczaka 3a, 71-412 Szczecin, tarasiuk@univ.szczecin.pl

**Trębińska A** — Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Genetyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, alicja@poczta.ibb.waw.pl

**Turkiewicz M** — Politechnika Łódzka, Instytut Biochemii Technicznej, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź, mtur@ck-sg.p.lodz.pl

**Turyn J** — Akademia Medyczna w Gdańsku, Katedra i Zakład Biochemii, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, turyn@amg.gda.pl

**Twardowski T** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, twardows@ibch.poznan.pl

## W

**Wiejak J** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Biologii Komórki, Pracownia Fizjologii Błony Komórkowej, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Wierzbński P** — Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Instytut Medycyny Wewnętrznej, Pracownia Gerontologii, ul. Kopcińskiego 22, 91-153 Łódź

**Wydro M** — Instytut Genetyki Roślin PAN, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

**Wyroba E** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Biologii Komórki, Pracownia Fizjologii Błony Komórkowej, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, e.wyroba@nenci.gov.pl

## Z

**Zakrzewska-Czerwińska J** — Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, Zakład Mikrobiologii, ul. Weigla

12, 53-114 Wrocław, zakrzew@immunoiitd.pan.wroc.pl

**Zawadzka-Skomił J** — Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Fizjologii Bakterii, ul. Ieczniakowa 1, 02-096 Warszawa, listeriajz@biol.uw.edu.pl

**Zawilak A M** — Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, Zakład Mikrobiologii, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław

**Zuwała-Jagiello J** — Akademia Medyczna, Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, ul. Szewska 38, 50-139 Wrocław, jagiellodr@interia.pl

**Zwierz K** — Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2a, 15-222 Białystok 8, kzwie@amb.edu.pl

**Zwierz P** — Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2a, 15-222 Białystok 8

## Ż

**Żak I** — Śląska Akademia Medyczna, Katedra i Zakład Biochemii i Genetyki Medycznej, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice, biochigen@slam.katowice.pl

**Żołądek T** — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Zakład Genetyki, Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, teresa@ibb.waw.pl

**Żywicki M** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, marekz@ibch.poznan.pl

# Wskazówki dla Autorów

Wydawany przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje prace przeglądowe omawiające nowe osiągnięcia, koncepcje i kierunki badawcze w dziedzinie biochemii i nauk pokrewnych; publikuje też noty z historii biochemii, zasady polskiego słownictwa biochemicznego, recenzje nadesłanych książek oraz sprawozdania ze zjazdów, konferencji i szkół, w których biorą udział członkowie Towarzystwa.

Prace przeznaczone do publikacji w „Postęпах Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych (do 20 stron tekstu licząc piśmiennictwo i tabele), minireviews (do 10 stron tekstu), oraz krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach (do 5 stron tekstu).

Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel, rycin: wykresy, schematy, reakcje, wzory i fotografie.

Wskazany jest podział artykułów monograficznych na rozdziały i podrozdziały, których rzeczowe tytuły tworzą spis treści. Zgodnie z przyjętą konwencją rozdziały noszą cyfry rzymskie, podrozdziały odpowiednio rzymskie i arabskie, np. I-1, I-2. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy przeto winni unikać składni obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie doraźnie tworzonych skrótów, nawet jeśli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z nadesłanych do Redakcji prac podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzenia zmian nie wpływających na treść pracy, deklaruje też gotowość konsultowania tekstu z Autorami.

Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”. W przypadku, gdy Autor(zy) zamierza(ją) włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów prac cytowanych, należy uzyskać i przekazać nam odpowiednią zgodę na przedruk.

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

**TEKST:** prosimy o nadsyłanie dwóch egzemplarzy wydruku oraz dyskietki z tekstem zapisanym jako \*.doc w formacie IBM PC. Wydruk powinien być jednostronny z lewym marginesem około 4 cm, z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami, z użyciem czcionki Arial CE 11 lub 12. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego prosimy o wpisanie ółówkiem na marginesie ich fonetycznego brzmienia.

Strona informacyjna jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) Autora (ów), nazwy, adresy, telefony, adresy e-mail zakładów, w których pracują Autorzy, adres do korespondencji,

tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz – w prawym dolnym rogu: liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrócony tytuł pracy, zamieszczany na okładce czasopisma (do 25 znaków).

Strona 1 (tytułowa) zawiera imiona i nazwiska Autorów, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści też w obu językach, tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym i adresem e-mail oraz wykaz stosowanych skrótów w porządku alfabetycznym.

Kolejno numerowane dalsze strony obejmują tekst pracy, piśmiennictwo, tabele, podpisy i objaśnienia rycin, wzorów i fotografii.

**PIŚMIENNICTWO:** Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3, 7, 9-26]. Odnosiniki bibliograficzne powinny mieć nową, uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez tych samych redaktorów (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady.

1. Hildebrandt GR, Aronson NN (1980) *Biochim Biophys Acta* 631: 499-502
2. Bostock CJ, Summer AT (1978) *The Eucaryotic Chromosome*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg GF Von VB (red) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, s. 541-553
4. Deleij J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stoltz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* t. 29B. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, s. 1-7
5. Franks NP, Lieb WR (1981) W: Knight C G (red) *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t. 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, s. 243-272

**ILUSTRACJE:** ryciny powinny być zapisane na dyskietce jako: \*.tif, lub \*.cdr, lub \*.psd, lub \*.eps. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Istnieje możliwość wykonania reprodukcji barwnych, ale ich koszty ponoszą Autorzy. Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów powinny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: ryciny noszą cyfry arabskiej, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ółówkiem preferowane miejsce umieszczenia ryciny czy wzoru. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Wydruki ilustracji należy na odwrocie podpisać imieniem i nazwiskiem pierwszego z Autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „górną-dół” (ółówkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

Wydruk i załączniki (w dwu egzemplarzach) oraz dyskietkę, właściwie zabezpieczone przed uszkodzeniem w czasie transportu, prosimy przelać na adres:

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”  
Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
ul. Pasteura 3  
02-093 Warszawa

## KOMUNIKAT ZARZĄDU GŁÓWNEGO

### POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

#### Dotyczący składek członkowskich i prenumeraty „Postępów Biochemii” w roku 2005

Składka członkowska w 2005 roku wynosi:

dla Członków rzeczywistych 80.- zł.

dla Członków studentów 40.- zł

w tym roczna prenumerata „Postępów Biochemii”.

Małżeństwa mogą opłacać składki w wysokości 80. + 40. = 120 zł.

Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską do 30 czerwca 2005, mają zapewnioną bezpłatną prenumeratę kwartalnika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego „Postępy Biochemii”. Członkowie, którzy opłacą składkę po tym terminie, będą mogli otrzymywać kwartalnik do czasu wyczerpania się zapasów magazynowych.

Powyższe zmiany nie dotyczą Członków Honorowych Towarzystwa.

Natomiast Członkowie-Emeryci – nadal zwolnieni z opłacania składki członkowskiej – płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” 30.- zł.

Osoby niebędące członkami Towarzystwa mogą być prenumeratorem „Postępów Biochemii”. Koszt w 2005 roku — 100 zł, w tym koszty wysyłki.

Biblioteki płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” w roku 2005 140.- zł. Cena prenumeraty obejmuje koszty wysyłki.

#### UWAGA: ZMIANA NUMERÓW KONT POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Składki członkowskie i prenumerata Kwartalnika “Postępy Biochemii”:

BPH PBK S.A. III Oddz. Warszawa, ul. Krucza 24-26;

Nr 95 1060 0076 0000 4110 5000 0371

Prenumerata Kwartalnika “Acta Biochimica Polonica”:

BPH PBK S.A. III Oddz. Warszawa, ul. Krucza 24-26;

Nr 35 1060 0076 0000 4110 5000 0384