

P. 939

27.05.2011

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2011
TOM 57
NUMER 1

Metylacja cytozyny w DNA
Biokomputery DNA
Grzyby owadobójcze



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

www.postepybiochemii.pl

<http://rcin.org.pl>

GS Junior, mój nowy najlepszy przyjaciel



... ponieważ mogę teraz sekwencjonować w moim laboratorium

Uważamy, że polubisz nowy system GS Junior. I nie tylko dlatego, że jest nowy i ekscytujący. Z wielu innych powodów. System GS Junior pozwoli Ci wykonywać sekwencjonowanie drugiej generacji w Twoim laboratorium, na Twoim stole, kiedy tylko będziesz gotowy. Ze względu na to, iż działanie systemu GS Junior jest oparte na potwierdzonej technologii 454 Sequencing, dostarczy Ci wyników, którym możesz zaufać za każdym razem. System GS Junior dostarczany jest z komputerem z przyjaznymi użytkownikowi narzędziami bioinformatycznymi, więc nie musisz być już ekspertem by składać, mapować czy analizować Twój genom, transkryptom czy metagenom. I czego tu nie lubić? By dowiedzieć się więcej o systemie GS Junior oraz w jaki sposób może Ci pomóc w pracy laboratoryjnej, odwiedź stronę: www.gsjunior.com. To może być początek pięknej przyjaźni.

System GS Junior Potęga sekwencjonowania drugiej generacji w Twoich rękach

Przeznaczony jedynie do badań w naukach przyrodniczych.
Nie do stosowania w procedurach diagnostycznych.

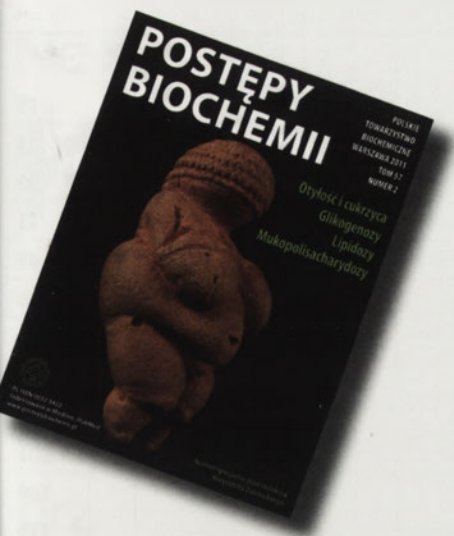


454, 454 SEQUENCING, GS JUNIOR and GS FLX are trademarks of Roche
© 2010 Roche Diagnostics GmbH. All rights reserved.

<http://rcin.org.pl>

Roche Diagnostics Polska sp. z o.o.
ul. Wybrzeże Gdynskie 6B
01-531 Warszawa
biologia.molekularna@roche.com
www.roche.pl





W NASTĘPNYM NUMERZE:

Choroby metaboliczne
Numer specjalny pod redakcją
Krzysztofa Zabłockiego.

W numerze m.in.:

Mukopolisacharydozy –
biochemiczne mechanizmy chorób
oraz możliwości terapeutyczne

Mitofuzyna 2 - ważne białko
obwodowego układu nerwowego i
powszechnie występujący regulator
metabolizmu

Wrodzone wady metabolizmu
szlaku puryn i pirymidyn

Zdjęcie na okładce:

Owadobójczy grzyb z rodzaju *Paecilomyces* wytwarza zarodniki przez pomarańczowe struktury zarodnikotwórcze – koremia. W zarodnikach może być niejednakowa liczba jąder, na skutek czego mogą powstawać kolonie różniące się morfologicznie. Fot. dr Jerzy Piątkowski z Zakładu Fizykochemii Drobnoustrojów (Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski).

Zdjęcie wykorzystano za zgodą Autora.

Wiadomości krajowe
pod red. Teresy Wesołowskiej

2

Z HISTORII BIOCHEMII

Britton Chance (1913 – 2010) – od żeglarstwa
do biofizyki i biochemii i z powrotem
Lech Wojtczak

9

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Komputery DNA

Janusz Błasiak, Tadeusz Krasieński, Tomasz Popławski, Sebastian Sakowski

13

Metylacja cytozyny w DNA i jej znaczenie
w terapii przeciwnowotworowej

Beata Plitta, Małgorzata Giel-Pietraszek,
Wojciech T. Markiewicz, Jan Barciszewski

24

Przegląd genów zaangażowanych w etiopatogenezę
płaskonabłonkowego nowotworu przełyku (ESCC)

Anna Klimczak, Jan Bitner, Janusz Szmaj

33

UDP-glukuronylotransferazy, białka siateczki
śródpłazmatycznej – struktura i mechanizm działania

Barbara Fedejko, Zofia Mazerska

41

UDP-glukuronylotransferazy w metabolizmie detoksykacyjnym
i aktywacyjnym związków endogennych oraz ksenobiotyków

Barbara Fedejko, Zofia Mazerska

49

Miozyna VI: unikalne białko motoryczne cytoszkieletu aktynowego

Marta Lenartowska, Jakub Walczewski

63

Molekularne i komórkowe mechanizmy działania
kurkuminy – dobroczynny wpływ na organizm

Marta Sikora-Polaczek, Anna Bielak-Żmijewska, Ewa Sikora

74

Roślinne ATPazy typu P

Anna Wdowikowska, Grażyna Kłobus

85

Funkcje apiraz roślinnych

Magdalena Wujak, Michał Komoszyński

92

Zależne od ATP proteazy chloroplastowe FtsH i Lon

Małgorzata Baranek, Magda Grabsztunowicz,
Bogna Sikora, Grzegorz Jackowski

101

Proteazy chloroplastowe Deg

Magda Grabsztunowicz, Robert Luciński, Małgorzata
Baranek, Bogna Sikora, Grzegorz Jackowski

109

Zewnątrzkomórkowe enzymy hydrolityczne wytwarzane
przez grzyby owadobójcze – rola w procesie infekcji

Emilia Włóka

115

Wskazówki dla autorów

122

Events/Opinions/Comments	1
HISTORY OF BIOCHEMISTRY	
Britton Chance (1913 – 2010) – from sailing to biophysics and biochemistry and back	9
REVIEWS	
DNA computing	13
Cytosine methylation in DNA and its role in cancer therapy	24
Genes responsible for etiopathogenesis in esophageal squamous cell carcinoma	33
UDP-glucuronyltransferases, proteins of endoplasmic reticulum – structure and mechanism of action	41
UDP-glucuronyltransferases in detoxification and activation metabolism of endogenous compounds and xenobiotics	49
Myosin VI: the unique motor protein of the actin cytoskeleton	63
Molecular and cellular mechanisms of curcumin action- beneficial effect on organism	74
Plant P- type ATPases	85
Functions of plant apyrases	92
ATP-dependent FtsH and Lon chloroplast proteases	101
Chloroplast Deg proteases	109
Extracellular hydrolytic enzymes produced by entomopathogenic fungi – role in an infection process	115

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE SKŁADKI CZŁONKOWSKIE W 2011 ROKU

Szanowni Państwo!

Przypominamy, że 31 marca mija termin opłacania składki członkowskiej za 2011 r. Wysokość składki wynosi 100 zł (50 zł w przypadku składek ulgowych). Bardzo prosimy o terminowe opłacenie składek. Członkowie, którzy są na emeryturze zwolnieni są z płacenia składek, nie otrzymują kwartalnika „Postępy Biochemii”, ale mogą go zaprenumerować po ulgowej cenie 50 zł rocznie. Tym z Państwa, którzy już składkę opłacili serdecznie dziękujemy.

Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską do 31 marca 2011 r. mają zapewnioną bezpłatną prenumeratę kwartalnika „Postępy Biochemii”. Członkowie, którzy opłacą składkę po 31 marca powinni liczyć się z faktem, że mogą nie otrzymać wszystkich zeszytów rocznika 2011 r. (będą otrzymywać kwartalnik do czasu wyczerpania nakładu).

Przypominamy także osobom, które zalegają ze składkami od roku 2009, że opłata zaległych składek do 31 marca 2011 r., uchroni przed wszczęciem procedury skreślenia tych osób z listy członków Towarzystwa.

Jeszcze raz serdecznie zachęcamy do skorzystania z przywilejów, jakie daje opłata składki członkowskiej w terminie.

PRENUMERATA „POSTĘPÓW BIOCHEMII” W 2011 ROKU

Prenumeratorzy instytucjonalni płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” 180 zł rocznie.

Osoby fizyczne nie będące członkami Towarzystwa mogą zaprenumerować „Postępy Biochemii” w cenie 120 zł rocznie.

Studenci i doktoranci nie będący członkami Towarzystwa prenumerują „Postępy Biochemii” po ulgowej cenie 50 zł rocznie. Konieczne jest przy tym udokumentowanie statusu studenta lub doktoranta odpowiednim zaświadczeniem.

Opłaty należy wносить na konto w banku PEKAO S.A. Oddział Warszawa, ul. Krucza 24-26; 81 1240 6003 1111 0000 4947 2703.

Opłaty z zagranicy: IBAN: PL81 1240 6003 1111 0000 4947 2703; SWIFT Code: PKOPPLPW. Koszt przelewu ponosi wpłacający.

Joanna Bendorowicz-Pikuła
Skarbnik PTBioch

PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII



Redaktor naczelny: Sławomir Pikuła; e-mail: s.pikuła@nencki.gov.pl, Redaktor senior: Zofia Zielińska

Redaktor działu krajowego: Teresa Wesolowska; e-mail: redbioch@sci.pam.szczecin.pl, Redaktor działu „Forum Młodych Biochemików”: Grzegorz Bartosz; e-mail: gbartosz@biol.uni.lodz.pl
Redaktorzy: Joanna Bendorowicz-Pikuła, Jolanta Barańska, Andrzej Dżugaj, Krystyna Grzelak, Lilla Hryniewiecka, Danuta Hulanicka, Andrzej Jerzmanowski, Andrzej Kasprzak, Wanda Kłopocka, Paweł Pomorski, Aleksander F. Sikorski, Anna Szakiel, Adam Szewczyk, Tomasz Twardowski, Marek Zembala, Krzysztof Zabłocki, Alicja Żylicz

Skład i łamanie: Małgorzata Basaj; e-mail: biochem@nencki.gov.pl

Adres redakcji: „Postępy Biochemii”, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: postepy@nencki.gov.pl; http://www.postepybiochemii.pl

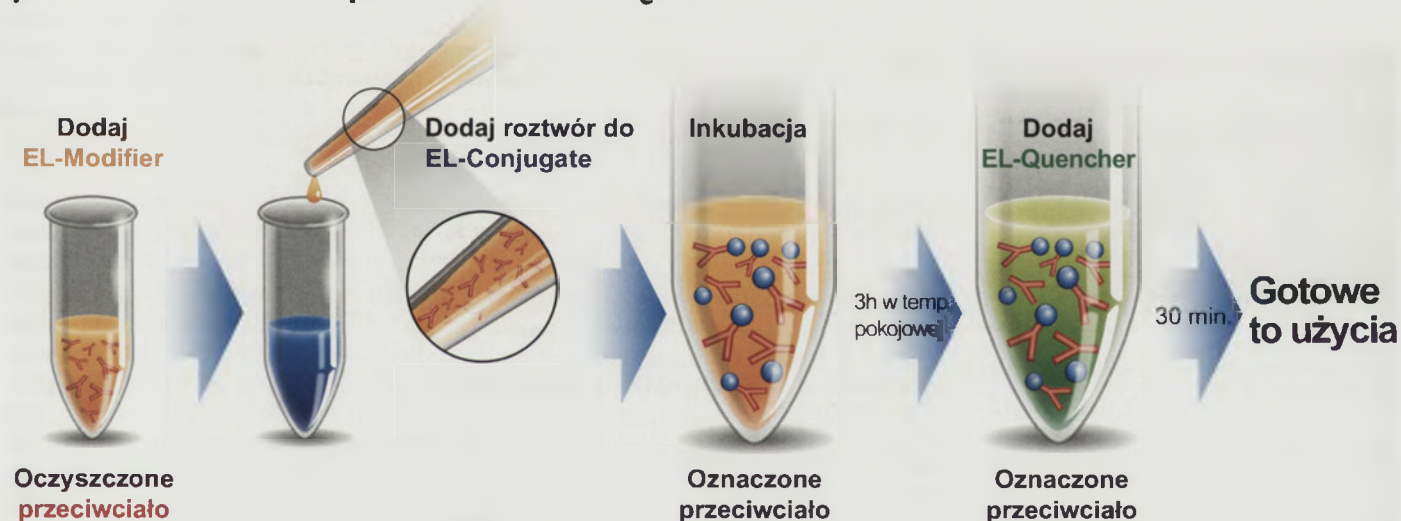
Wydawca: Polskie Towarzystwo Biochemiczne; ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel/fax (22) 5892499, e-mail: ptbioch@nencki.gov.pl, http://www.ptbioch.edu.pl

Kwartalnik „Postępy Biochemii” jest wydawany z pomocą finansową Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wzróższego,
„Postępy Biochemii” są indeksowane w Medline, IndexCopernicus i Agrolibrex. Nakład 1000 egz.

Nowość w naszym katalogu!

Kity do koniugacji przeciwciał EasyLink

Najprostszy sposób by skoniugować przeciwciała pierwszorzędowe



W procesie EasyLink dochodzi do koniugacji wolnych grup aminowych

- 25 koniugatów do detekcji enzymatycznej, biotynowej i fluorescencyjnej
- Możliwość użycia zarówno przeciwciał w mikrogramach jak i w miligramach
- jednoetapowy sposób oznaczania przeciwciała
- brak konieczności rozdzielania
- obecność BSA (max. 0.5%), Tris (max. 20mM) i azydku sodu (max. 0.1%)

Aby ułatwić Państwa badania, oferujemy także kity do oczyszczania i koncentracji wraz z danymi technicznymi:

- kompatybilne z kitami EasyLink
- łatwe w użyciu

Więcej informacji na temat kitów: www.abcam.com/EasyLink

Aby skorzystać z naszej gwarancji jakości, proszę zamawiać bezpośrednio w Abcamie:

Abcam plc | 330 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0FL, UK | Tel. 01223 696 000 | orders@abcam.com

Stypendia L'Oréal Polska dla Kobiet Nauki przy wsparciu Polskiego Komitetu ds. UNESCO. Jury X Konkursu firmy L'Oréal, pod przewodnictwem prof. Ewy Wojkowskiej, wyłoniło, spośród kilkudziesięciu kandydatur nadesłanych z wielu polskich ośrodków naukowych, 5 laureatek. Stypendia doktoranckie w wysokości 25 tysięcy złotych otrzymały: mgr Magdalena Lebiedzińska z Warszawy, mgr Anna Kozieradzka z Białegostoku, mgr Aleksandra Maruszak z Warszawy, a stypendia habilitacyjne w wysokości 30 tysięcy złotych dr Beata Pająk z Warszawy i dr Joanna Saluk-Juszczak z Łodzi (Fot 1). Uroczystość wręczenia stypendiów odbyła się 10 grudnia 2010 roku, w Zamku Królewskim w Warszawie.



Fot. 1. Stypendystki L'Oréal Polska. Od lewej mgr Magdalena Lebiedzińska, mgr Anna Kozieradzka, mgr Aleksandra Maruszak, dr Beata Pająk, dr Joanna Saluk-Juszczak

Dr Beata Pająk pracuje w Zakładzie Ultrastruktury Komórki, Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, PAN w Warszawie. Studia magisterskie ukończyła na Międzywydziałowym Studium Biotechnologii SGGW. Studium doktoranckie realizowała na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej pod opieką prof. Arkadiusza Orzechowskiego. Badała mechanizmy unikania przez komórki nowotworowe eliminacji. Następnie podjęła pracę w Zakładzie Ultrastruktury Komórki Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie. Od ponad roku aktywność naukową łączy z pracą w polskiej firmie BioVectis, w której koordynuje działanie laboratorium genetycznego. Tematem Jej rozprawy habilitacyjnej jest „Modulacja szlaków sygnałowych jako na-

rzędzie eliminacji komórek nowotworowych”. Celem prowadzonych badań jest wyjaśnienie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za oporność komórek nowotworowych gruczolakoraka okrężnicy człowieka na indukcję ich śmierci przez cytokiny układu immunologicznego takie jak interferony i tzw. ligandy śmierci. Badania zmierzają do uzyskania wiedzy, niezbędnej do wprowadzenia w przyszłości do terapii przeciwnowotworowej tzw. immunoterapii, w której podawane leki mogłyby wspomagać działanie układu odpornościowego. Dr Beata Pająk ma nadzieję, że wyniki prowadzonych przez Nią badań wniosą wkład do obecnego stanu wiedzy na temat fizjologii komórek nowotworowych i pośrednio przyczynią się do udoskonalenia terapii celowanej nowotworów jelita grubego.

Dr Joanna Saluk-Juszczak jest pracownikiem Katedry Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego. Tematem rozprawy habilitacyjnej w dziedzinie biochemii jest „Ochrona płytek krwi przez antyoksydanty egzogenne w stresie oksydacyjnym wywołanym stanem zapalnym”. Badania Stypendystki, historycznie ujmując, dotyczą właściwości i funkcjonowania płytek krwi. Jej zainteresowania koncentrowały się na stosunkowo słabo znanych poza-hemostatycznych funkcjach tych komórek, a interesuje Ją zwłaszcza aspekt udziału płytek krwi w rozwoju reakcji zapalnych oraz ich oddziaływania z komórkami układu immunologicznego, tym bardziej, że gdy rozpoczęła swoją pracę praktycznie nie istniały na ten temat doniesienia z polskich ośrodków badawczych. Prowadziła badania dotyczące fizjologicznej odpowiedzi płytek oraz zmian stopnia ich aktywacji w wyniku bezpośredniego działania odpowiedzialnych za rozwój zapalenia silnych patogenów, to jest endotoksyn bakteryjnych, czyli lipopolisacharydów pochodzących z różnych bakterii Gram-ujemnych. Obecnie zajmuje się wpływem endotoksyn na płytki na poziomie molekularnym, badając zmiany strukturalne białek i oksydacyjne uszkodzenia białek i lipi-

dów. Dotychczas wykazała zachodzenie oddziaływań pomiędzy endotoksynami bakterii a płytkami krwi oraz potwierdziła rolę płytek krwi (trakowanych do niedawna wyłącznie jako element hemostazy) jako komórek kluczowych dla rozwoju reakcji zapalnych. Ma to istotne znaczenie w planowaniu terapii przeciwzapalnych. Inny nurt badań Stypendystki stanowi oddzielne zagadnienie naukowe, odnoszące się do udziału płytek krwi w stanach patologicznych, dotyczy profilaktyki chorób związanych z nadmierną aktywacją tych komórek, poprzez wpływ substancji zaliczanych do nutraceutyków oraz składników żywności funkcjonalnej. Badania te dotyczą ochronnych właściwości wybranych związków naturalnych, które jako powszechnie dostępne w diecie mogłyby funkcjonować jako naturalne antyoksydanty egzogenne o właściwościach przeciwplatek. Stosowanie tych związków jako nutraceutyków wchodzących w skład diety skierowanej na ochronę przed chorobami sercowo-naczyniowymi, mogłoby zapobiegać jednym z głównych obecnie chorób cywilizacyjnych. Dr Joanna Saluk-Juszczak rozpoczęła także badania nad związkami polifenolowo-polisacharydowymi izolowanymi z ziół leczniczych rosnących w Polsce. Ich celem jest uzyskanie produktu pochodzenia roślinnego, który działając równocześnie jako antykoagulant i substancja hamująca właściwości prozakrzepowe płytek, wykazywałby właściwości przeciwpłytkowe, dzięki czemu znalazłby istotne zastosowanie w profilaktyce i leczeniu chorób sercowo-naczyniowych. Innowacyjne działanie produktu ma polegać na jego równoczesnym działaniu hamującym, zarówno na osoczowe elementy kaskady krzepnięcia, jak i na aktywację płytek. Prace zaplanowane są na płytkach od pacjentów z przewlekłą chorobą sercowo-naczyniową, jak również od kobiet ze zwiększonym ryzykiem zmian zakrzepowych w okresie menopauzy.

Lek. med. Anna Kozieradzka pracuje w Klinice Kardiologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. W

2005 r. ukończyła Wydział Lekarski Akademii Medycznej w Białymstoku. Od 2007 r. odbywa specjalizację z chorób wewnętrznych w Katedrze i Klinice Kardiologii i w tym samym roku odbyła 10-miesięczny staż w Zakładzie Kardiologii Molekularnej Szkoły Medycznej w Hanowerze w ramach stypendium naukowo-szkoleniowego DAAD. W czasie stażu praktycznie poznała zaawansowane techniki biologii molekularnej oraz echokardiografii u myszy. Od 2008 r. uczestniczy w studiach doktoranckich Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Stypendium L'Oreal uzyskuje w dziedzinie medycyna, genetyka, biologia molekularna. Temat rozprawy doktorskiej „Czynniki wpływające na 5-letnie rokowanie chorych z zawałem serca leczonych inwazyjnie”, a jej celem jest poznanie czynników wpływających na śmiertelność chorych z zawałem serca w 5-letniej obserwacji. Według Doktorantki jest to tematyka o podstawowym znaczeniu klinicznym. Rocznie do szpitali przyjmuje się około 150000 pacjentów z zawałem serca. Nieustannie czynione są wysiłki, aby poprawić jakość opieki zdrowotnej w tej grupie chorych oraz ich rokowanie. Na podstawie uzyskanych wyników Stypendystka pragnie zweryfikować powszechnie przyjęte poglądy dotyczące czynników ryzyka zgonu po zawale serca. Temat pracy doktorskiej obejmuje parametry kliniczne związane z rokowaniem po zawale serca. Jego kontynuacją jest projekt, w ramach którego poszukuje się czynników genetycznych wpływających na ryzyko zgonu. Projekt zakłada zbadanie kilkunastu polimorfizmów genów o udokumentowanym związku z występowaniem zawału serca. Żaden z nich nie był dotychczas badany w kontekście wpływu na śmiertelność 5-letnią po zawale. Zakłada się, że allele ryzyka zawału, mogą być jednocześnie niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi; hipoteza ta wymaga weryfikacji.

Mgr Magdalena Lebedzińska z Pracowni Bioenergetyki i Błon Biologicznych, Zakładu Biochemii, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, w Warszawie uzyskała stypendium w dziedzinie: biochemia, biologia molekularna. Tematem projektu jest: „Rola białka p66Shc w stresie oksydacyjnym związanym

z procesem starzenia oraz dysfunkcją mitochondriów.” Stypendystka rozpoczęła czwarty rok studiów doktoranckich w pracowni Bioenergetyki i Błon Biologicznych Inst. Nenckiego PAN w Warszawie, którą kieruje prof. Jerzy Duszyński. Promotorem doktoratu Laureatki jest dr hab. M. Więckowski. Stypendystka przede wszystkim interesuje się stresem oksydacyjnym. Długotrwały stres oksydacyjny osłabia komórkę, szczególnie jej systemy obronne oraz prowadzi do uszkodzenia materiału genetycznego. W aspekcie stresu oksydacyjnego i mitochondriów interesuje Doktorantkę szczególnie jedno białko, które nazywa się p66Shc, i które wydaje się być przełącznikiem regulującym zachowanie komórki w obliczu złych warunków. Stres powoduje uruchomienie przez to białko kaskady zdarzeń, która może skończyć się śmiercią komórki w wyniku zwiększonej produkcji wolnych rodników. Uzasadnieniem zainteresowania się białkiem p66Shc było spostrzeżenie, że ono powoduje wydłużenie życia u myszy. Laureatce L'Oreal udało się pokazać, że również u ludzi jest ono związane z wynikającymi ze stresu oksydacyjnego zaburzeniami. Wykazała, że u ludzi z chorobami o podłożu mitochondrialnym w patologii farmakologiczna interwencja skierowana w szlak związany z białkiem p66Shc poprawia stan komórek. Przy obecnym stanie wiedzy nie można dać jednoznacznej odpowiedzi na ile wyniki badań można odnieść do całego organizmu ludzkiego, a nie tylko do modelu komórkowego. Wydaje się jednak, iż poznawanie mechanizmów rządzących zachowaniem komórki w warunkach stresu zbliżyć może opracowania strategii przeciwdziałania skutkom zaburzeń funkcji mitochondriów..

Mgr Aleksandra Maruszak z Zespołu Kliniczno-Badawczego Chorób Zwyrodnieniowych Centralnego Układu Nerwowego, Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, PAN w Warszawie otrzymała stypendium firmy L'Oreal w dziedzinie: genetyka, biologia medyczna, neurogenetyka. Laureatka jest absolwentką dwóch kierunków - biotechnologii (SGGW) i psychologii (w ramach Międzywydziałowych Indywidualnych Stu-

diów Matematyczno-Przyrodniczych, UW). Obecnie jest doktorantką w Zespole Kliniczno-Badawczym Chorób Zwyrodnieniowych CUN prowadzonym przez prof. Marię Barcikowską. Pracę magisterską realizowała w laboratorium prof. Jacka Kuźnickiego w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej, dotyczyła ona choroby Alzheimera. Promotorem Jej pracy magisterskiej oraz doktorskiej jest dr hab. Cezary Żekanowski, prof. IMDiK. Tematem pracy jest „Analiza zmienności mitochondrialnego DNA oraz wybranych genów jądrowych u osób z chorobą Alzheimera”, a celem poznanie kolejnego elementu patogenetyki choroby Alzheimera oraz mechanizmów prowadzących do procesów neurodegeneracyjnych. Stypendystka prowadzi badania w grupie chorych z wczesną i późną postacią choroby Alzheimera; praca doktorska dotyczy analizy zmienności mitochondrialnego DNA oraz wybranych genów jądrowych w chorobie Alzheimera. Szczególnym zainteresowaniem Doktorantki jest zmienność mitochondrialnego DNA, dziedziczona po matce.

Nagrody Wydziału Nauk Medycznych PAN za osiągnięcia naukowe w 2010 r. uroczyste wręczono w dniu 17 grudnia 2010. Nagrody wręczył przewodniczący Wydziału prof. Wojciech Kostowski, obecni byli także liczni członkowie Wydziału.

Nagrodę naukową im. Jędrzeja Śniadeckiego otrzymał zespół kierowany przez prof. Krystynę Domańską-Janik z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie, za badania o znacznym stopniu oryginalności nad komórkami macierzystymi z krwi pępowinowej. Indywidualną nagrodę Wydziału otrzymała dr hab. Krystyna Chrzanowska z Instytutu Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie za badania nad genetycznie uwarunkowaną niestabilnością chromosomową. Zespołową nagrodę Wydziału wręczono zespołowi z Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie, kierowanemu przez dr hab. Małgorzatę Filip za badania nad neurologią uzależnienia od kokainy i nikotyny. Drugą nagrodę zespołową Wydziału otrzymał zespół kierowany przez prof. Janusza Sadowskiego oraz dr hab. Elżbietę Kompanowską-Jeziorską za badania nad patomecha-

nizmami nadciśnienia tętniczego (rola ATP, tlenu azotu metabolitów cytochromu P-450 i kwasów epoksykizatrienowych w regulowaniu ciśnienia tętniczego i w uwalnianiu reniny w odpowiedzi na zwiększoną podaż sodu).

Studenci prowadzący badania naukowe otrzymali **Laur Medyczny im. Wacława Mayzla**. Laureatami zostali **Magdalena Świątek** studentka Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej pracująca pod kierunkiem prof. J. Zakrzewskiej-Czerwińskiej, **Wojciech Błogowski** z Wydziału Lekarskiego Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, **Marcin Hellmann** z (obecnie na stażu w Uniwersytecie w Grenoble); Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, **Paweł Matusik**, **Krzysztof Tomaszewski**, **Katarzyna Chmielowska**, **Jan Nowak** studenci Wydziału Lekarskiego CM-UJ w Krakowie, pracujący w kole naukowym przy Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych i Gerontologii, **Edyta Szymańska**, **Sylwia Szymańska**, studentki I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, pracujące w kole naukowym przy Klinice Gastroenterologii, Hepatologii i Immunologii Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie.

Prestiżowe wyróżnienie Wydziału – **medal im. Jędrzeja Śniadeckiego** – przyznano nieobecnej na uroczystości prof. Jolancie Gutkowskiej z Wydziału Medycznego Uniwersytetu w Montrealu za badania nad działaniem angiotensyny i peptydu natriuretycznego (ANP).

Prof. Tomasz Twardowski (Fot. 2) z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, otrzymał 21.12.2010 roku **Medal Polskiej Akademii Nauk**. Prof. Michał Kleiber, prezes PAN, wręczając medal odczytał uzasadnie-

nie: „za szczególne zasługi dla rozwoju nauki polskiej i światowej, związane ze społeczną rolą nauki”.

Konkurs „Popularyzator Nauki 2010” organizowany przez serwis Nauka w Polsce Polskiej Agencji Prasowej i Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego został rozstrzygnięty w dniu 29 grudnia 2010 r. na mocy decyzji jury pod przewodnictwem prof. Michała Kleibera. **Tytuły „Popularyzator Nauki 2010”** otrzymali naukowcy, dziennikarze i społecznicy, którzy fascynują się upublicznianiem odkryć naukowych, procesów poznawczych w jednostkach badawczych. Nagrody otrzymali **dr hab. Maciej Geller** (nagroda specjalna), **dr Jan Grabski**, **dr Anna Hajdusianek** i **dr inż. Tomasz Malczyk** oraz **redaktorzy Wojciech Pastuszka**, **Cezary Łasiczka**, **Hanna Zielińska** i **reprezentant instytucji pozanaukowej Marcin Mazur**.

Dr Jan Grabski z Politechniki Warszawskiej współpracuje z warszawskim Festiwalem Nauki. Jest inicjatorem i głównym organizatorem wszystkich edycji spotkań pod hasłem „Jak to działa?”. Pokazał widzom zastosowania fizyki i techniki w urządzeniach codziennego użytku, w urządzeniach supermarketów, pod żaglami i skrzydłami oraz w medycynie. Odkrywał tajemnice promieniotwórczości, telefonii XXI wieku i Wielkiego Zderzacza Hadronów. Jest także autorem imprez „Mini Festiwal” i „Festiwal Nauki Małego Człowieka” – dedykowanych dzieciom i młodzieży. Współorganizuje coroczny Piknik Naukowy w Warszawie.

Dr Anna Hajdusianek (Fot. 3) z Politechniki Wrocławskiej pracuje na dobro Dolnośląskiego Festiwalu Nauki. Jej regularna współpraca ze szkołami, przedszkolami i przedsię-

biorstwami z Wrocławia i okolic sprawiła, że Doktor stała się autorytetem dla środowiska nauczycielskiego. Sprawiała, iż pedagodzy zapraszają ją na spotkania poświęcone nowoczesnej dydaktyce, a dzieci i młodzież tłumnie odwiedzają Akademię Młodych Odkrywców. Laureatka potrafi połączyć doświadczenia z zakresu nauk ścisłych z happeningiem i widowiskiem artystycznym, zahaczając nawet o świat baśni i magii. W upowszechnianiu nauki zaangażowała całą swoją rodzinę, czyniąc z misji popularyzatorskiej sposób na życie zawodowe i prywatne.

Dr inż. Tomasz Malczyk (Fot. 4) z Państwowej Wyższej Szkoły Zawodowej w Nysie stworzył Nyski Festiwal Nauki i rozszerza ideę współpracy festiwalowej w Europie. Jego konfe-



Fot. 4. Dr inż. Tomasz Malczyk

rencje popularnonaukowe poruszają tematy ważne dla potrzeb edukacyjnych i rozwojowych regionu nyskiego i województwa opolskiego. Zorganizowane przez dr Tomasza Malczyka otwarte wykłady promują naukę wśród doświadczonych przedsiębiorców, banków oraz pracowników administracji państwowej, a równocześnie cieszą się popularnością wśród uczniów i studentów. W tym roku prorektor opracował strukturę działania Regionalnego Centrum Transferu Wiedzy i Technologii Innowacyjnych i opublikował książkę o popularyzacji nauki.

Wyróżnienia w kategorii „Prezentacje Festiwalu Nauki” przyznano Andrzejowi Gołębiewskiemu z Uniwersytetu Warszawskiego za cykl pokazów „Fizyka dla wszystkich”, Elizie Szulińskiej wraz z zespołem Stowarzyszenia Euforis za imprezę „Dziecięcy Świat Muzyki” oraz Irene Cieślińskiej z Centrum Nauki Kopernik za wykład „Zabójstwo



Fot. 2. Prof. Tomasz Twardowski



Fot. 3. Dr Anna Hajdusianek

w **Hotelu Hilberta**". Do niedawna Andrzej Gołębiewski kierował Pracownią Pokazów Wykładowych na Uniwersytecie Warszawskim. Dla niego fizyka jest wszędzie, a prawie każde zagadnienie można obrazować w dużym tempie, we frapującym pokazie i samodzielnie wykonanych doświadczeniach. Andrzej Gołębiewski od 14 lat prezentuje cykl „Fizyka dla wszystkich” na warszawskim Festiwalu Nauki. Jego zdaniem, dla popularyzatora ważniejsze powinno być zaszczepienie w widzach ciekawości niż dogłębne wyjaśnienie jakiegoś zjawiska na pokazie. Warsztaty „Dziecięcy świat muzyki” zostały zorganizowane przez Elżę Szulińską i Stowarzyszenie Euforis we współpracy z Sinfonia Varsovia i Teatrem Wielkim Operą Narodową. Pokazały, co wspólnego ma matematyka z muzyką, na czym polega praca dyrygenta i w jaki sposób powietrze przepływa przez instrumenty dęte tak, by można było wydobyć dźwięk. Dla dzieci przygotowano zajęcia pantomimy, rytmiki i baletu, teatru muzycznego. Najmłodsi mogli spróbować swoich sił w grach plastycznych pt. „Narysuj muzykę” i napisać „Szalone partytury”. Na zakończenie warsztatów specjalny koncert zagrała Sinfonia Varsovia. Irena Cieślińska w wyróżnionym wykładzie mówiła o mrocznych sekretach matematyki. Czy wszystkie nieskończoności są równie nieskończone? Dlaczego odkrywanie tajemnic nieskończoności kosztowało ludzkość co najmniej dwie ofiary śmiertelne i dwóch matematycznych geniuszy straciło najpierw zmysły, a potem życie? Odpowiedzi na te pytania poznawali uczestnicy warsztatów „Zabójstwo w Hotelu Hilberta”. Hotel Hilberta jest przykładem klasycznego paradoksu używanego w matematyce. Mamy hotel, w którym jest nieskończenie wiele pokoi, ale wszystkie są zajęte. Przyjeżdża gość i trzeba go w jakiś sposób ulokować. Wówczas pierwszego gościa „przenosi się” do drugiego pokoju, drugiego do trzeciego i tak kolejno, a tymczasem, ponieważ pierwszy pokój zrobił się pusty, to w nim lokuje się pierwszego gościa.

Jury tegorocznej edycji konkursu postanowiło wrócić do podstaw ruchu festiwalowego, który łączy większość kandydatów. **Stąd specjalna nagroda i tytuł Popularyzatora Nauki 2010**

dla dr hab. Macieja Gellera - współtwórcy i dyrektora Warszawskiego Festiwalu Nauki (Fot. 5) za wybitne zasługi dla organizacji popularyzacji nauki w Polsce. Dr hab. Maciej Geller jest biofizykiem, pracownikiem naukowym Instytutu Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu Warszawskiego. Kierowana przez niego impreza z roku na rok cieszy się coraz większym zainteresowaniem – nie tylko warszawian. Dyrektor Geller podkreśla, że od początku istnienia warszawskiego Festiwalu Nauki, jego podstawowym sponsorem jest Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, które – niezależnie od opcji politycznej – udziela wsparcia tej szczególnej inicjatywie. Dzięki organizatorom, takim jak Maciej Geller, ruch festiwalowy w Polsce zyskuje też coraz większe poparcie, w tym finansowe, sektora gospodarki. Finansowanie imprez popularnonaukowych stało się dla przedsiębiorców, używając języka współczesnego – „trendy”. Dla uczonych zaś, udział w nich to zaszczytny obowiązek.



Fot. 5. Dr hab. Maciej Geller i prof. Magdalena Fikus

W kategorii Redakcja/Instytucja nienaukowa równorzędne nagrody otrzymali redaktorzy: Wojciech Pastuszka, Cezary Łasiczka i Hanna Zielińska (nagroda wspólna) oraz Marcin Mazur.

Wojciech Pastuszka (Fot.6) został nagrodzony za blog „Archeowieści” (<http://archeowieści.blox.pl>), w którym podaje najnowsze wiadomości z dziedziny archeologii, paleontologii i biologii ewolucyjnej. Przygotowywane przez niego artykuły są kompetentne, na wysokim poziomie naukowym, zawsze opatrzone odnośnikami do źródeł, a przy tym pisane ciekawie i przystępnie. Autor bloga stworzył forum dyskusyjne dla spotkań wirtualnych naukowców i laików. „Archeowieści” otrzymują informacje od polskich naukowców, angażują się

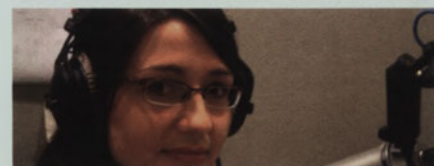


Fot. 6. Red. Wojciech Pastuszka

też w informowanie o działalności polskich muzeów i skansenów archeologicznych. Dział „Wydarzenia” informuje o najbliższych konferencjach, wykładach, wystawach czy festynach. Autor bloga „Archeowieści” pracuje hobbystycznie, po godzinach pracy.

Cezary Łasiczka i Hanna Zielińska (Fot.7) są dziennikarzami radia TOK FM. Cezary Łasiczka prowadzi w środy o godzinie 20:00 audycję „Radio-wa Akademia Nauk”, podczas której rozmawia z zaproszonymi gośćmi, zazwyczaj o naukach ścisłych. Tematykę naukową porusza również w swojej audycji „Off Czarek”. Hanna Zielińska w piątki o godz. 21:00 prowadzi audycję „Magazyn Naukowy”, w której rozmawia m.in. na temat najnowszych publikacji z dziedziny socjologii, psychologii, medycyny. Poza tym dziennikarka prowadzi też w TOK FM magazyn historyczny „Pętla czasu”. Audycji radiowych autorstwa Laureatów słucha w sumie co tydzień ponad 55 tysięcy osób.

Marcin Mazur z Podkarpackiego Amatorskiego Stowarzyszenia Astro-



Fot. 7. Red. Hanna Zielińska

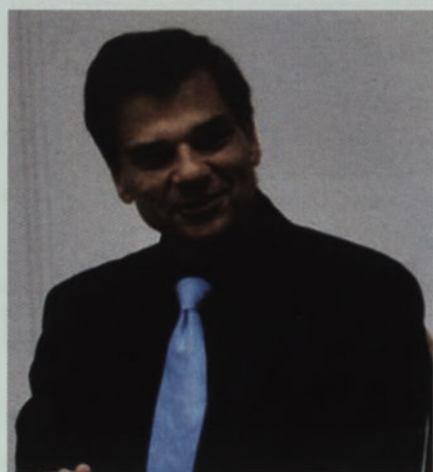
nomiczno-Astronautycznego organizuje od pięciu lat w Jasle i okolicach happeningi pod hasłem „Dogonić Kosmos”. Jego wielokierunkowe działania popiera m.in. generał Mirosław Hermaszewski, który przyjmuje kolejne zaproszenia na organizowane na Podkarpaciu spotkania. Młody pa-

sjonat astronomii i astronautyki pokazuje szerokiej publiczności, jak wiele radości daje obcowanie z nauką, uczy jak właściwie prowadzić obserwacje astronomiczne i pokazuje zastosowania tej dyscypliny w życiu codziennym. Działa na rzecz integracji środowisk lokalnych, a jego głos jest istotny nawet na szczeblu kształtowania polityki kosmicznej państwa.

Doceniając oryginalność zrealizowanych już projektów popularyzatorskich oraz umiejętne połączenie działalności edukacyjnej ze społeczną, do przyszłorocznej edycji konkursu jurorzy nominowali dr Tomasza Samojlika oraz Kawiarnię Naukową Dzieciom.

Przy okazji corocznego spotkania z najlepszymi popularyzatorami nauki **serwis Nauka w Polsce** postanowił wyróżnić tych rzeczników, którzy w największym stopniu ułatwiają pracę dziennikarzom naukowym PAP. **Wyróżnienia otrzymali: Magdalena Ochwat (Uniwersytet Śląski), Natalia Osica (Szkoła Wyższa Psychologii Społecznej) i Marek Pawłowski (Instytut Problemów Jądrowych w Świerku)** (opracowano na podstawie informacji w serwisie Nauka w Polsce).

Białka motoryczne w badaniach **dr hab. Andrzeja Kasprzaka** (Fot. 8), profesora Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego. Białko motoryczne to enzym, który w komórce zamienia energię rozpadu wysokoenergetycznej cząsteczki ATP (adenozynotrifosforanu) na energię mechaniczną, czyli tworzy ruch - następuje przesunięcie białka o określony krok, np. o odległość 4 czy 12 nm.



Fot. 8. Dr hab. Andrzej Kasprzak, prof. nadzw.

Trzy rodziny białek obecne w cytoplazmie komórki to miozyny, kinezoyny i dyneiny. Białka motoryczne łączą się ze specjalnymi „szynami” (mikrotubulami lub filamentami aktynowymi, które są polimerami białkowymi), po których mogą transportować np. organelle, kompleksy białkowe czy kwasy nukleinowe. Białko motoryczne miozyna jest odpowiedzialne za skurcz mięśnia. Ponadto białka te są też niezbędne m. in. w procesie podziału komórki. Białka motoryczne być może znajdą zastosowanie w nanotechnologii, m. in. jako nanomotoriki w elektronice. Mogą pomóc w walce z chorobami nowotworowymi czy neurodegeneracyjnymi, mogą znaleźć zastosowanie w mikrochirurgii. Białka motoryczne- kinezyna Eg5 - biorą udział w podziale komórki. Jeśli udałoby się zablokować aktywność motoryczną takich białek w wybranych komórkach (a więc spowodować, żeby nic nie przesuwały ani transportowały), można by było np. powstrzymać komórki nowotworowe przez ich namnażaniem. Według dr hab. Andrzeja Kasprzaka białka motoryczne działają jak bardzo małe motorki, które mogą przenosić różne elementy na odległości rzędu setek mikrometrów. Jest to z punktu widzenia technologicznego bardzo obiecująca umiejętność. Na razie ten mały motorek jest bardzo kapryśny - łączy się tylko z organelami w komórce, a naukowcy dążą do tego, aby łączył się np. z częściami mikroprocesora. Za cykl prac na temat „Molekularnego mechanizmu generacji ruchu przez mitotyczną kinezynę Ncd” zespół dr hab. Andrzeja Kasprzaka otrzymał w tym roku **nagrodę Wydziału II Nauk Biologicznych PAN**. Autorami prac byli dr Łukasz Hajdo, dr Elżbieta Kocik i dr Krzysztof Skowronek. Uroczystość wręczenia dyplomów odbyła się w dniu 2 grudnia 2010 roku w siedzibie Wydziału Nauk Biologicznych PAN w Pałacu Kultury i Nauki w Warszawie (informacja wg serwisu Nauka w Polsce).

Dr Tomasz Wilanowski (Fot. 9), kierownik nowoutworzonej w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marceliego Nenckiego Pracowni Przekazywania Sygnału, został wyróżniony prestiżową nagrodą Europejskiej Organizacji Biologii Molekularnej - EMBO Installation Grant. Jego pro-

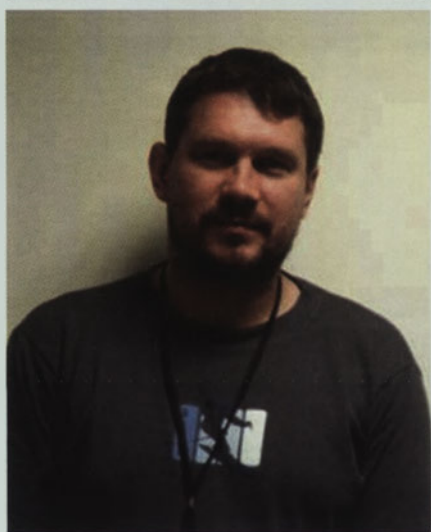


Fot. 9. Dr Tomasz Wilanowski

jekt będzie finansowany w ramach Programu dla Młodych Naukowców EMBO (EMBO Young Investigator Programme). Jest to wielki sukces zarówno dr Wilanowskiego, jak i Instytutu Nenckiego, gdyż wśród licznych grona kandydatów z całej Europy dr Wilanowski został wyróżniony jako jeden z zaledwie sześciu nagrodzonych. Pięcioletni grant w wysokości 50 000 euro rocznie jest przeznaczony na rozwój prowadzonej przez dr Wilanowskiego grupy badawczej. Badania Pracowni Przekazywania Sygnału koncentrują się na czynnikach transkrypcyjnych z rodziny Grainyhead u ssaków. Jest to grupa białek regulatorowych, które pełnią swoje funkcje w procesach rozwojowych i chorobowych. Dotychczas u myszy opisano mutacje w białkach Grainyhead prowadzące do rozszczipu kręgosłupa, zaburzeń w gojeniu się ran oraz wadliwej bariery skórnej, zaś u ludzi do utraty słuchu. Dr Wilanowski będzie kontynuować te badania w Instytucie Nenckiego. Pracownia dr Wilanowskiego zostanie włączona do sieci najlepszych, pracujących niezależnie, młodych europejskich naukowców EMBO Young Investigator Network. Niezależnie od wsparcia finansowego, udział w Programie dla Młodych Naukowców EMBO daje wiele innych możliwości, między innymi uczestnictwa w corocznych i tematycznych konferencjach naukowych, wsparcia mentorskiego ze strony EMBO, dofinansowania wykładów wygłaszanych na międzynarodowych kongresach, sponsorowanych specjalistycznych kursów dla doktorantów pracujących

w grupach badawczych laureatów i temu podobne. Chcielibyśmy, aby ten sukces dr Wilanowskiego okazał się inspiracją dla innych ambitnych młodych naukowców planujących swoją karierę w Polsce (wg informacji zamieszczonych w witrynie internetowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN).

Największe polskie osiągnięcia w dziedzinie chemii w 2010 r. to sposoby pozyskiwania wodoru do zasilania urządzeń oraz nietypowy siarczan srebra, który przyda się w farmacji lub oczyszczaniu ścieków. Autorem obu prac jest dr hab. Wojciech Grochala (Fot. 10) z Uniwersytetu Warszawskiego. Pracę dotyczącą nowego siarczanu srebra (II) opublikowano w styczniu 2010 r. Grochala wraz ze współpracownikami znalazł



Fot. 10. Dr hab. Wojciech Grochala

sposób syntezy tego związku chemicznego. Od znanego do tej pory siarczanu jednowartościowego srebra (Ag_2SO_4), nowy związek (AgSO_4) różni się wszystkimi istotnymi właściwościami fizykochemicznymi. Związek ma barwę czarną. Wszystkie pozostałe bezwodne siarczany metali są bardzo słabe, delikatne zabarwienie, albo są bezbarwne. To oznacza, że bardzo słabo pochłaniają promieniowanie widzialne, najczęściej absorbują promieniowanie ultrafioletowe. Siarczan srebra (II) - w przeciwieństwie do nich - absorbuje już promieniowanie w zakresie średniej podczerwieni. Drugą niezwykłą cechą uzyskanego związku jest jego bardzo silny magnetyzm. Nowy związek jest bardzo sil-

nym utleniaczem; ta cecha może być wykorzystana w farmacji do tworzenia leków albo do utylizacji ścieków. Jak zaznaczył Autor, gdyby siarczan srebra (II) udało się zamienić w wysokotemperaturowy nadprzewodnik, to znalazłby on olbrzymią liczbę zastosowań. W pracach badawczych nad nowym związkiem brało udział siedmiu naukowców, wśród nich chemicy z Uniwersytetu Warszawskiego, Uniwersytetu Jagiellońskiego i naukowcy z trzech słoweńskich instytutów naukowych. Wyniki badań zostały opublikowane jako „Very Important Paper” w prestiżowym czasopiśmie *Angewandte Chemie. International Edition*. Współpraca zespołu Grochali z Uniwersytetem Duisburg-Essen w Niemczech skutkowałą odkryciem związków chemicznych, które, po odpowiedniej modyfikacji, pozwolą na wykorzystanie powszechnie używanego w przemyśle chemicznym borowodoru sodu, jako „magazynu wodoru”. Praca na ten temat ukazała się w październiku 2010 r. Dzięki temu odkryciu możliwe jest, że niebawem w baku samochodu o napędzie wodorowym, zamiast czystego gazowego wodoru znajdzie się proszek, z którego po podgrzaniu wydzieląby się duże ilości wodoru, potrzebne do zasilania ogniw elektrycznych. Aby to było możliwe, potrzebny jest właściwy katalizator, czyli druga substancja, które umożliwi podgrzanemu borowodorowi rozłożyć się, a tym samym „wypuścić” zawarty w nim wodór. Naukowcom udało się też sprawić, że dzieje się to w stosunkowo niskiej temperaturze, a to już jest bliższe realnym zastosowaniom technologicznym. Jako katalizatora wykorzystali nikiel. Zdaniem Autorów udoskonalenie katalizatora nie powinno więc być trudne (wg serwisu Nauka Polsce).

Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia jest projektem modernizacji Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Realizacja projektu pozwoli na utworzenie nowych laboratoriów badawczych, pracujących wspólnie na rzecz opracowania nowych leków, metod diagnostycznych oraz rozwoju szeroko pojętej biomedycyny. Projekt został przygotowany przez pracowników Wydziału i jest finansowany w ramach pierwszego

konkursu Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, działanie 2.1. „Rozwój ośrodków o wysokim potencjale badawczym”. W konkursie rozstrzygniętym wiosną 2009 roku wniosek uzyskał 87,66 pkt i znalazł się na trzecim miejscu na liście rankingowej, spośród ponad 150 zgłoszonych projektów. Przyznana kwota dofinansowania to 28197842,44 zł. W ramach projektu, zostanie utworzonych 7 pracowni badawczych uzupełniających istniejącą infrastrukturę naukową. Powstaną laboratoria, w których będą prowadzone prace w zakresie m.in. proteomiki, biofizyki komórki, immunologii, wirusologii i hodowli tkankowych. Ponadto, w ramach projektu powstanie nowoczesnie wyposażona zwierzętarnia, pozwalająca na hodowlę i badania wielu rodzajów zwierząt laboratoryjnych. Zakup nowej aparatury (Fot. 11) oraz reorganizacja istniejącej przestrzeni, przyczyni się do rozszerzenia zakresu



Fot. 11. Mikroskop Leica SMD FCS FLIM

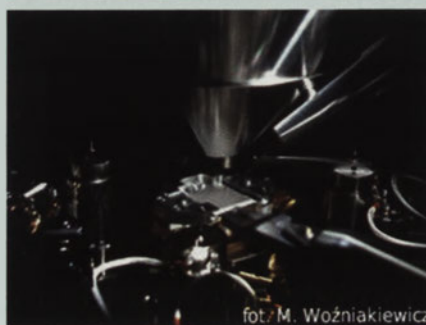
badani prowadzonych na Wydziale, prowadząc do rozpoczęcia nowych, interdyscyplinarnych projektów. Realizacja projektu rozpoczęła się we wrześniu 2008 roku. Planowany termin zakończenia wyznaczono na marzec 2012 roku. Projektem kieruje prof. dr hab. Józef Dulak. W ramach zadań powstaną nowe pracownie: Zwierzętarnia (koordynator: Prof. dr hab. Alicja Józkowicz); Pracownia Cytoometrii Obrazowej (koordynator: Prof. dr hab. Jerzy Dobrucki); Pracownia Proteomiki i Transkryptomiki (koordynator: Prof. dr hab. Andrzej Kozik); Pracownia Inżynierii Komórkowej i Tkankowej (koordynator: dr Justyna Dukała); Pracownia Wirusologicznej Diagnostyki Molekularnej (koordynator: dr Krzysztof Pyrc); Pracownia Biotechnologii Roślin (koordynatorzy: Prof. dr hab. Halina Gabrys, dr

hab. Leszek Fiedor); Bank Komórek (koordynator: dr Justyna Drukała). Rozbudowa infrastruktury badawczej przyczyni się do realizacji celów badawczych projektu, do których należą m. in: opracowanie i zastosowanie nowych zwierzęcych modeli chorób i testowanie terapii eksperymentalnych; opracowanie nowych metod analizy struktury komórek i interakcji badanych substancji z komórkami; stworzenie kompleksowego systemu analizy ekspresji genów na poziomie transkryptomu i proteomu; rozwój metod hodowli tkankowej skóry w celu ich zastosowania w warunkach klinicznych; opracowanie i rozwój metod pozwalających na identyfikację i kwantyfikację wirusów ludzkich i zwierzęcych pod kątem ich zastosowania w warunkach klinicznych i badawczych; opracowanie i badania pochodnych metabolitów roślinnych oraz pochodnych barwników fotosyntetycznych jako potencjalnych leków przeciw nowotworowych (wg witryny WBBiB UJ).

Numer specjalny kwartalnika Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii TRIPLET 1 (z grudnia 2010 roku) został w całości poświęcony projektowi „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia”. W treści specjalnego numeru zespół autorów podaje opis zadań projektu, zaawansowanie ich realizacji, charakterystykę zakupionej aparatury, urządzeń pomiarowych, sprzętu przeznaczonego do hodowli komórek, osobową odpowiedzialność za prowadzenie zadań projektu. Dostęp do periodyku na stronie Wydziału <http://www.wbbib.uj.edu.pl> oraz na stronie projektu: <http://www.uj.edu.pl/web/bmz/triplet>.

Otwarcie Laboratorium Nanostruktur wchodzącego w skład Zespołu Laboratoriów Nanotechnologii i Nauki o Powierzchni powstającego w ramach projektu ATOMIN: Badanie układów w skali atomowej: nauki ścisłe dla innowacyjnej gospodarki odbyło się uroczystie w dniu 9 grudnia 2010 na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ. Otwarcie było połączone z uruchomieniem zintegrowanego systemu do syntezy i diagnostyki nanostruktur - układu do obrazowania i manipulacji obiektami w skali nano, który znajduje się w Zakładzie Fizyki Nanostruk-

tur i Nanotechnologii Instytutu Fizyki kierowanym przez prof. dr hab. Marka Szymońskiego. Zintegrowany system do syntezy i diagnostyki nanostruktur (Fot. 12) jest urządzeniem unikatowym w skali światowej. Jego wyjątkowość polega na połączeniu w jednym urządzeniu niskotemperaturowego mikroskopu sondy skanującej (pracującego zarówno w trybie STM, jak i ncAFM w zakresie temperatur od 4K do temperatury pokojowej), cztero-próbnikowego mikroskopu tunelowego sprzężonego z wysokorozdzielczym mikroskopem elektronowym i hemisferycznym analizatorem energii elektronów oraz komory preparacyjnej. Takie zestawienie elementów najwyższej klasy pozwala na przeprowadzanie w jednym urządzeniu kompleksowych eksperymentów, łączących w sobie syntezę/fabrykację oraz charakteryzację nanostruktur, w kontrolowanych warunkach ultra wysokiej próżni (ciśnienia na poziomie 10^{-10} mbar i niższym). Ów potencjał badawczy został już doceniony przez Komisję Europejską poprzez przyznanie finansowania w ramach 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej dla zintegrowanego projektu Atomic Scale and Single Molecule Logic Gate Technologies (AtMol), zaproponowanego przez konsorcjum składającego się z 11 strategicznych partnerów, w tym Uniwersytetu Jagiellońskiego. AtMol jest jedynym tego typu projektem finansowanym w ramach akcji Future Emerging Technologies Proactive Information and Communication Technologies (FET Proactive ICT Call 6). Warto zaznaczyć, że istnieją tylko dwa układy eksperymentalne o porównywalnej konfiguracji i możliwościach jak ten, który w ramach Projektu ATOMIN wyposażył Laboratorium Nanostruktur - jeden w Singapurze i jeden w Tuluzie. Ośrodki dysponujące tymi urządzeniami są również



Fot. 12. Wnętrze komory z układem Nanoprobe

członkami konsorcjum, które realizuje projekt AtMol. Przez wzgląd na ścisłą współpracę w ramach konsorcjum, pracownicy Uniwersytetu Jagiellońskiego znajdują się w wąskim gronie ekspertów dysponujących zarówno doświadczeniem, jak i aparaturą, które umożliwiają realizację badań o charakterze przełomowym. Projekt ATOMIN jest realizowany pod kierownictwem prof. dr hab. Jarosława Koperskiego na Uniwersytecie Jagiellońskim z funduszy strukturalnych w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka Działanie 2.1. realizowany Bezpośrednimi beneficjentami są Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej i Wydział Chemii. Realizacja Projektu jest przewidziana na lata 2009-2012 (wg witryny UJ).

Medal Amicus Scientiae et Veritatis



Fot. 13. Dr n. med. Katarzyna Grymuła (z lewej)

tatis Szczecińskiego Towarzystwa Naukowego za osiągnięcia w dziedzinie biologii medycznej, otrzymała w końcu grudnia 2010 r. dr n. med. Katarzyna Grymuła (Fot. 13) z Zakładu Fizjologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Laureatka STN prowadzi badania, których celem jest poznanie mechanizmów związanych z przerzutowaniem mięsaka prądkowano-komórkowego. Badania te są kontynuacją projektu rozpoczętego na Uniwersytecie w Louisville pod kierunkiem profesora Mariusza Ratajczaka. Medal Amicus Scientiae et Veritatis został ustanowiony przez zarząd Szczecińskiego Towarzystwa Naukowego w 1986 roku z inicjatywy prof. dr hab. Kazimierza Stojalowskiego. Przyznawany jest corocznie młodemu naukowcom, którzy obronili doktorat przed 35. rokiem życia i wyróżniają się zaangażowaniem i twórczością naukową (wg witryny PUM).

pod redakcją Teresy Wesołowskiej

Britton Chance (1913 – 2010) – od żeglarstwa do biofizyki i biochemii i z powrotem Z historii biochemii

STRESZCZENIE

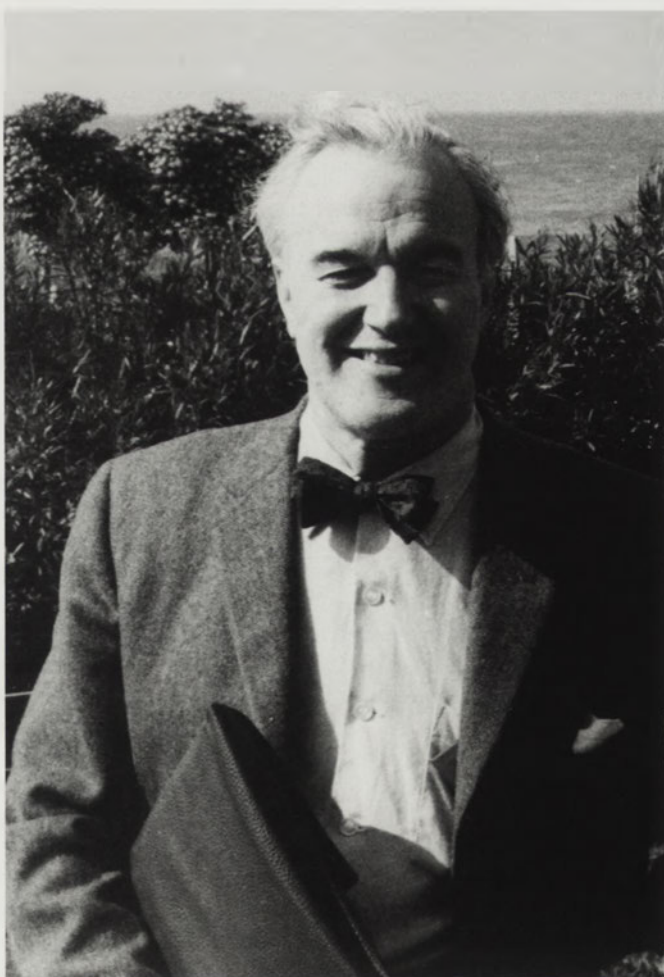
Przedstawiono krótkie *curriculum vitae* oraz dorobek naukowy zmarłego w listopadzie 2010 r. wybitnego amerykańskiego biofizyka i biochemika, Brittona Chance'a. Dzięki wprowadzeniu do badań biochemicznych metody szybkiego mieszania reagentów („stop-flow”) i rejestracji widm różnicowych, Chance pierwszy wykazał tworzenie kompleksu enzym-substrat na przykładzie peroksydazy. Wykazał również zmiany widm absorpcyjnych przekazników elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym przy przejściu ze stanu spoczynkowego do oddychania sprzężonego z fosforylacją ADP. Dzięki zastosowaniu wibrującej elektrody platynowej mierzył szybkość zużycia tlenu przez izolowane mitochondria i zdefiniował zależne od funkcji mitochondriów tak zwane *stany oddechowe*, nazwane następnie jego imieniem. Pierwszy opisał produkcję reaktywnych form tlenu w mitochondriach. Britton Chance był zapalonym żeglarzem i na Olimpiadzie w Helsinkach w 1952 r. zdobył dla Stanów Zjednoczonych złoty medal w konkurencji żeglarskiej.

WPROWADZENIE

Każdy, kto choć pobieżnie zajmował się energetyką mitochondriów lub łańcuchem oddechowym i oksydacyjną fosforylacją, musiał zetknąć się z pojęciem „stanów oddechowych Chance'a”. Ten wybitny biofizyk i biochemik amerykański zmarł niedawno (16 listopada 2010 r.) w Filadelfii w wieku 97 lat. Pozostawił ogromny wkład nie tylko w dziedzinie bioenergetyki, mechanizmów reakcji enzymatycznych, produkcji reaktywnych form tlenu, lecz także w rozwój biochemicznych i biofizycznych metod pomiarowych, a przy tym był autorem pionierskich rozwiązań technicznych w ... żeglarstwie.

CURRICULUM VITAE

Britton Chance (Ryc. 1) urodził się w stanie Pensylwania 24 lipca 1913 r. Studiował chemię na University of Pennsylvania w Filadelfii, gdzie uzyskał stopień Master of Science w 1936 r. Następnie przeniósł się do Cambridge w Wielkiej Brytanii, gdzie studiował biochemię i fizjologię. W rezultacie uzyskał dwa stopnie doktora (Ph.D.) – z chemii fizycznej na University of Pennsylvania w



Rycina 1. Britton Chance (24.7.1913 – 16.11.2010). Zdjęcie z 1969 r. Wcześniej zamieszczone w [8]. Fot. Ernesto Carafoli.

Lech Wojtczak

Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, Warszawa

Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: l.wojtczak@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 1 lutego 2011 r.
Artykuł zaakceptowano 4 lutego 2011 r.

Słowa kluczowe: kompleks enzym-substrat, oksydacyjna fosforylacja, kontrola oddechowa, reaktywne formy tlenu

1940 r. oraz z biologii i fizjologii na Cambridge University w 1942 r.

Jednakże zainteresowania i wiedza Chance'a sięgały poza chemię i biochemię. Dzięki świetnej znajomości elektroniki zainteresował się budową aparatury pozwalającej śledzić przebieg reakcji chemicznych i biochemicznych, którym towarzyszą niewielkie zmiany absorbancji. Stał się więc, już w latach trzydziestych ubiegłego wieku, prekursorem współczesnej spektrofotometrii. Co więcej, dzięki zastosowaniu metod szybkiego mieszania reagentów i szybkiej rejestracji zachodzących zmian optycznych zapoczątkował techniki tzw. „stop-flow”, pozwalające śledzić przebieg reakcji w czasach milisekundowych i między innymi wyjaśnić niektóre mechanizmy enzymatyczne.

W czasie II wojny światowej Britton Chance wrócił do Stanów Zjednoczonych i zaangażował się w badania nad radarem w Massachusetts Institute of Technology. Po zakończeniu wojny kontynuował swój pobyt w Europie, pracując w Sztokholmie w słynnym Nobel Institutet (współpraca z Hugo Theorellem nad dehydrogenazą alkoholową i peroksydazą) i w Molteno Institute w Cambridge. Pod koniec lat czterdziestych wrócił definitywnie do Filadelfii na swój macierzysty Uniwersytet i w 1949 r. objął stanowisko dyrektora Johnson Research Foundation, dużego instytutu prowadzącego na Wydziale Medycznym badania w zakresie biofizyki i biochemii. Funkcję dyrektora sprawował Chance nieprzerwanie do swego przejścia na emeryturę w 1983 r., jednakże badania naukowe prowadził dalej, niemal do ostatnich chwil swego długiego życia. Baza *Scopus* odnotowuje cztery publikacje ze współautorstwem Chance'a w 2010 r. i ponad dziesięć w 2009 r.

ŻEGLARSTWO

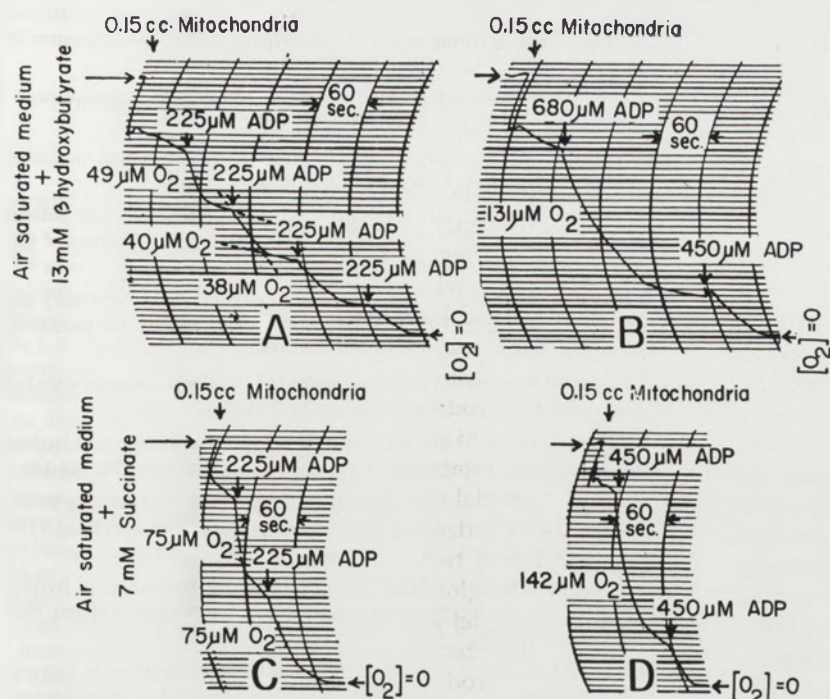
Zainteresowania naukowe łączył Britton Chance z pasją żeglarską. Żeglarstwo zaczął uprawiać już w dzieciństwie, najpierw ze swym ojcem, inżynierem chemikiem, a później samodzielnie. Wykorzystując swą wiedzę i zdolności w dziedzinie elektroniki, zbudował i opatentował w wieku 17 lat urządzenie do automatycznego sterowania żaglowcem. Skuteczność tego urządzenia okazała się tak wyśmienita, że kilka lat później, w 1938 r., brytyjska firma zaproponowała Chance'owi odpowiednią jego modyfikację i zainstalowanie na 20.000-tonowym statku-chłodni udającym się w rejs z Londynu do Australii. Dało to młodemu konstruktorowi okazję do odbycia dalekiej podróży, w którą zabrał niedawno poślubioną pierwszą żonę. Uwieńczeniem żeglarskich osiągnięć Chance'a było zdobycie przez niego, wraz z dwójką innych żeglarzy, złotego medalu na Olimpiadzie w Helsinkach w 1952 r. w klasie łodzi 5½-metrowych. Ulubionymi terenami dla bliższych i dalszych wypadów żeglarskich były dla Brittona wody Atlantyku wzdłuż wschodniego wybrzeża Ameryki oraz Bałtyk. Na tym ostatnim założył swą bazę żeglarską na zakupionej przez siebie małej wysepce w Archipelagu Sztokholmskim.

NAJWAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE

Pierwszym znaczącym osiągnięciem Chance'a na polu biochemii było wykazanie tworzenia się kompleksu enzym-

substrat na przykładzie peroksydazy i nadtlenu wodoru. Dokonał tego badając zmiany w widmie absorpcyjnym enzymu po dodaniu nadtlenu wodoru, a następnie akceptora tlenu, leukozieleni malachitowej [1]. Stało się to możliwe dzięki zastosowaniu własnej konstrukcji dwuwiązkowego spektrofotometru, własnej konstrukcji urządzenia „stop-flow” i, oczywiście, również własnego pomysłu zestawu do szybkiej rejestracji zmian widma różnicowego. Znaczenie tych badań polegało na tym, że stanowiły one pierwsze bezpośrednie i doświadczalne potwierdzenie teorii Leonora Michaelisa i Maud Leonory Menten, mówiącej, że reakcję katalizowaną przez enzym poprzedza utworzenie kompleksu enzym-substrat. W przypadku peroksydazy Chance opisał dwa tego rodzaju kompleksy, które nazwał *Complex I* i *Complex II*. Tymi samymi imionami ochrzcił później swe kolejne jachty. Właśnie na łodzi imieniem „Complex II” zdobył złoty medal olimpijski w 1952 r. Według nieoficjalnych i niepotwierdzonych informacji osiągnięcia Chance'a w badaniach nad tworzeniem kompleksu enzym-substrat były podstawą zgłoszenia jego kandydatury do Nagrody Nobla. Nagrody tej jednak, ani za te badania, ani za późniejsze nad sprzężeniem oksydacyjnej fosforylacji lub produkcją wolnych rodników tlenowych przez mitochondria, nigdy nie dostał.

Współczesnemu biochemikowi nazwisko Chance'a kojarzy się najczęściej z badaniami nad oksydacyjną fosforylacją w izolowanych mitochondriach. Sformułował on mianowicie pojęcie „stanów oddechowych” (ang. *respiratory states*), opatrzonych kolejnymi numerami od 1 do 5, określających natężenie funkcji oddechowych mitochondriów w zależności od sprzężenia ich, lub braku tego sprzężenia, z syntezą ATP [2,3]. I tak *stan 1* określa mitochondria zawieszone w środowisku inkubacyjnym zawierającym fosforan nieorganiczny, lecz nie zawierającym ani substratów oddechowych, ani ADP. Mitochondria takie praktycznie nie zużywają tlenu. *Stan 2* uzyskuje się przez dodanie ADP. Następuje wówczas szybkie utlenienie endogennych substratów. Po dodaniu do takiej zawiesiny odpowiedniego substratu oddechowego następuje faza szybkiego zużycia tlenu na skutek uruchomienia syntezy ATP. Jest to *stan 3*. Teraz głównym czynnikiem ograniczającym szybkość zużywania tlenu staje się aktywność syntazy ATP i/lub wydajność łańcucha oddechowego. Jest to oczywiście pewne uproszczenie, ponieważ swój udział mają tu także białka transportujące przez błony mitochondrialne zarówno substraty oddechowe oraz produkty ich utlenienia, jak i fosforan nieorganiczny oraz ADP i ATP, zakładając oczywiście, że dostęp tlenu cząsteczkowego jest nieograniczony. Ale dokładny udział ilościowy tych wszystkich czynników w całkowitym zużyciu tlenu przez intensywnie fosforylujące mitochondria w warunkach *in vitro* został określony znacznie później przez innych autorów [4]. Po całkowitym ufosforylowaniu dodanego ADP do ATP mitochondria przechodzą w *stan 4*. Jest to oddychanie niezwiązane z oksydacyjną fosforylacją, wynikające z niepełnego sprzężenia energetycznego badanego preparatu mitochondriów (uszkodzenia mechaniczne, przepuszczalność błon mitochondrialnych dla jonów itp.). Ponowne dodanie ADP powoduje ponowny wzrost zużycia tlenu, czyli powrót do *stanu 3* (Ryc. 2). Cykl taki można powtarzać aż do całkowitego wyczerpania tlenu w środowisku inkubacyjnym, czyli osiągnięcia *stanu 5*.



Rycina 2. Oryginalny zapis polarograficzny zużycia tlenu przez izolowane mitochondria z wątroby szczura z publikacji [2]. Widoczne są przyspieszenia zużycia tlenu po kolejnych dodatkach ADP i powrót do niskiego poziomu zużycia O_2 po ufosforylowaniu ADP do ATP.

Stosunek wartości zużycia tlenu w stanie 3 do tego w stanie 4 uważa się za miarę stopnia sprzężenia oksydacyjnej fosforylacji i określa mianem *współczynnika kontroli oddechowej* (ang. *respiratory control ratio*). Natomiast ilość zużytego tlenu potrzebnego do ufosforylowania określonej ilości dodanego ADP, co można odczytać z zapisu polarograficznego (Ryc. 2), pozwala obliczyć wydajność oksydacyjnej fosforylacji, czyli tak zwany stosunek P/O. Rycina 2 została zaczerpnięta z oryginalnej publikacji Chance'a [2]. Pokazany na niej zapis zużycia tlenu został wykonany przy zastosowaniu pierwszy raz użytej do tego celu przez Chance'a wibrującej elektrody platynowej. Opór elektryczny takiej elektrody zanurzonej w rozcieńczonym roztworze elektrolitu (w danym przypadku KCl, który jest głównym składnikiem środowiska inkubacyjnego dla izolowanych mitochondriów) zależy w sposób niemal liniowy od stężenia tlenu cząsteczkowego w tym środowisku. Obecnie w powszechnym użyciu w podobnych doświadczeniach jest elektroda typu Clarka, różniącą się od wibrującej elektrody platynowej tym, że zarówno platynowa katoda jak i srebrna anoda oddzielone są od środowiska pomiarowego cienką, przepuszczalną dla O_2 lecz nieprzepuszczalną dla wody i innych substancji w niej rozpuszczonych, błoną teflonową lub polietylenową. Zastosowana przez Chance'a nieosłonięta elektroda platynowa była bardziej wrażliwa niż wprowadzona później elektroda Clarka na ewentualnie obecne w środowisku inkubacyjnym substancje silnie redukujące. Jej zaletą był jednak niezwykle krótki czas odpowiedzi na zmiany stężenia O_2 .

Następnym epokowym odkryciem Chance'a w dziedzinie oksydacyjnej fosforylacji było określenie tak zwanych punktów sprzężenia (ang. *coupling sites*) na poziomie łańcucha oddechowego. Chance wyszedł z założenia, że jeśli dodanie ADP zwiększa oddychanie mitochondriów, to

winno ono przyspieszać transport elektronów w tych miejscach łańcucha oddechowego, które są bezpośrednio związane z syntezą ATP. W stanie dynamicznej równowagi, w jakim znajdują się elementy funkcjonującego łańcucha oddechowego, takie przyspieszenie winno powodować przesunięcia stanu oksydoredukcji nośników elektronów w miejscu sprzężenia, a mianowicie w kierunku utlenienia tuż *przed* i w kierunku redukcji tuż *za* miejscem sprzężenia. Określenia „przed” i „za” odnoszą się tu do kierunku transportu elektronów w łańcuchu oddechowym. I rzeczywiście, używając własnego pomysłu i własnej konstrukcji dwuwiązkowego spektrofotometru, Chance wykazał występowanie trzech takich „punktów przecięcia” (ang. *crossover points*), mianowicie pomiędzy układem nukleotydów nikotynamidowych NAD(P)H/NAD(P)⁺ a flawoproteina, pomiędzy cytochromem *b* a cytochromem *c* oraz między cytochromem *c* a cytochromami *a/a₃* [3,5,6]. Te miejsca odpowiadały w przybliżeniu *miejscom sprzężenia* proponowanym wcześniej przez innych autorów, między innymi A.L. Lehningera i E.C. Slatara, na podstawie badań pomiaru syntezy ATP przy użyciu różnych substratów oddechowych i specyficznych inhibitorów łańcucha oddechowego.

Wszystko to działo się w epoce powszechnego obowiązywania teorii *chemicznego sprzężenia* oksydacyjnej fosforylacji. Zarówno Chance jak i inni współcześni mu badacze zakładali, że łańcuch oddechowy w miejscach sprzężenia jest zablokowany przez specyficzny naturalny inhibitor (lub trzy różne inhibitory specyficzne dla trzech miejsc sprzężenia) i włączenie tego inhibitora w proces syntezy ATP (na skutek dodania ADP) odblokowuje przepływ elektronów przez łańcuch oddechowy. Dopiero teoria chemiosmotyczna Petera Mitchella [7] pozwoliła zrozumieć właściwe znaczenie Chance'owskich „*crossover points*” lub szerzej – *miejsc sprzężenia* postulowanych przez innych autorów. Są to po prostu miejsca, gdzie zachodzi aktywne wypompowywanie protonów z przestrzeni macierzy mitochondrialnej do przestrzeni zewnętrznej, czyli budowanie *siły protonomotorycznej*, wykorzystywanej następnie przez mitochondrialną syntazę ATP do tworzenia ATP. Obecnie wiemy, że są to kompleksy I, III i IV łańcucha oddechowego [8].

Wreszcie trzecim znaczącym odkryciem Chance'a w zakresie energetyki mitochondriów było wykrycie produkcji nadtlenu wodoru w tych organellach. Już na początku lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia Britton Chance opisał podstawowe cechy tego procesu. Należały do nich: (1) zależność od stopnia zredukowania nośników elektronów, w szczególności nukleotydów nikotynamidowych i flawin, (2) stan energetyczny mitochondriów i (3) ciśnienie parcjale tlenu w środowisku [9]. Chance i Alberto Boveris, wówczas młody argentyński „post-doc”, mierzyli wprawdzie produkcję nadtlenu wodoru, lecz podejrzewali słusznie, że pierwszym produktem jednoelektrodowej redukcji tlenu cząsteczkowego może być wolny rodnik, anion ponadtlenkowy $O_2^{\cdot -}$. Badania nad rolą reaktywnych form tlenu w metabolizmie komórki, w tym nad udziałem mitochondriów

w wytwarzaniu, a także usuwaniu, wolnych rodników tlenowych stanowią obecnie jedną z ważniejszych gałęzi bioenergetyki [10].

Warto tu także wspomnieć, że optyczne urządzenia pomiarowe pomysłu Chance'a znalazły zastosowanie w przyżyciowym mierzeniu procesów oddechowych w mózgu i mięśniach [11].

ZAKOŃCZENIE

Laboratorium Brittona Chance'a na University of Pennsylvania w Filadelfii było przez dziesiątki lat „Mekką” bioenergetyków z całego świata. Odwiedzali je zarówno naukowcy wielcy i sławni jak i początkujący. Codzienne *lunch'e* w pokoju seminaryjnym, na które w południe zbierali się wszyscy współpracownicy, stanowiły okazję do bezpośredniej, nieformalnej, lecz często inspirującej wymiany myśli. *Brit* lub *BC*, jak go powszechnie nazywano, był osobowością nieprzeciętną. Niezwykle żywotny zarówno fizycznie (do laboratorium przyjeżdżał na rowerze również w wieku powyżej 80 lat) jak i umysłowo, kontynuował pracę naukową z niezmiennym zaangażowaniem po formalnym przejściu na emeryturę w 1983 r. Był trzy razy żonaty i miał dwanaścioro dzieci. Ostatnią żoną, formalnie poślubioną według tradycyjnego chińskiego ceremoniału na Tajwanie dopiero w lutym 2010 r. [12], była japońska współpracownica i wieloletnia towarzyszka życia, Shoko Nioka.

Więcej informacji biograficznych znajdzie Czytelnik we wspomnieniach Nicole Kresge i wsp. [13] oraz Leslie Duttona [14].

PIŚMIENNICTWO

1. Chance B (1943) The kinetics of the enzyme-substrate compound of peroxidase. *J Biol Chem* 151: 553-577
2. Chance B, Williams GR (1955) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I-IV. *J Biol Chem* 217: 383-438
3. Chance B, Williams GR (1956) The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol* 17: 65-134
4. Tager JM, Wanders RJA, Groen AK, Kunz W, Bohnensack R, Küster U, Letko G, Böhme G, Duszyński J, Wojtczak L (1983) Control of mitochondrial respiration. *FEBS Lett* 151: 1-9
5. Chance B, Williams GR, Holmes WF, Higgins J (1955) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. V. A mechanism for oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 217: 439-451
6. Chance B, Williams GR (1955) A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* 176: 250-254
7. Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemi-osmotic type mechanism. *Nature* 191: 144-148
8. Wojtczak L (2000) Siedemdziesiąt lat badań nad oksydacyjną fosforylacją, czyli od koncepcji chemicznego sprzężenia do wirującej ATP-azy. *Kosmos* 49: 467-479
9. Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707-716
10. Czarna M, Jarmuszkiewicz W (2006) Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesłaniem sygnałów i programowaną śmiercią komórki. *Postepy Biochem* 52: 145-156
11. Chance B (2004) wywiad dla YouTube - <http://www.youtube.com/watch?v=UrLyWZpV71U>
12. Britton Chance i Shoko Nioka, ceremonia ślubna (2010) - <http://news-en.secr.ncku.edu.tw/files/14-1083-62793,r614-1.php>
13. Kresge N, Simoni RD, Hill RL (2004) Britton Chance: Olympian and developer of stop-flow methods. *J Biol Chem* 279 (50) e10 [wydanie on-line]
14. Dutton PL (2010) Britton Chance (1913-2010). *Science* 330: 1641

Britton Chance (1913 – 2010) – from sailing to biophysics and biochemistry and back

Lech Wojtczak✉

Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur St., 02-093 Warsaw, Poland

✉e-mail: l.wojtczak@nencki.gov.pl

ABSTRACT

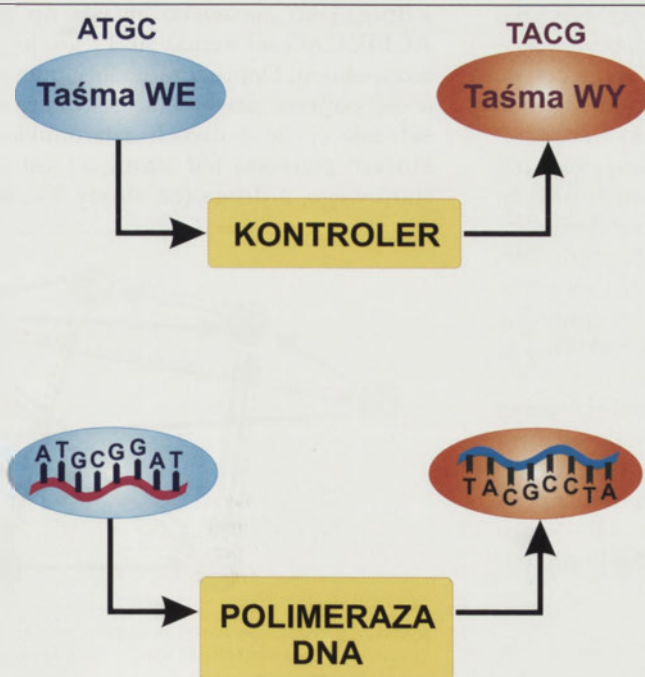
A short CV of Britton Chance, an outstanding American biophysicist and biochemists, who has passed away in November 2010, is presented. Chance invented and applied in biochemical research fast recording of difference spectra during chemical reactions. Due to this technique he discovered and studied formation of enzyme-substrate complexes as exemplified by the peroxidase reaction. He also described spectral changes of electron carriers of mitochondrial respiratory chain that accompany transition from the resting to the active (phosphorylating) states. Applying vibrating platinum electrode, he recorded changes in the rate of oxygen uptake by isolated mitochondria in resting and phosphorylating states and defined the so-called respiratory states, called after his name. He was the first to describe formation of reactive oxygen species by mitochondria. Britton Chance was a devoted yachtsman and won a gold medal for the United States in sailing at the 1952 Olympic Games in Helsinki.

STRESZCZENIE

Biokomputery czyli komputery molekularne mogą stanowić alternatywę dla komputerów krzemowych, których rozwój może być ograniczony ze względu na konieczność dalszej miniaturyzacji (ograniczenie zasadą nieoznaczoności Heisenberga) oraz konieczność przesyłania coraz większej ilości danych pomiędzy centralnym procesorem i główną pamięcią („wąskie gardło” von Neumana). Urzeczywistnienie idei komputerów DNA (czyli biokomputerów, w których główną rolę odgrywają cząsteczki DNA) zostało po raz pierwszy zademonstrowane przez Adlemana w 1994 roku w algorytmie rozwiązywania znanego problemu drogi Hamiltona. Był to początek nowej dziedziny informatyki, informatyki biomolekularnej, łączącej dwie dziedziny nauki – informatykę i biochemię. Na początku bieżącego stulecia pojawiło się szereg modeli komputerów DNA. Ważnym z nich był molekularny dwustanowy automat skończony Shapiro, w którym „sprzętem komputerowym” (ang. *hardware*) był enzym restrykcyjny *FokI*, natomiast oprogramowanie (ang. *software*) oraz sygnały wejścia/wyjścia stanowiły cząsteczki DNA. W innym modelu cząsteczka DNA dostarczała także energii do funkcjonowania takiego komputera. Komputery DNA, ze względu na swoje małe rozmiary, dużą możliwość upakowania informacji oraz zgodność z organizmami żywymi, mogą znaleźć szereg cennych zastosowań, od badania ekspresji genów, po diagnozę i leczenie chorób nowotworowych. Idea komputerów DNA jest w dalszym ciągu rozwijana w badaniach zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* a obiecujące wyniki tych badań pozwalają mieć nadzieję na przełom w informatyce.

WPROWADZENIE

DNA jest podstawowym nośnikiem informacji genetycznej oraz jednym z regulatorów ekspresji tej informacji, najczęściej jako element *cis* będący celem działania elementów *trans*. Specyficzne reguły parowania zasad azotowych stanowią klucz do przekazywania informacji genetycznej do następnych pokoleń (replikacja) oraz pierwszego etapu jej ekspresji (transkrypcja). Z kolei magazynowanie, przetwarzanie i przekazywanie informacji jest podstawową cechą komputerów. Pojawia się zatem pytanie, czy możliwe jest użycie DNA i jego metabolizmu do konstrukcji nowego rodzaju komputerów. Pytanie to staje się uzasadnione, jeżeli spojrzymy na prototyp współczesnych komputerów, maszynę Turinga (Ryc. 1). W urządzeniu tym jest wejście, na które dociera informacja początkowa, kontroler dokonujący przekształceń tej informacji wg ustalonych reguł oraz wyjście, na którym otrzymujemy przekształconą informację. Gdy na przykład przyjmujemy, że informacja na wejściu ma postać ciągu liter AATGCAGG, kontroler działa zgodnie z regułami Watsona i Cricka parowania zasad azotowych, to na wyjściu otrzymamy informację w postaci TTACGTCC. Analogia nasuwa się



Rycina 1. Maszyna Turinga (góra) i jej ekstrapolacja na „komputer DNA” (dół). WE – wejście, WY – wyjście.

Janusz Blasiak^{1,✉}

Tadeusz Krasiński²

Tomasz Popławski¹

Sebastian Sakowski³

¹Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź

²Wydział Matematyki i Informatyki, Uniwersytet Łódzki, Łódź

³Instytut Informatyki, Politechnika Śląska, Gliwice

✉Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; tel. (42) 635 43 34, faks: (42) 635 44 84, e-mail: jblasiak@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 15 kwietnia 2010 r.
Artykuł zaakceptowano 10 maja 2010 r.

Słowa kluczowe: komputery DNA; komputery molekularne; biokomputery

Wykaz skrótów: HW-SW (ang. *hardware-software complex*) – kompleks złożony ze sprzętu komputerowego-oprogramowania; RNAi – interferujący RNA; siRNA – krótki interferujący RNA

Podziękowania: Autorzy dziękują Paniom mgr Monice Kicińskiej i Annie Łuczyńskiej za pomoc w sporządzeniu rycin i końcowym opracowaniu manuskryptu. Praca wykonana w ramach projektu UŁ nr 505/376.

natychmiast: wejście i wyjście mogą być fragmentami jednoniciowego DNA, a kontroler – polimerazą DNA. Dostrzeżenie możliwości rozwiązania problemów informatycznych za pomocą DNA pozwoliło nie tylko na postrzeganie DNA jako możliwego elementu urządzenia liczącego, ale także uzmysłowiło, że organizmy żywe można traktować jako złożone systemy informatyczne. Biologiczne układy informatyczne oparte na informacji zakodowanej w DNA, umożliwiają organizmom żywym dostosowanie się do warunków środowiskowych, czyli rozwiązywanie złożonych problemów informatycznych [1].

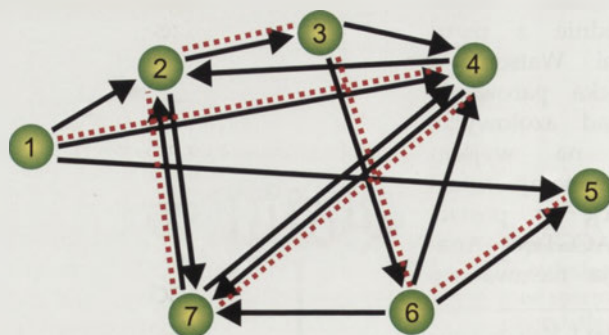
Organizmy żywe są prawdopodobnie najdoskonalszymi systemami informatycznymi znanymi do tej pory człowiekowi. Jest to o tyle interesujące, że komputery „tradycyjne”, oparte na procesorach krzemowych, kiedyś mogą osiągnąć kres swych możliwości w stosunku do stawianych im wymagań. Spowodowane jest to co najmniej dwoma przyczynami. Po pierwsze miniaturyzacja układów komputerowych pozwoliła na zwiększenie szybkości procesorów i krótszy czas dostępu do pamięci, jednakże miniaturyzacja napotyka barierę wynikającą z zasady nieoznaczoności Heisenberga. Zasada ta głosi, że nie można z dowolną dokładnością wyznaczyć jednocześnie położenia i pędu cząstki, a minimalny błąd takiej operacji jest rzędu 10^{-34} J s. To oczywiście bardzo mało, ale gdy miniaturyzacja doprowadzi do tego, że elementy procesorów będą się składać z kilku atomów, będzie to bardzo dużo. Drugą granicą rozwoju tradycyjnych komputerów może być efekt określany mianem „wąskiego gardła von Neumanna”. Wynika on z potrzeby przepływu informacji pomiędzy centralnym procesorem komputera i jego główną pamięcią. Im więcej takiej informacji, tym wolniej może ona być przesyłana – analogia do ruchu ulicznego nasuwa się sama – i to ograniczenie implikuje również ograniczenie szybkości pracy całego komputera krzemowego. Cóż zatem? Alternatywą mogą być komputery DNA. W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie komputerami biomolekularnymi, w których wiodącą rolę odgrywają DNA i cząsteczki związane z jego metabolizmem [2]. Komputery DNA można postrzegać jako operujące na bitach molekularnych określonych przez zasady DNA. Ponieważ cztery zasady DNA mogą występować w dowolnej kolejności i dowolnym wzorze powtarzania, bity molekularne nie ograniczają się jedynie do wartości 0 i 1, dlatego możliwości komputera DNA przekraczają możliwości komputera opartego na systemie binarnym. O tym, czy komputer DNA pozostanie komputerem zerojedynkowym, czy też stanie się komputerem wyższego rzędu, decyduje jego twórca określając zasady kodowania informacji. Komputery DNA, w przeciwieństwie do komputerów kwantowych, nie są komputerami mogącymi wykonywać algorytmy probabilistyczne. Uruchamiając ten sam program na komputerze DNA dwukrotnie, za każdym razem powinniśmy otrzymać ten sam wynik, aczkolwiek możliwa jest pewna losowość, co do wyboru drogi prowadzącej do rozwiązania algorytmu wynikająca z prawdopodobieństwa zdarzeń właściwych dla systemów biologicznych. Z tego powodu komputery DNA należy traktować jako komputery niedeterministyczne.

Tabela 1. Doświadczenie Adlemana – miasta i przypisane im sekwencje DNA. Każda sekwencja została podzielona na dwie następujące po sobie czteronukleotydowe sekwencje, z których druga została wyróżniona wytłuszczeniem (amerykańskie miasta występujące w oryginalnym doświadczeniu Adlemana zostały zastąpione polskimi miastami).

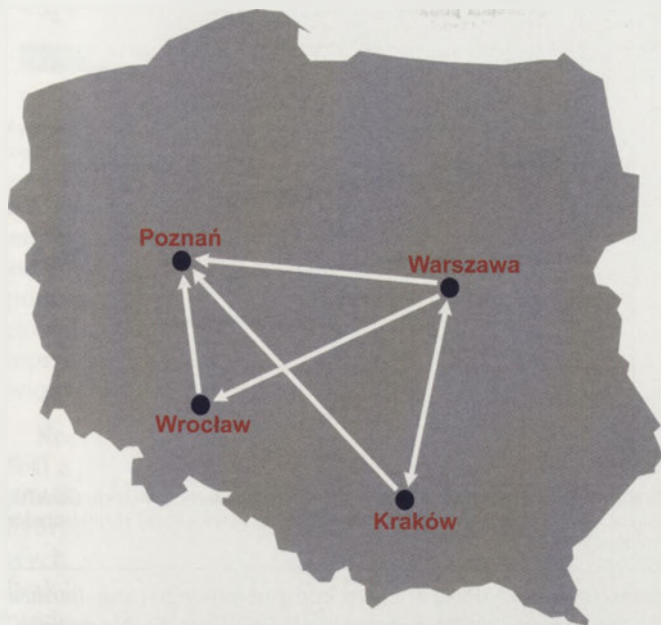
Miasto	Sekwencja DNA	Sekwencja komplementarna
Kraków	ACTT GCAG	TGAACGTC
Warszawa	TCGG ACTG	AGCCTGAC
Poznań	GGCT ATGT	CCGATACA
Wrocław	CCG AGGAA	GGCTCCTT

PROBLEM DROGI HAMILTONA I DOŚWIADCZENIE ADLEMANA

Problem drogi Hamiltona jest zagadnieniem z teorii grafów, polegający na rozstrzygnięciu, czy istnieje droga pomiędzy dwoma ustalonymi wierzchołkami n -elementowego grafu, taka, by przechodziła ona przez każdy z wierzchołków dokładnie raz (Ryc. 2). Pokrewnym zagadnieniem jest „problem komiwojażera”, choć jest raczej jego specjalnym przypadkiem. Rozpatrzmy problem drogi Hamiltona na przykładzie czterech polskich miast: Krakowa, Warszawy, Poznania i Wrocławia (wierzchołki grafu) oraz połączeń lotniczych pomiędzy nimi [3] (Ryc. 3). Załóżmy, że możliwe są tylko loty z Krakowa do Warszawy i z powrotem oraz z Krakowa do Poznania, z Warszawy do Poznania i Wrocławia, a także z Wrocławia do Poznania (krawędzie grafu). Wyznaczenie drogi Hamiltona na przykład pomiędzy Krakowem i Poznaniem jest banalne, jednakże już odpowiedź na pytanie, czy taka droga istnieje w przypadku 50 lub 100 miast jest trudna i złożona obliczeniowo. Rozwiązanie tego problemu z użyciem DNA zaproponował prawie 15 lat temu L.M. Adleman. Przenosząc rozumowanie Adlemana na nasz polski grunt, przyporządkujmy wszystkim czterem miastom ośmionukleotydowe sekwencje DNA (Tabela 1). Każda sekwencja składa się z dwóch części czteronukleotydowych, z których pierwszą można traktować jako „imię”, a drugą jako „nazwisko” miasta, np. dla Krakowa o kodzie ACTTGCAG sekwencja ACTT jest jego imieniem, a GCAG nazwiskiem. Dopuszczalne loty pomiędzy miastami koduje się poprzez utworzenie sekwencji ośmionukleotydowej składającej się z dwóch czteronukleotydowych części, z których pierwsza (od strony 5') jest „nazwiskiem” miasta startowego, a druga (od strony 3') „imieniem” miasta do-



Rycina 2. Ukierunkowany graf o 7 wierzchołkach zawierający tylko jedną drogę Hamiltona zaczynającą się w wierzchołku 1 i kończącą się w wierzchołku 5 (1 → 4 → 7 → 2 → 3 → 6 → 5, zaznaczona czerwonymi kropkami).



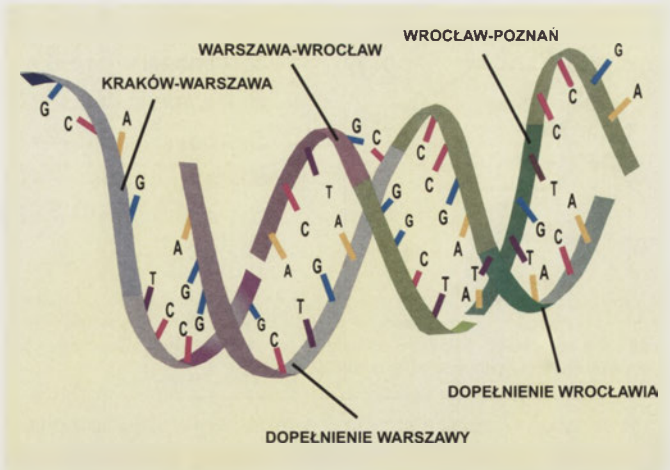
Rycina 3. Schemat połączeń lotniczych pomiędzy Krakowem, Warszawą, Poznaniem i Wrocławiem.

celowego (Tabela 2). Jeżeli teraz dokona się syntezy okamerów odpowiadających dopełnieniom miast oraz kodom lotów, a następnie wprowadzi się do probówki zawierającej odpowiedni bufor i ligazę DNA, to przy odpowiednich warunkach termicznych, dojdzie do hybrydyzacji pomiędzy odpowiednimi cząsteczkami reprezentującymi „imiona” i „nazwiska” ze względu na czteronukleotydowe odcinki komplementarne. Powstałe cząsteczki hybrydowe mogą być wydłużane dalej w ten sam sposób. Powstaną fragmenty dwuniciowego DNA o różnej długości i ze względu na konstrukcję cząsteczek kodujących loty („nazwisko”-„imię”), będą one wyznaczać wszystkie możliwe drogi pomiędzy czterema miastami (Ryc. 4). Część z nich będzie reprezentować drogę Hamiltona (o ile taka istnieje), którą można będzie zidentyfikować poprzez inne operacje biochemiczne.

W doświadczeniu Adlemana sama reakcja hybrydyzacji trwa ułamki sekund, przygotowanie oligomerów i wykrycie drogi Hamiltona – kilka godzin. Zdecydowanie nie jest to imponujący rezultat, jeżeli idzie o „szybkość komputerową”. Zagadnienie znalezienia drogi Hamiltona jest przykładem problemu NP-zupełnego, tzn. takiego dla którego istnieje algorytm sprawdzenia dla danej drogi, czy jest rozwiązaniem problemu i to w czasie

Tabela 2. Loty pomiędzy miastami kodowane przez sekwencje DNA w doświadczeniu Adlemana (amerykańskie miasta występujące w oryginalnym doświadczeniu Adlemana zostały zastąpione polskimi miastami).

Lot	Sekwencja DNA
Kraków-Warszawa	GCAGTCGG
Kraków-Poznań	GCAGCCGA
Warszawa-Wrocław	ACTGGGCT
Warszawa-Poznań	ACTGCCGA
Warszawa-Kraków	ACTGACTT
Wrocław-Poznań	ATGTCCGA

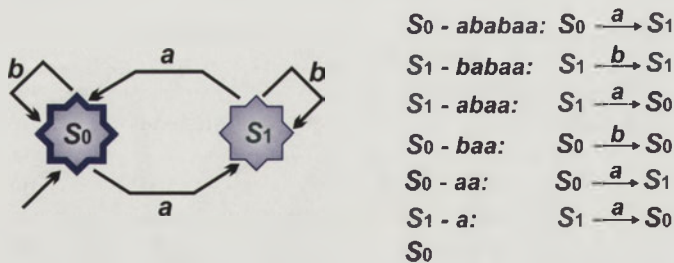


Rycina 4. Wynik hybrydyzacji fragmentów DNA reprezentujących dopełnienia reprezentacji Warszawy, Krakowa, Poznania i Wrocławia oraz lotów pomiędzy nimi.

wielomianowym, oraz czy inne problemy tego typu można do niego sprowadzić. Jest on często nazywany „Świętym Graalem” informatyki. Na przykład znalezienie drogi Hamiltona dla ukierunkowanego grafu z 12 wierzchołkami wymaga sprawdzenia $10! = 3\,628\,800$ możliwości! Czas jaki zajmie konwencjonalnemu komputerowi sprawdzenie tych dróg jest proporcjonalny do ich liczby, a podwojenie liczby wierzchołków zwiększa ten czas o 15 rzędów wielkości. Oszacowanie tego czasu przy użyciu komputera wykonującego milion standardowych operacji na sekundę daje zaskakującą wielkość porównywalną z wiekiem Wszechświata! Reakcja przeprowadzona przez Adlemana przebiegała w czasie nieporównywalnie krótszym niż czas szacowany na podstawie dowolnego znanego algorytmu rozwiązania problemu Hamiltona. W reakcji tej w jednym mikrolitrze zachodziło 3×10^{10} przejść z dokładnością 99,9%, z wydzielaniem 5×10^{-9} W/ μ l energii cieplnej przy temperaturze pokojowej (bez chłodzenia). Oszacowania te sugerują, że 1 J dostarczonej energii pozwala na wykonanie 2×10^{19} reakcji łączenia cząsteczek DNA. Jeżeli przyjąć, że jedna taka reakcja odpowiada 1 operacji komputerowej, to stwarza to możliwości bardzo efektywnego użytkowania energii, jeżeli weźmiemy pod uwagę, że zgodnie z zasadami termodynamiki maksymalna liczba nieodwracalnych operacji możliwych do wykonania przy użyciu energii 1 J wynosi 24×10^{19} J, a wydajność używanych obecnie superkomputerów to „zaledwie” 10^9 operacji/J [3]. Są to niewątpliwie dane zachęcające do rozważania DNA jako elementu komputerów. W takich rozważaniach konieczne jest odwołanie się do niektórych teoretycznych pojęć informatyki, w szczególności do teorii automatów skończonych, będących najprostszym modelem komputera.

AUTOMAT SKOŃCZONY SHAPIRO

Automat skończony można zdefiniować jako jednokierunkową, tylko do odczytu, maszynę Turinga (Ryc. 1). Na jego wejściu podaje się skończony ciąg symboli wziętych z pewnego skończonego alfabetu automatu. Pierwszy z lewej wyznacza początkowe położenie automatu, czyli głowicy odczytującej. Znajduje się ona w określonym z góry stanie początkowym. Każde przejście przemieszcza automat o je-



Rycina 5. Skończony automat dwustanowy (S_0 i S_1) o dwuelementowym alfabecie $\{a, b\}$ oraz symboliczne przedstawienie jego działania na słowie *ababaa* (na wejściu – strzałka bez opisu). Akceptowalny stan końcowy jest wyróżniony pogrubionym konturem (na podstawie [4], zmienione).

den symbol w prawą stronę, co może wywoływać zmianę jego stanu (których jest skończona liczba), gdyż jego oprogramowanie zawiera reguły przejść określające następny stan w oparciu o aktualny stan i wczytany symbol. Operacje wykonywane przez automat zostaną zakończone gdy: 1. wczytany zostanie ostatni symbol i automat znajdzie się w stanie końcowym („wyjście akceptujące”) lub 2. nastąpi jego „zawieszenie”, tzn. w pewnym momencie nie będą określone dalsze reguły przejść.

Jako przykład rozpatrzmy automat dwustanowy (stany S_0 i S_1), używający alfabetu składającego się z dwóch symboli a i b (Ryc. 5) [4]. Stan S_0 jest równocześnie stanem początkowym i końcowym. Automat przedstawiony na Ryc. 5 rozstrzyga, czy słowo zawiera parzystą liczbę symboli a . Wówczas bowiem, przy postępowaniu zgodnie z regułami przedstawionymi na rycinie, możliwe jest osiągnięcie akceptowalnego stanu końcowego S_0 . W ogólności automat dwustanowy operujący na dwuelementowym alfabecie ma 8 możliwych przejść.

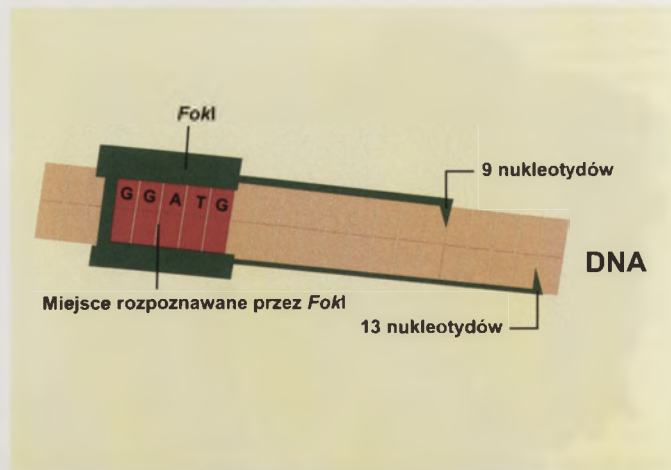
W zaproponowanym przez Shapiro i współpracowników molekularnym automacie skończonym, nazywanym dalej automatem Shapiro, funkcję słowa wejściowego oraz oprogramowania (czyli przejść) pełnią dwuniciowe DNA z jednoniciowymi zakończeniami, przybierającymi formę lepkich końców [4].

Tabela 3 przedstawia symbole $\{a, b\}$ automatu molekularnego oraz terminator t kodowane przez sekwencje DNA TGGCT, GCAGG i GTCGG oraz zawarte w nich kody par

Tabela 3. Stany i symbole dwustanowego (S_0 i S_1) automatu molekularnego operującego na dwuelementowym alfabecie $\{a, b\}$ kodowane przez czteronukleotydowe sekwencje DNA. Sekwencje ograniczone klamrą górną odpowiadają stanowi S_1 , klamrą dolną stanowi S_0 , dodatkowo przedstawiono sekwencję kończącą działanie automatu (terminator) (na podstawie [4], zmienione).

Symbol	Stan i sekwencja DNA
a	$\langle S_1, a \rangle$ TGGCT $\langle S_0, a \rangle$
b	$\langle S_1, b \rangle$ GCAGG $\langle S_0, b \rangle$
t^a	$\langle S_1, t \rangle$ GTCGG $\langle S_0, t \rangle$

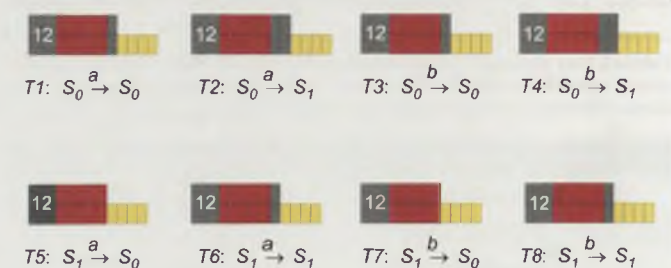
^asymbol końca, terminator



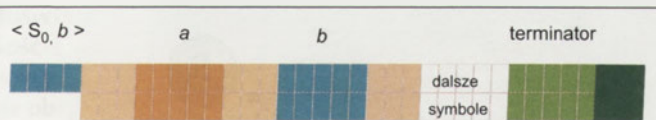
Rycina 6. Enzym restrykcyjny klasy II FokI rozpoznający sekwencję GGATG i trawiący DNA 9 nukleotydów w kierunku 5'-3' od tej sekwencji i 13 nukleotydów w kierunku 3'-5'.

<stan, symbol>. Rolę sprzętu komputerowego (ang. *hardware*) gra enzym restrykcyjny klasy II FokI (Ryc. 6). Na rycinie 7 przedstawiono wszystkie reguły przejść pomiędzy stanami S_0 i S_1 przy wprowadzaniu na wejściu symboli a i b . Reguły te, reprezentowane cząsteczkami DNA, uznać można za oprogramowanie (ang. *software*) automatu Shapiro. Cząsteczki te zawierają: detektory <stan, symbol> stanowiące ich jednoniciowe zakończenie (kolor żółty), miejsce rozpoznawane przez enzym FokI (czerwone) oraz sekwencję przedzielającą (kolor szary), która może liczyć 1 lub 2 nukleotydy. Gdy brak sekwencji przedzielającej, wówczas realizowane jest przejście S_1 do S_0 , gdy liczy ona 1 nt – utrzymywany jest stan bieżący, gdy 2 nt – następuje przejście ze stanu S_0 do S_1 . W przeciwieństwie do pierwszego automatu Shapiro [5], w przedstawianym nie jest wymagana ligaza DNA, a „cząsteczki oprogramowania” nie ulegają zmianom. Przykładowe słowo wejściowe, reprezentowane przez cząsteczkę DNA jest przedstawione na Ryc. 8. We fragmencie dwuniciowym znajdują się sekwencje odpowiadające symbolom a i b , zgodnie z tabelą 3. Jednoniciowe zakończenie od strony 5' koduje jednocześnie stan początkowy i pierwszy symbol. Na końcu 3' znajduje się sekwencja terminalna. Każdy symbol jest reprezentowany przez 5 nt sekwencję, zgodnie z tabelą 3, poprzedzielane dodatkowymi sekwencjami 3 nt.

Mechanizm działania dwustanowego automatu molekularnego Shapiro jest przedstawiony na rycinie 9. W każdej elementarnej operacji automatu trawiony jest jeden sym-



Rycina 7. Reguły przejść (*software*) automatu Shapiro. Każda z przedstawionych cząsteczek DNA realizuje specyficzną regułę przejścia poprzez wykrycie aktualnego stanu, odczytanie symbolu i określenie stanu następnego. Cząsteczki zawierają detektor <stan, symbol> (kolor żółty), miejsce rozpoznawane przez FokI (czerwone) oraz sekwencję przedzielającą (szary) (na podstawie [4], zmienione).



Rycina 8. Częsteczka DNA reprezentująca słowo wejściowe automatu skończonego.

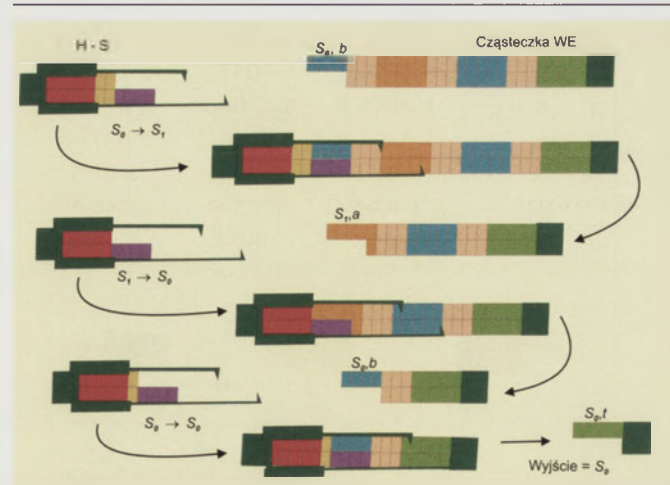
bol. Po trawieniu powstają dwa fragmenty DNA: krótki, o jednoniciowych zakończeniach z obydwu stron, który nie jest wykorzystywany w dalszych operacjach (fragment ten prawdopodobnie ulega dysocjacji na fragmenty jednoniciowe) oraz dłuższy, biorący udział w dalszych operacjach, reprezentujący słowo wejściowe, ale już bez kolejnego strawnego symbolu.

Komputer DNA jest tu tworzony przez kompleks enzymu *FokI* z jedną z cząsteczek oprogramowania (reguł przejścia) przedstawionych na rycinie 7. Kompleks ten działa poprzez hybrydyzację komplementarnych fragmentów jednoniciowych cząsteczek oprogramowania i słowa wejściowego. Brak ligazy DNA skutkuje występowaniem po jednym pęknięciu w każdej nici hybrydujących fragmentów, nie stanowi to jednak problemu z informatycznego punktu widzenia, lecz umożliwia łatwe odłączenie odczytanego symbolu od kompleksu sprzęt komputerowy-oprogramowanie (ang. *hardware-software*, oznaczane dalej jako HW-SW). Oprogramowanie, czyli krótkie oligonukleotydy przedstawione na rycinie 7, zawierają miejsce rozpoznawane przez enzym *FokI*, jednakże ich umiejscowienie charakteryzuje specyficzne miejsce trawienia cząsteczki reprezentującej słowo wejściowe. Wynika to z różnej długości sekwencji rozdzielającej sekwencję rozpoznawaną przez *FokI* od zakończenia jednoniciowego cząsteczki oprogramowania. Generalnie określona ilość kompleksu HW-SW może przekształcać dowolną cząsteczkę wejściową o dowolnej długości. Jednak przy bardzo długich cząsteczkach wejściowych, akumulacja krótkich fragmentów, będących wynikiem trawienia przez *FokI*, może spowalniać kolejne operacje, poprzez łączenie lepkich końców tych fragmentów z końcami cząsteczki wejściowej i cząsteczek oprogramowania. Można rozważać wykorzystanie energii swobodnej tych fragmentów do ich hydrolitycznej degradacji, co mogłoby zmniejszyć opóźnienie działania automatu wynikającego z ich akumulacji.

Operacje w automacie Shapiro będą trwały tak długo, jak długo będzie można dopasować cząsteczki oprogramowania do pary stan-symbol kodowanej przez jednoniciowe zakończenie lub nastąpi trawienie sekwencji końcowej, która jest identyfikowana albo poprzez swoją długość, albo sekwencję nukleotydów [5]. Przy słowie wejściowym składającym się z 12 symboli, średnia dokładność działania automatu Shapiro dla wszystkich elementów oprogramowania wynosiła 99,5%. Interesujące jest to, że dokładność rosła wraz ze wzrostem długości słowa wejściowego – dla słowa składającego się z 4 symboli, wynosiła 95%. Jest to zależność, która jest odwrotnością zależności spotykanej w wielu procedurach biologii molekularnej, na przykład łańcuchowej reakcji polimerazy. Jednakże szczegółowa analiza produktów reakcji pozwala na określenie dokładności reakcji automatu Shapiro na 99,9%. Jednym z najbardziej intrygujących cech omawianego automatu jest możliwość wielokrotnego użycia tego samego enzymu restrykcyjne-

go i tej samej cząsteczki oprogramowania. Oczywiście nie można tego robić w nieskończoność. Zatem jak długo? W doświadczeniu Shapiro jedna cząsteczka oprogramowania kierowała przeciętnie 54 przejściami. Optymalne warunki wykonywania operacji osiągnięto, gdy stężenie cząsteczek oprogramowania wynosiło 1 μM , enzymu *FokI* 4 μM , natomiast słowa wejściowego – 10 nM. Początkowa średnia szybkość działania automatu Shapiro wynosiła 0,05 operacji/s dla jednego elementu oprogramowania. To jeden element, ale my mamy przecież całą probówkę! Skumulowana szybkość w objętości jednego mikrolitra wynosiła 6, 646 $\times 10^{10}$ operacji na sekundę. Ważnym problemem w komputerach „konwencjonalnych” jest wydzielanie energii cieplnej i konieczność jej odprowadzania. W automacie Shapiro wydzielanie ciepła zależy od warunków reakcji i liczby symboli w słowie wejściowym. Obliczenia wykonane dla przeciętnych warunków dają wielkość około 5,3 $\times 10^{-9}$ W/ μl i średnią zmianę energii swobodnej około 33,9 kJ na jedno przejście. Szybkość reakcji była stała w zakresie 2-20°C, co może być wyrazem równowagi pomiędzy malejącą efektywnością hybrydyzacji lepkich końców i rosnącą aktywnością *FokI* wraz ze wzrostem temperatury.

Określenie warunków energetycznych pracy komputera DNA ma podstawowe znaczenie dla ustalenia jego optymalizacji. Bilans energetyczny takiego komputera może być określony jako różnica pomiędzy energią swobodną cząsteczki wyjściowej wraz z produktami „ubocznymi” (cząsteczki generowane w kolejnych aktach trawienia) i energią swobodną cząsteczki wejściowej. Wartość ujemna takiej różnicy wskazuje, że cząsteczka wejściowa DNA ma wystarczająco dużo energii, aby umożliwić wykonywanie wszystkich operacji. Mamy zatem sytuację, w którym DNA koduje informację wejściową, umożliwia odczyt informacji końcowej, dostarcza oprogramowania dla komputera oraz energii dla jego funkcjonowania. Możemy rozważać dwa typy kompleksów mających wkład w całkowity ujemny bilans energii swobodnej: kompleksy składników wejściowych oraz kompleksy produktów hydrolizy cząsteczek wejściowych. Pierwsze wykorzystują energię wiązań wodo-



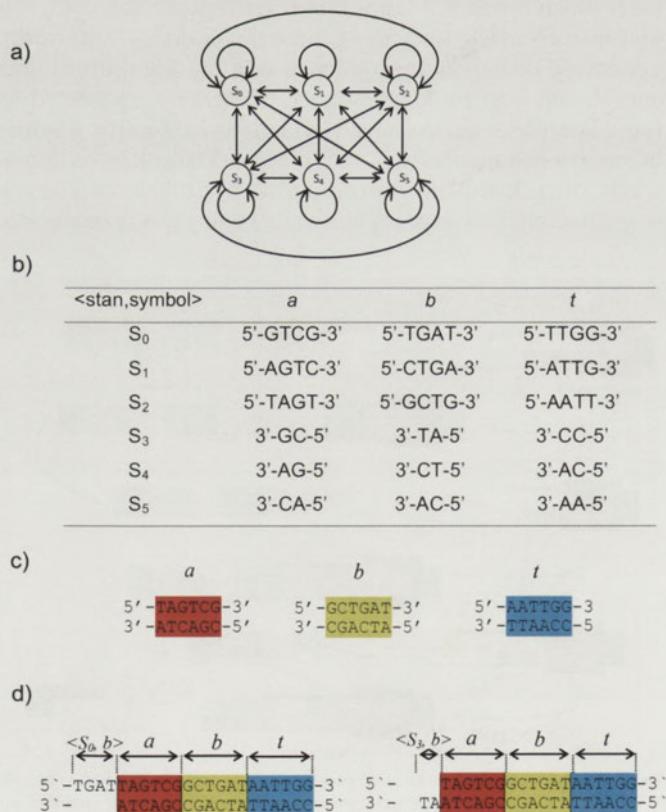
Rycina 9. Mechanizm działania dwustanowego automatu Shapiro. HW-SW – kompleks sprzęt komputerowy-oprogramowanie. Operacje są realizowane poprzez kaskadę cykli trawienia i usunięcia jednego symbolu wejściowego. Na rycinie słowo wejściowe zawiera na początku ciąg *bab*, stanem początkowym jest S_0 , a pierwszym przejściem $S_0 \rightarrow S_1$. Składniki kompleksu HW-SW nie muszą być odnawiane w kolejnych operacjach.

rowych pomiędzy zasadami, drugie – energię wiązań fosfodiesterowych szkieletu DNA. Opracowania układów wykorzystujących bardzo małe ilości energii dla wykonywania skomplikowanych obliczeń zostały dokonane około 40 lat temu [6,7], jednak automat Shapiro pokazał ich praktyczne zastosowanie.

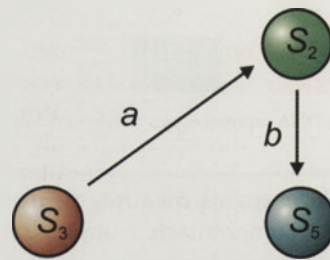
ROZSZERZENIA AUTOMATU SHAPIRO

Do tej pory rozważaliśmy dwustanowy automat skończony operujący na dwuelementowym alfabecie, w którym możliwe było 8 przejść pomiędzy stanami. Zespół z Wrocławia ogłosił w 2004 roku opracowanie skończonego automatu trzystanowego, operującego na dwuelementowym alfabecie, z 18 możliwymi przejściami. Zastosowano enzym restrykcyjny *Bse*MII [8]. Następnie dokonano rozszerzenia automatu Shapiro na automat trzystanowy z trójsymbolowym alfabetem [9]. Zastosowano restryktazę *Bbv*I i ligazę DNA z faga T4. Liczba przejść takiego automatu wynosiła 27.

W badaniach własnych opracowujemy rozszerzenie automatu Shapiro do 6 i więcej stanów [10]. Stosujemy 2 enzymy restrykcyjne *Bse*XI oraz *Eco*57I działające jednocześnie w jednym środowisku. Działanie enzymów na słowo wejściowe prowadzi do powstania 2 rodzajów lepkich końców. Umożliwia to zakodowanie 72 ruchów, co wystarczy dla automatu sześciostanowego dwusymbolowego (Ryc. 10a). Wszystkie możliwe pary <stan, symbol> oraz ich kody DNA zostały przedstawione na rycinie 10b. Podobnie jak w przypadku automatu Shapiro słowo wejściowe ma lepki ko-



Rycina 10. Mechanizm działania skończonego automatu podejmującego decyzję wg ustalonego algorytmu. Objasnienie w tekście (na podstawie [5], zmienione).



Rycina 11. Sześciostanowy automat Shapiro. a) wszystkie możliwe przejścia automatu (każda krawędź ma oznaczenie a, b), b) kodowanie par <stan, symbol>, c) kodowanie symboli, d) kodowanie słowa bab, gdy stanem początkowym jest S₀ lub S₁.

niec 5' lub 3'. Fragment końcowy 5' koduje stany S₀, S₁ oraz S₂ i liczy 4 nukleotydy. Dwunukleotydowy koniec 3' koduje stany S₃, S₄ i S₅ wraz z odpowiadającymi im symbolami. Symbole a, b oraz symbol t oznaczający sekwencję końcową są kodowane za pomocą sześciu nukleotydów (Ryc. 10c). Słowo kodowane jest w zależności od wybranego stanu początkowego, dodając odpowiedni lepki koniec zakończenia (Ryc. 10d). Kolejnym elementem automatu są przejścia pomiędzy stanami również zakodowane w postaci łańcuchów DNA. Proces przetwarzania informacji w sześciostanowym automacie przebiega podobnie jak w dwustanowym automacie Shapiro. Środowisko reakcji zawiera fragmenty DNA reprezentujące słowo wejściowe oraz reguły przejścia, a także enzymy restrykcyjne, stanowiące *hardware*. Analiza słowa wejściowego, podobnie jak w automacie Shapiro, polega na przemiennym łączeniu i trawieniu łańcuchów DNA, aż do pojawienia się sekwencji terminalnej. Nasz zespół bada działanie sześciostanowego automatu opartego na modelu Shapiro, poprzez konstrukcję prostego automatu przedstawionego na rycinie 11. Enzymy *Bse*XI, *Eco*57I i ligaza DNA różnią się optymalnymi warunkami działania. Problem ten rozwiązaliśmy stosując izoschizomery restryktaz *Bse*XI i *Eco*57I, odpowiednio *Bbv*I oraz *Acl*I, które mają takie same wymagania co do warunków reakcji oraz środowisko odpowiednie dla działania ligazy DNA. Do otrzymania składników reakcji zastosowaliśmy wektory plazmidowe, do których dołączyliśmy cząsteczki DNA stanowiące elementy automatu. W ten sposób powstała biblioteka reprezentująca elementy DNA niezbędne do działania sześciostanowego automatu Shapiro. Takie rozwiązanie umożliwia szybkie i wydajne pozyskanie fragmentów DNA z biblioteki za pomocą odpowiednio dobranych enzymów restrykcyjnych i prostej procedury izolacji właściwych fragmentów przed każdym doświadczeniem, ograniczając tym samym do jednej procedury weryfikację poprawności sekwencji DNA elementów automatu, polegającą na czasochłonnym i kosztownym sekwencjonowaniu, koniecznym przy ich każdorazowej konstrukcji *de novo*. Kolejnym etapem będzie optymalizacja działań automatu poprzez skrócenie procedur związanych z wykrywaniem sygnału końcowego.

INNE KOMPUTERY BIOMOLEKULARNE

KOMPUTER DNA BEZ ... SPRZĘTU KOMPUTEROWEGO

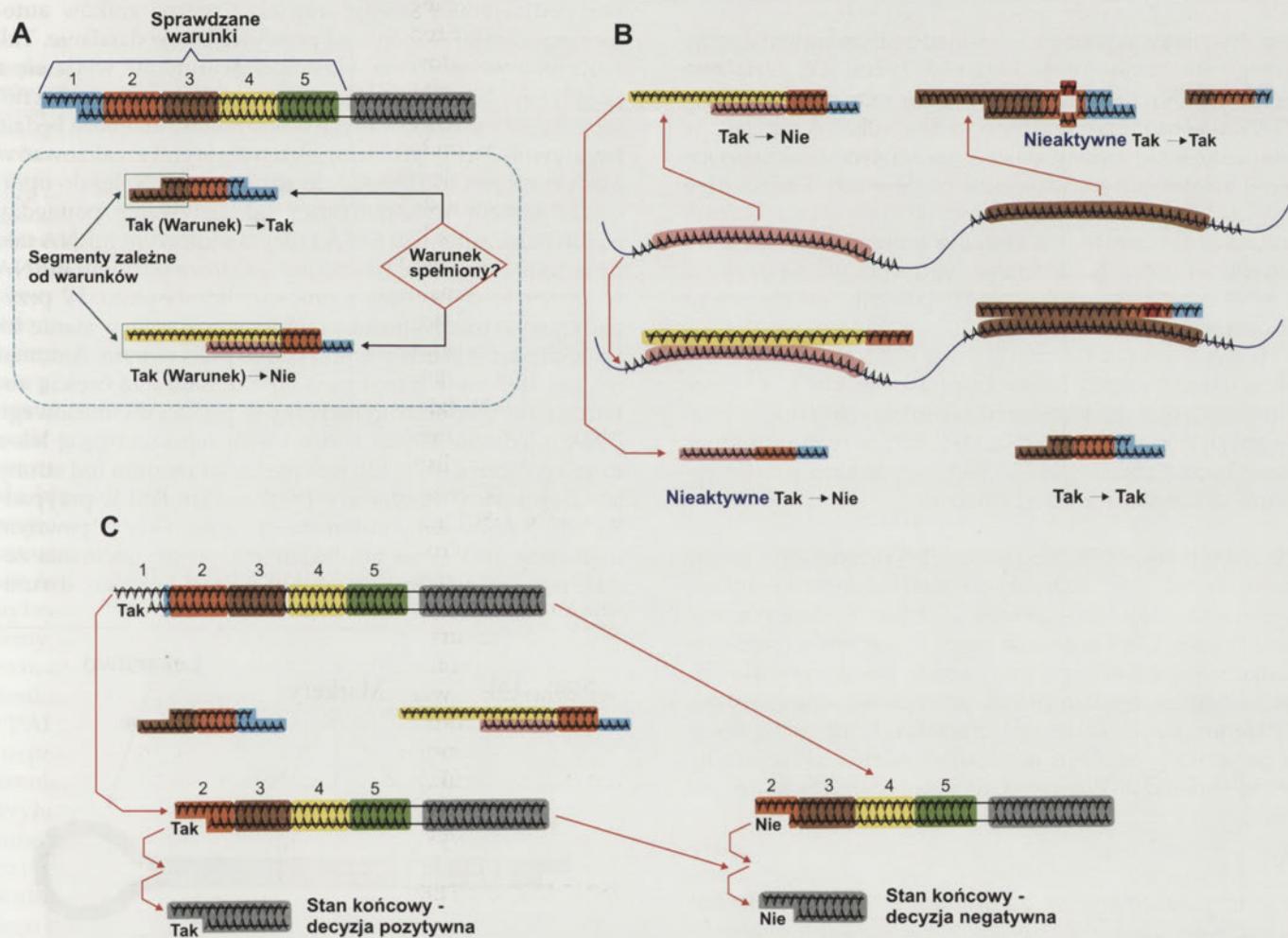
Już doświadczenie Adlemana pokazało, że w „obliczeniach realizowanych przez DNA” można się obejść bez polimerazy DNA. Również ligaza nie była niezbędna w tym

doświadczeniu, aczkolwiek „podnosiła” znacznie szybkość i dokładność obliczeń. Skończony automat dwustanowy, taki jak omówiony w poprzednim rozdziale, może się obejść bez enzymu restrykcyjnego, czyli komputer DNA może zostać pozbawiony *hardware* i funkcjonować jako komputer, przyjmując funkcjonalną, a nie strukturalną definicję komputera [11]. W takim komputerze możliwa jest realizacja algorytmu umożliwiającego podejmowanie decyzji wg instrukcji „jeżeli...to....w przeciwnym razie...” (Ryc. 12). Testowany algorytm miał postać: początek – sprawdzanie warunków – jeżeli aktualny warunek jest „Tak” automat pozostaje w stanie „Tak”, w przeciwnym razie przełącza się w stan „Nie” – jeżeli aktualny warunek jest „Nie”, automat pozostaje w tym stanie. Dla realizacji takiego komputera zastosowano specjalnie zaprojektowane cząsteczki DNA, o dwuniciowych segmentach reprezentujących jeden warunek i jeden krok algorytmu. Skrajny segment ma zakończenie jednoniciowe, wskazujące, że aktualnym stanem operacji jest „Tak”, natomiast jego dwuniciowa część reprezentuje następny warunek do sprawdzenia. Podstawowym mechanizmem działania takiego automatu jest wymiana nici pomiędzy komplementarnymi sekwencjami cząsteczek przejściowych i cząsteczką jednoniciowego DNA lub

mRNA (Ryc. 12a). Niekomplementarność nawet jednego nukleotydu powoduje utworzenie krótkiej pętli i odróżnieniu cząsteczki przejściowej „Tak” od „Nie”. Cząsteczki przejściowe „odrywają” fragmenty DNA słowa wejściowego i enzym restrykcyjny nie jest tu potrzebny.

SYSTEMY OPARTE NA RNA

W poprzednim podrozdziale zasygnalizowaliśmy możliwość użycia mRNA w komputerze DNA i nie jest to jedyny przypadek takiej fuzji [12]. Połączenie możliwości magazynowania informacji przez RNA z faktem jego syntezy w komórce, czyni go potencjalnym substratem dla komputerów działających *in vivo* [13,14]. Wśród wielu typów RNA i regulujących ich mechanizmów dwa znalazły szczególne zastosowanie w komputerach biomolekularnych: przełączniki RNA i interferujący RNA (RNAi). Przełączniki RNA są naturalnymi częściami transkryptów mRNA i tworzą one lokalnie stabilne struktury, takie jak pień-pętla w swoim stanie podstawowym [15]. W stanie tym translacja może zachodzić bez przeszkód, lub być hamowana, w zależności od konformacji przełącznika RNA. Konformacja ta może zależeć od szeregu czynników, takich jak temperatura czy inne cząsteczki RNA [14]. Po reakcji z zewnętrznym impul-



Rycina 12. Automat testowany w laboratorium oparty na sześciostanowym modelu Shapiro. Elementy automatu są zbudowane z fragmentów DNA kodujących słowo oraz poszczególne stany i przejścia pomiędzy nimi. Automat działa na słowie *ab* z zastosowaniem dwóch enzymów restrykcyjnych działających autonomicznie w jednej mieszaninie. Składa się on z 3 stanów, początkowym stanem automatu jest stan S_1 . Po wczytaniu analizowanego przez automat słowa *ab* przechodzi on kolejno ze stanu S_1 do stanu końcowego S_3 przez stan S_2 . Kończym efektem działania automatu będzie pojawienie się w roztworze fragmentu DNA o określonej wielkości.

sem (słowo wejściowe kodowane przez RNA), przełącznik przechodzi do stanu aktywnego, który zmienia sposób syntezy białka odpowiadającego mRNA. Stan aktywny może być odwracalny lub nieodwracalny po samostrawieniu się przez przełącznik RNA, wymagający nabycia przez niego właściwości rybozomu. Przełączniki RNA znalazły zastosowanie w komputerach *in vivo*, przede wszystkim w komórkach drożdży.

W mechanizmie opartym na RNAi wykorzystuje się krótkie interferujące RNA (siRNA) dla budowania obwodów logicznych, powstających poprzez oddziaływanie tych siRNA z obszarem genu nie podlegającym translacji od strony 3' [16].

INNE BIOKOMPUTERY

W 1999 roku Faulhammer wraz ze współpracownikami [12] przedstawił możliwość rozwiązania „problemu skoczka szachowego” za pomocą DNA i RNA. Problem ten polega na rozmieszczeniu skoczków na szachownicy w taki sposób, by wzajemnie nie atakowały się. W doświadczeniu tym zakodowano za pomocą RNA wszystkie możliwe rozmieszczenia skoczków na szachownicy, a następnie usuwano złe ustawienia przy użyciu RNazy H.

W 2003 roku wykonano doświadczalnie implementację znanego algorytmu gry w kółko i krzyżyk [17]. Działanie tego modelu oparte jest o enzym DNA oraz oligonukleotydy DNA o strukturze szpilki do włosów. DNA „grający w kółko i krzyżyk” należy zaliczyć raczej do intelektualnych zabaw niż poważnych projektów naukowych. Twórcy tego modelu zasugerowali możliwość wykorzystania bramek logicznych do konstrukcji systemu umożliwiającego identyfikację wirusów Zachodniego Nilu oraz ptasiej grypy u człowieka oraz do analizy zróżnicowania genetycznego różnych populacji.

Rozważano zastosowanie komputerów DNA w nanotechnologii, przy zastosowaniu nieliniowych struktur zbudowanych z fragmentów DNA [18]. Były to różne struktury geometryczne zbudowane z DNA, np. struktury czteroramienne zakończone lepki końcami.

W 2009 r. zespół Shapiro i wsp. [19] przedstawili prosty system wnioskujący, który na podstawie faktów i reguł odpowiada na postawione pytanie logiczne. System ten zbudowany jest z DNA oraz enzymu *FokI*, a wynik przeprowadzanych operacji odczytywany jest w postaci sygnału fluorescencyjnego. System potrafi prawidłowo odpowiedzieć na pytanie „Czy Sokrates jest śmiertelny?”, mając wprowadzone przy użyciu DNA następujące zdania: „Wszyscy ludzie są śmiertelni. Wszyscy Grecy są ludźmi. Sokrates jest Grekiem”.

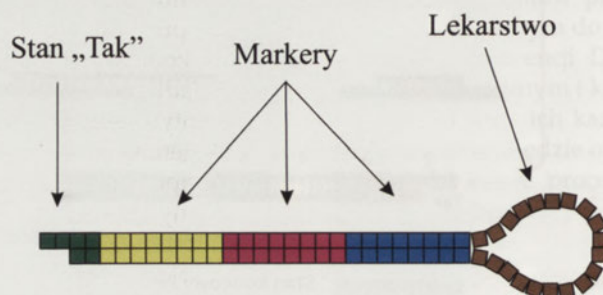
Przedstawione doświadczenia, implementujące znane algorytmy informatyczne za pomocą DNA, nie są jednak uniwersalne, tzn. implementacje te nie są na tyle ogólne by realizować dowolny „program komputerowy”. Na ogół są one komputerami tworzonymi do jednego problemu. Pewną „niewielką uniwersalność” ma automat Shapiro i jego rozszerzenia, realizujące dowolny program dla automatu

skończonego. Brak jest jednorodnego podejścia do kodowania, przetwarzania i odczytywania informacji za pomocą DNA. Dużym ograniczeniem tych implementacji są metody laboratoryjne, które charakteryzuje duża pracochłonność.

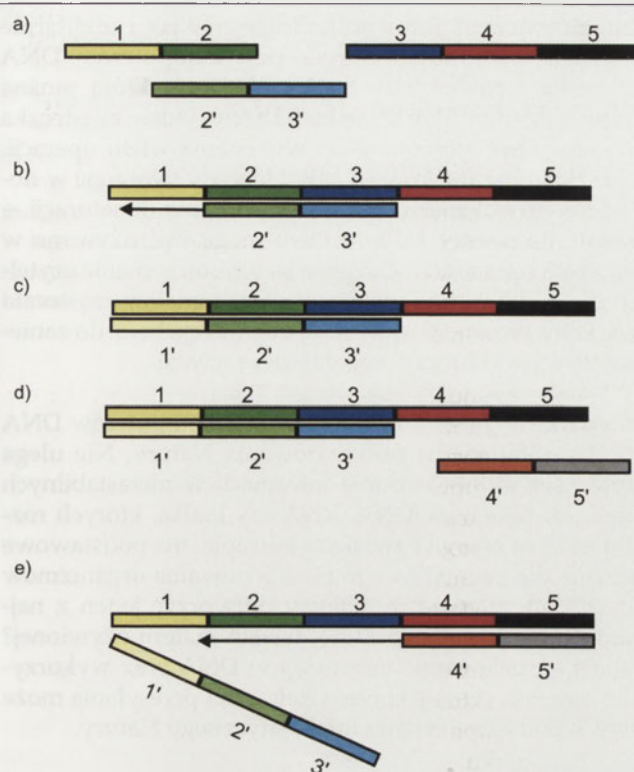
ZASTOSOWANIA KOMPUTERÓW DNA

Liczba praktycznych zastosowań komputerów molekularnych z pewnością nie jest imponująca, jednakże samo urzeczywistnienie idei wykorzystania biomolekuł do wykonywania obliczeń, stanowi poważny etap w poznawaniu i wykorzystywaniu sił Natury.

Zaproponowano wykorzystanie DNA do wspomagania diagnostyki i terapii chorób [11]. Komputery DNA stawiają wprawdzie diagnozę na podstawie analizy wyznaczników (markerów) choroby, takich jak zmiany w mRNA, a następnie proponują skuteczne leczenie. Algorytm wykorzystany do diagnozy jest stosunkowo prosty – potrzebne są do tego tylko dwa stany automatu: *tak* i *nie*. Taki automat ma odpowiedzieć na pytanie „Czy pacjent jest chory?” i na wejściu ustawiony jest na *tak*. Następnie sprawdza obecność jednego ze zbioru wyznaczników choroby. Odpowiedź pozytywna nie zmienia aktualnego stanu *tak* i komputer przechodzi do kolejnego etapu poszukiwania następnego markera. W przypadku braku któregośkolwiek z wyznaczników automat przechodzi w stan *nie* i przerywa swoje działanie. Tak więc tylko wystąpienie wszystkich warunków wiąże się z pozytywną diagnozą, w innym przypadku, przy nieobecności jednego z poszukiwanych wskaźników, diagnoza będzie negatywna. Drugi problem, jak ten algorytm zrealizować w medycynie jest trudniejszy do rozwiązania. Należało opracować system wykorzystujący oddziaływanie pomiędzy elementami automatu DNA i nieprawidłowym mRNA tak, by automat reagował na zmiany ilościowe poziomu mRNA w komórce, wynikające z procesu chorobowego. W przypadku wykrycia tych zmian automat pozostaje w stanie *tak* i przechodzi w stan *nie* w przypadku przeciwnym. Automat ten jest złożony z trzech modułów. Zasadniczą częścią automatu jest moduł diagnostyczny w postaci dwuniciowego DNA o jednym lepkiem końcu i pętli reprezentującej lek z drugiego końca (Ryc. 13). Kolejne części modułu (od strony lepszego końca) są odcinane przez enzym *FokI* w przypadku gdy kolejne stany automatu są na *tak*. Gdy w pewnym momencie stan automatu będzie *nie*, proces odcinania zostaje przerwany. Drugi moduł w postaci krótkich, dwuni-



Rycina 13. Model automatu diagnostyczno-terapeutycznego. Lepki koniec fragmentu DNA koduje aktualny stan automatu. Kolejne odcinki DNA reprezentują wyznaczniki (markery) nadmiaru lub niedomiaru pewnych mRNA. Pętla koduje lek, uwalniany po strawieniu markerów.



Rycina 14. Sieć neuronów oparta na DNA, w skład której wchodzi (a) neurony reprezentowane przez fragmenty DNA złożone z segmentów 1, 2 i 3, 4, 5 oraz łączniki neuronów komplementarne do poszczególnych segmentów DNA reprezentujących neurony (oznaczone jako 2', 3'). W kolejnym etapie (b) polimeraza wydłuża koniec DNA łącznika w wyniku czego powstaje kompletny element sieci (c). Następnie do roztworu wprowadza się cząsteczkę DNA kodującą informację wejścia, składającą się z segmentów 4', 5' (etap d). W wyniku reakcji przeprowadzanej przez polimerazę DNA, cząsteczka DNA wejścia jest wydłużana, uwalniając końcowy odcinek DNA (e).

ciowych oligomerów DNA jest modulem przetwarzającym informację zawartą w mRNA do postaci innych molekuł hybrydujących z modulem wejścia. W przypadku gdy warunek jest spełniony, powstaje cząsteczka DNA hybrydująca z modulem wejścia i enzym *FokI* odcina kolejną część tego modułu. W przeciwnym przypadku powstaje cząsteczka, również hybrydująca z modulem wejścia, ale blokującą dalszą fragmentację. Ostatni moduł, moduł wyjścia, jest krótkim jednoniciowym DNA, uwalnianym w ostatnim etapie odcinania modułu wejścia. Ma on znaczenie terapeutyczne i działa jako antysensowny DNA, który hybrydując z mRNA, indukuje jego degradację przez systemy komórkowe. Działanie tego automatu zostało przetestowane na komórkach nowotworowych prostaty. Automat analizował poziom mRNA dla genów kodujących białka PPAP2B, GSTP1, PIM1 i HPN. W przypadku stwierdzenia nieprawidłowości uwalniał w komórce antysensowny DNA zmniejszający w komórce ilość mRNA genów *hpn* i *gstp1*. Wykorzystanie DNA w diagnostyce i terapii chorób zostało tutaj przedstawione w mocno uproszczony sposób. W rzeczywistości, drugi moduł automatu składał się z dwóch „rywalizujących” cząsteczek DNA sprawdzających warunek lub jego brak, a trzeci moduł mógł również uwalniać cząsteczki blokujące lek, w przypadku osiągnięcia stanu automatu *nie*. Te dodatkowe mechanizmy są związane ze stochastycznością działania automatu.

W innym podejściu zaproponowano komputer DNA oparty na modelu Adlemana, który może dokonywać analizy profilu ekspresji genów [20]. Podstawą jego działania jest sieć neuronowa zbudowana z oligonukleotydów reprezentujących neurony i łączników pomiędzy neuronami. Stężenie oligonukleotydów jest zależne od aktywności sieci. Z kolei stężenie łączników reprezentujących aksony decyduje o szybkości działania sieci – im jest większe, tym szybciej z cząsteczek wejściowych produkowane są wyjściowe. System ten działa w oparciu o współzawodnictwo pomiędzy komplementarnymi oligonukleotydami reprezentującymi neurony wejściowe, wyjściowe oraz aksony. Do jego efektywnego działania niezbędne jest użycie enzymów modyfikujących DNA, takich jak ligaza DNA czy też polimeraza DNA. System ten jest ograniczony tylko do diagnostyki i brak mu możliwości terapeutycznych. Jego zaletą jest nie tylko szybkość działania znacznie przewyższająca obecnie stosowane techniki do określania profilu ekspresyjnego z użyciem mikromacierzy, ale również prostota zmniejszająca koszty i czas niezbędny do przeprowadzenia analizy (Ryc. 14).

Kolejną próbą zastosowania komputerów molekularnych w medycynie było wykorzystanie istniejących już w komórkach bakteryjnych i eukariotycznych naturalnych sieci przekazywania i analizy informacji opartych na RNA. Regulacja tych sieci RNA, które kontrolują syntezę białek komórkowych, miałyby się odbywać poprzez zastosowanie opisanych poprzednio przełączników RNA [21,22]. Zaletą takiego systemu jest fakt, że przełączniki RNA można dowolnie projektować, dzięki czemu możliwa jest kontrola sieci RNA w dowolnym punkcie [23].

Właściwości informatyczne DNA mogą być wykorzystane w kryptografii i steganografii. Do tej roli pretenduje DNA przede wszystkim dzięki niespotykaniu wysokiego upakowania informacji [24]. DNA może być także wykorzystany do binarnego przedstawiania informacji [25]. Wybiera się 2 sekwencje reprezentujące wartości 1 lub 0. Ciąg informacji powstaje poprzez połączenie ze sobą fragmentów DNA o takich sekwencjach w określonej kolejności. Ten sposób zapisu informacji umożliwia kodowanie nie tylko słów, ale ze względu na swój binarny charakter, również i obrazów. Rozkodowanie informacji polega na reakcji PCR i analizie elektroforetycznej powstałych w jej wyniku fragmentów DNA.

UWAGI KOŃCOWE

Z pewnością twierdzenie, że komputery krzemowe doszły w swym rozwoju „do ściany” jest przedwczesne, a jeszcze bardziej przedwczesne jest twierdzenie, że oto nadchodzi czas komputerów molekularnych. W procesie urzeczywistniania idei komputerów DNA ważny powinien być nie tylko postęp technologiczny – zwiększenie szybkości operacji, czy zmniejszone zużycie i wydzielanie energii – lecz także ogólne spojrzenie na mechanizmy składowania i przekazywania informacji wewnątrz komórki. Mówimy, że przesyłanie informacji genetycznej, to replikacja, transkrypcja, translacja, rekombinacja i wiemy o nich (prawie) wszystko, ale przecież to jest dalekie od prawdy. Na przykład uszko-

dzenia DNA i RNA mogą zaburzyć każdy z tych procesów. Gdy takim uszkodzeniem jest dwuniciowe pęknięcie DNA, to wówczas przepływ informacji od miejsca uszkodzenia do „instrumentów” naprawy DNA jest dość dobrze scharakteryzowany. Jest on realizowany głównie poprzez białka, biorące udział w tym przepływie informacji. Ale takie dwuniciowe pęknięcie DNA jest poważnym uszkodzeniem zagrażającym życiu komórki i czasem może być widziane w mikroskopie świetlnym jako pęknięcie chromosomu. Wydaje się, że takie masywne uszkodzenie nie powinno być trudne do wykrycia, tym bardziej, że przeciętna liczba takich uszkodzeń na komórkę na dobę to około 10. Inaczej sprawy się mają z subtelniejszymi uszkodzeniami, takimi jak jednoniciowe pęknięcia DNA, które mogą poważnie zaburzyć procesy przesyłania informacji genetycznej i których liczba na dobę na 1 komórkę może przekraczać kilkadziesiąt tysięcy. Uszkodzenia takie mogą hamować replikację, czy transkrypcję, jeżeli występują w nici antysensownej. Oczywiście w takich przypadkach uruchamiane są specjalne mechanizmy naprawy DNA, jednakże uszkodzenia te są naprawiane także w stanie spoczynkowym, choć nie z taką efektywnością, jak w czasie aktywnego przekształcania i przesyłania informacji genetycznej, ale znowu informacja o uszkodzeniu musi dotrzeć od miejsca uszkodzenia do „egzekutorów” i trudno sobie wyobrazić, aby odbywało się to poprzez szlak równie złożony, jak w przypadku pęknięć dwuniciowych, gdyż wymagałoby to zbyt wysokich nakładów energetycznych od komórki. Podsumowując ten przydługi wywód dotyczący uszkodzeń i naprawy DNA, należałoby się zastanowić nad możliwościami wykorzystania potencjału informatycznego DNA nie tylko w zakresie jego struktury pierwszorzędowej, to jest sekwencji zasad, ale także struktur wyższego rzędu. Procesy akomodacji uszkodzeń DNA i ich naprawy są przykładem kolejnych możliwości zastosowania DNA jako procesora.

Ze zrozumiałych względów jednym z najważniejszych aspektów komputerów DNA jest ich bilans energetyczny, tj. ilość dostarczanej i wydzielanej energii oraz ilość energii, która powinna być odprowadzona. W podrozdziale „Problem drogi Hamiltona i doświadczenie Adlemana” podaliśmy kilka danych liczbowych dotyczących tego zagadnienia. Wyglądają one bardzo zachęcająco. W dotychczas przeprowadzonych badaniach najbardziej energochłonnym etapem pracy komputera opartego na DNA jest ligacja. „Główny bohater” tej operacji, ligaza DNA, w zależności od rodzaju wymaga ATP bądź NAD, jako źródła energii. Jedna cząsteczka ATP/NAD – jedna ligacja. Nie wdając się w szczegółowe obliczenia, z mechanizmu tej reakcji można wnosić, że nie jest to proces nadzwyczaj energochłonny, a należy brać pod uwagę jeszcze co najmniej dwa aspekty tego zagadnienia. Po pierwsze, w szeregu zagadnień, komputer DNA może funkcjonować bez ligazy DNA [4]. Po drugie, wiązania występujące w cząsteczce DNA – fosfodiesterowe, wodorowe i inne, mają określoną energię swobodną, która może być wykorzystana w procesach przekształcania tej cząsteczki. W świetle tych danych, problem dostarczania i doprowadzania energii do komputera DNA nie stanowi przeszkody w rozwijaniu jego koncepcji, ale na rzeczywistą weryfikację tej tezy trzeba będzie poczekać do realizacji idei komputera DNA w „maszynę cyfrową z procesorem i oprogramowaniem DNA”.

Innym ważnym zarówno koncepcyjnie jak i utylitarnie problemem związanym z koncepcją komputerów DNA jest kwestia „recyklingu” cząsteczek DNA, którą można rozpatrywać dwojako. Z jednej strony jedna cząsteczka DNA może być stosowana do wykonania wielu operacji. Na przykład dwuniciowe oligonukleotydy tworzone w doświadczeniu Adlemana, mogą być poddane denaturacji, a powstałe fragmenty jednoniciowe mogą być używane w następnych operacjach. Z drugiej strony, otrzymanie czytelnego dla użytkownika wyniku wymaga analizy cząsteczki DNA, która prowadzi bądź do jej degradacji, bądź do zanieczyszczenia, wykluczającego dalsze jej użycie.

Nasuwa się pytanie, czy konstrukcje komputerów DNA są próbą odtworzenia funkcjonowania Natury. Nie ulega wątpliwości, że upakowanie informacji w metastabilnych polimerach takich jak DNA, RNA czy białka, których rozpad dostarcza energii i zwiększa entropię, ma podstawowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Zatem może próbujemy odtworzyć jeden z najbardziej naturalnych aspektów działań materii ożywionej? Ogólniej – upakowanie informacji w DNA oraz wykorzystanie jego energii do jej przekształcania i przesyłania może stanowić podstawę sytemu informatycznego Natury.

PIŚMIENICTWO

1. Węgrzyn S, Klamka J, Znamirowski L, Winiarczyk R, Nowak S (2004) Nano and quantum systems of informatics. Bulletin of the Polish Academy of Sciences. Technical Sciences 52: 1-10
2. Martínez-Pérez IM, Ignatova Z, Zimmermann KH (2009) Exploiting the features of the finite state automata for biomolecular computing. Recent Pat DNA Gene Seq 3: 130-138
3. Adleman LM (1994) Computing with DNA. Scientific American 279: 54-61
4. Benenson Y, Adar R, Paz-Elizur T, Livneh Z, Shapiro E (2003) DNA molecule provides a computing machine with both data and fuel. Proc Natl Acad Sci USA 100: 2191-2196
5. Benenson Y, Paz-Elizur T, Adar R, Keinan E, Livneh Z, Shapiro E (2001) Programmable and autonomous computing machine made of biomolecules. Nature 6862: 430-434
6. Bennet CH (1973) Logical reversibility of computation. IBM J Res Dev 17: 525-532
7. Bennet CH (1982) The thermodynamics of computation – a review. Int J Theor Phys 21: 905-940
8. Unold O, Troć M, Dobosz T, Trusewicz A (2004) Extended molecular computing model. WSEAS Trans Biol Biomed 1: 15-19
9. Soreni M, Yagov S, Kossoy E, Shoham Y, Keinan E (2005) Parallel biomolecular computation on surfaces with advanced finite automata. J Am Chem Soc 127: 3935-3943
10. Krasinski T, Sakowski S (2008) Extended Shapiro finite automaton built on DNA. Found Comp Dec Sci 33: 241-255
11. Benenson Y, Gil B, Ben-Dor U, Adar R, Shapiro E (2004) An autonomous molecular computer for logical control of gene expression. Nature 429: 423-429
12. Faulhammer D, Cukras AR, Lipton RJ, Landweber LF (2000) Molecular computation: RNA solutions to chess problems. Proc Natl Acad Sci USA 97: 1385-1389
13. Davidson EA, Ellington AD (2007) Synthetic RNA circuits. Nat Chem Biol 3: 23-28
14. Isaacs FJ, Dwyer DJ, Collins JJ (2006) RNA synthetic biology. Nat Biotechnol 24: 545-554
15. Winkler WC, Breaker RR (2005) Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. Annu Rev Microbiol 59: 487-517

16. Rinaudo K, Bleris L, Maddamsetti LR, Subramanian S, Weiss R, Benenson Y (2007) A universal RNAi-based logic evaluator that operates in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 25: 795-801
17. Stojanovic MN, Stefanovic D (2003) A deoxyribozyme-based molecular automaton. *Nat Biotechnol* 21: 1069-1074
18. Seeman N (1999) DNA engineering and its application to nanotechnology. *Trends in Biotechnology* 17: 37-443
19. Ran T, Kaplan S, Shapiro E (2009) Molecular implementation of simple logic program. *Nature Nanotechnology* 10: 642-648
20. Mills AP Jr (2002) Gene expression profiling diagnosis through DNA molecular computation. *Trends Biotechnol* 20: 137-140
21. Benenson Y (2009) RNA-based computation in live cells. *Curr Opin Biotechnol* 20: 471-478
22. Benenson Y (2008) Small hairpin RNA as a small molecule sensor. *Mol Syst Biol* 4: 227
23. Ellington AD, Szostak JW (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346: 818-822
24. Clelland CT, Risca V, Bacroft C (1999) Hiding messages in DNA microdots. *Nature* 399: 533-534
25. Leier A, Richter C, Banzhaf W, Rauhe H (2000) Cryptography with DNA binary strands. *Biosystems* 57:13-22

DNA computing

Janusz Błasiak^{1,✉}, Tadeusz Krasinski², Tomasz Popławski¹, Sebastian Sakowski³

¹Department of Molecular Genetics, University of Lodz, 141/143 Pomorska St., 90-236 Lodz, Poland

²Faculty of Mathematics and Computer Science, University of Lodz, 22 Banacha St., 90-238 Lodz, Poland

³Institute of Computer Science, Silesian University of Technology, 16 Akademicka St., 44-101 Gliwice, Poland

✉e-mail: jblasiak@biol.uni.lodz.pl

Key words: DNA computing; molecular computers, biocomputers

ABSTRACT

Biocomputers can be an alternative for traditional „silicon-based” computers, which continuous development may be limited due to further miniaturization (imposed by the Heisenberg Uncertainty Principle) and increasing the amount of information between the central processing unit and the main memory (von Neuman bottleneck). The idea of DNA computing came true for the first time in 1994, when Adleman solved the Hamiltonian Path Problem using short DNA oligomers and DNA ligase. In the early 2000s a series of biocomputer models was presented with a seminal work of Shapiro and his colleagues who presented molecular 2 state finite automaton, in which the restriction enzyme, *FokI*, constituted hardware and short DNA oligomers were software as well as input/output signals. DNA molecules provided also energy for this machine. DNA computing can be exploited in many applications, from study on the gene expression pattern to diagnosis and therapy of cancer. The idea of DNA computing is still in progress in research both *in vitro* and *in vivo* and at least promising results of these research allow to have a hope for a breakthrough in the computer science.

Beata Plitta

Małgorzata Giel-Pietraszuk

Wojciech T. Markiewicz

Jan Barciszewski✉

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk

✉Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań; tel: (61) 852 85 03, (61) 852 89 19, e-mail: Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl

Artykuł otrzymano 30 marca 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 21 maja 2010 r.

Słowa kluczowe: epigenetyka, metylacja, DNMT1, inhibitory, terapia nowotworów

Wykaz skrótów: 5-aza-C – 5-azacytydina; 5-aza-dC – 5-aza-2'-deoksycytydina; CpG – dinukleotyd cytozynowo-guaninowy; DNMT – DNA metylotransferaza; EGCG – 3-gallusan epigalokatechiny; 5-F-dC – 5-fluorodeoksycytydina; m⁵C – 5-metylocytozyna; M.HhaI – metylotransferaza pochodząca z *Haemophilus haemolyticus*; SAM – S-adenozyl-L-metionina

Podziękowania: Praca powstała w ramach realizacji projektu zamawianego PBZ-MNiSW-07/1/2007/11.

STRESZCZENIE

DNA metylotransferaza 1 (DNMT1) jest enzymem katalizującym reakcję metylacji reszty cytozyny w pozycji piątej pierścienia pirymidynowego, zachodzącą po procesie replikacji. Celem tej modyfikacji jest regulacja ekspresji genów charakterystyczna dla danego organizmu. DNMT1 utrzymuje wzór metylacji DNA poprzez jego kopiowanie z nici matczynej na nić potomną DNA. Donorem grupy metylowej w tym procesie jest S-adenozyl-L-metionina. Zaburzenia w poziomie metylacji DNA wynikające z nadekspresji genu kodującego enzym lub utraty specyficzności działania DNMT1 mogą prowadzić do transformacji nowotworowej. Hipermetylacja promotorów genów supresji nowotworowej powoduje wyciszenie ich transkrypcji. Natomiast hipometylacja sekwencji regulatorowych protoonkogenów i retrotranspozonów prowadzi do wzrostu ich aktywności transkrypcyjnej. DNMT1 jako kluczowy enzym w procesie prawidłowego odtwarzania wzoru metylacji, stanowi atrakcyjny cel dla terapii przeciwnowotworowej.

WPROWADZENIE

Informacja dotycząca budowy i funkcjonowania organizmu zakodowana jest w genomie. Jednak sama sekwencja DNA nie zapewnia prawidłowego jej odczytania. Do interpretacji tej informacji niezbędne są dodatkowe elementy w postaci metylacji cytozyny w DNA, modyfikacji histonów (acetylacja, fosforylacja, metylacja, ubikwitylacja) oraz niekodujących RNA, stanowiące kod epigenetyczny [1]

Metylacja cytozyny w pozycji 5 w eukariotycznym DNA jest jedyną modyfikacją polegającą na utworzeniu kowalencyjnego wiązania węgiel-węgiel. 5-Metylocytozyna (m⁵C) jest obecna w genomach wszystkich kręgowców i roślin kwitnących, a jej całkowita zawartość w genomie ssaków wynosi ~1% wszystkich nukleozydów co oznacza, że ok. 5% wszystkich cytozyn ulega metylacji [2]. Analiza profilu metylacji człowieka pokazała, że modyfikacji ulegają przede wszystkim cytozyny znajdujące się w dinukleotydach CpG. Metylacji mogą także ulegać cytozyny znajdujące się w sekwencjach CpNpG i CpNpN, gdzie N oznacza adenozyne, cytydynę lub tymidynę. W zarodkowych komórkach macierzystych prawie 25% wszystkich metylowanych cytozyn znajduje się w obrębie tych sekwencji, a wzrost poziomu ich metylacji obserwowano w genach kodujących białka związane z dojrzewaniem RNA i jego udziałem w procesach metabolicznych. Różnicowanie się zarodkowych komórek macierzystych prowadzi do utraty metylacji CpNpG i CpNpN. Zauważono jednak, że ulega ona odtworzeniu w indukowanych pluripotentnych komórkach macierzystych (iPSC, ang. *induced pluripotent stem cells*), czyli takich z których powstać mogą wszystkie tkanki znajdujące się w zarodku. Sugeruje to, że metylacja tego typu może być cechą charakterystyczną iPSC i pełni rolę w utrzymywaniu stanu pluripotentności oraz zapobieganiu śmierci i starzeniu się komórek [3].

Dinukleotydy CpG nie są równomiernie rozmieszczone w genomie. Skumulowane są w odcinkach zawierających 60-70% tego dinukleotydu zwanych wyspami CpG o długości 0,5-4 kbp. W pozostałej części genomu ich zawartość szacuje się na mniej niż 20% [4]. Promotory genów człowieka można podzielić na dwie klasy różniące się zawartością dinukleotydów CpG. Pierwsza klasa to promotory o niskiej zawartości miejsc metylacji (LCG, ang. *low CpG*), które ulegają hipermetylacji. Druga to promotory o wysokiej zawartości CpG (HCG, ang. *high CpG*), charakteryzujące się niskim poziomem metylacji i występujące w genach ulegających stałej transkrypcji [5].

Metylacja cytozyny zapewnia specyficzną na danym etapie rozwoju ekspresję genów warunkującą zróżnicowanie międzytkankowe [6-8]. Zauważono jednak, że tylko 4-8% wysp CpG jest zmetylowanych specyficznie dla danego typu. Największe zróżnicowanie (~76%) obserwuje się w odległości do 2kbp

od końców tych wysp [9]. Metylacja pełni również rolę w piętnowaniu genomowym, inaktywacji chromosomu X, wyciszaniu transpozonów i sekwencji retrowirusowych, naprawie DNA oraz utrzymywaniu stabilności genomu i struktury chromatyny [10]. Postuluje się dwa mechanizmy wyciszenia ekspresji genu. Zgodnie z pierwszym, metylacja stanowi bezpośrednią blokadę przeciwdziałającą wiązaniu czynników transkrypcyjnych do promotora genu. Drugi mechanizm zakłada wiązanie białek MBD (ang. *methyl-binding proteins*) co dodatkowo blokuje dostęp czynnikom i jednocześnie indukuje kondensację chromatyny [5].

W proces metylacji DNA w komórkach ssaków zaangażowane są 3 niezależnie kodowane metylotransferazy: DNMT1, DNMT3a i DNMT3b. Enzymy te można podzielić na dwie klasy: metylotransferazy przyłączające grupy metylowe *de novo* w czasie wczesnego rozwoju embrionalnego (3a, 3b) i metylotransferazę odtwarzającą wzór metylacji w czasie replikacji (DNMT1) [11]. DNMT3a i oddziałujący z nim paralog, nie wykazujący aktywności katalitycznej, DNMT3L oraz DNMT3b biorą prawdopodobnie udział także w metylacji sekwencji CpNpG i CpNpN w komórkach macierzystych [3,9]. Natomiast DNMT2 katalizuje przyłączenie grupy metylowej do reszty cytozyny w pozycjach 38 i 48 tRNA^{Asp} i nie bierze udziału w procesie metylacji DNA [12].

Metylacja nowo syntetyzowanej nici potomnej DNA według wzoru z nici matczynej odbywa się w czasie fazy S cyklu komórkowego [4,13-16]. Zauważono, że nieprawidłowa aktywność DNMT1 może prowadzić do deaminacji cytozyny prowadząc w konsekwencji do powstawania mutacji w trakcie replikacji DNA [2].

Brak DNMT1 w kompleksie replikacyjnym może spowodować skierowanie komórki na jedną z licznych ścieżek programowanej śmierci [17]. W linii komórkowej nowotworu okrężnicy zawierającej nokaut genu *Dnmt1* obserwuje się obniżenie poziomu całkowitej metylacji genomu, który pogłębia się jeszcze bardziej w przypadku podwójnego nokautu *Dnmt1* i *3b* [10]. Delecja *Dnmt1* lub *Dnmt3a* i *3b* prowadzi do letalności embrionów mysich [18]. DNMT1 zapewnia komórkom progenitorowym, m.in. naskórka, zdolność do wielokrotnego podziału, poprzez podtrzymywanie aktywności proliferacyjnej i hamowanie różnicowania tych komórek, zapewniając tym samym zdolność tkanki do samoodnowy. Zahamowanie procesu metylacji w czasie różnicowania się komórek prowadzi do aktywacji inhibitorów cyklin zależnych od kinaz (p15INK4B i p16INK4A) należących do białek supresji nowotworowej i regulujących cykl komórkowy [19].

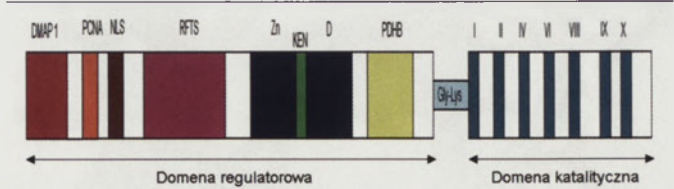
STRUKTURA GENU DNMT1 I BUDOWA BIAŁKA

Geny *Dnmt1* myszy i człowieka [16,20] kodują białko o masie 183,5 kDa zbudowane z około 1620 reszt aminokwasowych. Gatunkowo i tkankowo specyficzne różnice w wielkości DNMT1 w komórkach szczura i człowieka zależą od wyboru ramki odczytu i możliwości alternatywnego składania mRNA [14,21-23]. W różnych tkankach występuje 7 alternatywnie złożonych mRNA dla DNMT1. Stwierdzono, że w obrębie 32 eksonu, kodującego motyw IV, znajduje

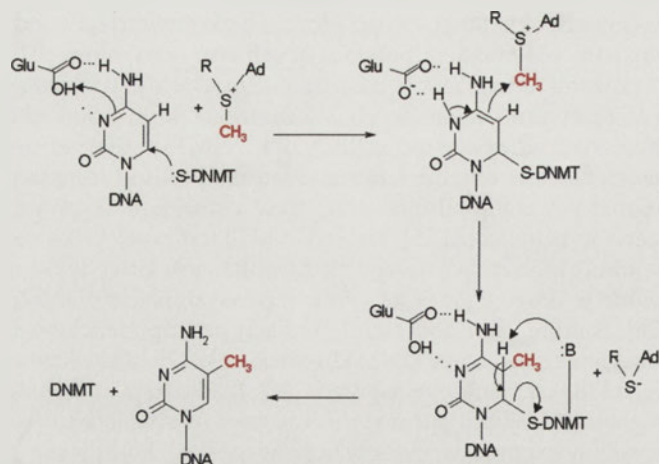
się 6, a w 36 eksonie, kodującym motyw zmienny, 4 możliwe miejsca składania. Doświadczalnie nie stwierdzono jednak istnienia białek odpowiadających tym wariantom [22]. Wykazano natomiast obecność izoformy DNMT1b dłuższej o 16 reszt aminokwasowych w komórkach krwi człowieka oraz znaczną zawartość mRNA dla DNMT1b alternatywnie złożonej w obrębie 4 intronu, jednak produkt translacji tej matrycy stanowił niewielką część z puli komórkowych metylotransferaz [24,25]. Białko DNMT1 jest syntetyzowane w komórkach rozwijającego się zarodka i jest łatwo wykrywalne w obrębie jądra na etapie jego wczesnej implantacji [26]. Natomiast w oocytach i stadiach preimplantacyjnych obserwuje się syntezę DNMT1 o masie ok. 175 kDa, skróconej o 118 reszt aminokwasowych [27]. Białko to pozbawione sygnału lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localization signal*) występuje w cytoplazmie w postaci kompleksu z aneksyną V [28]. Uważa się, że powodem międzykankowych różnic we wzorze metylacji jest obecność specyficznych form DNMT1 rozpoznających dinukleotydy CpG w odmiennych kontekstach sekwencyjnych.

Model budowy DNMT1 ssaków zaproponowany w oparciu o strukturę metylotransferaz prokariotycznych, składa się z: domeny regulatorowej przy końcu N, odcinka centralnego zawierającego 12 powtórzeń Gly-Lys oraz domeny katalitycznej zlokalizowanej w rejonie C końcowym [14,29-33] (Ryc. 1).

Domena regulatorowa, zbudowana z 1100 reszt aminokwasowych dzieli się na 2 subdomeny [34]. W obrębie pierwszej znajdują się: miejsca wiązania białka DMAP1 (ang. *DNA methyltransferase 1 associated protein 1*) i sygnału lokalizacji jądrowej (NLS) oraz antygenu jądrowego komórek proliferujących (PCNA, ang. *proliferating cell nuclear antigen*) [34]. Natomiast w obrębie drugiej subdomeny znajduje się miejsce wiązania z widełkami replikacyjnymi (RFTS, ang. *replication factory targeting sequence*). Wyróżniono także motyw palca cynkowego typu CxxC wiążącego DNA i 2 miejsca oddziaływania z białkami Rb (ang. *retinoblastoma protein*) oraz domenę PBHD (ang. *polybromo-1 protein homologous domain*) znajdującą się także w białkach zaangażowanych w regulację struktury chromatyny i odpowiadającą za oddziaływanie z innymi białkami [34]. Ponadto w obrębie domeny regulatorowej stwierdzono obecność miejsca oddziaływania z metylotransferazami 3a i 3b oraz motyw wiążący białko UHRF1 (ang. *ubiquitin-like with PHD and ring finger domain 1*). W domenie regulatorowej znajduje się także potencjalne miejsce oddziaływania z S-adenozyl-L-



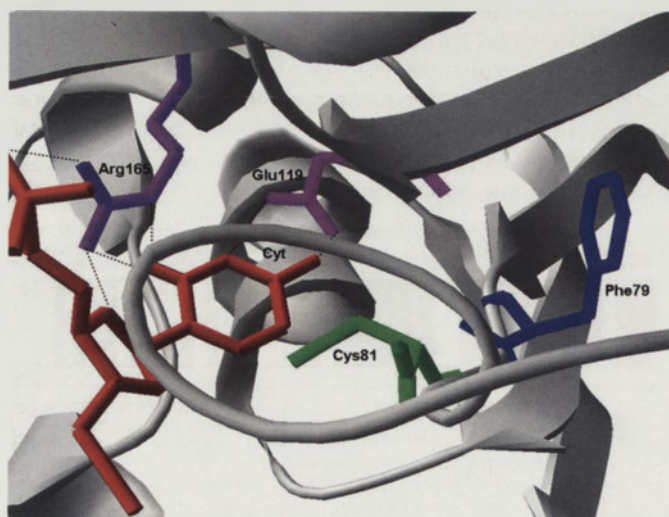
Rycina 1. Organizacja genu *Dnmt1* myszy. DMAP1 – miejsce wiązania białka DMAP1 (ang. *DNA methyltransferase 1 associated protein 1*); PCNA – miejsce wiązania antygenu komórek proliferujących; RFTS – sekwencja kierująca do widełek replikacyjnych; ZnD – motyw palca cynkowego bogaty w reszty cysteiny wiążące jony Zn; KEN – motyw zawierający zachowaną w ewolucji sekwencję reszt aminokwasowych KENxxxR; PBHD I i II – motyw homologiczny do PBHD (ang. *Polybromo-1 protein homologous domain*); Gly-Lys – sekwencja kodująca złożone z 12 reszt aminokwasowych powtórzenie Gly-Lys; I, II, IV, VI, VIII, IX, X – zachowane w ewolucji motywy domeny katalitycznej [11,32].



Rycina 2. Schemat mechanizmu reakcji metylacji DNA katalizowanej przez enzym DNMT1. W wyniku wiązania docelowej cytozyny przez resztę Glu119 znajdującą się w motywie VI enzymu następuje protonacja atomu N3 i powstanie 4,5-enaminy, a następnie atak grupy tiolowej reszty Cys81 motywu IV (PQC) w miejscu aktywnym DNMT1 na atom C6 w pierścieniu cytozyny. Powoduje to wzrost nukleofilowości i aktywację węgla w pozycji 5, a następnie jego atak na grupę metylową S-adenozylometioniny. Po przyłączeniu grupy metylowej do C5 następuje przekształcenie S-adenozylometioniny w S-adenozylhomocysteinę. Ostatnim etapem jest odtworzenie podwójnego wiązania pomiędzy C5 i C6 w cytozynie na drodze β -eliminacji i uwolnienie m^5C oraz enzymu [36,37,39].

metioniną, co świadczy o współdziałaniu N i C-końcowych rejonów białka w czasie katalizy reakcji metylacji [10,34]. Specyficzne rozpoznawanie hemimetylowanego DNA przez domenę regulatorową enzymu eukariotycznego następuje wskutek aktywacji allosterycznej przez m^5C . Prawdopodobne miejsce wiązania m^5C znajduje się w odległości ~ 1000 reszt aminokwasowych od centrum katalitycznego, pomiędzy resztami aminokwasowymi 121-500 [35].

Domeny N i C połączone są polipetydem bogatym w reszty Lys-Gly, podobną sekwencję zaobserwowano przy końcu aminowym histonu H4 i jest ona prawdopodobnie miejscem modyfikacji potranslacyjnej. Jak dotąd niewiele jednak wiadomo na temat wpływu tych modyfikacji na



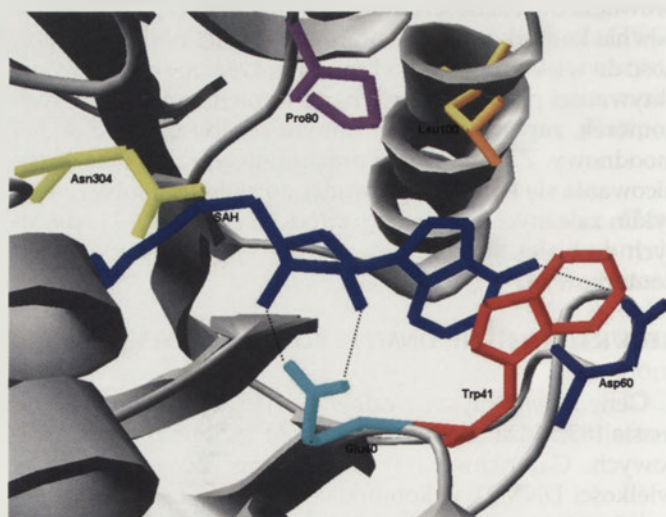
Rycina 3. Struktura kompleksu *M.HhaI*-DNA. Ulegająca metylacji reszta cytozyny zostaje wysunięta z helisy i umieszczona w centrum aktywnym enzymu, gdzie oddziałuje z resztą cysteiny 81 znajdującą się w ruchomej pętli katalitycznej. Linia przerywaną oznaczono wiązania wodorowe [36,39].

ewentualną regulację aktywności eukariotycznych metylotransferaz [2].

Domena katalityczna DNMT1, zbudowana z ok. 500 reszt aminokwasowych, znajduje się w C-końcowym rejonie enzymu. Składa się z 10 charakterystycznych motywów stanowiących kryterium identyfikacji metylotransferaz DNA, ich analogi znaleźć można w strukturach ponad 100 enzymów prokariotycznych [36,37]. W centrum katalitycznym znajduje się miejsce wiązania SAM, które tworzą zachowane w ewolucji reszty: Trp41 (motyw II), Leu100 (motyw V), Glu40 i Asp60 z motywów II i III oraz Pro80 (motyw IV) i Asn304 z motywu X. Miejsce wiązania DNA tworzą zachowane w ewolucji reszty aminokwasowe z motywów I, IV, VI, VII. W trakcie tworzenia kompleksu z DNA ruchoma pętla zawierająca aktywną katalitycznie resztę Cys81 z dipeptydu Pro-Cys motywu IV przemieszcza się, umożliwiając utworzenie wiązań z nukleotydami [31].

MECHANIZM REAKCJI METYLACJI

Metylotransferazy DNA katalizują reakcję przyłączenia grupy metylowej do węgla 5 cytozyny (Ryc. 2). W pierwszym etapie następuje wiązanie SAM do DNMT1 a następnie DNA. W wyniku specyficznego oddziaływania z DNA następuje wysunięcie cytozyny mającej ulec metylacji, na zewnątrz helisy, co wiąże się z zerwaniem oddziaływań warstwowych pomiędzy pierścieniami zasad w helisie (Ryc. 3). Pociąga to za sobą zmianę położenia atomów fosforu z sąsiadujących grup fosforanowych o 4 Å w stosunku do pozycji wyjściowej, jednak bez istotnych zmian w pozycji pozostałych atomów w sieci krystalicznej. Ponadto wiązanie enzymu z DNA powoduje przemieszczenie pętli katalitycznej zawierającej motyw IV, a tym samym skierowanie reszty Cys81 do miejsca aktywnego. Wysunięta cytozyna jest stabilizowana przez Phe i grupę sulfhydrylową Cys81 (motyw IV) oraz Glu119 (motyw VI) i Arg165 (motyw VIII) [32,36] (Ryc. 4).



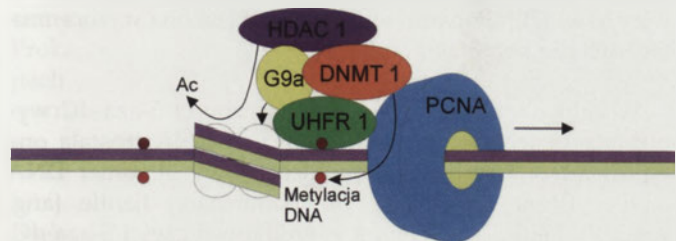
Rycina 4. Struktura kompleksu *M.HhaI*-SAH. Kolorami wyszczególniono zachowane w ewolucji reszty aminokwasowe oddziałujące z SAH w obrębie szczeliny katalitycznej enzymu. Linia przerywaną oznaczono wiązania wodorowe [36,39].

ROLA BIAŁKA UHRF1 W PROCESIE METYLACJI CYTOZYN

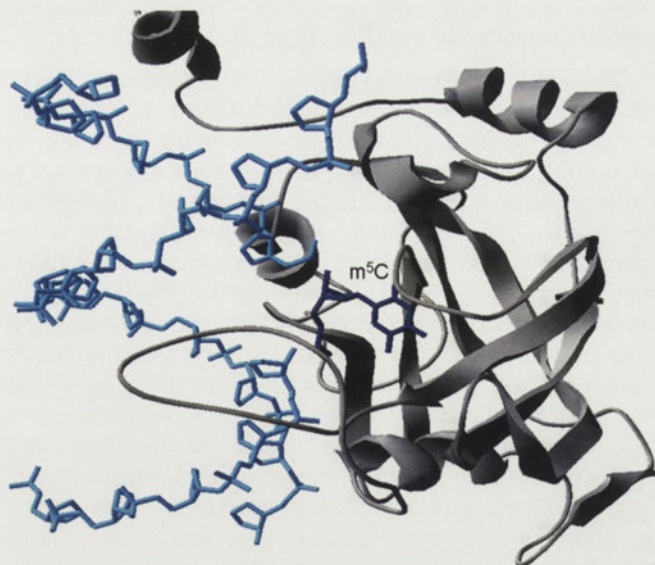
DNMT1 nie jest jedynym białkiem, które uczestniczy w powielaniu wzoru metylacji w trakcie replikacji [40,41]. Istotną rolę w podniesieniu specyficzności procesu metylacji odgrywa białko UHRF1 (ang. *ubiquitin-like with PHD and ring finger protein 1*), poznane jako ICBP90 (ang. *human inverted CCAAT box-binding protein of 90kDa*) lub Np95 (ang. *mice nuclear protein of 95 kDa*) [42,43].

Białko UHRF1 tworzy kompleks z białkiem PCNA, a następnie za pośrednictwem domeny SRA (ang. *set and ring-associated*) wiąże hemimetylowany DNA [44-46]. Do tego kompleksu przyłącza się DNMT1, która katalizuje reakcję metylacji cytozyn [47]. UHRF1 uczestniczy również w procesie metylacji histonu H3K9 tworząc kompleks z enzymem G9a/EHMT2 (ang. *histone H3-Lys-9 methyltransferase*), katalizującym tę reakcję. W dalszym etapie zmetylowany H3K9 oddziałuje z domeną PHD (ang. *plant homeodomain*) białka UHRF1, które dalej wiąże białko HDAC1 (ang. *histone deacetylase 1*) biorące udział w powstawaniu heterochromatyny (Ryc. 5) i powoduje wyciszenie transkrypcji DNA. UHRF1 bierze także udział w regulacji przejścia komórki z fazy G1 do S. Oprócz domen SRA i PHD białko to posiada także domeny UBL (ang. *ubiquitin-like domain*) i RING (ang. *really interesting new gene domain*) zawierającą motyw Cys₃HisCys₄ i wiążącą dwa atomy cynku [47].

Na podstawie analizy struktury krystalicznej kompleksu domeny SRA z oligonukleotydem DNA (Ryc. 6) zawierającym parę m⁵CpG-GpC stwierdzono, że m⁵C zostaje wysunięta na zewnątrz helisy i umieszczona w hydrofobowej kieszeni białka utworzonej przez Tyr471 i Tyr483, co pozwala na jej stabilizację poprzez oddziaływania warstwowe [48,49]. Domena SRA „obejmuje” docelową m⁵C, oddziałując zarówno w małym jak i dużym rowku DNA. Wysunięcie zasady na zewnątrz helisy, opisane wcześniej dla metylotransferazy, obserwowane jest często w kompleksach enzymów modyfikujących zasady zarówno w DNA jak i RNA. Związanie m⁵C z nici matczynej przez UHRF1 pozwala DNMT1 na metylację docelowej reszty cytozyny w nowo-syntezowanej nici. Stwierdzono, że UHRF1 nie jest syntetyzowane w tkankach serca, płuc, wątroby, nerek i pęcherza moczowego, natomiast jego wysoki poziom można obserwować w grasicy i szpiku kostnym oraz w komórkach nowotworowych [47]. Zmniejszenie poziomu UHRF1 prowadzi to znaczącej redukcji zdolności proliferacyjnej komórek progenitorowych naskórka, podtrzymywanej przez współdziałanie DNMT1 i UHRF1. Skutkiem tego jest ograniczona zdolność tkanki do samoodnowy [19].



Rycina 5. Udział białka UHRF1 w metylacji DNA i kondensacji chromatyny [44].



Rycina 6. Oddziaływanie białka UHRF1 z hemimetylowanym DNA. m⁵C jest wysunięta z helisy DNA i umieszczona w hydrofobowej kieszeni białka [48,49].

TERAPIA EPIGENETYCZNA

Charakterystyczny dla danego organizmu wzór metylacji ustanowiony jest w epiblaście i zachowany w dalszych etapach rozwoju organizmu. Obniżenie poziomu metylacji prowadzi do rozregulowania mechanizmu precyzyjnej kontroli ekspresji genów, a w konsekwencji do niestabilności genomu. Nieznaczny spadek metylacji obserwuje się wraz ze starzeniem się organizmu [5,50]. Zjawisko to może być skutkiem zaburzeń w syntezie i aktywności DNMT1 lub błędnego rozpoznania sekwencji mającej ulec metylacji. Naturalnym sposobem obrony komórki przed obniżeniem poziomu metylacji w obszarach heterochromatyny jest wzrost syntezy enzymu DNMT3b, którego zadaniem jest metylacja *de novo*. Powoduje to jednak zwiększenie poziomu m⁵C również w obrębie promotorów, które w zdrowych normalnych komórkach danego organizmu nie powinny być metylowane. Hipermetylację obserwuje się także w obrębie sekwencji DNA kodujących rRNA, czego konsekwencją jest zahamowanie transkrypcji w czasie starzenia się organizmu. Globalna hipometylacja DNA połączona z hipermetylacją rejonów promotorowych genów supresji nowotworowej i zmienioną syntezą DNMT1 ma podobne konsekwencje jak transformacja nowotworowa indukowana przez mutacje [50-53]. W komórkach nowotworowych zawartość m⁵C w DNA jest od 20 do 60% niższa niż w komórkach prawidłowych [52]. Różnice we wzorze metylacji komórek nowotworowych i prawidłowych 13-krotnie częściej występują w obrębie tzw. brzegów wysp CpG, gdzie liczba powtórzeń tego dinukleotydu jest mniejsza, niż w centralnej części wysp [54].

Odwracalność metylacji czyni z niej atrakcyjny cel w terapii chorób nowotworowych. Zahamowanie bowiem tego procesu w kolejnych podziałach komórki nie powoduje jej natychmiastowej śmierci, ale pozwala na aktywację wyciszonych przez hipermetylację genów supresorowych. Zatem farmakologiczna ingerencja w aktywność enzymu biorącego udział w kopiowaniu wzoru metylacji (DNMT1) daje szansę na zahamowanie procesu nowotworzenia. Reaktywacja genów proapoptotycznych i regulatorów cyklu

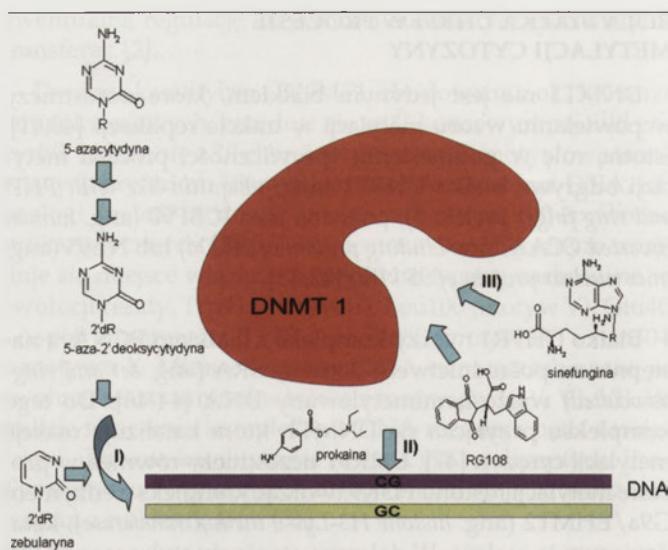
komórkowego w wyniku demetylacji prowadzi do śmierci komórki nowotworowej [5,55] (Ryc. 7).

Obecnie stosowane leki będące inhibitorami DNMT1 takie, jak Vidaza (5-azacytydyna) i Dacogen (decytabina – 5-aza-2'-deoksycytydyna) są pochodnymi cytozyny będącej substratem reakcji [5]. 5-azacytydyna i jej analogi po wniknięciu do komórki ulegają fosforylacji przez kinazę urydynowo-cytydynową, a następnie wbudowaniu w łańcuch RNA. Po redukcji przez reduktazę rybonukleotydową stają się także substratem w syntezie DNA [56]. Hamowanie procesu metylacji przez te związki polega na kowalencyjnym związaniu enzymu z DNA. Obecność bardziej elektroujemnego azotu w pozycji 5 pierścienia cytozyny powoduje wzrost elektrofilowości C6, co ułatwia atak enzymu i metylację pozycji 5. Przy braku protonu w pozycji N5 niezbędnego do odtworzenia podwójnego wiązania między pozycjami 5 i 6, wiązanie kowalencyjne pomiędzy enzymem a pierścieniem zasady nie może ulec zerwaniu [33]. Trwałe wiązanie enzymu z substratem (DNA) powoduje zmniejszenie puli aktywnych metylotransferaz DNA w komórce konsekwencją czego, jest obniżenie poziomu m⁵C w powielanym genomie. Taka sytuacja indukuje systemy naprawy DNA oraz aktywuje geny supresji nowotworowej. Efektem działania 5-aza-dC w komórce jest również selektywna degradacja DNMT1 w proteasomach w tempie szybszym aniżeli następuje postęp replikacji [57]. W celu obniżenia cytotoksyczności pochodnych cytydyny wykorzystano analogi deoksorybonukleotydów: 5-aza-2'-deoksycytydyna (5-aza-dC) i jej pochodne, które ulegają fosforylacji za pośrednictwem kinazy deoksycytydynowej i wbudowywane są bezpośrednio do DNA [5].

W komórkach nowotworowych pod wpływem związków hamujących metylację może dochodzić do uaktywnienia grupy genów np. p16, MLH1, retinoblastoma, które kontrolują proliferację komórki, jej różnicowanie, proces apoptozy i inne procesy utrzymujące homeostazę komórki [5]. Pokazano, że hamowanie DNMT1 przez 5-aza-dC powoduje obniżenie stopnia złośliwości nowotworu w mysim modelu neoplazji [58].

5-aza-C i 5-aza-dC znalazły zastosowanie w leczeniu mielodysplazji [59]. Nie potwierdzono jednak efektu terapeutycznego tych związków w terapii guzów litych [60]. Czynnikiem obniżającym efektywność tych związków jest ich krótki okres półtrwania w roztworach wodnych [61,62]. W testach klinicznych, w czasie których ograniczono czas podawania preparatu do 2 tygodni, nie obserwowano indukcji wtórnych nowotworów, będących wynikiem hipometylacji [63]. W trakcie długotrwałej terapii należy jednak brać pod uwagę możliwość wywołania mutacji i niestabilności chromosomów oraz hypometylacji genów podnoszących inwazyjność nowotworu [15,64].

Niższą toksycznością i wyższą stabilnością w roztworach wodnych charakteryzuje się 5,6-dihydro-5-azacytydyna (DHAC) [65], chociaż nie ma jednoznacznych dowodów aktywności tego związku [66]. Lepszy efekt uzyskano dla 5-fluoro-deoksycytydyny (5-F-dC). Podstawienie fluorem atomu wodoru przy C5, blokuje możliwość odtworzenia wiązania podwójnego pomiędzy atomami C5 i C6 i odła-



Rycina 7. Mechanizmy hamowania DNMT1: I) 5-azacytydyna, 5-aza-2'-deoksycytydyna, zebularyna ulegają wbudowywaniu w łańcuch DNA a następnie hamują działanie DNMT1 poprzez tworzenie trwałych kompleksów z tym enzymem II) prokaina wiążąc się z sekwencjami CpG blokuje dostęp DNMT1 do tych sekwencji; III) RG108 i sinefungina blokują centrum aktywne hamując katalizowaną przez niego reakcję.

czenie enzymu [33,67]. Związek ten wykazuje wielokierunkową aktywność metaboliczną w komórkach ssaków, wpływa na wiele szlaków komórkowych, a powstające produkty jego przemiany są cytotoksyczne [5].

Inny analog cytydyny, zebularyna (1-beta-D-ribofuranosyl-2(1H)-pirymidyna), pozbawiona jest egzocyklicznej grupy aminowej, co ogranicza jej oddziaływanie z guanozyną, obniżając tym samym energię wiązania DNA z enzymem [33]. Związek ten pierwotnie został scharakteryzowany jako skuteczny inhibitor deaminazy cytydynowej, jego aktywność w hamowaniu procesu metylacji odkryto w 2003 roku. Zaletą zebularyny jest stabilność w środowisku obojętnym i kwaśnym oraz mniejsza toksyczność w stosunku do linii komórkowych niż 5-azanukleozydów, co stwarza potencjalną możliwość doustnego przyjmowania tego leku [68]. Ponadto w testach na liniach komórkowych obserwowano znaczne ograniczenie wzrostu komórek nowotworowych pod wpływem zebularyny w porównaniu z liniami nietransformowanych fibroblastów, będące efektem zwiększonej aktywacji ekspresji genu p21, którego produkt hamuje proliferację [69]. Ze względu na znacznie wyższą aktywność kinazy urydynowo-cytydynowej w komórkach nowotworowych, zebularyna jest wbudowywana w DNA w większym stopniu niż w komórkach prawidłowych [69]. Istotną wadą tego związku jest jednak jego niska biodostępność, co powoduje konieczność stosowania milimolowych stężeń w celu uzyskania stężenia terapeutycznego w surowicy krwi [70]. Ponadto wykazano, że jest ona wysoce mutagenna dla komórek *E. coli* [71].

W celu obniżenia wysokiej toksyczności 5-aza-dC wynikającej z wbudowywania w łańcuch DNA, została ona wprowadzona w dziesięcionukleotydowy oligomer DNA o specyficznej strukturze przypominającej hantle (ang. *dumbbell*). Helisa zawierająca w środkowej części 5-aza-dC, zamknięta jest na końcach przez dwie pętle. Część ta wiąże się kowalencyjnie z DNMT1 za pośrednictwem 5-aza-

dC [72,73]. Charakterystyczny kształt tego DNA ma na celu przedłużenie okresu jego półtrwania w surowicy pacjenta [73]. Wykazano, że związek ten wydajnie wnika do jądra komórkowego powodując znaczne obniżenie aktywności proliferacyjnej komórek, co świadczy o oddziaływaniu z DNMT1. Jednocześnie pozbawiony jest toksyczności charakteryzującej wolną 5-aza-dC. Powstawanie kompleksu dodekamer-DNMT1 potwierdzono w badaniach *in vitro* [73].

Druga grupa potencjalnych inhibitorów obejmuje związki blokujące centrum aktywne enzymu, które nie są pochodnymi cytydyny. Jej przedstawicielem jest RG-108, związek ten znacząco obniża poziom metylacji genomu i nie wykazuje aktywności cytotoksycznej. Jego zastosowanie jest jednak ograniczone ze względu na wysoką hydrofobowość [52,74]. Inny szeroko badany związek w kontekście hamowania DNMT1 to stabilna w roztworach wodnych hydralazy-na, charakteryzująca się niską cytotoksycznością. Związek ten hamuje wzrost komórek nowotworowych *in vivo* powodując demetylację genu APC aktywującą tym samym jego ekspresję. W testach komórkowych pokazano jednak różną wrażliwość nowotworowych linii komórkowych na ten związek [75].

Poszukując efektywnych terapeutyków analizowano także analogi SAM pozbawione grupy metylowej. Mechanizm działania tego typu związków polega również na trwałym wiązaniu enzymu z DNA. Przykładem jest sinefungina dla której stała hamowania (K_i) dla metylotransferazy EcoRI wynosi 10 nM [76]. Jednakże inhibitory tego typu powodują deaminację m⁵C do T, co jest zjawiskiem niekorzystnym [77]. Innym przykładem inhibitora niekompetycyjnego jest pochodna chinoliny (SGI-1027). Związek ten charakteryzuje się wysoką liofilowością. W analizie wpływu tego związku na komórki linii H4IIE (ang. *rat hepatoma*) i HCT116 (ang. *colon cancer line*) wykazano hamowanie wzrostu przy braku cytotoksyczności i aktywacji apoptozy, a także nieznaczny tylko wzrost stężenia białka GSH – markera stresu oksydacyjnego [78].

Podjmuje się również próby blokowania dostępu metylotransferazy do sekwencji docelowej na DNA. W tym celu wykorzystuje się związki wiążące się do dinukleotydów CpG. Właściwości takie wykazują prokaina, stosowana jako środek miejscowo znieczulający i jej pochodna prokainoamid, lek antyarytmiczny, będące pochodnymi kwasu 4-aminobenzoowego [79]. Związki te powodują obniżenie poziomu metylacji DNA w komórkach nowotworowych człowieka. W testach prowadzonych na liniach komórkowych związek ten zastosowany w stężeniu 2mM wykazywał średnią indukcję apoptozy. Był jednak dobrze tolerowany przez komórki i nie obniżał aktywności DNMT1 [53]. Prokaina jest inhibitorem reakcji metylacji w niektórych typach linii komórkowych człowieka np. MCF-7, ale jest efektywna tylko w wysokich stężeniach [55].

Ze względu na spodziewaną niską cytotoksyczność, inhibitorów DNMT1 poszukuje się także wśród związków pochodzenia naturalnego [80]. Przykładem jest psammaplina, pochodna bromotyrozyny uzyskiwana z gąbki *P. purpura*, która inhibuje aktywność DNMT1 *in vitro* [81]. Brak

danych dotyczących mechanizmu działania tego związku. Wydaje się, że elementem niezbędnym w procesie hamowania DNMT1 jest bisulfidowy łącznik przyłączony do grupy hydroksyminoamidowej. Psammaplina A hamuje wszystkie metylotransferazy i deacetylazy histonów (HDAC), natomiast psammaplina G wykazuje specyficzną aktywność tylko w stosunku do DNMT1 [81]. Negatywnym aspektem działania psammapliny A jest ograniczanie aktywności także innych enzymów na przykład topoizomerazy II [82].

Jednym z najszerzej badanych związków naturalnych jest galusan epigalokatechiny (EGCG), główny polifenol zielonej herbaty [83]. Pokazano, że powoduje on spadek metylacji DNA w komórkach nowotworowych i wzrost transkrypcji genów supresji nowotworowej [83]. Za pomocą metod *in silico* wykazano, że EGCG potencjalnie może oddziaływać z ważnymi katalitycznie resztami Glu1265, Pro1223, Ser1229, Cys1225 i Arg1309 DNMT1, których zadaniem jest stabilizacja struktury helisy DNA w czasie reakcji metylacji poprzez oddziaływanie z cytozyną [83]. Inne badania nie potwierdzają wpływu EGCG na metylację DNA w komórkach [53]. Wysłunięto natomiast hipotezę, że hamowanie DNMT1 w liniach komórkowych jest skutkiem stresu oksydacyjnego wywołanego przez EGCG. Wykazano bowiem, że EGCG ulega deprotonacji w środowisku obojętnym i zasadowym (pH 6,8-7,8) generując powstawanie anionorodnika nadtlenkowego ($\bullet O_2^-$), który następnie uczestniczy w reakcji Fentona, w wyniku, której tworzą się bardzo toksyczne rodniki hydroksylowe $\bullet OH$. Oznacza to, że wpływ EGCG na metylację może być mniej bezpośredni niż sądzono [53,84,85]. Innym przykładem aktywnego związku pochodzenia roślinnego jest kurkumina, polifenol występujący w ostryżu (*Curcuma longa*). Związek ten charakteryzuje się niską wartością IC₅₀ (30nM) dla prokariotycznego enzymu M.SssI, a badania *in silico* wskazują, że potencjalnie może on oddziaływać w obrębie miejsca katalitycznego DNMT1. Kurkumina wiąże się do ponad 30 różnych białek, przez co blokuje wiele szlaków przekazywania sygnałów, proliferację komórek, inwazyjność oraz zdolność do metastazy i angiogenezy komórek nowotworowych. Wykazuje także właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne [79,86]. Jednakże niska biodostępność spowodowana jej słabą absorpcją w jelitach oraz krótkim czasem połowicznej eliminacji z organizmu 1,45 h nie pozwala na bezpośrednie wykorzystanie w terapii nowotworów. Obecnie trwają prace nad podniesieniem biodostępności tego związku [86].

Odkrycie udziału białka UHRF1 w procesie metylacji rozszerza potencjalne cele dla poszukiwań nowych terapeutyków przeciwnowotworowych. Określenie struktury kryształicznej domeny SRA białka UHRF1 stwarza możliwość modelowania inhibitorów tego białka blokujących kieszeń wiążącą m⁵C. Jednakże celem dla terapeutyków mogą być także domeny PHD i RING wiążące się do metylowanej H3K9 i E3 ligazy ubikwitynowej. Kombinacja inhibitorów daje większe szanse na zahamowanie funkcji UHRF1 [47].

PODSUMOWANIE

Podstawową metodą leczenia chorób nowotworowych stosowaną obecnie jest chemioterapia. Jednakże ze względu na poważne skutki uboczne tej metody, poszukuje się no-

wych rozwiązań. Odkrycie znaczenia metylacji w rozwoju zmian nowotworowych stworzyło nowe możliwości w potencjalnej terapii, której naturalnym celem staje się enzym – DNMT1 – odpowiedzialny za ten proces. Stosowane obecnie inhibitory DNMT1 – pochodne azacytydyny (Vidaza, Dacogen) powodują jednak znacznie większy efekt biologiczny niż tylko hypometylacja promotorów wyciszonych genów [87]. Nie odpowiadają zatem nowoczesnym standardom terapeutycznym, zgodnie z którymi dobry lek powinien być maksymalnie skuteczny i minimalnie toksyczny. Ponieważ trudno jest również w tej chwili określić skutki długotrwałego stosowania inhibitorów nukleozydowych niezbędne jest poszukiwanie inhibitorów nienukleozydowych, które będą oddziaływać bezpośrednio z enzymem i nie będą włączane do DNA.

PIŚMIENNICTWO

- Mund C, Brueckner B, Lyko F (2006) Reactivation of epigenetically silenced genes by DNA methyltransferase inhibitors: basic concepts and clinical applications. *Epigenetics* 1: 7-13
- Goll MG, Bestor TH (2005) Eucaryotic cytosine methyltransferases. *Ann Rev Biochem* 74: 481-514
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filipini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462: 315-22
- Siedlecki P, Zielenkiewicz P (2006) Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Bioch Pol* 53: 245-256
- Enlago N, Yi SV (2008) DNA methylation and structural and functional bimodality of vertebrate promoters. *Mol Biol* 25: 1602-1608
- Yoo CB, Jones PA (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 5: 37-50
- Lan J, Hua S, He X, Zhang Y (2010) DNA methyltransferases and methyl-binding proteins of mammals. *Acta Biochim Biophys Sin* 42: 243-252
- Guz J, Foksiński M, Oliński R (2010) Mechanizm metylacji i demetylacji DNA – znaczenie w kontroli ekspresji genów. *Postepy Biochem* 56: 7-15
- Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash J, Sabuncian S, Feinberg AP (2009) Genome-wide methylation analysis of human colon cancer reveals similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 41: 178-186
- Pradhan S, Esteve PO (2003) Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. *Clin Immun* 109: 6-16
- Cheng X, Blumenthal RM (2008) Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 16: 341-350
- Schaefer M, Hegemann S, Hanna K, Lyko F (2009) Azacytidine inhibits RNA methylation at DNMT2 target sites in human cancer cell lines. *Cancer Res* 69: 8127-8132
- Egger G, Jeong S, Escobar SG, Cortez CC, Li TWH, Saito Y, Yoo CB, Jones PA, Liang G (2006) Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14080-14085
- Margot JB, Aquiree-Arteta AM, Di Giacco BV, Pradhan S, Roberts RJ, Cardo MC, Leonhardt H (2000) Structure and function of the mouse DNA methyltransferase gene: Dnmt1 shows a tripartite structure. *J Mol Biol* 297: 293-300
- Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R (2003) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300: 455
- Spada F, Haemmer A, Kuch D, Rothbauer U, Schermelleh L, Kremmer E, Carell T, Längst G, Leonhardt H (2007) DNMT1 but not its interaction with the replication machinery is required for maintenance of DNA methylation in human cells. *J Cell Biol* 176: 565-571
- Brown KD, Robertson KD (2007) DNMT1 knockout delivers a strong blow to genome stability and cell viability. *Nat Genet* 3: 289-290
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-926
- Sen GL, Reuter JA, Webster DE, Zhu L, Khavari PA (2010) DNMT1 maintains progenitor function in self-renewing somatic tissue. *Nature* 463: 563-567
- Yen RW, Vertino PM, Nelkin BD, Yu JJ, el-Deiry W, Kumaraswamy A, Lennon GG, Trask BJ, Celano P, Baylin SB (1992) Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 20: 2287-2291
- Pradhan S, Talbot D, Sha M, Benner J, Hornstra L, Li E, Jaenisch R, Roberts RJ (1997) Baculovirus-mediated expression and characterization of the full-length murine DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 25: 4666-4673
- Gaudet F, Talbot D, Leonhardt H, Jaenisch R (1998) A short DNA methyltransferase isoform restores methylation *in vivo*. *J Biol Chem* 273: 32725-32729
- Deng J, Szyf M (1998) Multiple isoforms of DNA methyltransferase are encoded by the vertebrate cytosine DNA methyltransferase gene. *J Biol Chem* 273: 22869-22872
- Bonfils C, Beaulieu N, Chan E, Cotton-Montpetit J, MacLeod AR (2000) Characterization of the human DNA methyltransferase splice variant Dnmt1b. *J Biol Chem* 275: 10754-10760
- Hsu DW, Lin MJ, Lee TL, Wen SC, Chen X, Shen CKJ (1999) Two major forms of DNA (cytosine-5) methyltransferase in human somatic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9751-9756
- Trasler JM, Trasler DG, Bestor TH, Li E, Ghibu F (1996) DNA methyltransferase in normal and Dnmtn/Dnmtn mouse embryos. *Dev Dyn* 206: 239-247
- Ratnam S, Mertineit C, Ding F, Howell CY, Clarke HJ, Bestor TH, Chaillet JR, Trasler JM (2002) Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. *Dev Biol* 245: 304-314
- Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR (2001) Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 104: 829-838
- Eden A, Gaudet F, Jaenisch R (2003) Response to comment on chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. And induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 302: 1153
- Bestor TH (1992) Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J* 11: 2611-2617
- Kumar S, Cheng X, Klimasauskas S, Mi S, Posfai J, Roberts RJ, Wilson GG (1994) The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 22: 1-10
- Ramchandani S, Bigey P, Szyf M (1998) Genomic structure of the human DNA methyltransferase gene. *Biol Chem* 379: 535-540
- Gowher H, Jeltsch A (2004) Mechanism of inhibition of DNA methyltransferases by cytidine analogs in cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 3: 1062-1068
- Pradhan S, Esteve PO (2003) Allosteric activator domain of maintenance human DNA (cytosine-5) methyltransferase and its role in methylation spreading. *Biochemistry* 42: 5321-5332
- Jeltsch A (2006) Specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme. *Epigenetics* 1: 63-66
- Cheng X (1995) Structure and function of DNA methyltransferases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24: 293-318
- Lauster R, Trautner TA, Noyer-Weidner M (1989) Cytosine-specific type II DNA methyltransferases. A conserved enzyme core with variable target-recognizing domains. *J Mol Biol* 206: 305-312
- Szyf M (2000) The DNA methylation machinery as a therapeutic target. *Curr Drug Targets* 1: 101-118

39. Wu JC, Santi DV (1987) Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *J Biol Chem* 262: 4778-4786
40. Chen T, Li E (2006) Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Curr Top Microbiol Immunol* 301: 179-201
41. Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H (2005) Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8905-8909
42. Hopfner R, Mousli M, Jeltsch JM, Voulgaris A, Lutz Y, Marin C, Bellocq JP, Oudet P, Bronner C (2000) ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase II α expression. *Cancer Res* 60: 121-128
43. Kim JK, Estève PO, Jacobsen SE, Pradhan S (2009) UHRF1 binds G9a and participates in p21 transcriptional regulation in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 37: 493-505
44. Bostick M, Kim JK, Estève PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE (2007) UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317: 1760-1764
45. Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M, Koseki H (2007) The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 450: 908-912
46. Achour M, Jacq X, Rondé P, Alhosin M, Charlot C, Chataigneau T, Jeanblanc M, Macaluso M, Giordano A, Hughes AD, Schini-Kerth VB, Bronner C (2008) The interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 is involved in the regulation of VEGF gene expression. *Oncogene* 27: 2187-2197
47. Unoki M, Brunet J, Mousli M (2009) Drug discovery targeting epigenetic codes: the great potential of UHRF1, which links DNA methylation and histone modifications, as a drug target in cancers and toxoplasmosis. *Biochem Pharmacol* 78: 1279-1288
48. Avvakumov GV, Walker JR, Xue S, Li Y, Duan S, Bronner C, Arrow-smith CH, Dhe-Paganon S (2008) Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature* 455: 822-826
49. Hashimoto H, Horton JR, Zhang X, Bostick M, Jacobsen SE, Cheng X (2008) The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature* 455: 826-830
50. Fraga MF, Esteller M (2007) Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* 23: 413-418
51. Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415-428
52. Esteller M (2003) Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 4: 351-358
53. Stresmann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F (2006) Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res* 66: 2794-2800
54. Doi A, Park I, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Lowery S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, Feinberg AP (2009) Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* 41: 1350-1353
55. Lyko F, Brown R (2005) DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J Natl Cancer Inst* 97: 1498-1506
56. Santini V, Kantarjian HM, Issa JP (2001) Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Annu Intern Med* 13: 573-586
57. Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T, Jacob ST (2005) 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 25: 4727-4741
58. Santini V, Kantarjian HM, Issa JP (2001) Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Annu Intern Med* 13: 573-586
59. Kaminskas E, Farrell A, Abraham S, Baird A, Hsieh LS, Lee SL, Leighton JK, Patel H, Rahman A, Sridhara R, Wang YC, Pazdur R (2005) FDA Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res* 11: 3604-3608
60. Weiss AJ, Metter GE, Nealon TF, Keanan JP, Ramirez G, Swaminathan A, Fletcher WS, Moss SE, Manthei RW (1977) Phase II study of 5-azacytidine in solid tumors. *Cancer Treat Rep* 61: 55-58
61. Lin KT, Momparler RL, Rivard GE (1981) High-performance liquid chromatographic analysis of chemical stability of 5-aza-2'-deoxycytidine. *J Pharm Sci* 70: 1228-1232
62. Notari RE, DeYoung JL (1975) Kinetics and mechanisms of degradation of the antileukemic agent 5-azacytidine in aqueous solutions. *J Pharm Sci* 64: 1148-1157
63. Yang AS, Estecio MR, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Issa JP (2003) Comment on Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation and Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 302: 1153
64. Hamm CA, Xie H, Costa FF, Vanin EF, Seftor EA, Sredni ST, Bischof J, Wang D, Bonaldo MF, Hendrix MJC, Soares MB, Tora L (2009) Global demethylation of rat chondrosarcoma cells after treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine results in increased tumorigenicity. *PLoS ONE* 4: e8340
65. Beisler JA, Abbasi MM, Kelley JA, Driscoll JS (1977) Synthesis and antitumor activity of dihydro-5-azacytidine, a hydrolytically stable analogue of 5-azacytidine. *J Med Chem* 20: 806-81268
66. Curt GA, Kelley JA, Fine RL, Huguenin PN, Roth JS, Batist G, Jenkins J, Collins JM (1985) A phase I and pharmacokinetic study of dihydro-5-azacytidine (NSC 264880). *Cancer Res* 45: 3359-3363
67. Eidinoff ML, Rich MA, Perez AG (1959) Growth inhibition of a human tumor cell strain by 5-fluorocytidine and 5-fluoro-2'-deoxycytidine: reversal studies. *Cancer Res* 19: 638-642
68. Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, Jones PA, Selker EU (2003) Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst* 95: 399-409
69. Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G, Marquez VE, Greer S, Orntoft TF, Thykjaer T, Jones PA (2004) Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell* 6: 151-158
70. Holleran JL, Parise RA, Joseph E, Eiseman JL, Covey JM, Glaze ER, Lyubimov AV, Chen YF, D'Argenio DZ, Egorin MJ (2005) Plasma pharmacokinetics, oral bioavailability, and interspecies scaling of the DNA methyltransferase inhibitor, zebularine. *Clin Cancer Res* 11: 3862-3868
71. Lee G, Wolff E, Miller JH (2004) Mutagenicity of the cytidine analog zebularine in *Escherichia coli*. *DNA Repair* 3: 155-161
72. Vives M, Eritja R, Tauler R, Marquez VE, Gargallo R (2004) Synthesis, stability, and protonation studies of a self-complementary dodecamer containing the modified nucleoside 2'-deoxyzebularine. *Biopolymers* 73: 27-43
73. Kuch D, Schermelleh L, Manetto S, Leonhardt H, Carell T (2008) Synthesis of DNA dumbbell based inhibitors for the human DNA methyltransferase Dnmt1. *Angew Chem Int Ed Engl* 47: 1515-1518
74. Brueckner B, Boy RG, Siedlecki P, Musch T, Kliem HC, Zielenkiewicz P, Suhai S, Wiessler M, Lyko F (2005) Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Res* 65: 6305-6311
75. Song Y, Zhang C (2009) Hydralazine inhibits human cervical cancer cell growth in vitro in association with APC demethylation and re-expression. *Cancer Chem Pharm* 63: 605-613
76. Reich NO, Mashhoon N (1990) Inhibition of EcoRI DNA methylase with cofactor analogs. *J Biol Chem* 265: 8966-8970
77. Sharath AN, Weinhold E, Bhagwat AS (2000) Reviving a dead enzyme: cytosine deaminations promoted by an inactive DNA methyltransferase and an S-sdenosylmethionine analogue. *Biochemistry* 39: 14611-14616
78. Datta J, Ghoshal K, Denny WA, Gamage SA, Brooke DG, Phiasivongsa P, Redkar S, Jacob ST (2009) A new class of quinoline-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking

- DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation. *Cancer Res* 15: 4277-4285
79. Villar-Garea A, Fraga MF, Espada J, Esteller M (2003) Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer Res* 63: 4984-4989
 80. Liu Z, Xie Z, Jones W, Pavlovicz RE, Liu S, Yu J, Li PK, Lin J, Fuchs JR, Marcucci G, Li C, Chan KK (2009) Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 706-709
 81. Piña IC, Gautschi JT, Wang GY, Sanders ML, Schmitz FJ, France D, Cornell-Kennon S, Sambucetti LC, Remiszewski SW, Perez LB, Bair KW, Crews P (2003) Psammaplins from the sponge *Pseudoceratina purpurea*: inhibition of both histone deacetylase and DNA methyltransferase. *J Org Chem* 68: 3866-7383
 82. Simmons TL, Andrianasolo E, McPhail K, Flatt P, Gerwick WH (2005) Marine natural products as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 4: 333-342
 83. Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, Welsh W, Yang CS (2003) Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res* 63: 7563-7570
 84. Nakagawa H, Hasumi K, Woo JT, Nagai K, Wachi M (2004) Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis* 25: 1567-1574
 85. Elbling L, Weiss RM, Teufelhofer O, Uhl M, Knasmueller S, Schulte-Hermann R, Berger W, Micksche M (2005) Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J* 19: 807-809
 86. Kunnumakkara AB, Aggarwal PA (2008) Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett* 269: 199-225
 87. Fandy TE (2009) Development of DNA methyltransferase inhibitors for the treatment of neoplastic diseases. *Curr Med Chem* 16: 2075-2085

Cytosine methylation in DNA and its role in cancer therapy

Beata Plitta, Małgorzata Giel-Pietraszuk, Wojciech T. Markiewicz, Jan Barciszewski✉

Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, 12/14 Z. Noskowskiego St., 61-704 Poznan, Poland

✉e-mail: Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl

Key words: epigenetics, methylation, DNMT1, inhibitors, cancer therapy

ABSTRACT

DNA methyltransferase 1 (DNMT1) is one of three enzymes independently coded in mammalian cells. It catalyses postreplicative synthesis of 5-methylcytosine in DNA. The aim of this modification is regulation of gene expression characteristic for the given organism. DNMT1 maintains methylation pattern by copying it from maternal to daughter strand. S-adenosyl-L-methionine is a donor of methyl group in this process. Disturbance in methylation level results in changes in cell differentiation and finally to tumor transformation. Hypermethylation of promoter or first exon of tumor suppression gene results in silencing of its transcription. While hypomethylation of regulatory sequence of protooncogene and retrotransposon make them transcriptionally active. DNMT1 as a key enzyme in maintaining of proper methylation pattern is an attractive target in anti-tumor therapy.

Przegląd genów zaangażowanych w etiopatogenezę płaskonabłonkowego nowotworu przełyku (ESCC)

STRESZCZENIE

Płaskonabłonkowy nowotwór przełyku (ESCC) jest ważnym typem nowotworu, nie tylko ze względu na częstość jego występowania na świecie, ale również z tego powodu, że rokowania dla pacjenta z wykrytymi zmianami nowotworowymi przełyku są bardzo złe. Mimo, że w Polsce stanowi stosunkowo niski procent ogółu zachorowań na nowotwory złośliwe (około 2%), to jednak pogłębianie wiedzy na temat tej choroby może przyczynić się do wczesnego wykrycia i skutecznego jej leczenia. Zarówno czynniki środowiskowe, takie jak używki, dieta uboga w warzywa, jak również zmiany ekspresji niektórych genów mogą wpływać na powstawanie i rozwój tego typu nowotworu. W ostatnich latach trwają intensywne badania dotyczące poznania funkcji genu *GAEC1*, który wydaje się pełnić ważną rolę zarówno w normalnych komórkach, jak i w komórkach zmienionych nowotworowo. Przypuszcza się, że białko kodowane przez ten gen może się okazać istotne w procesie nowotworzenia, pozostając ważnym elementem fizjologicznych procesów zachodzących w prawidłowych tkankach.

WPROWADZENIE

Płaskonabłonkowy nowotwór przełyku (ESCC, ang. *Esophageal Squamous Cell Carcinoma*) WHO sklasyfikowało jako ósmy najczęściej występujący nowotwór złośliwy na świecie, a szósty pod względem śmiertelności [1]. W Polsce stanowi on poniżej 2% zachorowań na nowotwory złośliwe [2]. Istnieje zależność między częstością zapadania na ESCC, a regionem świata [3]. Do obszarów o wysokim ryzyku zachorowań na ten typ nowotworu należy tak zwany „azjatycki pas nowotworu przełyku” (ang. *Asian Esophageal Cancer Belt*) rozciągający się od wschodniej Turcji przez Kazachstan, Turkmenistan, Uzbekistan, Tadżykistan, Irak, Iran do zachodnich i północnych Chin, a także Japonii. Pozostałe regiony świata charakteryzujące się wysokim współczynnikiem ryzyka wystąpienia tej choroby to południowo-wschodnia Afryka, Francja, Bermudy i Ameryka Południowa z Brazylią na czele [4,5]. Na podstawie danych WHO z roku 2003, w południowo-wschodniej Azji ESCC zajmuje czwarte miejsce na liście nowotworów złośliwych pod względem częstości występowania.

Wyróżniono dwa główne histologiczne podtypy nowotworu przełyku: płaskonabłonkowy nowotwór przełyku (ESCC) oraz nowotwór gruczolowy przełyku (gruczolakorak, AEDC, ang. *Esophageal Adenocarcinoma*). Pierwszy z nich przeważa pod względem występowania, stanowiąc 70% przypadków wszystkich zachorowań na świecie, w Chinach liczba zachorowań dochodzi do 90% [6]. Natomiast AEDC dominuje w krajach Europy zachodniej z wyłączeniem Francji [7].

Rokowania dla pacjentów z wykrytym ESCC są złe. Pomimo rozwoju terapii łączonych nadal niewiele ponad 15% pacjentów ze zdiagnozowanym ESCC przeżywa 5 lat [8], a średnia przeżywalność wynosi jeden rok. W Polsce 80% pacjentów umiera w ciągu 12 miesięcy od momentu rozpoznania nowotworu [2]. ESCC w 50% lokalizuje się w środkowej części przełyku, rzadziej w górnej, natomiast w dolnym odcinku tego narządu w większości przypadków rozwija się AEDC. W oparciu o dane WHO wykazano, że blisko dwa razy więcej mężczyzn niż kobiet zapada na płaskonabłonkowy nowotwór przełyku [1]. Czynniki wysokiego ryzyka, występujące w otoczeniu, wpływają na tak charakterystyczny układ występowania tego nowotworu na świecie. Jest kilka znaczących dowodów sugerujących, że alkohol, tytoń, dieta uboga w witaminy i antyoksydanty (brak zielonych warzyw, owoców cytrusowych, mikroelementów, cynku, ryboflawiny, witaminy A) oraz obecność czynników kancerogennych w pokarmie mają znaczenie w patogenezie nowotworów przełyku [9,10]. Czynniki te wpływając na śluzówkę przełyku powodują, że staje się ona bardziej wrażliwa na działanie kancerogenów włącznie z mykotoksynami, nitrozaminami i prawdopodobnie wirusami: brodawczaka ludzkiego (HPV, ang. *Human Papilloma*

Anna Klimczak¹

Jan Bitner²

Janusz Szemraj^{1,✉}

¹Zakład Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź

²Zakład Biofizyki Błon, Uniwersytet Łódzki, Łódź

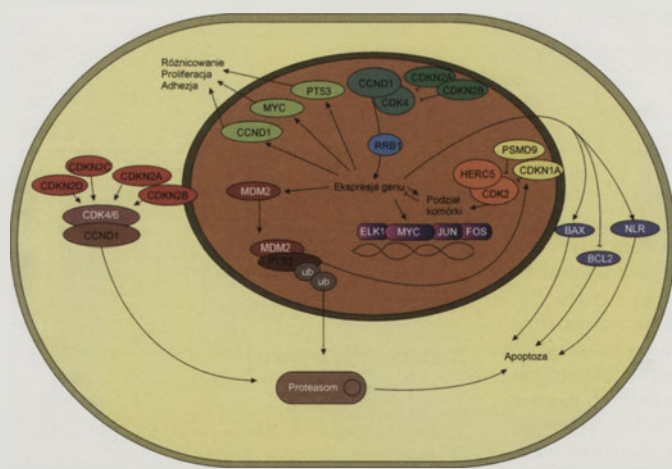
✉ Zakład Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; tel.: (42) 678 06 20, (42) 678 24 65, e-mail: jszemraj@csk.am.lodz.pl

Artykuł otrzymano 23 grudnia 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 8 kwietnia 2010 r.

Słowa kluczowe: płaskonabłonkowy nowotwór przełyku (ESCC), nowotworzenie, proto-onkogen, anty-onkogen, *GAEC1*

Wykaz skrótów: ESCC (ang. *Esophageal Squamous Cell Carcinoma*) – płaskonabłonkowy nowotwór przełyku; AEDC (gruczolakorak, ang. *Esophageal Adenocarcinoma*) – nowotwór gruczolowy przełyku; *GAEC1* (ang. *Gene Amplified in Esophageal Cancer 1*) – gen amplifikowany w nowotworze przełyku 1; HPV (ang. *Human Papilloma Virus*) – wirus brodawczaka ludzkiego; EBV (ang. *Epstein-Barr Virus*) – wirus Epsteina-Barr; PKC (ang. *Protein Kinase C*) – kinaza białkowa C; CKII (ang. *Casein Kinase II*) – kinaza kazeiny II; EGFR (ang. *Epidermal Growth Factor receptor*) – receptor epidermalnego czynnika wzrostu



Rycina 1. Schemat działania wybranych genów związanych z procesami zachodzącymi w ESCC. Dodatkowo zaznaczono następujące geny: *JUN*, *ELK1*, *FOS* – kodujące białka jądrowe będące czynnikami transkrypcyjnymi, *HERC5*, *CDKN21* – kodujące białka odpowiedzialne za wejście komórki w poszczególne fazy cyklu komórkowego, *CDKN2C*, *CDKN2CD* – geny będące inhibitorami kinaz zależnych od cyklin, *BAX* – gen aktywujący apoptozę, *LNR* – proteaza biorąca udział w apoptozie, *CDK2*, *CDK4* – geny kodujące białka z rodziny kinaz zależnych od cyklin.

virus) lub Epsteina-Barr (EBV, ang. *Epstein-Barr virus*) [11]. Również zmiany genetyczne w zasadniczy sposób wpływają na powstawanie i rozwój ESCC. W tabeli 1 przedstawiono kilka klas genów zaangażowanych w kancerogenezę płaskonabłonkowego nowotworu przełyku, podczas gdy rycina 1 przedstawia schemat działania wybranych genów związanych z procesami zachodzącymi w ESCC.

PATOGENEZA ESCC

Kancerogeneza ESCC jest procesem wieloetapowym, na który składa się kumulacja zmian genetycznych prowadzących do histologicznych zmian w komórkach nabłonka prowadząc kolejno przez hiperplazję, anaplazję, dysplazję, nowotwór *in situ* do powstania ognisk przerzutowych. Wnikliwa analiza rozwoju ESCC i roli zmian genetycznych w kancerogenezie może być pomocna w diagnozie, prognoście, leczeniu pacjentów z ESCC. Poniżej przedstawiono kilka molekularnych mechanizmów zaangażowanych w patogenezę tego typu nowotworu.

ROLA WIRUSÓW W ESCC

HPV 16 i 18 są głównymi podtypami tego wirusa, których obecność wykryto w ESCC. Wykazano, że podtypy te inicjują proces kancerogenezy, w którym onkoproteiny E6 oraz E7, produkowane przez te wirusy, oddziałując z genami *TP53* i *RB1*, powodują utratę funkcji biologicznej przez produkty białkowe tych genów, prowadząc do utraty kontroli cyklu komórkowego charakterystycznego dla komórek nowotworowych. Inne podtypy HPV wykrywane w ESCC to: HPV 6, 11, 13, 25, 30, 33, 38, 53, 54 i 73. Sugeruje się, że zależność między HPV i ESCC jest większa na obszarach o zwiększonym ryzyku zachorowań. Różnorodność środowiskowa, geograficzna i genetyczna może mieć wpływ na podatność na infekcję wirusem HPV przełyku w różnych populacjach. Niewykluczone, że infekcja onkogennym podtypem HPV może być integralną częścią procesu prowadzącego do powstania ESCC.

EBV jest powiązany z rakiem gardła dolnego i chłoniakiem Burkitta. Biorąc pod uwagę sąsiedztwo przełyku i gardła dolnego, prawdopodobieństwo, że EBV może prowadzić do powstania i rozwoju ESCC, wzrasta. Jakkolwiek dotychczasowe dane wskazują na stosunkowo rzadką korelację EBV z ESCC. Nie ma jednoznacznych dowodów, że EBV bierze udział w kancerogenezie ESCC [11].

ROLA GENÓW W PATOGENEZIE ESCC

Zmiany molekularne występujące w kilku klasach genów próbuje się powiązać z patogenezą ESCC. Do zmian tych należą: aktywacja onkogenów, inaktywacja genów hamujących proces nowotworzenia (TSGs, ang. *Tumor Suppressor Genes*) oraz zmiany ekspresji genów związanych z tworzeniem przerzutów oraz apoptozą [11].

CZYNNIKI WZROSTU I ICH RECEPTORY

Czynniki wzrostu i ich receptory odgrywają istotną rolę w przejściu komórki z fazy G_0 do cyklu komórkowego. W przypadku *ERBB1* i *ERBB2* udowodniono ich wpływ na patogenezę ESCC. Nadekspresja *ERBB* jest powiązana ze słabszą odpowiedzią na chemioterapię i zmniejszonym prawdopodobieństwem przeżycia pacjenta z wykrytym nowotworem, dlatego uważa się, że gen ten jest dobrym markerem prognostycznym pacjentów z ESCC. Sugerowano, że nadekspresja *ERBB2* odgrywa znaczącą rolę we wczesnych stadiach rozwoju nowotworu. W przypadku *CCND1* (cykliny D1) wykryto amplifikację i/lub nadekspresję tego genu. Przyjęto, że jest to dobry marker prognostyczny dla pacjentów ze względu na jego powiązanie z przerzutami do węzłów chłonnych lub stopniem zaawansowania rozwoju nowotworu, wysoką aktywnością proliferacji, obniżonym prawdopodobieństwem przeżycia pacjentów i niższą odpowiedzią na chemioterapię [12,13].

TGS

Różnego rodzaju mutacje występujące w genie *TP53*, szczególnie w eksonach 5-8 (fragment ten koduje domenę wiążącą DNA) prowadzą do powstania nie tylko ESCC, ale i innych typów nowotworów. W obszarach geograficznych o podwyższonym ryzyku zachorowań obserwowano wzrost częstości zapadalności na ESCC o 50%. Przeprowadzona analiza mutacji wykazała statystycznie istotną częstość mutacji typu substytucji zwłaszcza transwersji $G \rightarrow T$ w genie *TP53* w grupie chorych w porównaniu ze zdrowymi kontrolami. Wykryto odwrotną korelację pomiędzy ekspresją genów *CDKN2A* i *RB1*. Brak ekspresji *RB1* i nadekspresję *CCND1* skorelowano z krótszym czasem przeżycia pacjenta. Wyżej wymienione zmiany mogą być wykorzystane w opracowaniu testów wczesnego wykrywania ESCC [31-33].

CZYNNIKI JĄDROWE

W zróżnicowanych podtypach ESCC obserwowano amplifikację i nadekspresję genu *MYC* lub jej brak. Nie ma jednak jednoznacznych dowodów świadczących o przydatności tego genu jako markera prognostycznego ESCC [16,17].

Tabela 1. Charakterystyka genów powiązanych z płaskonabłonkowym nowotworem przełyku.

Typ genu	Nazwa genu / identyfikator genu*	Inne nazwy genu	Położenie genu na chromosomie	Najczęstszy mechanizm powiązany z patogenezą	Funkcja genu w komórce	Dane dotyczące ESCC
Protoonkogeny	gen kodujący czynnik wzrostu fibroblastów 4 / <i>FGF4</i>	HST; KFGF; HST-1; HSTF1; K-FGF; FGF4	11q13	amplifikacja genu	<i>FGF4</i> i <i>FGF3</i> wchodzi w skład rodziny <i>FGF</i> , która jest odpowiedzialna m.in. za wzrost komórek, morfogenezę, rozwój nowotworu, jego inwazyjność.	Częste koamplifikacje zaobserwowano u 30-50% pacjentów z ESCC. Uważa się, że są odpowiedzialne za rozprzestrzeniania się tego typu nowotworu [12,13].
	gen kodujący czynnik wzrostu fibroblastów 3 / <i>FGF3</i>	INT2; HBGF-3; FGF3	11q13	amplifikacja genu		
	gen kodujący receptory nabłonkowego czynnika wzrostu / <i>EGFR</i>	ERBB, ERBB1, HER1, PIG61, mENA	7p12	amplifikacja, nadekspresja genu	<i>EGFR</i> kodują białka błonowe, które pełnią funkcję receptorów czynników wzrostu; receptory te prezentują aktywność kinazy tyrozynowej.	<i>EGFR</i> może pełnić autokrynną rolę w kancerogenezie przełyku; amplifikację i/lub nadekspresję genu <i>EGFR</i> często wykrywano (29-92%) w ESCC. Zmiany w ekspresji koreluje się ze zmniejszeniem szans przeżycia pacjenta (poniżej 5 lat) z ESCC. Nadekspresja <i>EGFR</i> jest związana ze słabą odpowiedzią na chemioterapię. Uważa się, że zmiany ekspresji genu <i>EGFR</i> są dobrym markerem złego rokowania dla chorego [14].
	gen kodujący 2 receptor epidermalnego czynnika wzrostu człowieka / <i>ERBB2</i>	CD340, HER-2, HER-2/neu, HER2, NEU,	17q21	amplifikacja, nadekspresja genu		Rzadko znajdowana amplifikacja i/lub nadekspresja genu w ESCC. Badania immunohistochemiczne nadekspresji genu <i>ERBB2</i> sugerują jego udział w początkowych stadiach kancerogenezy ESCC [14,15].
	c-Myc / <i>MYC</i>	MRTL, bHLHe39, c-Myc	8q24	amplifikacja, nadekspresja genu		Zmiany w ekspresji genu wiążę się z bardzo dobrze zróżnicowanym podtypem tego nowotworu [16,17].
	cyklina D1 / <i>CCND1</i>	BCL1, PRAD1, D11S287E, CCND1	11q13	amplifikacja, nadekspresja genu	Koduje białko, które pełni krytyczną funkcję w fazie G1.	Ważny marker analizy stopnia zaawansowania ESCC. Wykazano jego powiązanie ze zmianami w węzłach chłonnych a przerzutami, stopniem zaawansowania rozwoju guza, wysoką aktywnością proliferacji, niską prognozą przeżycia i odpowiedzią na chemioterapię [18,19].
	gen kodujący homolog domeny białka TP53 / <i>MDM2</i>	HDMX, hdm2, MGC5370, MDM2	12q13-15	amplifikacja genu	Koduje białko będące inhibitorem białka TP53; zmniejsza proliferację; zwiększa przeżycie pacjenta.	W Japonii amplifikacja tego genu została wykryta u 18% chorych z ESCC. Znalezione korelację amplifikacji genu ze słabymi prognozami przeżycia. Uzyskane wyniki nie zostały potwierdzone badaniami w Chinach [20,21].

gen kodujący białko TP53 / <i>TP53</i>	p53, LFS1, TP53, FLJ92943, TP53	17p13	mutacja, nadekspresja genu	Koduje białko powstrzymujące transformację nowotworową przez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 lub przez indukcję procesu apoptozy.	Większość mutacji występujących w genie to mutacje punktowe typu transwersji G w T powstałych pod wpływem chemicznych kancerogenów m.in. występujących w dymie papierosowym. Metody immunohistochemiczne wykazały nadekspresję genu w ESCC. Sugeruje się, że gen ten odgrywa istotną rolę w początkowych stadiach rozwoju ESCC [6,13,22].
gen kodujący inhibitor kinazy zależnej od cykliny 1A / <i>CDKN1A</i>	P21, CIP1, SDI1, WAF1, CAP20, CDKN1, MDA-6, p21CIP1,	6p21	nadekspresja genu	Koduje białko, które jest ściśle regulowane przez <i>TP53</i> na poziomie transkrypcji.	Badania przeprowadzane na populacjach azjatyckich wykazały ekspresję genu <i>CDKN1A</i> między 21 a 85% pacjentów z ESCC. Chorzy nie wykazujący ekspresji tego genu mieli większe szanse przeżycia, nie zaobserwowano powiązania między ekspresją <i>CDKN1A</i> a nadmierną akumulacją TP53 w ESCC [23,24].
gen kodujący kinazę zależną od cykliny 2A / <i>CDKN2A</i>	ARF, MLM, p16, p19, CMM2, INK4, MTS1, TP16,	9p21	mutacja, metylacja genu	Geny <i>CDKN2A</i> i <i>CDKN2B</i> kodują białko, które wiąże się do CDK4 i CDK6. Powstały kompleks zapobiega wejściu komórki w fazę S, wskutek czego hamuje proliferację komórki.	Dane mówiące o delecji, mutacji i hipermetylacji w liniach ESCC oraz w wyjściowej formie ESCC obserwowano na różnym poziomie [25,26].
gen kodujący inhibitor kinazy zależnej od cykliny 2B / <i>CDKN2B</i>	P15, MTS2, TP15, CDK41, INK4B,	9p21	mutacja, metylacja genu		Gen <i>CDKN2B</i> poddawany jest głównie delecji homozygotycznej [27,28].
gen kodujący inhibitor kinazy zależnej od cykliny 1B / <i>CDKN1B</i>	KIP1, MEN4, CDKN4, MEN1B, P27KIP1	12p13	nadekspresja genu	Koduje białko działające jak inhibitor kinazy zależnej od cyklin, który może blokować przejście komórki z fazy G1 do S.	Utratę ekspresji <i>CDKN1B</i> obserwowano u 39-67% pacjentów z ESCC, co wiązało się ze złymi rokowaniami. Jest głównym substratem SKP2 (białka 2 fazy S oddziałujące z kinazą), we wczesnym ESCC, brak indukowanej przez SKP2 degradacji <i>CDKN1B</i> może mieć wpływ na rozwój guza, a w konsekwencji słabe prognozy wyleczenia [29,30].
Rb / <i>RB1</i>	RB, pRb, OSRC, pp110, p105-Rb, B1	13q14	mutacja genu	Koduje jądrowa fosfoproteinę, która może być fosforylowana przez kompleks CDK/CCND1, co wymusza proliferację komórki.	Zmiany w genie <i>RB1</i> były obserwowane w 30-60% u pacjentów z ESCC, które wynikały z mutacji i utraty heterozygotyczności. Obserwowano odwrotną korelację pomiędzy ekspresją <i>CDKN2A</i> i <i>RB1</i> ; zależność zaniku ekspresji <i>RB1</i> i nadekspresja <i>CCND1</i> wpływają na skrócenie czasu przeżycia [31-33].

Bcl-2 / *BCL2*

Bcl-2

18q21

zmniejszona
ekspresja genuRodzina genów *BCL2*
koduje białka, które są
ważnymi regulatorami cyklu
komórkowego i pełnią funkcję
inhibitorów apoptozy.Ekspresję genu *BCL2*
wykrywano częściej wśród
mniej zróżnicowanych
linii ESCC. Nadekspresja
BCL2 lub jej występowanie
z ekspresją *MYC* wpływa
na mniejszy czas przeżycia
pacjenta. Ekspresja genów
z rodziny *BCL* była
odwrotnie skorelowana
z ekspresją samego *BCL2*
oraz zmniejszała ze
wzrostem zróżnicowania
nowotworu [34-36].nm23 / *NME1*NB, AWD,
NBS, NM23,
GAAD,

17q21

zmniejszona
ekspresja genuRodzina genów *NME* koduje
kinazy difosfonukleozydów,
które mogą hamować
powstawanie przerzutów.Zahamowanie ekspresji
genu *NME1* jest związane ze
skróceniem czasu przeżycia
pacjenta z ESCC [37,38].

*nazwy genów sformalizowane przez Human Genome Organisation (HUGO)

GENY ZWIĄZANE Z APOPTOZĄ

Programowana śmierć komórki odgrywa istotną rolę w patogenezie, rozwoju i zdolności nowotworu do odpowiedzi na bodźce zewnętrzne. Białka kodowane przez rodzinę *BCL2* pełnią istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy. Ekspresję genu *BCL2* częściej wykrywano w słabiej zróżnicowanych nowotworach. Sugeruje się, że ekspresja wyżej wymienionego genu może pełnić rolę czynnika prognostycznego u pacjentów z ESCC i mieć potencjalne zastosowanie w jej leczeniu. Wspólną ekspresję genów *BCL2* i *MYC* powiązano ze zmniejszonym prawdopodobieństwem przeżycia pacjenta [34,35].

GENY ZWIĄZANE Z POWSTAWANIEM PRZERZUTÓW

Ważnym powodem nieudanej kuracji w leczeniu ESCC są jej nawroty i przerzuty. Rodzina *NME1* koduje kinazę difosfonukleozydową, która może hamować potencjał przerzutowania nowotworu do węzłów chłonnych. Zahamowanie ekspresji *NME1* koreluje się z krótszym przeżyciem pacjenta [36,37].

ZMIANY CYTOGENETYCZNE W ESCC

Amplifikacje chromosomowego DNA u chorych z ESCC obserwowano w rejonach chromosomów 3q, 5p, 8p, 9p, 11q, 12p, 14q, 14p, 19q i 20q, podczas gdy utraty heterozygotyczności w obrębie loci zlokalizowanych w rejonach 3p, 3q, 5q, 6p, 8p, 9p, 9q, 10p, 11p, 11q, 13q, 17p, 17q, 18q, 19q i 21q. To pomogło zlokalizować regiony genomu, które zawierają geny związane z patogenezą ESCC. Onkogeny *MYC* (8q24), *ERB1* (7p12-13), *FGF4*, *FGF3* i *CCND1* (11q13) identyfikowano w różnych amplikonach w ESCC. Utratę heterozygotyczności w obrębie loci zaobserwowano w genach *PT53* (17p13), *RB1* (13q14), *BRCA1* (17q21), *BRCA2* (13q12-13), *APC* (8q21), *MCC* i *DCX* (5q21), *p16* (9p21) i *IRF1* (5q31) TGSs. Powyższe dane sugerują, że amplifikacja onkogenów i delecja alleli są rodzajami mutacji odrywającymi istotną rolę w kancerogenezie ESCC [38,39].

ZNACZENIE METYLACJI W ESCC

Zmiany epigenetyczne takie jak dziedziczne zmiany w ekspresji genów, które nie powodują zmian w pierwotnej sekwencji nukleotydowej, odgrywają istotną rolę w kancerogenezie. Metylacja DNA jest znaczącą zmianą epigenetyczną w genomie człowieka. Metyltransferazy DNA (*DNMT1*, *DNMT3A* i *DNMT3B*) [40] katalizują reakcję przemieszczenia grupy metylowej z S-adenozylometioniny (SAM) na węgiel w pozycji 5 reszty cytozyny w DNA. Dodatkowa grupa metylowa w strukturze cytozyny nie wpływa bezpośrednio na parowanie zasad, ale na oddziaływanie DNA-białko, ponieważ grupy metylowe są skierowane do większego rowka helisy. Metylacja reszt cytozyny w DNA w prawidłowych tkankach zachodzi na poziomie 0,75-1% wszystkich par zasad DNA. 5-metylocytozynę znajdowano głównie w sekwencjach CpG, a 70% tych obszarów jest metylowane u chorych z ESCC [25,26,41]. Wyspy CpG są powiązane z promotorem oraz z pierwszym eksonem genów aktywnych transkrypcyjnie. Hipermetylacja tych regionów może prowadzić do wyciszenia transkrypcji genów i odgrywa znaczącą rolę w inaktywacji TGSs. Większość wysp CpG w tkankach prawidłowych nie jest metylowana, a te, które były poddane temu procesowi, są powiązane z genami specyficznymi dla linii germinialnej, czy genami specyficznymi tkankowo [41]. Metylacja wysp CpG *de novo* w regionach promotorowych niektórych genów, w tym TGS, może wyciszać transkrypcję prowadząc do rozwoju wielu negatywnych w skutkach procesów [42].

GAEC1 A KANCEROGENEZA

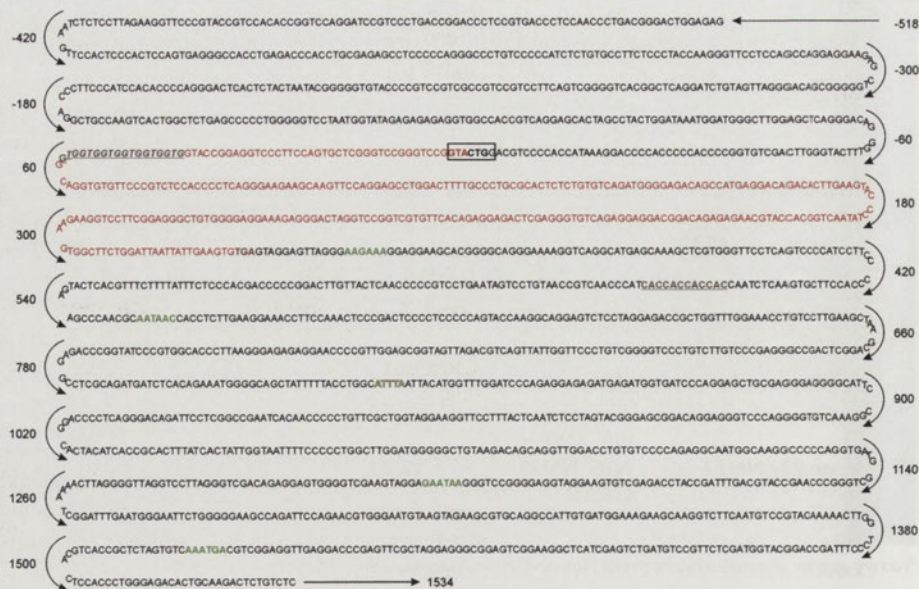
Przedmiotem naszych zainteresowań jest gen *GAEC1* (ang. *Gene Amplified in Esophageal Cancer 1*), pierwszy raz zlokalizowany w ESCC [11]. Na podstawie sekwencji nukleotydowej mRNA przeanalizowaliśmy charakterystyczne motywy i porównaliśmy je z danymi literaturowymi. Na tej podstawie wysnuliśmy hipotezę, że gen *GAEC1* może być bezpośrednio bądź pośrednio odpowiedzialny za proces nowotworzenia w ESCC. Badania doświadczalne zweryfikują tę tezę.

Rycina 2. Sekwencja nukleotydowa genu *GAEC1*. Czarnym kolorem czcionki zaznaczono introny, a czerwonym ekson. Kolorem zielonym zaznaczono miejsca poliadenylacji, żółtym – sekwencję rozpoznawaną przez białko wiążące element ARE (ang. *ARE-binding protein*), w ramce przedstawiono sekwencję Kozak, a poprzez podkreślenie zaznaczono sekwencje, których modyfikację mogą brać udział w patogenezie.

GAEC1

Gen *GAEC1* pierwszy raz zlokalizowano w płaskonabłonkowym raku przełyku ESCC [11]. Jego locus zidentyfikowano na ramieniu dłuższym chromosomu 7 (7q22.1) [38]. *GAEC1* jest genem posiadającym jeden ekson, który jest otoczony dwoma intronami. mRNA tego genu złożony jest z 2052 pz, przy czym 327 pz to sekwencja kodująca, a 518 pz od końca 5' oraz 1207 pz od końca 3' stanowi sekwencję niekodującą. Gen ten posiada promotor typu „TATA-less”. Są trzy prawdopodobne miejsca inicjacji transkrypcji: pozycja od -87 do -85, od -54 do -52 oraz ostatnia w pozycji od 1 do 3 [43]. Ostatnia wymieniona pozycja kodonu ATG jest najbardziej prawdopodobnym miejscem startu produkcji białka przez rybosom, ponieważ otacza ją zachowana w ewolucji sekwencja Kozak [44]. Świadcza o tym charakterystyczne nukleotydy: w pozycji -3 jest puryna (G), w pozycji -1 C, a za miejscem inicjacji transkrypcji jest G. Przed miejscem inicjacji, końca 3' regionu niekodującego, zlokalizowano miejsce (AATA-AA), rozpoznawane przez białko wiążące element ARE (ang. *ARE-binding protein*, inaczej *AU-Rich Element binding protein*), które jest odpowiedzialne za degradację RNA [45].

GAEC1 powszechnie ulega ekspresji na różnym poziomie w prawidłowych tkankach włącznie z przełykiem oraz narządami przewodu pokarmowego. Największą nadekspresję tego genu zaobserwowano w łożysku, leukocytach krwi obwodowej, płucach, śledzionie oraz jelicie cienkim [40]. Właściwości transformacyjne *GAEC1* sprawdzono na mysich fibroblastach 3T3 z wykorzystaniem wektorów pcDNA3.1-*GAEC1* i pCMV-*Ras*. Badania wykazały niezależną zdolność transfekowania powyższych wektorów w agarze oraz tworzenie skupisk w monokulturze badanych fibroblastów. Opisano amplifikację oraz nadekspresję genu w 6/10 różnych liniach ESCC i w 34/99 wśród innych typów nowotworów [43]. Badania przeprowadzone przez Gopalan i wsp. [46] sugerują udział *GAEC1* w powstawaniu fenotypu nowotworowego komórek jelita grubego. Wykazano amplifikację *GAEC1* u 79% chorych z gruczolakami jelita grubego. Zaobserwowano istotnie statystyczny wzrost ilości kopii *GAEC1*u pacjentów z rakiem gruczolowym jelita



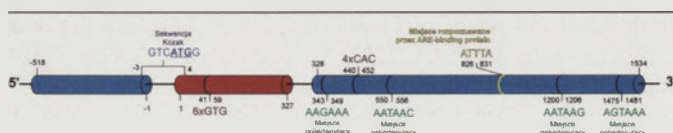
grubego o wysokim stopniu zróżnicowania w porównaniu z gruczolakiem, czy pacjentami nie wykazujących zmian nowotworowych jelita grubego [46]. Nie poznano jeszcze funkcji tego genu w zdrowych tkankach. *GAEC1* koduje białko jądrowe zbudowane z 109 aa (m.c.z.~15kDa).

Analiza sekwencji nukleotydowej *GAEC1* oraz aminokwasowej produktu białkowego genu pokazała miejsce fosforylacji rozpoznawane przez kinazę białkową C (CK2, ang. *Protein Kinase C*) oraz trzy miejsca rozpoznawane przez kinazę kazeiny II (CKII, ang. *Casein Kinase II*). Pierwszy wymieniony enzym jest odpowiedzialny za regulację cyklu komórkowego, drugi bierze udział w regulacji przekazywania sygnałów jak również kieruje cyklem komórkowym.

W analizowanej strukturze mRNA wykryto również sześć trójnukleotydowych powtórzeń GTG w części kodującej oraz cztery sekwencje złożone z trzech nukleotydów CAC od strony 3'. W niektórych genach powyższe fragmenty mogą ulec mutacji (delecji lub insercji) prowadząc często do rozwoju schorzeń [47]. Rycina 2 przedstawia sekwencję *GAEC1* oraz zaznaczone na nim najważniejsze jego elementy, natomiast rycina 3 przedstawia schemat tego genu.

PODSUMOWANIE

W ESCC często obserwuje się zmiany na poziomie molekularnym, związane z aktywacją protoonkogenów, inaktywacją genów supresorowych, zmianami ekspresji genów odpowiedzialnych za powstawanie przerzutów, wpływających na przebieg procesu apoptozy. Rozwój tego nowotworu związany jest z mutacją genu *TP53*, zakłóceniem cyklu komórkowego w fazie G1 (inaktywacja *CDKN2A*, amplifikacja *CCDN1*, modyfikacja *RB1*), aktywacją onkogenów (np. *ERBB*, *MYC*) oraz inaktywacją genów supresorowych (np. *CDKN2B*). Wraz z rozwojem nowotworu wzrasta liczba zmian genetycznych. Gen *GAEC1* jest godnym uwagi, ponieważ jego ekspresję wykryto na różnych poziomach, zarówno w prawidłowych, jak i nowotworowych komórkach, co sugeruje, że może on pełnić ważną, do tej pory niewykrytą, funkcję. Dalsze badania mają na celu poznanie funk-



Rycina 3. Schematyczne przedstawienie sekwencji genu *GAEC1*. Na niebiesko zaznaczono introny, a na czerwono ekson. Fioletowy kolor przedstawia sekwencję Kozak, na zielono – miejsca poliadenylacji, a na żółto – miejsce rozpoznawane przez białko wiążące element ARE.

cji wyżej wymienionego genu i jego produktu białkowego oraz przedstawienie dowodów na potwierdzenie lub obalenie tezy, że gen *GAEC1* może pełnić ważną rolę w procesie kancerogenezy.

PIŚMIENICTWO

- Bernard W, Stewart PK (2003) World cancer report. International Agency for Research on Cancer
- Kordek R, Jassem J, Jezierski A, Kornafel J, Krzakowski M, Pawłęga J (2007) Onkologia podręcznik dla studentów i lekarzy. Via Medica
- Muñoz N (1993) Epidemiological aspects of oesophageal cancer. *Endoscopy* 25: 609-612
- Coleman MP, Esteve J, Damiecki P, Arslan A, Renard H (1993) Trends in cancer incidence and mortality. International Agency for Research on Cancer
- Reed PI, Johnston BJ (1993) The changing incidence of oesophageal cancer. *Endoscopy* 25: 606-608
- Lam KY, Ma L (1997) Pathology of esophageal cancers: local experience and current insights. *Chin Med J* 110: 459-464
- Blot WJ, McLaughlin JK (1999) The changing epidemiology of esophageal cancer. *Semin Oncol* 26: 2-8
- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ (2005) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 55: 10-30
- Cheng KK, Duffy SW, Day NE, Lam TH (1995) Oesophageal cancer in never-smokers and never-drinkers. *Int J Cancer* 60: 820-822
- Garidou A, Tzonou A, Lipworth L, Signorello LB, Kalapothaki V, Trichopoulos D (1996) Life-style factors and medical conditions in relation to esophageal cancer by histologic type in a low-risk population. *Int J Cancer* 68: 295-299
- Lam AK (2000) Molecular biology of esophageal squamous cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 33: 71-90
- Kitagawa Y, Ueda M, Ando N, Shinozawa Y, Shimizu N, Abe O (1991) Significance of int-2/hst-1 coamplification as a prognostic factor in patients with esophageal squamous carcinoma. *Cancer Res* 51: 1504-1508
- Wagata T, Shibagaki I, Imamura M, Shimada Y, Toguchida J, Yandell DW, Ikenaga M, Tobe T, Ishizaki K (1993) Loss of 17p, mutation of the p53 gene, and overexpression of p53 protein in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 53: 846-850
- Burgess AW, Thumwood CM (1994) The sixth george swanson christie memorial lecture: growth factors and their receptors: new opportunities for cancer treatment. *Pathology* 26: 453-463
- Lam KY, Tin L, Ma L (1998) C-erbB-2 protein expression in oesophageal squamous epithelium from oesophageal squamous cell carcinomas, with special reference to histological grade of carcinoma and pre-invasive lesions. *Eur J Surg Oncol* 24: 431-435
- Kanda Y, Nishiyama Y, Shimada Y, Imamura M, Nomura H, Hiai H, Fukumoto M (1994) Analysis of gene amplification and overexpression in human esophageal-carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 58: 291-297
- Miyazaki S, Sasno H, Shiga K, Sawai T, Nishihira T, Okamoto H, Mori S (1992) Analysis of c-myc oncogene in human esophageal carcinoma: immunohistochemistry, in situ hybridization and northern and southern blot studies. *Anticancer Res* 12: 1747-1755
- Gramlich TL, Fritsch CR, Maurer D, Eberle M, Gansler TS (1994) Differential polymerase chain reaction assay of cyclin d1 gene amplification in esophageal carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 3: 255-259
- Doki Y, Imoto M, Han EK, Sgambato A, Weinstein IB (1997) Increased expression of the p27kip1 protein in human esophageal cancer cell lines that over-express cyclin d1. *Carcinogenesis* 18: 1139-1148
- Shibagaki I, Tanaka H, Shimada Y, Wagata T, Ikenaga M, Imamura M, Ishizaki K (1995) P53 mutation, murine double minute 2 amplification, and human papillomavirus infection are frequently involved but not associated with each other in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1: 769-773
- Zhu D, Wang L, Zhang C, Wang X, Mao X, Jia Y, Yan S, Wu M (1996) No evidence for the amplifications of mdm2 and c-myc genes involved in the genetic susceptibility to esophageal cancer in a high-risk area of north China. *Cancer Genet Cytogenet* 89: 184-185
- Audrézet MP, Robaszkiewicz M, Mercier B, Nousbaum JB, Bail JP, Hardy E, Volant A, Lozac'h P, Charles JF, Gouéron H, Férec C (1993) Tp53 gene mutation profile in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 53: 5745-5749
- Yang G, Zhang Z, Liao J, Seril D, Wang L, Goldstein S, Yang CS (1997) Immunohistochemical studies on waf1p21, p16, prb and p53 in human esophageal carcinomas and neighboring epithelia from a high-risk area in northern china. *Int J Cancer* 72: 746-751
- Lam KY, Law S, Tin L, Tung PH, Wong J (1999) The clinicopathological significance of p21 and p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma: an analysis of 153 patients. *Am J Gastroenterol* 94: 2060-2068
- Igaki H, Sasaki H, Kishi T, Sakamoto H, Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, Sugimura T, Terada M (1994) Highly frequent homozygous deletion of the p16 gene in esophageal cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 203: 1090-1095
- Tanaka H, Shimada Y, Imamura M, Shibagaki I, Ishizaki K (1997) Multiple types of aberrations in the p16 (ink4a) and the p15(ink4b) genes in 30 esophageal squamous-cell-carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 70: 437-442
- Xing EP, Nie Y, Song Y, Yang GY, Cai YC, Wang LD, Yang CS (1999) Mechanisms of inactivation of p14arf, p15ink4b, and p16ink4a genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 5: 2704-2713
- Xing EP, Nie Y, Wang LD, Yang GY, Yang CS (1999) Aberrant methylation of p16ink4a and deletion of p15ink4b are frequent events in human esophageal cancer in Linxian, China. *Carcinogenesis* 20: 77-84
- Shamma A, Doki Y, Tsujinaka T, Shiozaki H, Inoue M, Yano M, Kawanishi K, Monden M (2000) Loss of p27(kip1) expression predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 58: 152-158
- Fukami T, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Isogai K, Sakamoto M, Takamoto S, Murakami Y (2003) Promoter methylation of the *tscl1* gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines. *Int J Cancer* 107: 53-59
- Huang Y, Meltzer SJ, Yin J, Tong Y, Chang EH, Srivastava S, McDaniel T, Boynton RF, Zou ZQ (1993) Altered messenger RNA and unique mutational profiles of p53 and rb in human esophageal carcinomas. *Cancer Res* 53: 1889-1894
- Boynton RF, Huang Y, Blount PL, Reid BJ, Raskind WH, Haggitt RC, Newkirk C, Resau JH, Yin J, McDaniel T, Meltzer SJ (1991) Frequent loss of heterozygosity at the retinoblastoma locus in human esophageal cancers. *Cancer Res* 51: 5766-5769
- Roncalli M, Bosari S, Marchetti A, Buttitta F, Bossi P, Graziani D, Peracchia A, Bonavina L, Viale G, Coggi G (1998) Cell cycle-related gene abnormalities and product expression in esophageal carcinoma. *Lab Invest* 78: 1049-1057
- Sarbia M, Bittinger F, Porschen R, Verreet P, Dutkowski P, Willers R, Gabbert HE (1996) Bcl-2 expression and prognosis in squamous-cell carcinomas of the esophagus. *Int J Cancer* 69: 324-328
- Bhatavdekar JM, Patel DD, Ghosh N, Chikhlikar PR, Trivedi TI, Suthar TP, Doctor SS, Shah NG, Balar DB (1997) Coexpression of bcl-2, c-myc, and p53 oncoproteins as prognostic discriminants in patients with colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 40: 785-790
- Iizuka N, Tangoku A, Hayashi H, Yosino S, Abe T, Morioka T, Oka M (1999) The association between nm23-h1 expression and survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 138: 139-144
- Tomita M, Ayabe T, Matsuzaki Y, Edagawa M, Maeda M, Shimizu T, Hara M, Onitsuka T (2001) Expression of nm23-h1 gene product in esophageal squamous cell carcinoma and its association with vessel invasion and survival. *BMC Cancer* 1: 3
- Kwong D, Lam A, Guan X, Law S, Tai A, Wong J, Sham J (2004) Chromosomal aberrations in esophageal squamous cell carcinoma among

chinese: gain of 12p predicts poor prognosis after surgery. *Hum Pathol* 35: 309-316

39. Montesano R, Hollstein M, Hainaut P (1996) Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* 69: 225-235
40. Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9: 2395-2402.
41. Paulsen M, Ferguson-Smith AC (2001) DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol* 195: 97-110
42. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61: 3225-3229
43. Law FBF, Chen YW, Wong KY, Ying J, Tao Q, Langford C, Lee PY, Law S, Cheung RWL, Chui CH, Tsao SW, Lam KY, Wong J, Srivastava G, Tang JCO (2007) Identification of a novel tumor transforming gene GAEC1 at 7q22 which encodes a nuclear protein and is frequently amplified and overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene* 26: 5877-5888
44. Kozak M (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15: 8125-8148
45. DeMaria CT, Brewer G (1996) Auf1 binding affinity to a+u-rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J Biol Chem* 271: 12179-12184
46. Gopalan V, Smith RA, Nassiri MR, Yasuda K, Salajegheh A, Kim SY, Ho YH, Weinstein S, Tang JCO, Lam AKY (2010) GAEC1 and colorectal cancer: a study of the relationships between a novel oncogene and clinicopathologic features. *Hum Pathol* 41: 1009-1015
47. Pearson CE, Nichol Edamura K, Cleary JD (2005) Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* 6: 729-742

Genes responsible for etiopathogenesis in esophageal squamous cell carcinoma

Anna Klimczak¹, Jan Bitner², Janusz Szemraj¹✉

¹Department of Medical Biochemistry, Medical University of Lodz, 6/8 Mazowiecka St., Lodz 92-215, Poland

²Department of Molecular Biophysics, University of Lodz, 12/16 Banacha St., 90-237 Lodz, Poland

✉e-mail: jszemraj@csk.am.lodz.pl

Key words: ESCC, carcinogenesis, proto-oncogene, anti-oncogene, *GAEC1*

ABSTRACT

Esophageal squamous cell carcinoma is a very important cancer type, not only because of its frequent cases around the world but also because of its high mortality rate. Despite of the fact that this is a very rare cancer in Poland (around 2% of patients), we need to know more about this disease in order to find better ways to fight it. Epidemiological factors: smoking and use of psychoactive substances like alcohol and drugs, poor diet as well as changes in expression of genes may have influence on this cancer. During last years there has been a lot of research on the role of *GAEC1*, which seems to play a very important role in normal and cancer cells. Perhaps the protein coded by this gene is an important part in cancer development, also being an important element in processes in normal tissues.

UDP-glukuronylotransferazy, białka siateczki śródplazmatycznej – struktura i mechanizm działania

STRESZCZENIE

Isoenzymy UDP-glukuronylotransferazy (UGT, EC. 2.4.1.17), katalizują w organizmach ssaków reakcję koniugacji grupy glikozydowej pochodzącej z kwasu urydyno-5'-difosforo-D-glukuronowego (UDPGA) z aglikonem. UDPGA jest przyłączany do odpowiedniej grupy funkcyjnej metabolitu I fazy, rzadziej związku wyjściowego. W ten sposób polarność aglikonu i zdolność jego wydalania z komórki zwiększa się, co w konsekwencji obniża toksyczność związku. UGT zawiera 2 domeny. Domena N-końcowa jest odpowiedzialna za wiązanie aglikonu, zaś domena C-końcowa za wiązanie UDPGA. Cechą wyróżniającą tą grupę enzymów jest umiejscowienie w błonie siateczki śródplazmatycznej dzięki obecności transbłonowej części domeny C-końcowej. Wynika stąd latencja aktywności enzymów oraz fakt, że transport kofaktora UDPGA i produktów sprzęgania przez błonę wymaga specyficznych transporterów, odpowiednio nukleotydowych NST i anionowych AT_{ER} . UDP-glukuronylotransferazy funkcjonują przeważnie jako homo- lub heterodimery; niektóre z dimerów tworzą tetramery. U człowieka 19 białek UGT kodowanych jest przez 3 podrodziny genów *UGT1A*, *UGT2A* i *UGT2B*; produkty ich ekspresji występują przede wszystkim w wątrobie, w żółtku, w płucach i w nabłonku jelit.

WPROWADZENIE

UDP-glukuronylotransferazy (UGT) odgrywają u ssaków główną rolę w przemianach substancji, zarówno endo- jak i egzogennych, do form lepiej rozpuszczalnych w wodzie, poprzez sprzęganie ich z kwasem glukuronowym występującym w postaci kwasu UDP-glukuronowego. Głównym celem tej reakcji biotransformacji jest usuwanie z organizmu cząsteczek lipofilowych do żółci oraz moczu.

Procesy eliminacji ksenobiotyków z organizmu zachodzą na drodze przemian metabolicznych I i II fazy. Białka z rodziny cytochromów P-450 są głównymi enzymami fazy I, zaś UDP-glukuronylotransferazy to podstawowe katalizatory reakcji II fazy. II faza metabolizmu, obejmująca reakcje koniugacji, następuje zazwyczaj po I fazie, która jest odpowiedzialna za aktywację metabolizowanej cząsteczki. W wyniku reakcji II fazy powstaje produkt o silniejszych właściwościach hydrofilowych i w większości przypadków reakcje te obniżają aktywność biologiczną i wynikającą z niej toksyczność związku wyjściowego. Wyróżnia się kilka podstawowych typów reakcji koniugacji tj. sprzęganie z glukuronianem, siarczanem, glutationem, aminokwasami, a także reakcje acetylacji i metylacji. Wymagają one obecności kofaktorów, które muszą być dostarczane organizmowi z zewnątrz lub powstają w trakcie komórkowych przemian związków endogennych. W przeciwieństwie do enzymów I fazy, których rola oraz mechanizmy aktywacji zostały dość dobrze poznane, enzymom II fazy poświęcano jak dotąd mniej uwagi. Wciąż niewiele wiadomo na temat roli systemów detoksykacji nie tylko w metabolizmie ksenobiotyków, ale również związków endogennych.

UDP-glukuronylotransferazy obecne są w komórkach zarówno roślin i zwierząt, jak i bakterii. Analiza porównawcza ich sekwencji świadczy o tym, że – podobnie jak w przypadku enzymów cytochromu P450 – enzymy te ewoluowały ze wspólnego genu jeszcze przed różnicowaniem organizmów na pro- i eukariotyczne [1]. Enzymy UGT człowieka to nadrodzina 19 białek tworzących dwie rodziny [2], katalizujących reakcje koniugacji szerokiej gamy substancji endogennych i związków pochodzenia zewnętrznego (Ryc. 1). Przykładami endogennych substratów UDP-glukuronylotransferaz są bilirubina, hormony steroidowe, hormony tyroidowe, kwasy żółciowe oraz witaminy rozpuszczalne w tłuszczach. Metabolizując te składniki, UDP-glukuronylotransferazy w istotny sposób przyczyniają się do utrzymania homeostazy organizmu. Druga istotna funkcja tych enzymów to ochrona przed szkodliwymi kancerogenami, czynnikami zanieczyszczającymi środowisko oraz składnikami pożywienia, a także

Barbara Fedejko

Zofia Mazerska✉

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

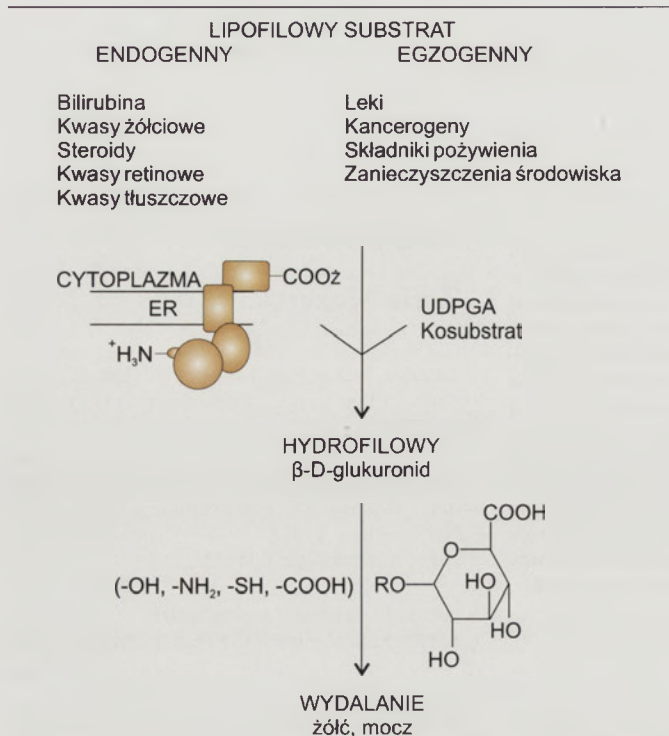
✉Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk; e-mail: zofia.mazerska@pg.gda.pl

Artykuł otrzymano 4 maja 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 19 lipca 2010 r.

Słowa kluczowe: detoksykacja ksenobiotyków, detoksykacja leków, glukuronidacja, UDP-glukuronylotransferazy, UGT

Wykaz skrótów: AT_{ER} – transporter anionowy; ER – siateczka śródplazmatyczna; NST – transporter nukleotydowy; UDP – urydynodifosforan; UDPGA – kwas urydyno-5'-difosforo-D-glukuronowy; UGT – UDP-glukuronylotransferaza



Rycina 1. Glukuronidacja lipofilowych substratów endo- i egzogennych (na podstawie [5]). Reakcja sprzężania z udziałem UDP-glukuroniltransferaz (EC 2.4.1.17) wymaga przeniesienia kosubstratu w postaci UDPGA na cząsteczkę hydrofobowego aglikonu, co prowadzi do utworzenia metabolitu o zwiększonej polarności, a w konsekwencji umożliwia jego wydalanie z moczem lub żółcią.

detoksykacja leków [3]. Szacuje się, że UGT odpowiedzialne są za metabolizm około 35% leków, które podlegają reakcjom fazy II [4].

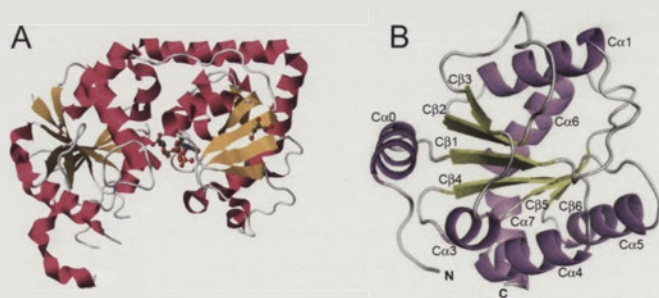
STRUKTURA UDP-GLUKURONYLOTANSFERAZ – ZALEŻNOŚĆ OD BŁONY SIATECZKI ŚRÓDPLAZMATYCZNEJ

Biorąc pod uwagę sekwencję reszt aminokwasowych i przewidywaną strukturę, UDP-glukuroniltransferazy należą do jednej z największych grup enzymów tj. glikozylotransferaz (GT). Glikozylotransferazy odgrywają istotną rolę w szeregu ważnych procesów biologicznych np. szlaku przekazywania sygnałów [6]. Pomimo znacznej różnorod-

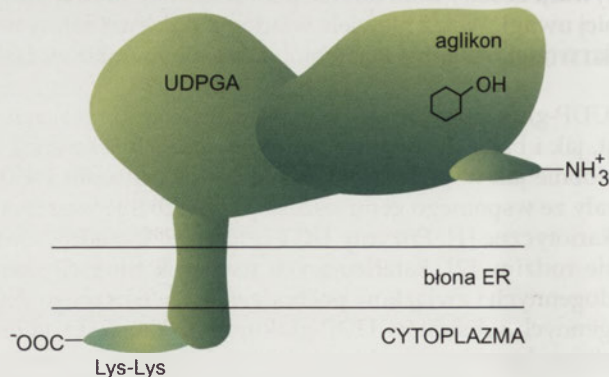
ności sekwencji reszt aminokwasowych i reakcji katalizowanych przez dziesiątki do tej pory sklasyfikowanych rodzin, glikozylotransferazy przyjmują jedną z dwu struktur GT-A lub GT-B [7]. UDP-glukuroniltransferazy należą do rodziny GT1, charakteryzujących się strukturą GT-B, na którą składają się, jak przedstawiono na rycinie 2A [8], dwie tzw. domeny Rossmanna, charakterystyczne dla białek wiążących nukleotydy, oddzielone rejonem łącznikowym. Proponowana struktura UGT oparta jest na podobieństwie sekwencji reszt aminokwasowych rejonów, których struktura zastała zachowana w ewolucji, do sekwencji poznanych struktur enzymów rodziny GT1 [9]. Dotychczas nie udało się określić całkowitej struktury krystalicznej żadnego enzymu UGT, chociaż przedstawiono strukturę krystaliczną dla C-końcowego fragmentu UGT2B7 człowieka (Ryc. 2B) [10]. Potwierdziła ona, że domena odpowiedzialna za oddziaływanie z UDPGA ma charakter domeny globularnej z motywem Rossmanna, w którym rdzeń białka tworzony jest przez sześć łańcuchów składających się na β -kartkę, otoczonych siedmioma α -helisami. Tym samym dowiedziono, że UGT podlegają fałdowaniu w sposób charakterystyczny dla białek rodziny GT-B. Nałożenie struktury krystalicznej fragmentu UGT2B7 na struktury roślinnych i bakteryjnych białek GT potwierdziło znaczące podobieństwo nie tylko w strukturze drugo- i trzeciorzędowej glikozylotransferaz, ale również umiejscowienie i sposób ich oddziaływania z kosubstratem. [11].

Jak wspomniano, UGT to białka zbudowane z dwóch głównych domen o łącznej wielkości 50-60 kDa. Tworzy je 529 lub 534 reszt aminokwasowych, włączając w to sekwencję sygnałową na N-końcu enzymu składającą się z 25 reszt. Sekwencja ta odpowiedzialna jest za kierowanie powstającego białka do ER, po czym jest odcinana [12]. Cała domena N-końcowa jak również przeważająca część domeny C-końcowej umiejscowione są w świetle siateczki śródplazmatycznej (Ryc. 3). Krótka helisa transbłonowa, złożona przypuszczalnie tylko z 17 reszt hydrofobowych, jest jedynym fragmentem białka będącym „kotwicą” enzymu. Podobnie „ogon” cytoplazmatyczny UDP-glukuroniltransferazy to jedynie 19-26 reszt.

Za obecność UGT w siateczce śródplazmatycznej odpowiada nie tylko sekwencja sygnałowa na N-końcu białka,



Rycina 2. (A) Struktura enzymów z rodziny GT-B na przykładzie β -glukozylotransferazy faga T4 w kompleksie z UDP-glukozą [8]. Rysunek wykonano na podstawie pliku 1j39 z bazy PDB (Protein Data Bank). (B) Struktura C-końcowej domeny enzymu UGT2B7 (kopia Ryc. 1 z [10] za zgodą wydawnictwa Elsevier), na którą składa się sześć łańcuchów tworzących β -kartkę i siedem otaczających je α -helis. Enzymy GT-B składają się z dwóch odległych domen oddzielonych szczeliną. Domena C-końcowa jest odpowiedzialna za wiązanie substratu w postaci donora nukleotydu, chociaż elementy podobne do „kieszeni” Rossmanna obecne są w obu domenach glikozylotransferaz.



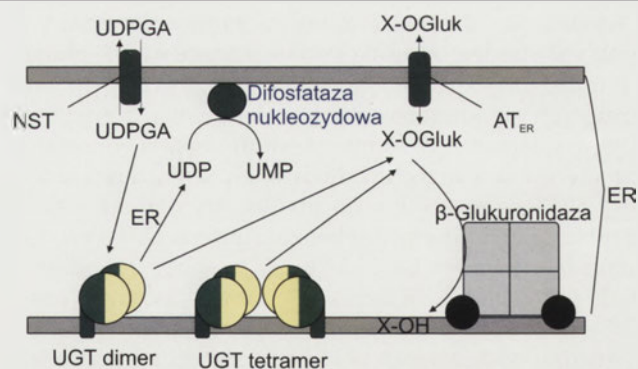
Rycina 3. Proponowany model umiejscowienia UDP-glukuroniltransferazy w błonie ER (na podstawie [16]). Cała domena N-końcowa (wiążąca aglikon) jak również przeważająca część domeny C-końcowej (wiążącej UDPGA) umiejscowione są w świetle siateczki śródplazmatycznej. Jedynym fragmentem białka będącym „kotwicą” enzymu w błonie ER jest krótka helisa transbłonowa. Podobnie krótki jest „ogon” cytoplazmatyczny białka UGT zawierający reszty lizyny.

lecz również obecność w części cytoplazmatycznej reszt lizyny w pozycji 3 i 4 lub 5. Wykazano bowiem, że białka zewnętrznej błony komórkowej oraz białka wydzielane, do których C-końcowego fragmentu dołączony został cytoplazmatyczny „ogon” pochodzący z UGT były błędnie kierowane do ER, zaś addycje lub delecje we fragmencie zawierającym właśnie 2 reszty lizyny zapobiegały błędnej lokalizacji tych białek [13,14]. Dodatkowo uważa się, że w oddziaływaniach z błonami ER biorą udział, oprócz fragmentu transbłonowego i ogona cytoplazmatycznego, również zewnętrznie umiejscowione hydrofobowe reszty aminokwasowe domeny wewnątrz światła siateczki śródplazmatycznej [15].

Centrum aktywne UGT znajduje się w świetle siateczki śródplazmatycznej. Jak przedstawia rycina 4, ze względu na niedostępność centrum aktywnego enzymu, przejście kofaktora jak i produktu sprzęgania przez błonę ER wymaga aktywności specyficznych transporterów. Takimi transporterami dla kofaktora UDPGA są transportery nukleotydowe, NST. Przejście kofaktora do wnętrza siateczki śródplazmatycznej odbywa się na zasadzie antyportu, gdzie UDPGA transportowany jest do światła ER, podczas gdy UDP-N-acetyloglukozamina do cytosolu. Po przejściu przez barierę jaką stanowi błona, UDPGA może zostać związany z enzymem. W wyniku reakcji powstaje glukuronid i UDP. Ten ostatni jest następnie defosforylowany przez difosfatazę nukleozydową do UMP. Powstały glukuronid dociera ze światła siateczki śródplazmatycznej do cytosolu na zasadzie ułatwionej dyfuzji z udziałem transporterów anionowych AT_{ER} lub poddany działaniu β -glukuronidazy przechodzi w związek wyjściowy [17].

Wykazano, że obecność UGT w komórce nie ogranicza się jedynie do błon ER, choć jest to główna lokalizacja tych enzymów. Wiadomo, że izoenzym UGT2B7 obecny jest również w błonie jądrowej, zarówno zewnętrznej (co nie dziwi, ponieważ jest ona połączona z siateczką śródplazmatyczną), ale i wewnętrznej oraz w jądrze komórkowym, gdzie prowadzona jest między innymi glukuronidacja substratu UGT2B7, morfiny [18]. Przypuszcza się, że funkcja jądrowych UDP-glukuronylotransferaz polega z jednej strony na ochronie białek i kwasów nukleinowych przeciw toksycznym efektom wywołanym przez substancje endo- i egzogenne oraz z drugiej, na regulacji poziomu ligandów receptorów jądrowych. W ten sposób UGT stanowią barierę dla związków mutagennych i kancerogennych, co jest szczególnie istotne w przypadku bliskości jądrowego DNA [18-21].

UDP-glukuronylotransferazy obecne we frakcji pęcherzyków mikrosomalnych izolowanych z wątroby ssaków wykazują tzw. latentę aktywności, czyli obserwuje się niską aktywność enzymatyczną dopóki znajdują się w nienaruszonych pęcherzykach mikrosomalnych. Cecha ta ujawnia się nie tylko w reakcjach *in vitro*, ale również ma znaczenie *in vivo*. Zaproponowano dwa modele wyjaśniające latentę aktywności. Hipoteza konformacyjna zakładała, że enzym dopiero po działaniu detergentu przyjmuje konformację aktywną, teoria przedziałowości zaś sugerowała, że miejsce aktywne białka jest wewnątrz pęcherzyka mikrosomalnego. Znana dziś transbłonowa topologia UDP-glukuronylotrans-



Rycina 4. Schemat lokalizacji oligomerów UGT, β -glukuronidazy i transporterów w świetle ER (na podstawie [17]). Przejście kofaktora, UDPGA, jak i produktu sprzęgania, X-O-Gluk, przez błonę siateczki umożliwiają transportery, odpowiednio, nukleotydowy, NST oraz anionowy AT_{ER} . Pierwszy przenosi kofaktor na zasadzie antyportu, drugi ułatwionej dyfuzji. UDPGA, wiążąc się z enzymem, bierze udział w tworzeniu glukuronidu, X-O-Gluk, który dociera do cytosolu lub poddany działaniu β -glukuronidazy przechodzi w związek wyjściowy, X-OH.

feraz zgodna jest z drugą hipotezą. Latencja białek UGT wynika z obecności bariery dla substratów, kofaktora i powstających produktów w postaci błony ER. Pełna zdolność do katalizowania reakcji sprzęgania z kwasem glukuronowym przez enzymy obecne w mikrosomach ujawnia się dopiero po zakłóceniu struktury błony lipidowej przez czynniki fizyczne (sonikacja, cykle zamrażania i rozmrażania) lub chemiczne (detergenty) [22]. Do niedawna standardowymi czynnikami stosowanymi w badaniach *in vitro* do usuwania latencji UDP-glukuronylotransferaz były detergenty. Mimo ich powszechnego stosowania w badaniach reakcji katalizowanych przez UGT napotymano na szereg problemów, m.in.: konieczność empirycznego wyznaczania optymalnych warunków reakcji, zależność ilości detergentu od użytych substratów i enzymów, ich wpływ na aktywność enzymów, zakłócenia w detekcji metabolitów, ograniczenia w badaniach zmierzających do określenia jednocześnie aktywności oksydacyjnej i glukuronidacyjnej, ze względu na hamowanie aktywności cytochromów P450, itp. Obecnie w badaniach *in vitro* stosuje się dodatek alametycyny, peptydu pochodzenia grzybowego, złożonego z 20 reszt aminokwasowych, który tworzy w błonie komórkowej pory w postaci kanałów jonowych. W ten sposób zapewnia swobodną dyfuzję substratom, kofaktorowi i produktom, bez rażącego naruszenia struktury warstwy lipidowej błony i bez zmiany aktywności enzymów mikrosomalnych, w tym cytochromów P450 [20].

MONOMERY CZY OLIGOMERY?

Wiedza na temat oddziaływań białko-białko wśród grupy UDP-glukuronylotransferaz jest ograniczona z dwóch powodów wynikających z silnych oddziaływań tych białek z błoną ER. Po pierwsze, trudna jest izolacja pojedynczych izoenzymów z ich mieszaniny pochodzącej z tkanek zwierzęcych, takich jak mikrosomy komórek wątroby [21]. Po drugie, otrzymywane poszczególne izoformy rekombinantowych enzymów UGT w postaci oczyszczonych białek nie odpowiadają w pełni właściwościom enzymów związanych z błonami [15]. W związku z tym istnieją trudności w zastoso-

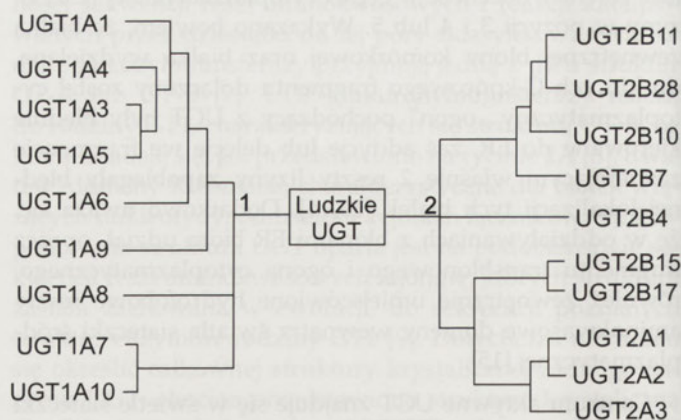
Badania wrażliwości enzymu na promieniowanie γ pozwoliły stwierdzić, że funkcjonalne jednostki UDP-glukuronylotransferazy składają się z heterogennej grupy enzymów różniących się znacznie masą molekularną, a enzymy te mogą występować w formie pojedynczej podjednostki lub oligomerów do czterech podjednostek. Wykazano, że tetramery UGT są niezbędne do utworzenia diglukuronidów: bilirubiny [22] i dihydroksybenzo(a)pirenu [23]. Przypuszczalnie homodimery UGT1A1 mogą ze sobą swobodnie oddziaływać w błonie ER tworząc tetramery. Istotnym jest, że UGT może tworzyć w błonach również heterodimery, np. w przypadku oddziaływań UGT2B1 z enzymami podrodziny UGT1A [24,25]. UGT2B1 występuje także w formie homodimerów, a domeną uczestniczącą w oddziaływaniu jest domena N-końcowa [26]. Przełomem w pracach nad dimerami UGT była praca Meech'a i Mackenzie'go [26], w której dowiedziono, że oligomeryzacja dwóch nieaktywnych białek może prowadzić do powstania jednostki funkcjonalnej. Stosując technikę FRET (rezonansowe przeniesienie energii fluorescencji) stwierdzono, że w żywych komórkach białka UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 i UGT1A10 ulegają homodimeryzacji, zaś UGT1A1 wiąże się z UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 i UGT1A10 [27]. Najnowsze doniesienia potwierdzają, że nie tylko UGT2B1 z rodziny UGT2B oligomeryzuje. UGT2B7 również tworzy homo- jak i heterooligomery z enzymami UGT1A [28].

Konsekwencje struktury czwartorzędowej w aspekcie funkcji UGT w komórkach nie zostały wyjaśnione. Sugeruje się, że obecność oligomerów może dwójako wpływać na aktywność białka: (1) aglikon jest wiązany przez obydwa monomery w dimerze, przy założeniu, że każdy monomer bezpośrednio bierze udział w tym oddziaływaniu; (2) oligomeryzacja UGT jest niezbędna do przeniesienia UDPGA z cytosolu do światła ER poprzez utworzenie kanału przez fragmenty transbłonowe [29]. Pierwsza z hipotez może wyjaśniać szeroką i częściowo pokrywającą się specyficzność substratów UGT.

EKSPRESJA GENÓW KODUJĄCYCH BIAŁKA UGT W KOMÓRKACH CZŁOWIEKA

19 znanych UDP-glukuronylotransferaz człowieka (Ryc. 5) jest kodowanych przez dwie rodziny genów *UGT1* i *UGT2*, które ze względu na podobieństwo sekwencji, podzielono dalej na 3 podrodziny: *UGT1A*, *UGT2A* i *UGT2B*. Homologia sekwencji DNA wśród enzymów danej rodziny wynosi przynajmniej 50%, zaś wśród enzymów danej podrodziny co najmniej 60% [30-33].

Wszystkie izoformy rodziny *UGT1* kodowane są przez gen zawierający około 210 kpz, który zlokalizowany jest na chromosomie 2 (2q37) i składa się z 17 eksonów. Cztery dalsze eksony (2-5) kodują C-końcową część sekwencji białka, natomiast trzynaście pierwszych eksonów (1A1-1A3P) odpowiedzialne jest za kodowanie N-końcowej sekwencji poszczególnych izoform UGT. mRNA kodujący każdą z izoform jest generowany przez odmienny splicing i fuzję jednego z bliższych zmiennego eksonu i czterech dalszych eksonów. Mechanizm ten prowadzi do powstania izoform



Rycina 5. Drzewo filogenetyczne enzymów z rodziny UGT człowieka (na podstawie [32]).

UGT1 z odmienną domeną N-końcową, ale identyczną częścią C-końcową. Funkcjonalna część białka kodowana jest przez dziewięć eksonów: 1, 3-10. Eksony 2, 11, 12, 13 są pseudogenami zawierającymi nonsensowne mutacje, a mianowicie kodony stop [5,34].

W przeciwieństwie do izoenzymów UGT1, białka UGT2 są kodowane przez niezależne geny [5]. mRNA rodziny UGT2 jest transkrybowany z czterech odmiennych genów, każdy złożony z sześciu eksonów. Rodzina UGT2 podzielona jest na dwie podrodziny UGT2A i UGT2B w zależności od sekwencji reszt aminokwasowych. Obie podrodziny UGT2 człowieka kodowane są przez niewielką grupę genów zlokalizowanych na chromosomie 4 (4q13) człowieka, zawierającym pięć pseudogenów. Sekwencja UGT2A jest w ponad 70% podobna do sekwencji izoform UGT2B. Ponieważ transkrypcja mRNA białek UGT2B zachodzi na matrycy oddzielnych genów, C-końcowa domena poszczególnych członków rodziny UGT2B nie jest identyczna. Jednak homologia domeny C-końcowej izoform UGT2B jest dużo wyższa w porównaniu z sekwencją N-końcową [5,34,35].

Wątroba jest najważniejszym, choć nie jedynym, organem, w którym zachodzi reakcja glukuronidacji. W wątrobie obecne są enzymy z obydwu rodzin UGT tj. UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17 i UGT2B28. Enzymami występującymi poza wątrobą są UGT1A7 obecny w przełyku, żołądku i płucach, UGT1A8 i UGT1A10, których synteza ma miejsce w przewodzie pokarmowym oraz UGT2A1 znajdujący się głównie w komórkach nabłonkowych nosa. mRNA kodujący szereg UDP-glukuronylotransferaz obecny jest także w komórkach nabłonka jelit. W nerkach obecne są izoformy UGT z obydwu rodzin, a poziom UGT2B7 w tym organie dorównuje syntezie w wątrobie. Enzymy z rodziny UGT2B obecne są też w tkankach charakteryzujących się wysokim poziomem hormonów steroidowych tj. w gruczołach piersi i prostaty [34].

MECHANIZM REAKCJI GLUKURONIDACJI

Spośród szeregu reakcji metabolizmu II fazy, sprzęganie z kwasem glukuronowym uważane jest za podstawę detoksykacji, ze względu na znaczną liczbę substratów będących

w spektrum działania UDP-glukuronylotransferaz [35].

Reakcja glukuronidacji ma na celu przeniesienie kwasu α -D-glukuronowego z kwasu urydyno-5'-difosfo-D-glukuronowego na odpowiednią grupę funkcyjną cząsteczki leku lub jego metabolitu. Kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy, aktywna forma kwasu glukuronowego, powstaje w cytosolu w cyklu reakcji rozpoczynających się od glukozy, przy udziale UDP i w obecności NAD [35]. Cząsteczka ulegająca reakcji z UDPGA musi zawierać odpowiednią grupę funkcyjną: hydroksylową, tiolową, aminową, sulfonamidową bądź karboksylową. Jak przedsta-

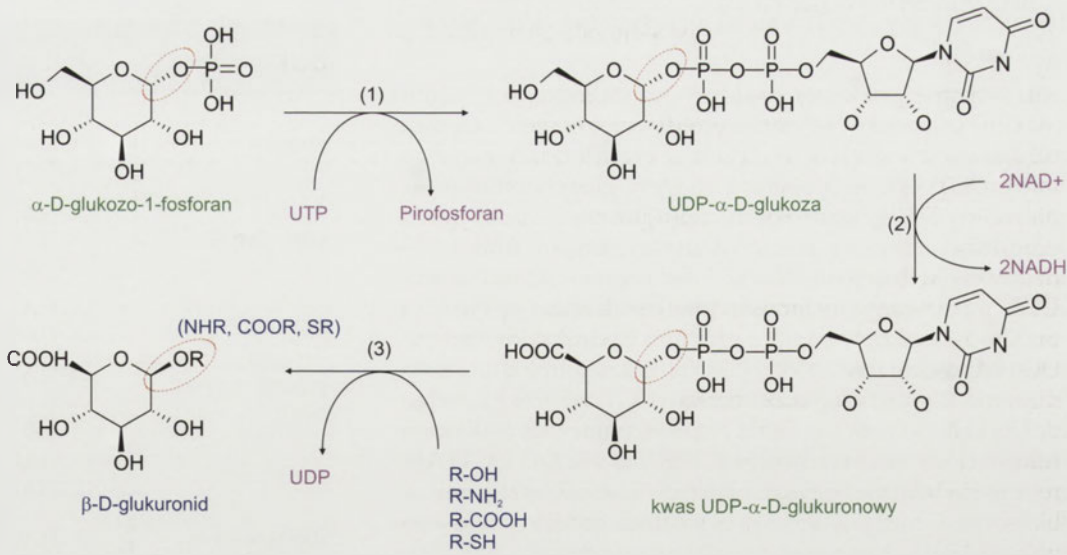
wiono na rycinie 6 produktem reakcji są β -D-glukuronidy, wśród których wyróżniamy O-, N-, C-, lub S-glukuronidy [36-39]. Wszystkie są znacznie bardziej hydrofilowe niż macierzyste substraty czy metabolity fazy pierwszej. Wyższa hydrofilowość niesie konsekwencje w postaci lepszej rozpuszczalności takiego metabolitu i powoduje zwiększenie jego wydzielania do nerek. Natomiast glukuronidy słabiej rozpuszczalne w wodzie, wydzielone do żółci, mogą być zawracane do obiegu, po hydrolizie do macierzystego leku katalizowanej przez β -glukuronidazę. Następnie wyjściowa forma leku ulega resorpcji jelitowej, co prowadzi do jej akumulacji w organizmie. Przykładem leku wywołującego tą drogą niepożądane objawy ze strony przewodu pokarmowego jest irinotekan, którego glukuronid po hydrolizie przez β -glukuronidazy odpowiedzialny jest za toksyczność irinotekanu, polegającą na bezpośrednim uszkodzeniu śluzówki jelit [38]¹.

Najbardziej podatnymi na glukuronidację miejscami w metabolizowanych cząsteczkach są nukleofilowe atomy tlenu lub azotu, będące akceptorem kwasu cukrowego. Wykazano, że glukuronidacja zachodzi ze zmianą konfiguracji węgla anomerycznego [40], co obok innych przesłanek [41] świadczy o mechanizmie substytucji S_N2 , w którym następuje atak nukleofilowego heteroatomu aglikonu na atom C₁ kwasu glukuronowego.

WIĄZANIE KOSUBSTRATU

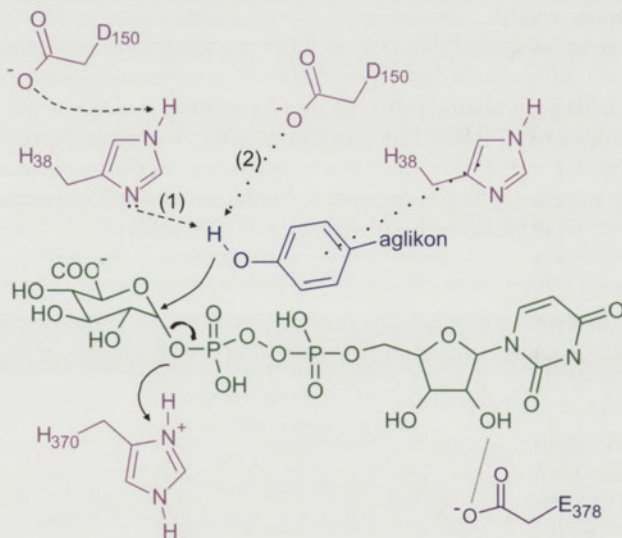
Pierwsze sugestie dotyczące miejsca wiązania UDPGA w domenie C-końcowej pojawiły się 20 lat temu [42]. Następnie, dzięki technice znakowania fotopowinowactwa [43], oraz porównywania sekwencji reszt aminokwasowych

¹ Rola metabolizmu irinotekanu z UGT została szerzej opisana w artykule pt. "UDP-glukuronylotransferazy w metabolizmie detoksykacyjnym i aktywacyjnym związków endogennych oraz ksenobiotyków" zamieszczonym w niniejszym numerze „Postępów Biochemii”.



Rycina 6. Synteza kwasu UDP-glukuronowego i zmiana jego konfiguracji $\alpha \rightarrow \beta$ (zaznaczona czerwoną linią) w czasie reakcji glukuronidacji (na podstawie [39]). (1) Pirofosforylaza UDP-glukozy katalizuje syntezę α -UDP-glukozy, która utleniana jest (2) do właściwego kofaktora przez dehydrogenazę UDP-glukozy bez zmiany konfiguracji wiązania glikozydowego. Reakcja sprzężania aglikonu (3) przez UGT prowadzi do powstania β -glukuronidu, ponieważ atak nukleofilowego atomu substratu następuje po przeciwnej stronie wiązania kwasu glukuronowego z UDP.

i struktury białek [29] określono, że kluczowymi dla wiązania kosubstratu w domenie UDP-glukuronylotransferaz są reszty 350-400. Wiadomo, że reszta His370 oddziałuje z grupą fosforanową, co przedstawiono na rycinie 7, podobnie jak ma to miejsce w innych glikozylotransferazach (GtfA – His293, GtfD – His309), w których reszta histydyny odgrywa kluczową rolę w mechanizmie katalitycznym. Przypuszczalnie jej funkcja polega na stabilizacji grupy odchodzącej. Natomiast Glu378 tworzy prawdopodobnie wiązania wodorowe z 2' i 3' OH rybozy, a za oddziaływanie z grupami hydroksylowymi kwasu glukuronowego mogą odpowiadać zachowane w ewolucji reszty Asp395 oraz Gln396 [44]. Zaproponowano, że ugrupowanie indo-



Rycina 7. Proponowany mechanizm reakcji glukuronidacji katalizowanej przez UGT1A6 (na podstawie [48]). His370 domeny C-końcowej oddziałuje z grupą fosforanową kosubstratu, Glu378 oddziałuje z grupą hydroksylową rybozy, natomiast His38 i Asp150 domeny N-końcowej są odpowiedzialne za deprotonację aglikonu. (1) His38 dzięki oddziaływaniom z sąsiadującą Asp150 odpowiedzialna jest za deprotonację aglikonu. (2) Inny mechanizm, również uwzględniający kluczową rolę tych reszt zakłada, że to Asp150 uczestniczy w deprotonacji substratu, a His38 oddziałuje z nim i determinuje tym samym specyficzność enzymu.

lowe Trp353, grupa karbonylowa i aminowa Leu354 oraz łańcuch boczny Arg335 mogą uczestniczyć w stabilizacji uracylu [45].

Uzyskanie pierwszej struktury krystalicznej fragmentu UGT2B7 człowieka [10], a następnie wprowadzenie mutacji punktowych w obrębie tej struktury oraz jej porównanie do wcześniej poznanych białek z rodziny glikozylotransferaz pozwoliło ustalić, które reszty aminokwasowe uczestniczą w oddziaływaniach z poszczególnymi grupami funkcyjnymi UDPGA. Resztami UGT2B7 tworzącymi wiązania wodorowe z grupami fosforanowymi kosubstratu są Thr373 i His374, za oddziaływania z grupami hydroksylowymi rybozy odpowiadają Asp398 i Gln399. Szczególnie istotna dla wiązania kosubstratu przez enzymy UGT, również z rodziny UGT1A, wydaje się reszta Asp398, ponieważ wykazano całkowitą utratę aktywności UGT2B7, UGT1A6 i UGT1A10 po mutacji właśnie tej reszty. Postuluje się, że reszty aminokwasowe domeny N-końcowej również uczestniczą w stabilizacji UDPGA poprzez oddziaływanie Arg49 i Arg259 z ujemnie naładowaną grupą karboksylową rybozy [11].

WIĄZANIE AGLIKONU

W wiązaniu aglikonu uczestniczy domena N-końcowa, którą charakteryzuje większy, w porównaniu do domeny C-końcowej, stopień zmienności, co prawdopodobnie umożliwia metabolizm szerokiej gamy substratów enzymów UGT. Są nimi zazwyczaj związki o strukturze pierścieniowej, aromatyczne, wysoce hydrofobowe, a nawet lipidy. Przypuszcza się, że reszty 140 – 240 mogą być pomocne w dotarciu silnie lipofilowym substratom do miejsca aktywnego enzymu [46].

Najbardziej prawdopodobnym obszarem uczestniczącym w oddziaływaniach z aglikonem wśród enzymów z podrodziny UGT1A są reszty 36-40, wśród których najważniejszą funkcję odgrywa His38 (Ryc. 7). Jest to aminokwas obecny w tym miejscu we wszystkich białkach podrodziny, z wyjątkiem UGT1A4, w którym zastąpiony jest przez Pro40. Rola reszty histydyny polega na deprotonacji grupy hydroksylowej substratu. Drugą kluczową resztą domeny N-końcowej jest Asp150, która powoduje deprotonację reszty histydyny [45,47]. Inny mechanizm również uwzględniający kluczową rolę tych reszt zakłada, że to Asp150 uczestniczy w deprotonacji substratu, a His38 oddziałuje z nim

Tabela 1. Oddziaływania pomiędzy UDP-glukuronylotransferazami.

Izoenzymy		Rodzaj oddziaływań	Lit.
UGT1A1	UGT1A1	homodimeryzacja, homotetrameryzacja	22,24
UGT1A6/7	nie zidentyfikowano	dimeryzacja, tetrameryzacja	23
UGT1A	UGT2B1	heterodimeryzacja	25
UGT1A	UGT2B7	heterodimeryzacja	28
UGT2B1	UGT2B1	homodimeryzacja	26
UGT2B7	UGT2B7	homodimeryzacja	28
UGT1A	UGT1A	homodimeryzacja	27
UGT2B21	UGT2B22	heterodimeryzacja	30,31

Tabela 2. Rozmieszczenie w tkankach poszczególnych izoenzymów UGT.

Miejsce syntezy białka	Izoenzym
wątroba	UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17, UGT2B28
jelito cienkie	UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A8, UGT1A10, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B15
jelito grube	UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B7
przełyk, żołądek, płuca	UGT1A1, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B4, UGT2B15
nerki	UGT1A6, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B7
śluzówka nosa	UGT1A6, UGT1A7, UGT2A1
prostata	UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17
błona śluzowa macicy	UGT1A1, UGT1A3, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B7
jajnik	UGT1A9, UGT2B4, UGT2B15, UGT2B17
mózg	UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6, UGT2A1, UGT2B7
pierś	UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B28

i determinuje tym samym specyficzność enzymu [47,48]. Dodatkowo resztami, które zidentyfikowano jako kluczowe dla aktywności UGT1A10 są Phe90 i Phe93, które stabilizują aglikon poprzez oddziaływania warstwowe [49]. Wśród enzymów drugiej podrodziny, UGT2B, znaczenie katalityczne ma aromatyczna reszta w pozycji 33: fenyloalaniny dla UGT2B4 i tyrozyny dla UGT2B7 [50].

KOLEJNOŚĆ WIĄZANIA KOSUBSTRATU I AGLIKONU

Mechanizm katalityczny enzymów, które wykorzystują dwa substraty (UDPGA oraz aglikon w przypadku UGT) może zostać sklasyfikowany jako sekwencyjny, w którym obydwa substraty muszą utworzyć z enzymem kompleks trzeciorzędowy, lub jako tzw. typ ping-pong, gdzie przynajmniej jeden z substratów jest wiązany po uwolnieniu pierwszego z produktów. Wiadomo, że UDP-glukuronylotransferazy należą do pierwszej z wymienionych grup. Dodatkowo wyniki badań nad kolejnością wiązania poszczególnych substratów do enzymu skłaniają do stwierdzenia, że jest ona nieprzypadkowa, przy czym UDPGA jako pierwsze oddziałuje z enzymem. Potwierdzają to doświadczenia z wykorzystaniem 8 rekombinantowych enzymów człowieka z podrodziny UGT1A [51].

PODSUMOWANIE

Podobnie jak cytochromy P-450 – UGT-glukuronylotransferazy pełnią główną rolę w szlakach metabolicznych zarówno substancji endogennych jak i ksenobiotyków. Mimo odmiennych mechanizmów ich aktywności katalitycznej oba białka są dość silnie zakotwiczone w lipofilo-

wym środowisku błon siateczki śródplazmatycznej. Co więcej, ich centra aktywności dostosowane są do substratów o niskiej polarności i dzięki różnorodności form izoenzymów charakteryzują się bardzo szeroką specyficznością substratową. Cechy te umożliwiają obu enzymom funkcję katalizatorów szerokiego zakresu reakcji prowadzących do detoksykacji endo- i egzogennych związków lipofilowych.²

PIŚMIENNICTWO

1. Bock KW (2003) Vertebrate UDP- glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects. *Biochem Pharmacol* 66: 691-696
2. Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger S, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Roy Chowdhury J, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW (1997) The UDP-glucuronosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7: 255-269
3. Tukey RH, Strassburg CP (2000) Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 581-616
4. Evans WE, Relling MV (1999) Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286: 487-491
5. Guillemette C (2003) Pharmacogenomics of human UDP- glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J* 3: 136-158
6. Breton C, Snajdrova L, Jeanneau C, Koca J, Imberty A (2006) Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* 16: 29-37
7. Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG (2008) Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annu Rev Biochem* 77: 521-555
8. Larivière L, Gueguen-Chaignon V, Moréra S (2003) Crystal structures of the T4 phage beta-glucosyltransferase and the D100A mutant in complex with UDP-glucose: glucose binding and identification of the catalytic base for a direct displacement mechanism. *J Mol Biol* 330: 1077-1086
9. Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, Henrissat B (1997) A classification of nucleotidediphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 326: 929-939
10. Miley MJ, Zielinska AK, Keenan JE, Bratton SM, Radomska-Pandya A, Redinbo MR (2007) Crystal structure of the cofactor-binding domain of the human phase II drug-metabolism enzyme UDP-glucuronosyltransferase 2B7. *J Mol Biol* 369: 498-511
11. Radomska-Pandya A, Bratton SM, Redinbo MR, Miley MJ (2010) The crystal structure of human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 C-terminal end is the first mammalian UGT target to be revealed: the significance for human UGTs from both the 1A and 2B families. *Drug Metab Rev* 42: 128-139
12. Kurkela M, García-Horsman JA, Luukkanen L, Mörsky S, Taskinen J, Baumann M, Kostianen R, Hirvonen J, Finel M (2003) Expression and characterization of recombinant human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs). *J Biol Chem* 278: 3536-3544
13. Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 9: 3153-3162
14. Kinosaki M, Masuko T, Sogawa K, Iyanagi T, Yamamoto T, Hashimoto Y, Fujii-Kuriyama Y (1993) Intracellular localization of UDP-glucuronosyltransferase expressed from the transfected cDNA in cultured cells. *Cell Struct Funct* 18: 41-51
15. Meech R, Mackenzie PI (1998) Determinants of UDP glucuronosyltransferase membrane association and residency in the endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 356: 77-85
16. Mulder GJ (1992) Glucuronidation and its role in regulation of biological activity of drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32: 25-49

² Charakterystyka substratów UGT została przedstawiona w artykule pt. "UDP-glukuronosyltransferazy w metabolizmie detoksykacyjnym i aktywacyjnym związków endogennych oraz ksenobiotyków" zamieszczonym w niniejszym numerze „Postępy Biochemii”.

17. Bock KW, Kohle C (2009) Topological aspects of oligomeric UDP-glucuronosyltransferases in endoplasmic reticulum membranes: Advances and open questions. *Biochem Pharmacol* 77: 1458-1465
18. Radomska-Pandya A, Pokrovskaya ID, Xu J, Little JM, Jude AR, Kurten RC, Czernik PJ (2002) Nuclear UDP-glucuronosyltransferases: identification of UGT2B7 and UGT1A6 in human liver nuclear membranes. *Arch Biochem Biophys* 399: 37-48
19. Meech R, Mackenzie PI (1997) Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24: 907-915
20. Fisher MB, Campanale K, Ackermann BL, VandenBranden M, Wrighton SA (2000) In vitro glucuronidation using human liver microsomes and the pore-forming peptide alamethicin. *Drug Metab Dispos* 28: 560-566
21. Finel M, Kurkela M (2008) The UDP-glucuronosyltransferases as oligomeric enzymes. *Curr Drug Metab* 9: 70-76
22. Peters WHM, Jansen PLM, Nauta H (1984) The molecular weights of UDP-glucuronosyltransferase determined with radiation-inactivation analysis. *J Biol Chem* 259: 11701-11706
23. Gschaidmeier H, Bock KW (1994) Radiation inactivation analysis of microsomal UDP-glucuronosyltransferases catalysing mono- and diglucuronide formation of 3,6-dihydroxybenzo(a)pyrene and 3,6-dihydroxychrysene. *Biochem Pharmacol* 48: 1545-1549
24. Ghosh SS, Sappal BS, Kalpana GV, Lee SW, Chowdhury JR, Chowdhury NJ (2001) Homodimerization of human bilirubinuridine-diphosphate glucuronosyltransferase-1 (UGT1A1) and its functional implications. *J Biol Chem* 276: 42108-42115
25. Ikushiro S, Emi Y, Iyanagi T (1997) Protein-protein interactions between UDP-glucuronosyltransferase isozymes in rat hepatic microsomes. *Biochemistry* 36: 7154-7161
26. Meech R, Mackenzie PI (1997) UDP-glucuronosyltransferase, the role of the amino terminus in dimerization. *J Biol Chem* 272: 26913-26917
27. Operana TN, Tukey RH (2007) Oligomerization of the UDPglucuronosyltransferase 1A proteins. *J Biol Chem* 282: 4821-4829
28. Fujiwara R, Nakajima M, Oda S, Yamanaka H, Ikushiro S, Sakaki T, Yokoi T (2010) Interactions between human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B7 and UGT1A enzymes. *J Pharm Sci* 99: 442-454
29. Radomska-Pandya A, Czernik PJ, Little JM, Battaglia E, Mackenzie PI (1999) Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev* 31: 817-899
30. Ishii Y, Miyoshi A, Watanabe R, Tsuruda K, Tsuda M, Yamaguchi-Nagamatsu Y, Yoshisue K, Tanaka M, Maji D, Ohgiya S, Oguri K (2001) Simultaneous expression of guinea pig UDP-glucuronosyltransferase 2B21 and 2B22 in COS-7 cells enhances UDP-glucuronosyltransferase 2B21-catalyzed morphine-6-glucuronide formation. *Mol Pharmacol* 60: 1040-1048
31. Ishii Y, Miyoshi A, Maji D, Yamada H, Oguri K (2004) Simultaneous expression of guinea pig UDPglucuronosyltransferase 2B21 and 2B22 in COS-7 cells enhances UDP-glucuronosyltransferase 2B21-catalyzed chloramphenicol glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 32: 1057-1060
32. Guillemette C, Lévesque E, Harvey M, Bellemare J, Menard V (2010) UGT genomic diversity: beyond gene duplication. *Drug Metab Rev* 42: 22-42
33. Burchell B (2003) Genetic variation of human UDP-Glucuronosyltransferase: Implications in disease and drug glucuronidation. *Am J Pharmacogenomics* 3: 37-52
34. Kiang TK, Ensom MH, Chang TK (2005) UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther* 106: 97-132
35. Ionescu C, Caira MI (2005) *Drug Metabolism: Current Concepts*, Publisher Springer, Dordrecht, The Netherlands
36. Ritter JK (2000) Roles of glucuronidation and UDP- glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact* 129: 171-193
37. Dutton GJ (1980) *Glucuronidation of Drugs and Other Compounds*. CRC Press Inc., Boca Raton, USA

38. Alimonti A, Gelibter A, Pavese I, Satta F, Cognetti F, Ferretti G, Rasio D, Vecchione A, Di Palma M (2004) New approaches to prevent intestinal toxicity of irinotecan-based regimens. *Cancer Treat Rev* 30: 555-562
39. Parkinson A, Ogilvie BW (2008) Biotransformation of xenobiotics, W: Klaassen CD (red) Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. The McGraw-Hill Companies, USA, str. 161-304
40. Johnson LP, Fenselau C (1978) Enzymatic conjugation and hydrolysis of [18O]isoborneol glucuronide. *Drug Metab Dispos* 6: 677-679
41. Yin H, Bennett G, Jones JP (1994) Mechanistic studies of uridine diphosphate glucuronosyltransferase. *Chem Biol Interact* 90: 47-58
42. Mackenzie PI (1990) Expression of chimeric cDNAs in cell culture defines a region of UDP glucuronosyltransferase involved in substrate selection. *J Biol Chem* 265: 3432-3435
43. Pillot T, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, Lafaurie C, Tebbi D, Treat S, Radomska A, Lester R, Siest G, Magdalou J (1993) Determination of the human liver UDPglucuronosyltransferase 2B4 domains involved in the binding of UDP-glucuronic acid using photoaffinity labeling of fusion proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 785-791
44. Patana A-S, Kurkela M, Goldman A, Finel M (2007) The human UDP-Glucuronosyltransferase: identification of key residues within the nucleotidesugar binding site. *Mol Pharmacol* 72: 604-611
45. Locuson CW, Tracy TS (2007) Comparative modelling of the human UDPglucuronosyltransferases: insights into structure and mechanism. *Xenobiotica* 37: 155-168
46. Radomska-Pandya A, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, Magdalou J (2005) Structure of UDP-glucuronosyltransferases in membranes. *Methods Enzymol* 400: 116-147
47. Li D, Fournel-Gigleux S, Barre L, Mulliert G, Netter P, Magdalou J, Ouzzine M (2007) Identification of Aspartic Acid and Histidine Residues Mediating the Reaction Mechanism and the Substrate Specificity of the Human UDP-glucuronosyltransferases 1A. *J Biol Chem* 282: 36514-36524
48. Magdalou J, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M (2010) Insights on membrane topology and structure/function of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev* 42: 154-161
49. Xiong Y, Bernardi D, Bratton S, Ward MD, Battaglia E, Finel M, Drake RR, Radomska-Pandya A (2006) Phenylalanine 90 and 93 are localized within the phenol binding site of human UDP-glucuronosyltransferase 1A10 as determined by photoaffinity labeling, mass spectrometry, and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 45: 2322-2332
50. Barré L, Fournel-Gigleux S, Finel M, Netter P, Magdalou J, Ouzzine M (2007) Substrate specificity of the human UDP-glucuronosyltransferase UGT2B4 and UGT2B7. Identification of a critical aromatic amino acid residue at position 33. *FEBS J* 274: 1256-1264
51. Luukkanen L, Taskinen J, Kurkela M, Kostainen R, Hirvonen J, Finel M (2005) Kinetic characterization of the 1A subfamily of recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos* 33: 1017-1026

UDP-glucuronyltransferases, proteins of endoplasmic reticulum – structure and mechanism of action

Barbara Fedejko, Zofia Mazerska 

Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Chemical Faculty, Gdansk University of Technology, 11/12 Narutowicza St., 80-233 Gdansk, Poland

 e-mail: zofia.mazerska@pg.gda.pl

Key words: drug detoxification, glucuronidation, UDP-glucuronosyltransferases, UGT, xenobiotic detoxification

ABSTRACT

UDP-glucuronyltransferase isoenzymes, UGTs, are responsible in mammals for conjugation of glucuronic acid generated by UDPGA with aglicon. UDPGA is bound to the appropriate group of I phase metabolite or, occasionally, to the native compound. As a result, the aglicon polarity increases, excretable product in human urine is formed and, in turn, toxic effects are reduced. UGT protein structure consists of 2 domains. N-terminal catalyses of aglicon binding, whereas, C-terminal controls the addition of uridine-5'-diphosphoglucuronic acid. UGTs are anchored in endoplasmic reticulum, ER, by transmembrane fragment of C-terminal domain. The membrane location results in the latency of enzyme activity and demands specific transporters for cofactor as well as for conjugation products. There are NST and AT_{ER}, respectively. UDP-glucuronyltransferases exist usually as homo- and heterodimers, some of them are tetramers. 19 human UGT proteins are described by 3 gene subfamilies, *UGT1A*, *UGT2A* and *UGT2B*, which are expressed preferentially in the liver, but also in stomach, lung and intestine epithelium.

UDP-glukuronylotransferazy w metabolizmie detoksykacyjnym i aktywacyjnym związków endogennych oraz ksenobiotyków

STRESZCZENIE

Glukuronidacja jest główną drogą koniugacji w szlakach metabolizmu i wydalania związków endogennych oraz ksenobiotyków. Reakcja ta jest katalizowana przez UDP-glukuronylotransferazy (UGT), dla których substratami są bilirubina, hormony steroidowe, tyroidowe i kwasy żółciowe oraz związki egzogenne, w tym leki, związki kancerogenne, chemiczne zanieczyszczenia środowiska i składniki żywności. Z terapeutycznego punktu widzenia szczególnie istotny jest udział UGT w biotransformacji leków, w tym leków przeciwnowotworowych. Wiadomo, że występują znaczne różnice osobnicze w zdolności do koniugacji z kwasem glukuronowym, co spowodowane jest polimorfizmem genów podrodzin UGT1A i UGT2B. Zazwyczaj reakcja glukuronidacji prowadzi do dezaktywacji ksenobiotyków i umożliwia wydalanie hydrofilowych koniugatów, co powoduje obniżenie ich toksyczności. Jednak poznano szereg glukuronidów, m.in. glukuronidy acylowe kwasów karboksylowych, 6-O-glukuronid morfiny i glukuronidy retinoidów, o reaktywności zachowanej lub podwyższonej w porównaniu ze związkiem wyjściowym. Wykazują one porównywalną lub silniejszą zdolność do wiązania się z cząsteczkami strukturalnymi w komórce, a w konsekwencji zachowaną lub podwyższoną toksyczność.

WPROWADZENIE

Sprzęganie z kwasem glukuronowym jest podstawową reakcją biotransformacji ksenobiotyków i odpowiada za eliminację 40-70% związków egzogennych. UDP-glukuronylotransferazy (UGT) uczestniczą w przeniesieniu fragmentu glukuronowego z kosubstratu UDPGA na jedną lub kilka grup elektrofilowych akceptora o właściwościach hydrofobowych. Substraty o budowie alkoholi alifatycznych lub fenoli koniugowane są do eterów O-glukuronidowych, natomiast związki zawierające grupy karboksylowe tworzą estry - glukuronidy acylowe. O-glukuronidy są najpowszechniejsze. Cząsteczki z ugrupowaniem fenolowym i karboksylowym, takie jak kwas mykofenolowy lub diflunisal mogą być metabolizowane do obydwu typów glukuronidów. Glukuronidacja pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowych amin prowadzi do utworzenia N-glukuronidów. Natomiast poznano stosunkowo mało S- i C-glukuronidów (Tab. 1) [1].

Tabela 1. Klasyfikacja leków metabolizowanych do glukuronidów ze względu na rodzaj powstającego koniugatu (na podstawie [1]).

O-glukuronidy		C-glukuronidy	N-glukuronidy	S-glukuronidy
hydroksylowe	karboksylowe	karbonylowe	aminy, amidy, sulfonamidy	tiolowe
buprenorfina	benoksaprofen	feprazon	amitriptylina	disulfiram
chloramfenikol	citalopram	fenylbutazon	chloropromazyna	metimazol
kodeina	kwas kłofibrowy	sulfinpirazon	citalopram	
diflunisal	diklofenak	fenoprofen	klozapina	
ezetymib	diflunisal		difenhydramina	
lorazepam	furosemid		doksepina	
morfina	ibuprofen		imipramina	
kwas mykofenolowy	moksyflokscyna		indinawir	
oksazepam	kwas mykofenolowy		ketotifen	
paracetamol	kwas nalidyksowy		lamotrygina	
propofol	naproksen		meksyletyna	
propranolol	kwas salicylowy		olanzapina	
zydowudyna	kwas walproinowy		tamoksyfen	

Barbara Fedejko

Zofia Mazerska

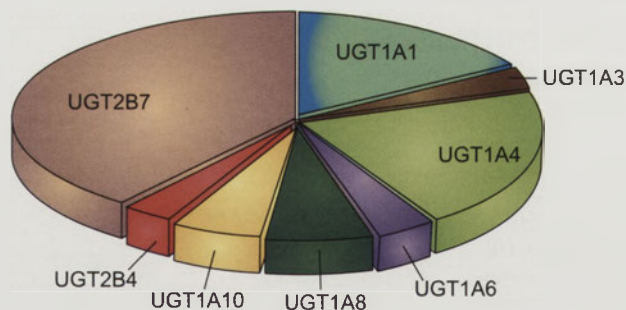
Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk; e-mail: zofia.mazerska@pg.gda.pl

Artykuł otrzymano 4 maja 2010 r.
Artykuł zaakceptowano 19 lipca 2010 r.

Słowa kluczowe: aktywacyjna glukuronidacja, biotransformacja leków, detoksykacja ksenobiotyków, izoenzymy UGT, UDP-glukuronylotransferazy

Wykaz skrótów: AAF, 2-acetyloaminofluoren; CN-I/-II, syndrom Criglera-Najjara I/II; CYP, cytochrom P450; NLPZ, niesteroidowe leki przeciwzapalne; NNAL, 4-(metylonitrozamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol; SN-38, aktywny metabolit irinotekanu; 7-etylo-10-hydroksykamptotecyna; UDPGA, kwas urydyno-5'-difosforo-D-glukuronowy; UGT, UDP-glukuronylotransferaza



Rycina 1. Procentowy udział poszczególnych izoform UGT w metabolizmie leków (na podstawie [3]).

Klasyczny pogląd stwierdzający, że białka z rodziny cytochromów P450 (CYP) są najważniejszymi enzymami metabolizującymi leki jest prawdziwy dla wielu związków. Jednak dla wielu innych, takich jak przeciwwirusowa zydowudyna, wcześniejsza transformacja oksydacyjna przez cytochromy nie jest konieczna przed glukuronidacją [2]. Wśród 200 najpowszechniej przyjmowanych leków w USA w 2002 roku aż 35% znanych jest jako substraty UGT2B7, 20% podlega reakcji N-glukuronidacji przez UGT1A4 i 15% przez UGT1A1 (Ryc. 1). W porównaniu z liczbą leków metabolizowanych przez CYP, pula leków usuwanych na drodze sprzęgania z kwasem glukuronowym jest niewielka (około 1/7) [3]. Faktyczne znaczenie metabolizmu leków katalizowanych przez UGT jest jeszcze większe, ponieważ większość produktów przemian oksydacyjnych przez cytochromy P450 jest substratem dla UDP-glukuronylotransferaz i jest przez nie sprzęgana. Pomijanie w ubiegłych dziesięcioleciach roli UGT wynikało często z braku identyfikacji struktur glukuronidów, które podczas izolacji metabolitów ulegały hydrolizie, tym samym wskazując pozornie na znaczącą rolę CYP. W rzeczywistości ilość glikuronidów, w zależności od różnic osobniczych, może znacznie przekraczać ilość metabolitów I fazy, jak ma to miejsce w przypadku warfaryny [4].

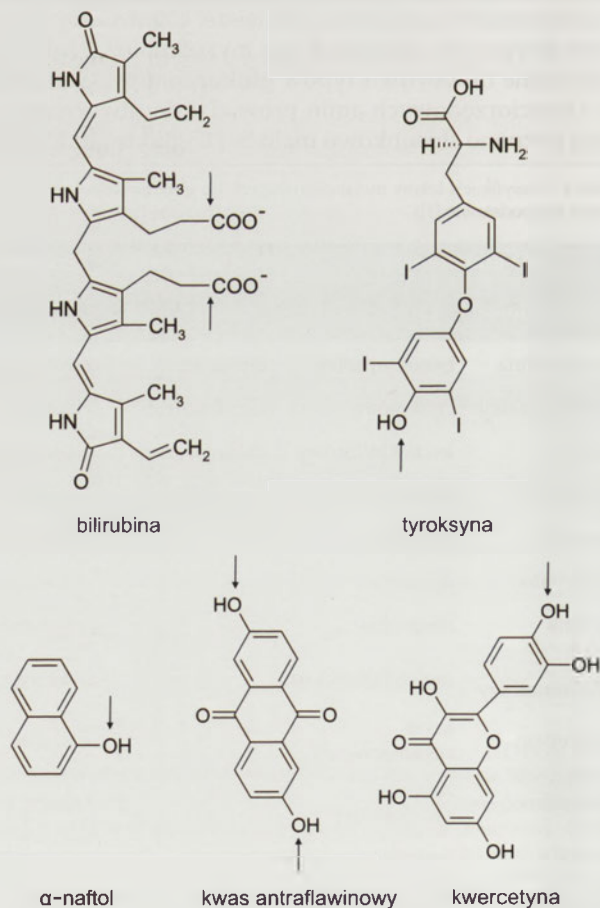
METABOLIZM KATALIZOWANY PRZEZ UGT1A1¹

Wśród enzymów rodziny UGT1 najwyższą ekspresję w wątrobie wykazano dla enzymu UGT1A1 [5]. Aktywność tej izoformy doceniono głównie ze względu na metabolizm szeregu związków endogennych, głównie bilirubiny [6,7], estrogenów [8], hormonów tyroidowych [9]. UGT1A1 odpowiedzialna jest też za glukuronidację około 15% najczęściej przepisywanych leków [10], głównie pochodnych fenolu (irinotekan, paracetamol, etopozyd, naltrekson, buprenorfina) [11]. UGT1A1 jest też najważniejszym obiektem badań wśród UDP-glukuronylotransferaz ze względu na polimorfizm kodujących ją genów i dużą częstość występowania mutacji prowadzących do niefunkcjonalnego białka.

¹ Strukturę i mechanizm działania enzymów UGT opisano w artykule pt „UDP-glukuronylotransferazy – białka siateczki śródplazmatycznej. Struktura, mechanizm działania” zamieszczonym w niniejszym numerze „Postępów Biochemii”.

REGULACJA POZIOMU BILIRUBINY

Ze względu na fakt, że UGT1A1 jest odpowiedzialna za glukuronidację bilirubiny *in vivo*, różnice fenotypowe występujące w konsekwencji zmienionej ekspresji i aktywności tego białka są łatwe do obserwacji. Bilirubina, o strukturze przedstawionej na rycinie 2, jest produktem oksydacyjnego metabolizmu hemu, generowanym podczas naturalnych przemian hemoglobiny, mioglobiny czy białek rodziny cytochromów P450, na poziomie 250-400 mg/dzień. Jej słaba rozpuszczalność w wodzie ogranicza możliwość wydalenia z organizmu w pierwotnej formie. Tworzony w wątrobie glukuronid bilirubiny, powstający poprzez estryfikację dwóch grup karboksylowych reszt kwasu propionowego jest wydzielany do żółci poprzez aktywność transporterów anionowych zależnych od ATP [12]. Zwiększony poziom bilirubiny w surowicy w formie niesprężonej z kwasem glukuronowym jest przyczyną żółtaczki oraz grupy chorób dziedzicznych określanych jako hiperbilirubinemia. Najłagodniejszą z nich jest синдром Gilberta, występujący u 6-12% populacji, w którym poziom bilirubiny w surowicy jest nieznacznie podwyższony, co nasila się podczas spotęgowanej hemolizy [7]. Natomiast syndromy Criglera-Najjara I i II (CN-I, CN-II) są rzadkimi, ale groźnymi zaburzeniami, wynikającymi z bardzo niskiej lub niewykrywalnej aktywności UGT1A1. Poziom bilirubiny w surowicy pacjentów z CN-I utrzymuje się zazwyczaj na poziomie powyżej 350 μ M przy bardzo niskim poziomie koniugatu w żółci, co nieleczone prowadzi do śmierci. CN-II jest łagod-



Rycina 2. Wybrane endo- i egzogenne substraty izoenzymu UGT1A1. Strzałkami zaznaczono miejsca w strukturze, w których zachodzi reakcja metaboliczna.

niejszą hiperbilirubinemią – poziom bilirubiny w surowicy nie przekracza 350 μM, a wartość tą można obniżyć podając fenobarbital. Dodatkowo w żółci wykrywalne są mono- a nawet diglukuronidy [13].

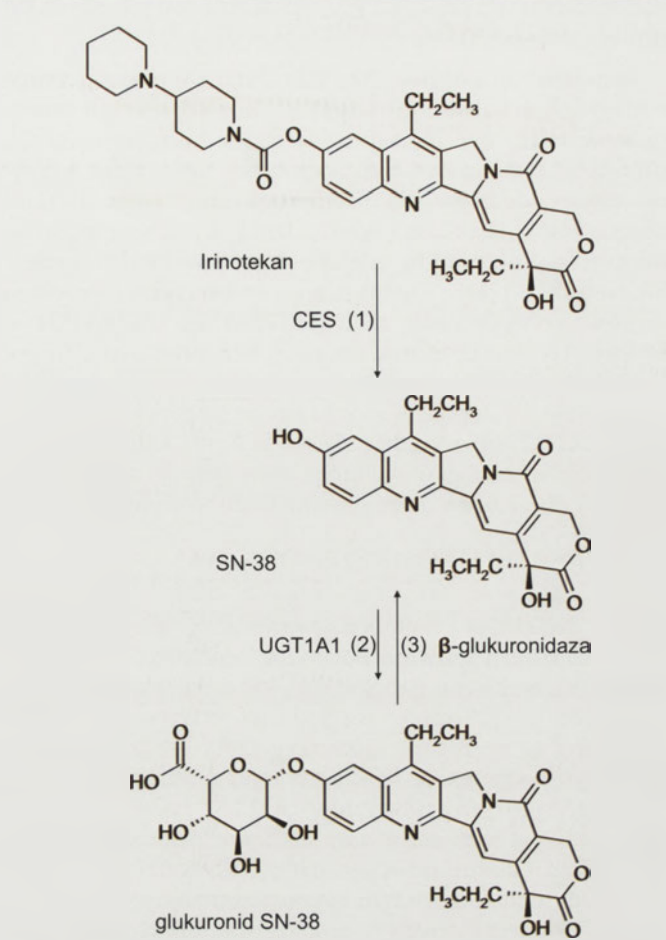
Poznano do tej pory ponad 60 mutacji punktowych, delecji i insercji, w wyniku których obserwuje się obniżoną aktywność UGT1A1 [14]. W populacji kaukaskiej najczęściej (10-20%) występują zmiany w regionie promotorowym genu kodującego enzym UDP-glukuronylotransferazy (UGT1A1*28) prowadzące do objawów syndromu Gilberta. Mutacja UGT1A1*28 polega na insercji A(TA)_nTAA do sekwencji TATA, co powoduje najczęściej wzrost ilości powtórzeń TA z n=6 do n=7. Inne rzadziej występujące allele to UGT1A1*33, gdzie n=5 i UGT1A1*34, gdzie n=8. Wszystkie te różnice z wyjątkiem allelu UGT1A1*33 redukują aktywność promotora UGT1A1 (a tym samym zawartość białka w komórkach wątroby) o około 30% [15]. U pacjentów dotkniętych CN-I wykryto mutacje genu UGT1 we współdzielonych eksonach 2, 3, 4 i 5 oraz mutacje eksonu pierwszego (1A1), tj. Cys280→Stop(840C→A) i Gly276Arg(826G→C) [12]. Wybrane warianty polimorficzne genu UGT1A1 zebrano w tabeli 2.

METABOLIZM HORMONÓW TYROIDOWYCH

Hormony tyroidowe są wydzielane przez tarczycę pod ścisłą kontrolą tyreotropiny na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Prohormon tyroksyna, T₄, (Ryc. 2) podlega dejodynacji w pierścieniu zewnętrznym do trójiodotyroniny, T₃, a także w pierścieniu wewnętrznym do nieaktywnego metabolitu rT₃. Oprócz tych procesów hormony tarczycy podlegają mechanizmom sprzęgania z glukuronianem i siarczanami. Rola glukuronidacji hormonów tarczycy polega więc na przywracaniu ich fizjologicznego stężenia. Tak więc zaburzenia procesów sprzęgania będą podwyższać aktywność hormonów, powodując szereg powikłań np. powiększenie tarczycy. Porównanie aktywności UGT pochodzącej z wątroby osób zdrowych z UGT osób z syndromem CN oraz UGT z mikrosomów nerki wykazało, że UGT1A1

Tabela 2. Wybrane warianty polimorficzne genu UGT1A1 zmieniające aktywność enzymu (na podstawie [1,14,20]).

Allel	Zmiana nukleotydu	Polimorfizm
UGT1A1*1	typ dziki	typ dziki
UGT1A1*6	221G→A	G71R
UGT1A1*7	1456T→G	Y486D
UGT1A1*14	826G→C	G276R
UGT1A1*25	840C→A	C280X
UGT1A1*27	686C→A	P229Q
UGT1A1*28	A(TA) _n TAA	obniżenie aktywności promotora
UGT1A1*33	A(TA) ₅ TAA	podwyższenie aktywności promotora
UGT1A1*34	A(TA) ₈ TAA	obniżenie aktywności promotora



Rycina 3. Transformacja irinotekanu prowadząca do powstania reaktywnego metabolitu SN-38 i jego glukuronidu. (1) Karboksyestrazy hydrolizują wiązanie estrowe w cząsteczce irinotekanu, co prowadzi do utworzenia metabolitu o około 200-krotnie wyższej aktywności, który następnie (2) jest sprzęgany z kwasem glukuronowym w pozycji 10-OH głównie przez UGT1A1. Przy niewydajnie prowadzonej reakcji koniugacji, spowodowanej mutacjami genu kodującego enzym, przeważa hydroliza glukuronidu SN-38 katalizowana przez β-glukuronidazę (3), co uniemożliwia wydalanie intermediatu i prowadzi do toksyczności leku.

wraz z UGT1A9 odpowiedzialne są za glukuronidację T₄ i rT₃, ale nie T₃, przy czym rT₃ jest substratem preferencyjnie wykorzystywanym przez oba izoenzymy. U ludzi, w przeciwieństwie do szczurów, T₃ wydaje się podlegać tylko dejodynacji i sprzęganiu z siarczanem [9].

ZNACZENIE POLIMORFIZMU UGT1A1 W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Wśród pacjentów z syndromem Gilberta zaobserwowano niższy poziom glukuronidacji leków takich jak paracetamol, tolbutamid czy lorazepam. Najszerzej zbadany został wpływ allelu UGT1A1*28 na stopień glukuronidacji, a tym samym na obniżenie toksyczności, metabolitu irinotekanu o symbolu SN-38. Irinotekan jest pochodną kamptoteczyny, który jako prolek jest metabolizowany przez karboksyestrazę do aktywnego metabolitu SN-38 o właściwościach inhibitora topoizomerazy I (Ryc. 3). UGT1A1 jest głównym izoenzymem sprzęgającym SN-38 z kwasem glukuronowym w pozycji 10 [16]. Stwierdzono, że osoby, u których występuje syndrom Gilberta są bardziej narażone na skutki uboczne przyjmowania irinotekanu [17]. Prawdopodobnie obniżona aktywność promotora genu UGT1A1 hamuje tworzenie glukuronidu SN-38. Oprócz mutacji UGT1A1*28 potwierdzono

też znaczenie dla częstości występowania ostrych powikłań mutacji (686C→A) [18] i (3156G→A) [19].

Estrogeny to kolejna poza bilirubiną i tyroidami grupa endogennych substratów UGT1A1. Rozwój szeregu nowotworów może być modulowany przez hormony estrogenu, zaś metabolizm tych hormonów może mieć wpływ na ryzyko zachorowania. Produkt ekspresji genu *UGT1A1* obecny jest w tkankach piersi, gdzie jest zaangażowany w tworzenie glukuronidu estradiolu oraz w liniach komórkowych raka piersi. Postulowano, że istnieje tam większa częstość występowania alleli (*UGT1A1**28, *UGT1A1**34) o niskiej aktywności transkrypcyjnej. Przypuszczenie to potwierdziły wyniki wskazujące, że wyższe stężenie estradiolu i estriolu występuje w osoczu kobiet o niskiej aktywności allelu UGT. Istotna wydaje się też być rola katecholowych metabolitów estrogenów, które niewydajnie sprzęgane z UDPGA mogą być kancerogenami endogennymi [14,20].

KSENOBIOTYKI JAKO SUBSTRATY UGT1A1

Do związków metabolizowanych przez izoenzym UGT1A1 należą głównie pochodne fenolowe. Polifenolowe pochodne kwasu galusowego, które są stosowane jako konserwanty, głównie ze względu na właściwości antyoksydacyjne, są sprzęgane kilka razy szybciej niż bilirubina, przy czym na szybkość reakcji ma wpływ długość łańcucha bocznego estru. Do substratów UGT1A1 należy też kwas benzoesowy i jego estry oraz alkilowe pochodne fenolu, czy naftolu. Glukuronidacja α-naftolu zachodzi szybciej niż β-naftolu. Jednak izoenzym ten nie katalizuje glukuronidacji fenoli podstawionych w pozycji orto, takich jak karwakrol i tymol ani alkoholi alifatycznych jak borneol czy mentol. Inna grupa substratów to antrachinony, które tworzą mono- i diglukuronidy z udziałem grupy hydroksylowej w pozycji 2, 3 lub 6. Natomiast obecność grupy hydroksylowej w pozycji 4' zapewnia wysoki stopień glukuronidacji flawonoidów takich jak kwercetyna, fizetyna i naringenina [21]. Badania z wykorzystaniem rekombinantowego izoenzymu UGT1A1 człowieka pozwoliły określić, że opioidy są substratem dla tego białka, przy czym buprenorfina, jeden z najbardziej lipofilowych analgetyków, jest metabolizowana przez ten enzym w przynajmniej 75%. Reaktywność względem nalorfiny i naltreksonu jest mniejsza, zaś morfina jest jednym z substratów o najsłabszym powinowactwie do UGT1A1 [22]. Wybrane leki będące substratami UGT1A1 przedstawiono w tabeli 3.

UDZIAŁ W METABOLIZMIE INNYCH
IZOENZYMÓW UGT1A

IZOENZYM UGT1A3

UGT1A3 człowieka odpowiedzialna jest za glukuronidację estronu, 2-hydroksyestronu, N-hydroksy metabolitów 2-acetyloaminofluorenu (AAF), a także kancerogennych pochodnych 6-OH i 12-OH benzo(a)pirenu [23]. Do substratów należą też opioidy, flawonoidy, kumaryny, antrachinony i małe cząsteczki o budowie fenoli np. 4-nitrofenol. UGT1A3 katalizuje też, obok UGT1A4, N-glukuronidację amin pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowych: 4-aminobifenylu, difenylaminy, cyproheptadyny. Wśród leków metabolizowanych przez UGT1A3 należy wymienić związki o bu-

dowie kwasów karboksylowych: niesteroidowe leki przeciwzapalne (naproksen i ibuprofen) i fibraty (ciprofibrat) [24]. UGT1A3 wykazuje specyficzność względem grupy karboksylowej kwasów żółciowych, a najlepszym substratem wśród tej grupy jest kwas lithocholowy [25].

Wiadomo, że w egzonie 1 genu *UGT1A3* występuje 6 mutacji punktowych: Gln6→Arg(17A→G), Trp11→Arg(31T→C), Arg45→Trp(133C→T), Val47→Ala(140T→C), Glu27→Glu(81G→A), Ala159→Ala(447A→G), z których wariant drugi oraz drugi i czwarty podwyższają aktywność enzymu względem estronu [26]. W stosunku do flawonoidów trzy spośród 7 alleli wykazują znacząco niższą aktywność w porównaniu z typem dzikim, zaś jeden podnosi wydajność glukuronidacji 4-krotnie [27].

Tabela 3. Wybrane przykłady stosowanych klinicznie leków (z wyłączeniem leków przeciwnowotworowych), dla których wykazano, że są substratami rekombinantowych enzymów rodzin UGT1A i UGT2B człowieka (na podstawie [1,11]).

Izoenzym	Leki jako substraty
UGT1A1	acetaminofen, buprenorfina , etynyloestradiol, ezetymib, furosemid, karwedilol, kwas niflumowy , nalorfina, naltrekson , retigabina, troglitazon
UGT1A3	amitryptylina, buprenorfina, ciprofibrat, cyproheptadyna, diklofenak, ezetymib, fenoprofen, flurbiprofen , ibuprofen, imipramina, ketoprofen, ketotifen, kwas klofibrowy, kwas walproinowy, naproksen
UGT1A4	amitryptylina, chlorpromazyna , cyproheptadyna, doksepina , imipramina, ketotifen, klozapina, olanzapina , posakonazol , retigabina
UGT1A6	acetaminofen, diklofenak, kwas salicylowy , kwas walprionowy, metylodopa , propofol
UGT1A7	kwas mykofenolowy
UGT1A8	ciprofibrat, diflunisal, furosemid, kwas mykofenolowy, kwas klofibrowy, kwas walproinowy, nalokson, naltrekson, propofol, troglitazon
UGT1A9	acetaminofen , diflunisal, diklofenak, entakapon , flawopirydol , flurbiprofen, furosemid , gemfibrozil, ibuprofen, ketoprofen, kotynina, kwas mefenamowy, kwas mykofenolowy , kwas niflumowy, naproksen, oksazepam, propofol , tolkapon , troglitazon
UGT1A10	kwas mykofenolowy, kwas niflumowy, troglitazon
UGT2B4	karwedilol , kodeina
UGT2B7	benoksaprofen, buprenorfina, cyklosporyna A , diflunisal, diklofenak , entakapon, ezetymib, fenoprofen, flurbiprofen , gemfibrozil , ibuprofen , indometacyna, karbamazepina , karwedilol, ketoprofen, kodeina, kwas klofibrowy, kwas mefenamowy, kwas walproinowy, morfina , nalorfina, naltrekson, naproksen , oksazepam, pitawastatyna, tolkapon, zydowodyna
UGT2B15	diklofenak, entakapon, ezetymib, oksazepam (izomer S), rofekoksyb tolkapon

Wyróżniono leki, dla których dany izoenzym jest główną formą enzymu prowadzącą sprzęganie do postaci glukuronidów.

IZOENZYM UGT1A4

Wśród enzymów podrodziny UGT1A izoforma UGT1A4 jest jedną z najmniej poznanych. Wykazuje wysoką homologię sekwencji z UGT1A3 i podobnie jak ona jest aktywna względem amin alifatycznych i aromatycznych [28]. Oprócz amin, UGT1A4 katalizuje glukuronidację alkoholi monoterpenowych, sapogenin, androgenów i progestyn [29]. Do substratów UGT1A4 należą też związki obecne w dymie papierosowym: nikotyna, kotynina i pochodna nitrozoaminy NNAL. W aspekcie klinicznym UGT1A4 istotna jest ze względu na metabolizm antydepresantów: amitriptyliny i imipraminy oraz leków antypsychotycznych: klozapiny, olanzapiny czy chinonów przeciwmalariacyjnych [30]. Przypuszcza się, że jest jedynym rekombinantowym izoenzymem katalizującym N-glukuronidację przeciwnowotworowego tamoksyfenu. *Trans*-4-hydroksy-tamoksyfen to aktywny metabolit tamoksyfenu o wyższym powinowactwie względem receptorów estrogenowych w porównaniu do wyjściowego związku i innych produktów biotransformacji. Wraz z izomerem *cis* jest wydalany w formie N- i O-glukuronidu [31].

Doniesiono o 19 mutacjach punktowych i 2 zmieniających ramkę odczytu genu *UGT1A4*. Spośród tych 21 mutacji 8 prowadzi do zmiany aminokwasu, 5 to mutacje ciche a pozostałe 8 to mutacje w regionach niekodujących. Warianty Pro24→Thr i Leu48→Val wykazują obniżoną aktywność względem benzydiny, androsteronu i dihydrotestosteronu w porównaniu z typem dzikim. N-glukuronidacja NNAL i jego prekursora 4-(metylo-nitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanonu, jednego z najsilniejszych kancerogenów dymu papierosowego, jest ważnym szlakiem ich detoksykacji i zachodzi wydajniej u osób będących homozygotami względem allelu Pro24→Thr [20].

IZOENZYM UGT1A6

UGT1A6 jest obok UGT1A1 główną izoformą UDP-glukuronylotransferaz występującą w wątrobie [32]. Zaangażowana jest przede wszystkim w glukuronidację fenoli i amin aromatycznych jak 1- i 2-naftyloaminy i ich N-hydroksy pochodnych [33]. Do leków metabolizowanych przez UGT1A6 zaliczają się salicylany, antydepresanty, neuroleptyki i blokery β-adrenoreceptorów [14].

Dwie najwcześniej wykryte mutacje eksonu 1 genu *UGT1A6*: Thr181→Ala(541A→G) i Arg184→Ser(552A→C) prowadzą do powstania białka o niższej aktywności względem związków fenolowych, 3-O-metylo-DOPY, salicylanu metylu i β-blokerów [34]. Oprócz nich stwierdzono też występowanie SNP w kodonie 7: Ser7→Ala(19T→G) [35] oraz dwie mutacje w regionie 5'-regulatorowym: Arg90→His(269G→A) i Ser103→Stop(308C→A) [36]. Rola polimorfizmu UGT1A6 poznano w badaniach wpływu przyjmowania aspiryny na ryzyko wystąpienia gruczolakoraka okrężnicy [37,38]. Obecność allelu *UGT1A6*2* (541A→G, 552A→C) związana była ze zmniejszoną zachorowalnością na gruczolakoraka wśród kobiet regularnie przyjmujących kwas acetylosalicylowy. Prawdopodobnie jest to związane z podwyższeniem poziomu salicylanów na skutek obniżonej koniugacji aspiryny z UDPGA. Wia-

domo, że kwas salicylowy hamuje syntezę prostaglandyny poprzez nieodwracalne hamowanie cyklooksygenazy, co w efekcie może osłabiać proliferację komórek i pobudzać apoptozę.

IZOENZYM UGT1A7

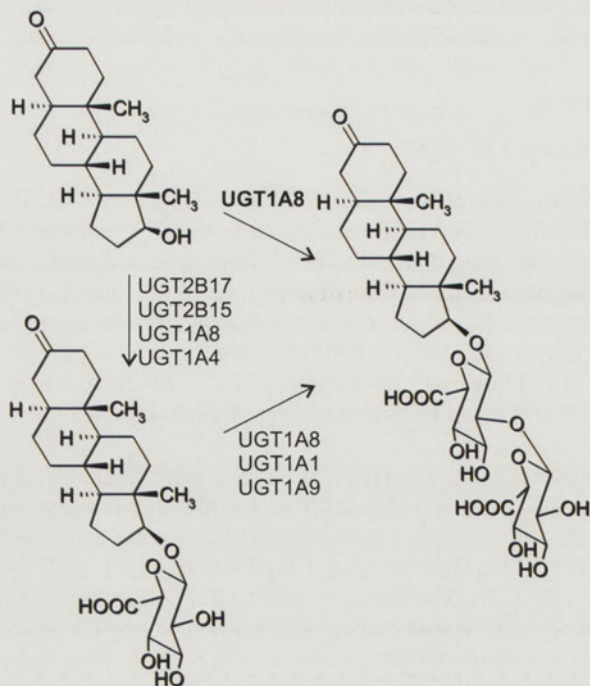
Wśród enzymów podrodziny UGT1A jedynie UGT1A7, UGT1A8 i UGT1A10 nie podlegają syntezie w wątrobie [11]. Aktywność izoenzymu UGT1A7, obecnego w żołądku oraz płucach, skierowana jest głównie na glukuronidację policyklicznych węglowodorów aromatycznych oraz amin heterocyklicznych, również tych obecnych w dymie papierosowym [39,40]. Wraz z izoenzymami UGT1A8-1A10 bierze też udział w detoksykacji kwasu mykofenolowego [41].

Stwierdzono występowanie 9 alleli genu *UGT1A7* (*UGT1A7*1-UGT1A7*9*), które są wynikiem zmian następujących reszt aminokwasowych: Gly115→Ser, Asn129→Lys, Arg131→Lys, Glu139→Asp i Trp208→Arg [14]. SNP kodonów 129, 131 i 208 tworzy wariant *UGT1A7*3*, którego częstość występowania jest najwyższa i jednocześnie skorelowana z występowaniem wariantu *UGT1A1*28* [42]. Rekombinantowe białka *UGT1A7*2-UGT1A7*4* wykazują obniżoną aktywność katalityczną względem 3-, 7- i 9-hydroksybenzo(a)pirenu, co sugeruje, że mutacje te odpowiadają za fenotyp wolno metabolizujący. Osoby będące homozygotami względem tych alleli mogą być narażone na wyższą szkodliwość policyklicznych węglowodorów aromatycznych i nitrozoamin dymu papierosowego [43]. Obecność alleli UGT1A7 warunkujących fenotyp wolno metabolizujący podwyższa ryzyko wystąpienia nowotworów: raka krtani [44], raka wątroby wywołanego wirusem HCV [45,46], raka odbytu [47], oraz raka trzustki [48] i raka płuc [49].

IZOENZYM UGT1A8

Aktywność pozawątrobowego enzymu UGT1A8 jest skierowana na szereg substratów endo- i egzogennych. UGT1A8 metabolizuje pochodne benzo(a)pirenu, głównie 10- i 11-hydroksy, mutageny metabolit N-OH-2-acetyloaminofluoren, chinolinę [50]. Do substratów egzogennych należy też szereg flawonoidów i antrachinonów, leki takie jak ciprofibrat, furosemid, fenoloftaleina oraz opioidy, wśród których najwydajniej transformowany jest naltrekson. Substratami endogennymi UGT1A8 są oprócz estrogenów, androgenów i kwasów żółciowych, metabolizowanych też przez inne izoenzymy UGT, także kwasy retinowe, RA, które sprzęgane są jedynie przez UGT1A8 i UGT2B7. Poza tym, UGT1A8 wykazuje aktywność względem grupy karboksylowej kwasu all-trans retinowego i pochodnych 5,6-epoksy-RA i 4-hydroksy-RA [51]. Rekombinantowy UGT1A8 wykazuje, jako jedyny izoenzym UGT, zdolność metabolizmu dihydroksytestosteronu, DHT, (Ryc. 4) nie tylko do monoglukuronidu, ale również diglukuronidu dihydroksytestosteronu, w którym następuje koniugacja dwóch reszt kwasu glukuronowego na jednej grupie hydroksylowej DHT w pozycji C17 [52].

Analiza sekwencji eksonu 1 *UGT1A8* pozwoliła zidentyfikować 4 genotypy, z których jeden allel jest wynikiem cichej mutacji w kodonie 255, podczas gdy pozostałe prowa-



Rycina 4. Metabolizm dihydrotestosteronu z udziałem izoenzymów UGT (na podstawie [52]). Jedynym izoenzymem katalizującym bezpośrednie tworzenie diglukuronidu dihydrotestosteronu jest UGT1A8. Alternatywnym szlakiem powstawania tego metabolitu jest monoglukuronidacja, po której następuje przyłączenie drugiej grupy glukuronozylowej do części cukrowej monoglukuronidu.

dążą do zmiany reszty aminokwasowej w pozycji 173 i 277. Najczęściej występujące warianty *UGT1A8*1* (Ala173) oraz *UGT1A8*2* (Ala173→Gly) nie wpływają znacząco na funkcję białka, podczas gdy *UGT1A8*3* (Cys277→Tyr) koduje białko o obniżonej aktywności katalitycznej w stosunku do metabolitów hydroksy-benzo(α)pirenu i prostych fenoli [53]. Dodatkowo allel *UGT1A8*3* jest czynnikiem ryzyka wystąpienia raka odbytu. Również homozygoty *UGT1A8*1/*3* i *UGT1A8*2/*3* są związane z wyższym prawdopodobieństwem zachorowania na ten nowotwór, podczas gdy allel *UGT1A8*1* jest czynnikiem prewencyjnym [54].

IZOENZYM UGT1A9

UGT1A9 odgrywa istotną rolę w metabolizmie endogennych hormonów estrogenowych [55] i tyroidowych [9], jak również różnorodnych egzogennych związków chemicznych i leków. Substratami są fenole, metabolity pirenu, aktywny metabolit irinotekanu, SN-38, propranolol [56]. UGT1A9 jest enzymem najwydajniej sprzęgającym acetaminofen z kwasem glukuronowym [57] oraz głównym UGT zaangażowanym w glukuronidację flawopirydołu w wątrobie [58] (Tab. 3).

Zidentyfikowano ponad 15 haplotypów wynikających z 20 mutacji genu *UGT1A9*. Substytucja Asp256→Asn (766G→A) powoduje obniżenie wydajności tworzenia glukoconidu SN-38 do jedynie 3,8% w stosunku do aktywności produktu białkowego allela *UGT1A9*1*. Niższa aktywność w stosunku do SN-38, ale nie flawopirydołu, związana jest także z obecnością *UGT1A9*3* (Met33→Thr). Częstą mutacją regionu promotorowego genu *UGT1A9* jest insercja nukleotydu tymidynowego do fragmentu A(T)₁₀AT, przy czym

promotor A(T)₁₀AT wykazuje ponad 2,5-krotnie wyższą aktywność, zwiększając tym samym syntezę białka [20].

IZOENZYM UGT1A10

Aktywność obecnego w przewodzie pokarmowym UGT1A10 została określona wobec cząsteczek lipofilowych, głównie kancerogenów, w tym związków dostarczanych wraz z pożywieniem. Zaobserwowano m.in. wysoką wydajność glukuronidacji bioflawonoidów przez UGT1A10. Preferowanymi substratami z grupy flawonoidów są pochodne z grupą hydroksylową na atomie węgla C6 i C7 pierścienia A lub C4' pierścienia B. Obecność innych grup, szczególnie cukrowych, obniża aktywność [59]. W warunkach *in vitro* UGT1A10 wykazuje najwyższą aktywność wśród białek rodziny UGT w stosunku do policyklicznych węglowodórów aromatycznych [60] i amin heterocyklicznych, w tym pochodnych imidazopirydyny [61]. Spośród kancerogenów pochodnych benzo(α)pirenu i 2-acetyloaminofluorenu, AAF, najlepszymi substratami są 11- i 12-hydroksy B(α)P i 1-hydroksy AAF [48]. W homogenatach uzyskanych z komórek z podwyższoną zawartością białka UGT1A10 (nadekspresja właściwego genu) zaobserwowano zachodzenie reakcji O-glukuronidacji NNAL ze wzmoczoną wydajnością [62].

W związku z tym, że UGT1A10 metabolizuje szeroką gamę kancerogenów istotne wydają się być międzyosobnicze różnice w aktywności tego białka. Spośród kilkunastu mutacji punktowych, zmiana Glu139→Lys (415G→A) powoduje obniżoną aktywność [60,61]. Istotna wydaje się też zmiana w kodonie 202 Thr→Ile (605C→T), powodująca spadek wydajności glukuronidacji 7-hydroksy-4-trifluorokumaryny i 17β-estradolu o około 50% [63].

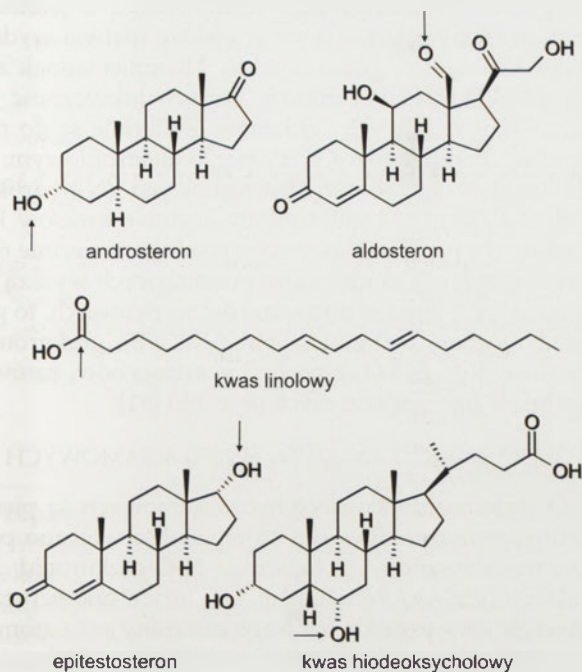
METABOLIZM Z UDZIAŁEM PODRODZINY UGT2B

Podrodzina enzymów UGT2B, która obejmuje UGT2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15, 2B17 i 2B28, doceniona została głównie ze względu na przemiany steroidów, gdyż są one metabolizowane przez wszystkie UGT2B z wyjątkiem 2B10 i 2B11. Istotny jest też wkład podrodziny UGT2B w detoksycację ksenobiotyków, przy czym UGT2B7 jest najważniejszą ze wszystkich izoform UGT jeśli chodzi o liczbę metabolizowanych leków (Ryc. 1)

IZOENZYM UGT2B4

Glukuronidacja kwasów żółciowych zachodzi preferencyjnie w pozycji 6α-OH. UGT2B4 jest zaangażowany w przemiany tych pochodnych, w tym kwasu hiodeoksychołowego, (Ryc. 5) zaliczanego do drugorzędowych kwasów żółciowych. Inne endogenne substraty takie jak 4-hydroksyestron, 17-epiestriol i pochodne androsteronu są wspólne dla UGT2B4 i UGT2B7 [64,65]. Lekiem metabolizowanym przez UGT2B4 jest karwedilol (Tabela 3), który podlega sprzęganiu również wobec UGT1A1 i UGT2B7, ale jedynie wobec UGT2B4 powstają dwa glukuronidy tego leku [66].

Spośród kilku mutacji *UGT2B4*, wpływ obecności allela *UGT2B4*2* (Asp458→Glu) został przebadany najszerzej. Nie stwierdzono jednak zmian glukuronidacji kwasów żół-



Rycina 5. Wybrane substraty UGT2B7 o znaczeniu fizjologicznym. Strzałkami zaznaczono miejsca w strukturze, w których zachodzi reakcja metaboliczna.

ciowych, pochodnych fenolowych i katecholoestrogenów, ani ryzyka wystąpienia raka piersi powiązanych z mutacją UGT2B4 [20].

IZOENZYM UGT2B7

Ze względu na udział w transformacji szerokiej gamy związków istotnych z klinicznego, fizjologicznego i toksykologicznego punktu widzenia, UGT2B7 jest najważniejszym izoenzymem podrodziny UGT2B i jednym z najważniejszych wśród wątrobowych UDP-glukuronylotransferaz (Ryc. 1). Aktywność UGT2B7 pozwala utrzymać homeostazę organizmu, ponieważ skierowana jest na glukuronidację androsteronu, epitestosteronu, estronu, estradiolu i katecholowych pochodnych estrogenów oraz kwasów tłuszczowych. Wybrane substraty tego enzymu przedstawiono na ryc. 5. Odgrywa on też kluczową rolę w detoksykacji kwasów żółciowych i może chronić przed tworzeniem potencjalnych kancerogenów takich jak chinonowe pochodne estrogenów [65,67]. Innymi endogennymi substratami są mineralo- i glukokortykoidy: aldosteron i jego metabolity oraz tetrahydrokortyzon [68]. Dodatkowo UGT2B7 katalizuje koniugację głównych klas farmaceutyków takich jak analgetyki, niesteroidowe leki przeciwzapalne, NLPZ, leki przeciwwirusowe (Tabela 3) oraz przeciwnowotworowe (Tabela 4). Do najlepiej poznanych substratów UGT2B7 zalicza się morfinę, której 3-O-glukuronid jest wynikiem reakcji katalizowanej też przez UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6 i UGT1A8-10 oraz 6-O-glukuronid powstający tylko wobec UGT2B7 [11]. Wśród NLPZ do najszybciej metabolizowanych substratów należą diklofenak [69], flurbiprofen [70], ibuprofen i ketoprofen [71]. UGT2B7 jest jedynym izoenzymem odpowiedzialnym za glukuronidację antybiotyku przeciwnowotworowego epirubicyny [72] oraz pochodnej nukleozydu o właściwościach inhibitora odwrotnej transkryptazy wirusa HIV, 3'-azydo-3'-deoksytymidyny, AZT [1]. Poza tym wykazuje najwyższą aktywność wśród en-

zymów metabolizujących chloramfenikol do 3-O- i 1-O-glukuronidów [73].

Transwersja 802C→T prowadząca do zmiany His268→Tyr jest najpowszechniej występującą mutacją SNP genu UGT2B7. Częstotliwość alleli UGT2B7*1 i UGT2B7*2 wśród populacji kaukaskiej jest mniej więcej jednakowa, a ich wpływ na profil metaboliczny został szeroko zbadany. Allel *2 wykazał właściwości katalityczne zbliżone do allela*1 w stosunku do steroidów, opioidów, mentolu, propranololu, oksazepamu i epirubicyny. Wariant UGT2B7*1 wydaje się być bardziej aktywny jedynie w stosunku do NNAL i zydowudyny [14,20].

Tabela 4. Wybrane związki o właściwościach przeciwnowotworowych oraz kancerogennych będące substratami izoenzymów UGT (na podstawie [20]).

Izoenzym	Substrat o właściwościach:	
	przeciwnowotworowych	kancerogennych
UGT1A1	SN-38, etopozyd, galusan epigalokatechiny, flawopirydol, flutamid	estron, estradiol, hydroksylowe i metoksyłowe pochodne estronu i estradiolu
UGT1A3	genisteina	estron, estradiol, hydroksylowe i metoksyłowe pochodne estronu i estradiolu
UGT1A4	tamoksifen	benzydyna, kotynina, nikotyna, pochodne nitrozoaminy
UGT1A6	flutamid	polichlorowane bifenyle
UGT1A7	SN-38,	aminy heterocykliczne, policykliczne węglowodory aromatyczne
UGT1A8	chryzyna, kwercetyna,	benzo(a)piren, estron, estradiol, hydroksylowe i metoksyłowe pochodne estronu i estradiolu
UGT1A9	SN-38, flawopirydol, raloksifen	N-hydroksy-2-AAF, benzydyna, kotynina, nikotyna, , estron, estradiol, hydroksylowe i metoksyłowe pochodne estronu i estradiolu
UGT1A10	SN-38, raloksifen,	benzo(a)piren, estron, estradiol, hydroksylowe i metoksyłowe pochodne estronu i estradiolu
UGT2B4		4-hydroksyestron, androsteron, hydrokorynina
UGT2B7	epirubicyna, farnesol	kwas trans-retinowy, estron, estradiol, hydroksylowe i metoksyłowe pochodne estronu i estradiolu, hydroksykorynina, benzydyna, pochodne nitrozoaminy
UGT2B15	tamoksifen, flawonoidy	steroidy płciowe, hydroksykorynina, dihydrotestosteron
UGT2B17	flawonoidy, antrachinony	androgeny

UGT2B15, początkowo zidentyfikowany jako enzym zaangażowany w glukuronidację steroidów androgennych [74], jest enzymem z podrodziny UGT2B prowadzącym najwydajniejsze sprzężanie głównego metabolitu dihydroksytestosteronu – 3 α -diolu [75]. Poza tym rekombinantowy ludzki UGT2B15 selektywnie katalizuje glukuronidację *cis*-4-hydroksytamoksyfenu [76], czy inhibitora prostaglandyny, COX-2, 5-hydroksyrofekoksybu [77]. Jest też najbardziej aktywny spośród rekombinantowych białek UDP-glukuronylotransferazy w stosunku do bisfenolu A [78] i jako jedyny prowadzi stereoselektywne sprzężanie S-oksazepamu [79].

Najważniejszą zmianą w regionie kodującym genu *UGT2B15*, mającą wpływ na aktywność produktu białkowego, jest podstawienie Asp86→Tyr. Z jednej strony powoduje ona 5-krotne obniżenie aktywności w stosunku do S-oksazepamu u homozygot względem allele *UGT2B15*2* w porównaniu do wariantu *UGT2B15*1* [80]. Z drugiej strony wariant *UGT2B15*1* wykazuje niższą aktywność glukuronidacji 17 β -hydroksyandrogenów, a jego występowanie niesie 3-krotnie większe ryzyko zachorowania na raka prostaty [14,20].

REAKTYWNE PRODUKTY GLUKURONIDACJI

Jak wspomniano wcześniej rolą reakcji glukuronidacji jest obniżenie aktywności biologicznej wyjściowego agli-

konu poprzez obniżenie jego reaktywności, z jednoczesnym wzrostem polarności, co w efekcie ułatwia wydalanie tych koniugatów poprzez nerki. Niemniej jednak znane są przykłady glukuronidów, których toksyczność jest wyższa niż wyjściowych aglikonów. Zaliczane są do nich dwie klasy koniugatów o charakterze elektrofilowym: N-O-glukuronidy kwasów hydroksamowych (N-hydroksy-N-acetyloaryloamin) i glukuronidy acylowe kwasów karboksylowych, przedstawione odpowiednio na rycinie 6A i 6D. Inne przykłady koniugatów, posiadających wyższą aktywność w porównaniu do związków wyjściowych, to glukuronid morfiny, 6-O-glukuronid (Ryc. 6B), glukuronidy retinoidów (Ryc. 6C) oraz pochodne estrogenów, zarówno naturalnych jak i syntetycznych (Ryc. 6E) [81].

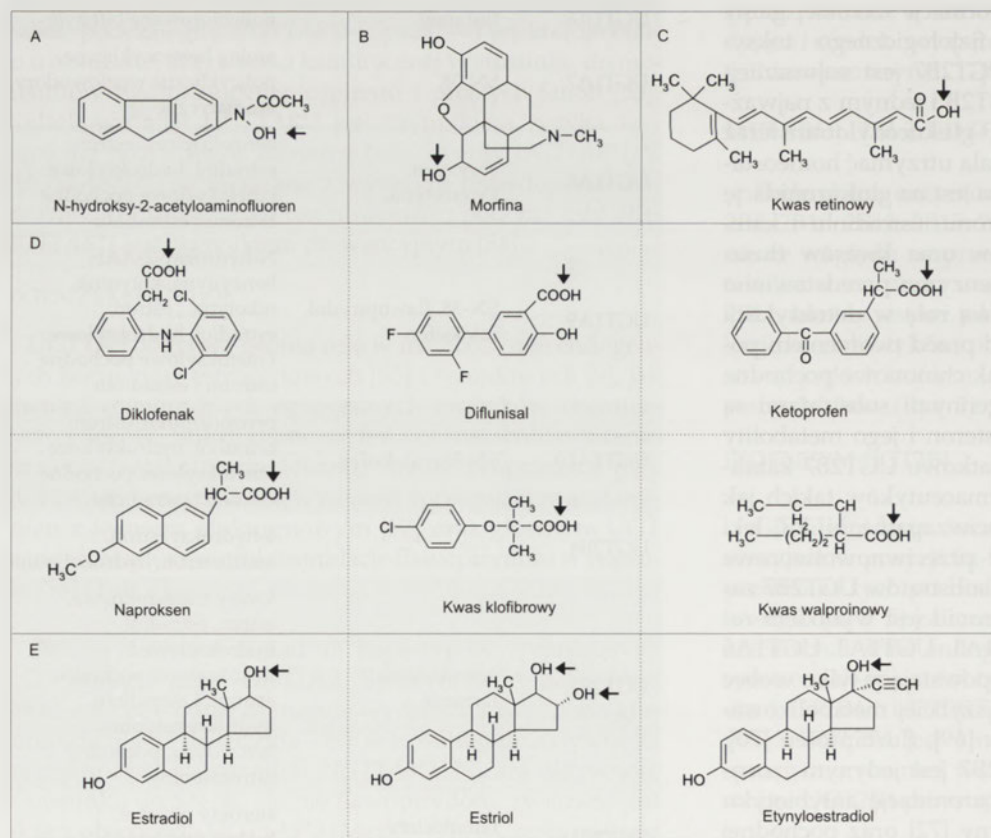
N-O-GLUKURONIDY KWASÓW HYDROKSAMOWYCH

N-O-glukuronidy kwasów hydroksamowych są pierwszą grupą glukuronidów, dla której zaobserwowano podwyższoną aktywność biologiczną. N-O-glukuronid jest charakterystycznym koniugatem, w którym anomeryczny atom węgla kwasu glukuronowego związany jest z atomem tlenu grupy N-hydroksylowej. Przykładem związku, który wykazuje reaktywność w stosunku do nukleofilu obecnych w komórce, takich jak metionina, tryptofan i guanozyna, jest glukuronid N-hydroksy-2-acetyloaminofluorenu (Ryc. 6A) [82], główny metabolit 2-AAF obecny w moczu, wykazujący równie silny efekt kancerogeny, jak związek wyjściowy. Specyficzność oddziaływań z DNA tego koniugatu skierowana jest na guanozynę, a wiązanie ma miejsce

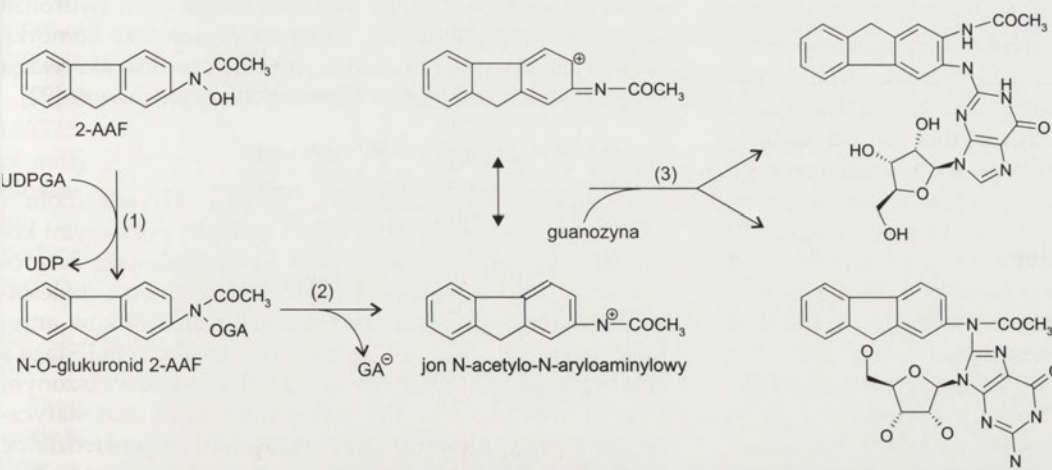
w pozycji N² lub C8 guanozyny poprzez mechanizm wymagający heterolitycznego rozpadu z utworzeniem jonu N-acetylo-N-aryloaminylowego (Ryc. 7) [83]. N-O-glukuronid 2-AAF jest pochodną wykazującą najwyższą reaktywność spośród związków należących do glukuronidów kwasów hydroksamowych, choć wiadomo, że reaktywne metabolity powstawać mogą też w czasie biotransformacji 4-aminobifenylu [84] i benzydyny [85].

GLUKURONIDY ACYLOWE KWASÓW KARBOKSYLOWYCH

Drugą grupą glukuronidów wykazujących charakter elektrofilowy są glukuronidy acylowe, które tworzone są w reakcji estryfikacji kwasów karboksylowych z grupą α -hydroksylową kwasu glukuronowego. Znaczenie tych pochodnych w ujęciu toksyczności jest o wiele ważniejsze niż N-O-glukuronidów, z powodu dużej liczby powszechnie przyjmowanych leków, które są kwasami karboksylowymi. Wśród nich znajdują się między innymi niesteroidowe leki prze-



Rycina 6. Przykłady związków podlegających bioaktywacji w wyniku reakcji glukuronidacji. A: N-hydroksy-2-acetyloaminofluoren, B: morfina, C: kwasy trans-retinowe, D: kwasy karboksylowe, E: estrogeny. Strzałkami zaznaczono grupy podlegające glukuronidacji.

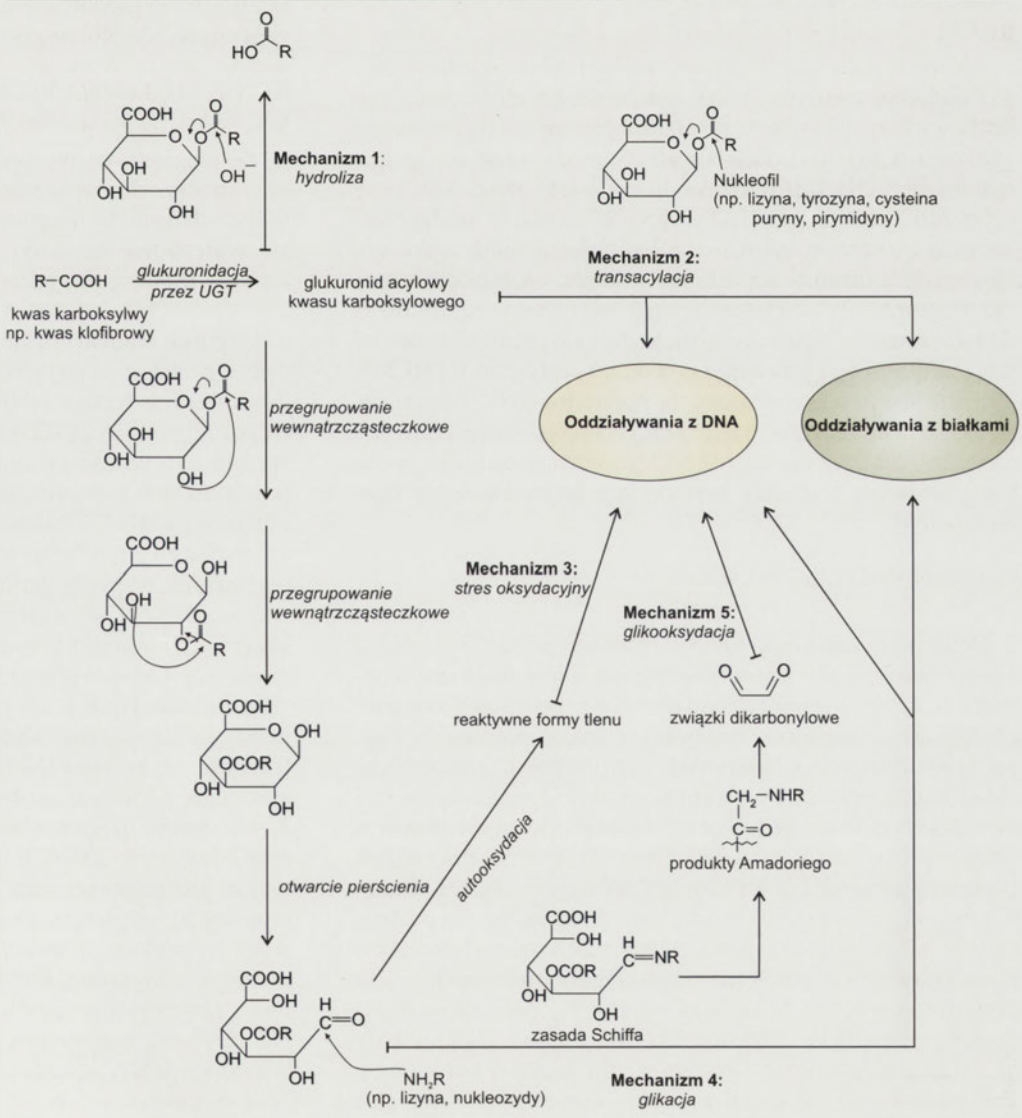


Rycina 7. Metabolizm N-hydroksy-2-acetyloaminofluorenu prowadzący do utworzenia reaktywnego metabolitu, a następnie adduktu z guanozyną. (1) Tworzenie glukuronidu N-hydroksy-2-AAF jest wynikiem reakcji katalizowanej przez UGT1A6 oraz UGT2B7. (2) W warunkach pH<7 z glukuronidu powstaje jon N-acetylo-N-aryloaminyliowy, który wiąże się z atomem C8 lub N² guanozyny (3).

ciwzapalne (NLPZ), leki zmniejszające stężenie cholesterolu i trójglicerydów we krwi, klofibrat, oraz leki przeciwdrgawkowe, kwas walproinowy (Ryc. 6D). Reakcja glukuronidacji ma także wpływ na stężenie istotnych fizjologicznie kwasów karboksylowych pochodzenia endogennego, m.in. bilirubiny. Przyjmowanie NLPZ i innych leków o budowie kwasów karboksylowych jest związane z wieloma efektami cytotoksycznymi, kancerogennymi czy efektami uczuleniowymi, co po części przypisuje się tworzonemu przez te związki reaktywnym glukuronidom [86].

Reaktywność glukuronidów acylowych wynika z elektrofilowego charakteru grupy karbonylowej, co może prowadzić do reakcji hydrolizy, transacylacji oraz przegrupowania wewnątrzcząsteczkowego (Ryc. 8). Najprostszą reakcją jest reakcja hydrolizy, prowadząca do uwolnienia aglikonu. Podatność na reakcję hydrolizy jest uważana za istotną przyczynę przedłużonego okresu półtrwania niektórych niesteroidowych leków przeciwzapalnych w warunkach zaburzonego wydalania metabolitów z kwasem glukuronowym, np. u osób z zaburzeniami pracy nerek lub wątroby. Drugim typem reakcji glukuronidów acylowych jest transacylacja, w której karbonylowy atom węgla glukuronidu może wiązać się z nukleofilowymi elementami struktury białek, jakimi są ε-aminowe grupy reszty lizyny, grupa fenolowa reszty tyrozyny oraz grupa tiolowa reszty cyste-

Rycina 8. Mechanizmy prowadzące do indukcji uszkodzeń DNA i białek przez glukuronidy kwasów karboksylowych (na podstawie [86]).



iny, a powstające addukty zawierają tylko fragment aglikonowy glukuronidu. Kolejny szlak przemian to przegrupowanie wewnątrzcząsteczkowe glukuronidów, prowadzące do migracji grupy acylowej z węgla C-1 na C-2, a dalej kolejno na C-3 i C-4. Powstają w ten sposób izomery odporne na działanie enzymu β-glukuronidazy hydrolizującej koniugaty. Reakcje te są szczególnie istotne, gdyż w ich wyniku, po otwarciu pierścienia kwasu glukuronowego, tworzą się substraty dla reakcji glikacji z udziałem grup aminowych lizyny. Glikacja

skutkuje obecnością zarówno aglikonu jak i szkieletu cukrowego w tworzonych adduktach [81].

Stosunkowo niedawno wykazano, że również nukleozydy DNA, a nie tylko białka, mogą stanowić cel molekularny dla glukuronidów acylowych. Badania *in vitro* potwierdziły, że glukuronidy gemfibrozilu i kwasu klobifrowego tworzą addukty z DNA, w przeciwieństwie do związków wyjściowych [87]. Na podstawie reaktywności glukuronidów acylowych względem białek, a także bezpośrednich oddziaływań monosacharydów z białkami i DNA zaproponowano cztery potencjalne drogi prowadzące do indukcji uszkodzeń DNA przez te koniugaty (Ryc. 8) [86]. Jednym z mechanizmów może być transacylacja w wyniku oddziaływań zaktywowanej formy kwasu karboksylowego z purynami i pirymidynami DNA. Alternatywną drogą jest wspomniana wcześniej glikacja z aminami pierwszorzędowymi, skutkująca tworzeniem imin i produktów przegrupowania Amadoriego. Te z kolei, w obecności O₂ i metali przejściowych mogą tworzyć złożone końcowe produkty glikacji i związki dikarbonylowe. Zakładając, że glukuronidy acylowe posiadają tak jak glukoza zdolność do autooksydacji, możliwym mechanizmem jest też indukcja oksydacyjnych uszkodzeń DNA.

6-O-GLUKURONID MORFINY

Morfina, należąca do grupy analgetyków opioidowych, jest najlepiej znanym związkiem, którego glukuronid posiada wyższą aktywność farmakologiczną od wyjściowego aglikonu. Glukuronidacja morfiny, może zająć na grupie fenolowej 3-OH lub hydroksylowej 6-OH (Ryc. 6B), przy czym tylko 6-O-glukuronid wykazuje działanie analgetyczne. Inne metabolity morfiny to 3,6-diglukuronid, normorfina oraz glukuronidy tej ostatniej. Wśród osobników z różnych gatunków obserwuje się znaczne różnice w zdolności do tworzenia 6-O-glukuronidu. Myszy i szczury w ogóle nie mają zdolności jego tworzenia, podczas gdy u ludzi 10-20% morfiny jest przekształcana w tą pochodną [88]. Szacuje się, że aktywność morfiny względem receptorów opioidowych może być 50 razy niższa niż 6-O-glukuronidu, który podawany dożylnie wykazuje zaskakująco wysoki efekt analgetyczny [89].

GLUKURONIDY RETINOIDÓW

Retinoidy, takie jak kwasy *trans*-retinowy (Ryc. 6C) i *trans*-retinol, są aktywnymi biologicznie metabolitami witaminy A, która odpowiedzialna jest za prawidłowy wzrost i różnicowanie komórek, zarówno w czasie dojrzewania jak i u osób dorosłych. Glukuronidy retinoidów są naturalnym składnikiem osocza i występują w wyższym stężeniu niż związki wyjściowe [90]. Są odpowiedzialne za stymulowanie wzrostu u szczurów z deficytem witaminy A oraz różnicowanie komórek nabłonkowych. Wykazywały też silniejszą niż wyjściowy aglikon zdolność do hamowania proliferacji komórek gruczołu piersiowego indukowanej prolaktyną w kulturach *in vitro* oraz wspomagały proliferację wielu nowotworowych linii komórkowych [91]. Jednak w większości przypadków glukuronidy retinoidów wykazywały aktywność zbliżoną do aktywności form przed koniugacją. Przypuszcza się, że mechanizmami odpowiedzialnymi za

wymienione efekty mogą być: natychmiastowa hydroliza do wyjściowego aglikonu, transport do wnętrza komórki, po którym następuje hydroliza, lub bezpośrednia aktywacja odpowiednich receptorów błonowych czy jądrowych [92].

GLUKURONIDY ESTROGENÓW

D-glukuronidy estrogenów, estriolu, 17 β -estradiolu i 17 α -etynyloestradiolu (Ryc. 6E) są najlepiej poznanymi koniugatami, które odpowiedzialne są za cholestazę (nagromadzenie żółci w hepatocytach) u ciężarnych oraz cholestazę związaną z przyjmowaniem doustnych środków antykoncepcyjnych. Zależność między nawracającą cholestazą a rolą hormonów zaobserwowano u kobiet z podwyższonym stężeniem estrogenów. Przypuszcza się, że za cholestatyczne działanie D-glukuronidów estrogenów odpowiedzialne jest białko MRP2/ABCC2 transportujące glukuronidy estrogenów [93].

REGULACJA EKSPRESJI GENÓW UDP-GLUKURONYLOTANSFERAZY

Regulacja ekspresji genów *UGT* jest, obok polimorfizmu, jednym z głównych czynników mających wpływ na zróżnicowany poziom glukuronidacji, nie tylko w różnych tkankach i organach jednego organizmu, ale również w tych samych tkankach i organach różnych organizmów.

KONSTYTUTYWNA REGULACJA GENÓW *UGT* W WĄTROBIE

Ze względu na występowanie większości izoform *UGT* w wątrobie, do najwcześniejszych poznanych czynników odgrywających rolę w regulacji ekspresji genów *UGT* zaliczają się wątrobowe czynniki transkrypcyjne LETF (ang. *liver-enriched transcription factors*).

Czynnik transkrypcyjny hepatocytów HNF-1 α (ang. *hepatocyte nuclear factor*) jest białkiem, które wiąże się jako homodimer lub wraz z HNF-1 β jako heterodimer do sekwencji palindromowej GTTAATNATTAAC, zwiększając w ten sposób aktywność promotora genu. Badania prowadzone w hodowlach komórek wskazały, że wszystkie do tej pory zbadane geny *UGT* człowieka regulowane są na tej drodze. Czynniki transkrypcyjnymi wpływającymi pośrednio na poziom ekspresji genów białek *UGT* poprzez oddziaływanie z HNF-1 są: wiążący oktamer Oct-1 i czynnik transkrypcyjny białaczki komórek pre-B Pbx2 (ang. *Pre B cell homeobox-2*). Oct-1 wpływa na transkrypcję *UGT2B7* poprzez wiązanie do HNF-1, co podwyższa aktywność promotora genu. Ta właściwość Oct-1 może zapewniać regulację aktywności promotora *UGT2B7* w warunkach stresu genotoksycznego, ponieważ zaobserwowano, że poziom białka Oct-1 w komórce ulega podwyższeniu w obecności czynników uszkadzających DNA tj. promieniowania UV, promieniowania jonizującego oraz leków przeciwnowotworowych: etopozyd, cisplatyny i kamptotecyny. Przeciwnie właściwości wykazują kwasy żółciowe i androgeny, które zapobiegają wiązaniu Oct-1 do HNF-1. Hamowanie aktywności promotorów genów *UGT2B* (z wyjątkiem *UGT2B4* i *UGT2B7*) ma miejsce poprzez wiązanie czynnika Pbx2 do sekwencji DNA sąsiadującej z sekwencją wiążącą HNF-1. Należy zauważyć, że w wątrobie wśród genów rodziny

UGT2B najwyższą ekspresję wykazują UGT2B4 i UGT2B7, które, jak wspomniano powyżej, nie podlegają hamującemu wpływowi Pbx2.

Konstrytuwnym regulatorem genów UGT1A1, UGT1A6 i UGT1A9 jest również receptor jądrowy HNF-4α zawierający motyw palca cynkowego. Wiąże się on w postaci homodimeru do powtórzeń AGGTCA, oddzielonych przez jeden lub dwa nukleotydy. Podobnie jak HNF-1 odpowiada za podwyższenie aktywności promotora, a efekt ten jest najsilniejszy dla genu UGT1A9.

REGULACJA PRZEZ CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE
AKTYWOWANE ZWIĄZANIEM LIGANDA

Wątrobowe UGT, oprócz regulacji przez LETF są regulowane także przez czynniki transkrypcyjne zależne od ligandów, w tym receptory jądrowe i inne białka zaangażowane w odpowiedź na stres.

Receptor cytoplazmatyczny AhR (ang. *Aryl hydrocarbon receptor*), w obecności agonistów tj. tetrachlorodibenzodioxyny (TCDD), benzo(a)pirenu czy 3-metylocholantrenu, wiąże się wraz z białkiem jądrowym ARNT (ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) ze specyficzną sekwencją DNA T/GCGTG, tzw. czynnikami wzmacniającymi odpowiedź na ksenobiotyki XRE (ang. *xenobiotic responsive enhancers*). Powoduje to podwyższenie aktywności transkrypcyjnej promotorów UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6 i UGT1A9.

Ekspresja genu UGT1A1 regulowana jest też z udziałem czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (ang. *NF-E2-related factor-2*). Jego aktywność zależy od obecności w komórce antyoksydantów, które powodują dysocjację związanego z Nrf2 białka Keap1 (ang. *Kelchlike ECH-associated protein 1*). Następuje po tym translokacja Nrf2 z cytoplazmy do jądra, gdzie tworząc heterodimer z białkiem Maf wiąże się do struktury TGACnnnGC, tzw. sekwencji odpowiedzi na antyoksydanty ARE (ang. *antioxidant response element*). Przypuszcza się, że ekspresja UGT1A6 jest również aktywowana antyoksydantami, jednak aktywacja ta przebiega poprzez inny mechanizm z udziałem receptora AhR.

Wśród 49 receptorów jądrowych człowieka, kilka odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji genów UGT. Grupa ta obejmuje konstytutywny receptor androstanu (CAR, ang. *constitutive androstane receptor*), receptor pregnanu X (PXR, ang. *pregnane X receptor*), farnesoidowy receptor X (FXR, ang. *farnesoid X receptor*), wątrobowy receptor X (LXR, ang. *liver X receptor*) i receptor aktywowany przez proliferatory peroksyosomów (PPAR, ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*). Wszystkie one tworzą heterodimery z receptorem kwasu 9-cis retinowego (RXR, ang. *retinoid X receptor*), po czym wiążą się z sekwencjami docelowymi. W przypadku genu UGT1A1 jego ekspresja regulowana jest przez CAR w odpowiedzi na obecność agonisty fenobarbitalu lub antagonistów takich jak androstenol. Przypuszcza się, że CAR odgrywa też rolę w regulacji UGT1A6. Z kolei aktywowany rifampicyną lub klotrimazolem PXR może wiązać się do sekwencji UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4 i UGT1A6, podwyższając ich ekspresję. Związany z ligandem FXR indukuje UGT2B4, poprzez mechanizm niewymagający utworzenia

dimeru z RXR oraz jest inhibitorem ekspresji UGT2B7. Oksysterole, do kumulacji których dochodzi podczas cholestazy, są ligandami dla LXR, który po dimeryzacji z RXR i związaniu z elementem promotora UGT1A3, aktywuje transkrypcję tego genu. Ponieważ substratami UGT1A3 są kwas chenodeoksycholowy i lithocholowy, podwyższony poziom oksysteroli może powodować detoksykację kwasów żółciowych. Geny UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4 i UGT1A6 podlegają dodatniej regulacji przez PPAR, którego ligandami są eikozanoidy, kwasy tłuszczowe oraz leki z grupy fibratów (gemfibrozil, klofibrat) i tiazolidynediony [94,95].

PODSUMOWANIE

Wśród związków sprzęganych w organizmie człowieka przez UDP-glukuronylotransferazy do mniej toksycznych koniugatów są zarówno endogenne hormony i kwasy żółciowe jak i ksenobiotyki o zróżnicowanej strukturze, w tym leki i związki kancerogenne. Enzymy rodziny UGT wykazują w stosunku do nich szeroką, często pokrywającą się, specyficzność substratową. Stwierdzono poza tym polimorfizm genów kodujących niemal każdą izoformę UGT oraz, że poszczególne warianty polimorficzne enzymu mogą się znacząco różnić aktywnością katalityczną modyfikując zdolność do detoksykacji, a nawet wpływać na ryzyko wystąpienia nowotworu.

Reakcja glukuronidacji, uważana zazwyczaj za główny kierunek metabolicznej detoksykacji, może jednak prowadzić do tworzenia metabolitów o zachowanej, a nawet podwyższonej aktywności farmakologicznej w stosunku do wyjściowych aglikonów. Konieczne jest więc poznanie molekularnych mechanizmów powstawania glukuronidów, jak również określenie roli poszczególnych izoenzymów dla przebiegu tych procesów. Istotnym aspektem badań nad aktywnością UGT wydaje się również określenie czy na efektywność bądź toksyczność danego leku mają wpływ czynniki zmieniające aktywność tych enzymów. Można przypuszczać, że wielopoziomowa różnorodność enzymów UGT, polegająca z jednej strony na istnieniu wielu izoform tych białek, z drugiej na polimorfizmie ich genów w grupach etnicznych i u poszczególnych osobników jest całkowym efektem ewolucji. Gdy dołączymy do tego możliwość indukcji ekspresji genów kodujących białka UGT przez różne czynniki środowiska (leki, żywność, chemiczne zanieczyszczenia środowiska), to obserwowana różnorodność wydaje się czynnikiem obrony organizmu, który musi być „przygotowany” na detoksykację wielu nowych substancji wprowadzanych do organizmu. W tym aspekcie optymalną metodą obrony wydaje się być szeroki „potencjał” możliwości katalitycznych enzymów UGT.

PIŚMIENICTWO

1. Shipkova M, Wieland E (2005) Glucuronidation in therapeutic drug monitoring. Clin Chim Acta 358: 2-23
2. Barbier O, Turgeon D, Girard C, Green MD, Tephly TR, Hum DW, Bélanger A (2000) 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) is glucuronidated by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7). Drug Metab Dispos 28: 497-502
3. Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, Ball SE (2004) Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for

- typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos* 32: 1201-1208
4. Miller GP, Jones DR, Sullivan SZ, Mazur A, Owen SN, Mitchell NC, Radomska-Pandya A, Moran JH (2009) Assessing cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase contributions to warfarin metabolism in humans. *Chem Res Toxicol* 22: 1239-1245
 5. Ikushiro S, Emi Y, Iyanagi T (1995) Identification and analysis of drug-responsive expression of UDP-glucuronosyltransferase family 1 (UGT1) isozyme in rat hepatic microsomes using anti-peptide antibodies. *Arch Biochem Biophys* 324: 267-272
 6. Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude Elferink RP, Chowdhury JR, Chowdhury NR, Jansen PL (1994) Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 269: 17960-17964
 7. Bosma PJ (2003) Inherited disorders of bilirubin metabolism. *J Hepatol* 38: 107-117
 8. Ebner T, Rimmel RP, Burchell B (1993) Human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase catalyzes the glucuronidation of ethinylestradiol. *Mol Pharmacol* 43: 649-654
 9. Findlay KA, Kaptein E, Visser TJ, Burchell B (2000) Characterization of the Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferase-Catalyzing Thyroid Hormone Glucuronidation in Man. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2879-2883
 10. Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, Ball SE (2004) Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos* 32: 1201-1208
 11. Kiang TK, Ensom MH, Chang TK (2005) UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther* 106: 97-132
 12. Iyanagi T, Emi Y, Ikushiro S (1998) Biochemical and molecular aspects of genetic disorders of bilirubin metabolism. *Biochim Biophys Acta* 30: 173-184
 13. Jansen PL (1999) Diagnosis and management of Crigler-Najjar syndrome. *Eur J Pediatr* 158 Suppl 2: 89-94
 14. Guillemette C (2003) Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J* 3: 136-158
 15. Mackenzie PI, Gregory PA, Lewinsky RH, Yasmin SN, Height T, McKinnon RA, Gardner-Stephen DA (2005) Polymorphic variations in the expression of the chemical detoxifying UDP-glucuronosyltransferases. *Toxicol Appl Pharmacol* 207: 77-83
 16. O'Dwyer PJ, Catalano RB (2006) Uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 and irinotecan: practical pharmacogenomics arrives in cancer therapy. *J Clin Oncol* 24: 4534-4538
 17. Iyer L, Das S, Janisch L, Wen M, Ramirez J, Karrison T, Fleming GF, Vokes EE, Schilsky RL, Ratain MJ (2002) UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J* 2: 43-47
 18. Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H, Yokoyama A, Saitoh S, Shimokata K, Hasegawa Y (2000) Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* 60: 6921-6926
 19. Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, Karrison T, Janisch L, Ramirez J, Rudin CM, Vokes EE, Ratain MJ (2004) Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* 22: 1382-1388
 20. Nagar S, Rimmel RP (2006) Uridine diphosphoglucuronosyltransferase pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 25: 1659-1672
 21. Senafi SB, Clarke DJ, Burchell B (1994) Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation. *Biochem J* 303: 233-240
 22. King CD, Green MD, Rios GR, Coffman BL, Owens IS, Bishop WP, Tephly TR (1996) The glucuronidation of exogenous and endogenous compounds by stably expressed rat and human UDP-glucuronosyltransferase 1.1. *Arch Biochem Biophys* 332: 92-100
 23. Mojarrabi B, Butler R, Mackenzie P (1996) cDNA cloning and characterization of the Human UDP glucuronosyltransferase, UGT1A3. *Biochem Biophys Res Commun* 225: 785-790
 24. Green MD, King CD, Mojarrabi B, Mackenzie PI, Tephly TR (1998) Glucuronidation of amines and other xenobiotics catalyzed by expressed human UDP-glucuronosyltransferase 1A3. *Drug Metab Dispos* 26: 507-512
 25. Gall WE, Zawada G, Mojarrabi B, Tephly TR, Green MD, Coffman BL, Mackenzie PI, Radomska-Pandya A (1999) Differential glucuronidation of bile acids, androgens and estrogens by human UGT1A3 and 2B7. *J Steroid Biochem Mol Biol* 70: 101-108
 26. Iwai M, Maruo Y, Ito M, Yamamoto K, Sato H, Takeuchi Y (2004) Six novel UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A3) polymorphisms with varying activity. *J Hum Genet* 49: 123-128
 27. Chen Y, Chen S, Li X, Wang X, Zeng S (2006) Genetic Variants of Human UGT1A3: Functional Characterization and Frequency Distribution in a Chinese Han Population. *Drug Metab Dispos* 34: 1462-1467
 28. Green MD, Bishop WP, Tephly TR (1995) Expressed human UGT1.4 protein catalyzes the formation of quaternary ammonium-linked glucuronides. *Drug Metab Dispos* 23: 299-302
 29. Green MD, Tephly TR (1996) Glucuronidation of amines and hydroxylated xenobiotics and endobiotics catalyzed by expressed human UGT1.4 protein. *Drug Metab Dispos* 24: 356-363
 30. Miyagi SJ, Collier AC (2007) Pediatric Development of Glucuronidation: The Ontogeny of Hepatic UGT1A4. *Drug Metab Dispos* 35: 1587-1592
 31. Ogura K, Ishikawa Y, Kaku T, Nishiyama T, Ohnuma T, Muro K, Hiratsuka A (2006) Quaternary ammonium-linked glucuronidation of trans-4-hydroxytamoxifen, an active metabolite of tamoxifen, by human liver microsomes and UDP-glucuronosyltransferase 1A4. *Biochem Pharmacol* 71: 1358-1369
 32. Hanioka N, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Nishimura T, Ando M (2001) Determination of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 activity in human and rat liver microsomes by HPLC with UV detection. *J Pharm Biomed Anal* 25: 65-75
 33. Orzechowski A, Schrenk D, Bock-Hennig BS, Bock KW (1994) Glucuronidation of carcinogenic arylamines and their N-hydroxy derivatives by rat and human phenol UDP-glucuronosyltransferase of the UGT1 gene complex. *Carcinogenesis* 15: 1549-1553
 34. Ciotti M, Marrone A, Potter C, Owens IS (1997) Genetic polymorphism in the human UGT1A6 (planar phenol) UDP-glucuronosyltransferase: pharmacological implications. *Pharmacogenetics* 7: 485-495
 35. Nagar S, Zalatoris JJ, Blanchard RL (2004) Human UGT1A6 pharmacogenetics: identification of a novel SNP, characterization of allele frequencies and functional analysis of recombinant allozymes in human liver tissue and in cultured cells. *Pharmacogenetics* 14: 487-499
 36. Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Kaniwa N, Ozawa S, Komamura K, Kotake T, Morishita H, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoike H, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Kamatani N, Sawada J (2005) Genetic polymorphisms of UGT1A6 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* 20: 85-90
 37. Bigler J, Whittom J, Lampe JW, Fosdick L, Bostick RM, Potter JD (2001) CYP2C9 and UGT1A6 genotypes modulate the protective effect of aspirin on colon adenoma risk. *Cancer Res* 61: 3566-3569
 38. Chan AT, Tranah GJ, Giovannucci EL, Hunter DJ, Fuchs CS (2005) Genetic variants in the UGT1A6 enzyme, aspirin use, and the risk of colorectal adenoma. *J Natl Cancer Inst* 97: 457-460
 39. Strassburg CP, Manns MP, Tukey RH (1998) Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. *J Biol Chem* 273: 8719-8726
 40. Strassburg CP, Strassburg A, Nguyen N, Li Q, Manns MP, Tukey RH (1999) Regulation and function of family 1 and family 2 UDP-glucuronosyltransferase genes (UGT1A, UGT2B) in human oesophagus. *Biochem J* 338: 489-498
 41. Bernard O, Guillemette C (2004) The main role of UGT1A9 in the hepatic metabolism of mycophenolic acid and the effects of naturally occurring variants. *Drug Metab Dispos* 32: 775-778

42. Köhle C, Möhrle B, Münzel PA, Schwab M, Wernet D, Badary OA, Bock KW (2003) Frequent co-occurrence of the TATA box mutation associated with Gilbert's syndrome (UGT1A1*28) with other polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase-1 locus (UGT1A6*2 and UGT1A7*3) in Caucasians and Egyptians. *Biochem Pharmacol* 65: 1521-1527
43. Guillemette C, Ritter JK, Auyeung DJ, Kessler FK, Housman DE (2000) Structural heterogeneity at the UDP-glucuronosyltransferase 1 locus: functional consequences of three novel missense mutations in the human UGT1A7 gene. *Pharmacogenetics* 10: 629-644
44. Zheng Z, Park JY, Guillemette C, Schantz SP, Lazarus P (2001) Tobacco carcinogen-detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with orolaryngeal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 93: 1411-1418
45. Wang Y, Kato N, Hoshida Y, Otsuka M, Taniguchi H, Moriyama M, Shiina S, Kawabe T, Ito YM, Omata M (2004) UDP-glucuronosyltransferase 1A7 genetic polymorphisms are associated with hepatocellular carcinoma in Japanese patients with hepatitis C virus infection. *Clin Cancer Res* 10: 2441-2446
46. Stücker I, Lorient MA, N'Koutchou G, Céné S, Bodin L, Mulot C, Gelu-Simeon M, Pelletier L, Bronowicki JP, Degos F, Beaune P, Laurent-Puig P, Hémon D, Trinchet JC, Pelletier G (2007) UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 genetic polymorphisms in hepatocellular carcinoma: a differential impact according to seropositivity of HBV or HCV markers? *BMC Cancer* 7: 214
47. Strassburg CP, Vogel A, Tukey RH, Manns MP (2002) Polymorphisms of the human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A7 gene in colorectal cancer. *Gut* 50: 851-856
48. Ockenga J, Vogel A, Teich N, Keim V, Manns MP, Strassburg CP (2003) UDP glucuronosyltransferase (UGT1A7) gene polymorphisms increase the risk of chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 124: 1802-1808
49. Araki J, Kobayashi Y, Iwasa M, Urawa N, Gabazza EC, Taguchi O, Kaito M, Adachi Y (2005) Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 1A7 gene: a possible new risk factor for lung cancer. *Eur J Cancer* 41: 2360-2365
50. Mojarrabi B, Mackenzie PI (1998) Characterization of two UDP glucuronosyltransferases that are predominantly expressed in human colon. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 704-709
51. Cheng Z, Radomska-Pandya A, Tephly TR (1999) Studies on the substrate specificity of human intestinal UDP-glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10. *Drug Metab Dispos* 27: 1165-1170
52. Murai T, Samata N, Iwabuchi H, Ikeda T (2006) Human UDP-glucuronosyltransferase, UGT1A8, glucuronidates dihydrotestosterone to a monoglucuronide and further to a structurally novel diglucuronide. *Drug Metab Dispos* 34: 1102-1108
53. Huang YH, Galijatovic A, Nguyen N, Geske D, Beaton D, Green J, Green M, Peters WH, Tukey RH (2002) Identification and functional characterization of UDP-glucuronosyltransferases UGT1A8*1, UGT1A8*2 and UGT1A8*3. *Pharmacogenetics* 12: 287-297
54. Wang M, Sun DF, Li YQ, Chen J, Guo CH, Liu FG, Yuan MB (2005) Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A8 gene in human colorectal cancer. *World Chin J Digestol* 13: 1819-1823
55. Albert C, Vallée M, Beaudry G, Bélanger A, Hum DW (1999) The Monkey and Human Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferase UGT1A9, Expressed in Steroid Target Tissues, Are Estrogen-Conjugating Enzymes. *Endocrinology* 140: 3292-3302
56. Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Ozawa S, Sawada J (2003) Three novel single nucleotide polymorphisms in UGT1A9. *Drug Metab Pharmacokinet* 18: 146-149
57. Court MH, Duan SX, Moltke LL, Greenblatt DJ, Patten CJ, Miners JO, Mackenzie PI (2001) Interindividual Variability in Acetaminophen Glucuronidation by Human Liver Microsomes: Identification of Relevant Acetaminophen UDP-Glucuronosyltransferase Isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* 299: 998-1006
58. Ramírez J, Iyer L, Journault K, Bélanger P, Innocenti F, Ratain MJ, Guillemette C (2002) *In Vitro* Characterization of Hepatic Flavopiridol Metabolism Using Human Liver Microsomes and Recombinant UGT Enzymes. *Pharmacol Res* 19: 588-594
59. Lewinsky RH, Smith PA, Mackenzie PI (2005) Glucuronidation of bioflavonoids by human UGT1A10 : structure-function relationships. *Xenobiotica* 35: 117-129
60. Dellinger RW, Fang JL, Chen G, Weinberg R, Lazarus P (2006) Importance of UDP-glucuronosyltransferase 1A10 (UGT1A10) in the detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons: decreased glucuronidative activity of the UGT1A10¹³⁹Lys isoform. *Drug Metab Dispos* 34: 943-949
61. Dellinger RW, Chen G, Blevins-Primeau AS, Krzeminski J, Amin S, Lazarus P (2007) Glucuronidation of PhIP and N-OH-PhIP by UDP-glucuronosyltransferase 1A10. *Carcinogenesis* 28: 2412-2418
62. Balliet RM, Chen G, Dellinger RW, Lazarus P (2009) UGT1A10: Activity against the tobacco-specific nitrosamine, NNAL, and a potential role for a novel UGT1A10 promoter deletion polymorphism in cancer susceptibility. *Drug Metab Dispos* 38: 484-490
63. Jinno H, Saeki M, Tanaka-Kagawa T, Hanioka N, Saito Y, Ozawa S, Ando M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Sawada J (2003) Functional characterization of wild-type and variant (T202I and M59I) human UDP-glucuronosyltransferase 1A10. *Drug Metab Dispos* 31: 528-532
64. Lévesque E, Beaulieu M, Hum DW, Bélanger A (1999) Characterization and substrate specificity of UGT2B4 (E458): a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene. *Pharmacogenetics* 9: 207-216
65. Barre L, Fournel-Gigleux S, Finel M, Netter P, Magdalou J, Ouzzine M (2007) Substrate specificity of the human UDP-glucuronosyltransferase UGT2B4 and UGT2B7. Identification of a critical aromatic amino acid residue at position 33. *FEBS J* 274: 1256-1264
66. Ohno A, Saito Y, Hanioka N, Jinno H, Saeki M, Ando M, Ozawa S, Sawada J (2004) Involvement of human hepatic UGT1A1, UGT2B4, and UGT2B7 in the glucuronidation of carvedilol. *Drug Metab Dispos* 32: 235-239
67. Radomska-Pandya A, Little JM, Czernik PJ (2001) Human UDP-glucuronosyltransferase 2B7. *Curr Drug Metab* 2: 283-298
68. Girard C, Barbier O, Veilleux G, El-Alfy M, Bélanger A (2003) Human uridine diphosphate-glucuronosyltransferase UGT2B7 conjugates mineralocorticoid and glucocorticoid metabolites. *Endocrinology* 144: 2659-2668
69. King C, Tang W, Ngui J, Tephly T, Braun M (2001) Characterization of rat and human UDP-glucuronosyltransferases responsible for the *in vitro* glucuronidation of diclofenac. *Toxicol Sci* 61: 49-53
70. Mano Y, Usui T, Kamimura H (2007) Predominant contribution of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 in the glucuronidation of racemic flurbiprofen in the human liver. *Drug Metab Dispos* 35: 1182-1187
71. Sakaguchi K, Green M, Stock N, Reger TS, Zunic J, King C (2004) Glucuronidation of carboxylic acid containing compounds by UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Arch Biochem Biophys* 424: 219-225
72. Innocenti F, Iyer L, Ramírez J, Green MD, Ratain MJ (2001) Epirubicin glucuronidation is catalyzed by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7. *Drug Metab Dispos* 29: 686-692
73. Chen M, Leduc B, Kerr SG, Howe D, Williams DA (2009) Identification of Human UGT2B7 As the Major Isoform Involved In the O-Glucuronidation of Chloramphenicol. *Drug Metab Dispos* 38: 368-375
74. Chen F, Ritter JK, Wang MG, McBride OW, Lubet RA, Owens IS (1993) Characterization of a cloned human dihydrotestosterone/androstenediol UDP-glucuronosyltransferase and its comparison to other steroid isoforms. *Biochemistry* 32: 10648-10657
75. Turgeon D, Carrier JS, Lévesque E, Hum DW, Bélanger A (2001) Relative enzymatic activity, protein stability, and tissue distribution of human steroid-metabolizing UGT2B subfamily members. *Endocrinology* 142: 778-787
76. Nishiyama T, Ogura K, Nakano H, Ohnuma T, Kaku T, Hiratsuka A, Muro K, Watabe T (2002) Reverse geometrical selectivity in glucuronidation and sulfation of cis- and trans-4-hydroxytamoxifen by human liver UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases. *Biochem Pharmacol* 63: 1817-1830

77. Zhang JY, Zhan J, Cook CS, Ings RM, Breau AP (2003) Involvement of human UGT2B7 and 2B15 in rofecoxib metabolism. *Drug Metab Dispos* 31: 652-658
78. Hanioka N, Naito T, Narimatsu S (2008) Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere* 74: 33-36
79. Court MH, Duan SX, Guillemette C, Journault K, Krishnaswamy S, Von Moltke LL, Greenblatt DJ (2002) Stereoselective conjugation of oxazepam by human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): S-oxazepam is glucuronidated by UGT2B15, while R-oxazepam is glucuronidated by UGT2B7 and UGT1A9. *Drug Metab Dispos* 30: 1257-1265
80. He X, Hesse LM, Hazarika S, Masse G, Harmatz JS, Greenblatt DJ, Court MH (2009) Evidence for oxazepam as an *in vivo* probe of UGT2B15: oxazepam clearance is reduced by UGT2B15 D85Y polymorphism but unaffected by UGT2B17 deletion. *Br J Clin Pharmacol* 68: 721-730
81. Ritter JK (2000) Roles of Glucuronidation and UDP-Glucuronosyltransferases in Xenobiotic Bioactivation Reactions. *Chem Biol Interact* 129: 171-193
82. Miller EC, Lotlikar PD, Miller JA, Butler BW, Irving CK, Hill JT (1968) Reactions in vitro of some tissue nucleophiles with the glucuronide of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene. *Mol Pharmacol* 4: 147-154
83. Hanna PE, Banks RB (1985) Arylhydroxylamines and arylhydroxamic acids: conjugation reactions, W: Bioactivation of Foreign Compounds, Anders MW, ed., Academic Press, New York
84. Babu SR, Lakshmi VM, Huang GP, Zenser TV, Davis BB (1996) Glucuronide conjugates of 4-aminobiphenyl and its N-hydroxy metabolites. pH stability and synthesis by human and dog liver. *Biochem Pharmacol* 51: 1679-1685
85. Babu SR, Lakshmi VM, Hsu FF, Zenser TV, Davis BB (1995) Glucuronidation of N-hydroxy metabolites of N-acetylbenzidine. *Carcinogenesis* 16: 3069-3074
86. Sallustio BC, DeGraaf YC, Weekley JS, Burcham PC (2006) Bioactivation of carboxylic acid compounds by UDP-Glucuronosyltransferases to DNA-damaging intermediates: Role of glycooxidation and oxidative stress in genotoxicity. *Chem Res Toxicol* 19: 683-691
87. Sallustio BC, Harkin LA, Mann MC, Krivickas SJ, Burcham PC (1997) Genotoxicity of acyl glucuronide metabolites formed from clofibrate acid and gemfibrozil: a novel role for phase-II-mediated bioactivation in the hepatocarcinogenicity of the parent aglycones. *Toxicol Appl Pharmacol* 147: 459-464
88. Christrup LL (1997) Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiol Scand* 41: 116-122
89. Murthy BR, Pollack GM, Brouwer KL (2002) Contribution of morphine-6-glucuronide to antinociception following intravenous administration of morphine to healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 42: 569-576
90. Barua AB, Batres RO, Olson JA (1989) Characterization of retinyl beta-glucuronide in human blood. *Am J Clin Nutr* 50: 370-374
91. Formelli F, Barua AB, Olson JA (1996) Bioactivities of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and retinoyl beta-glucuronide. *FASEB J* 10: 1014-1024
92. Olson JA, Moon RC, Anders MW, Fenselau C, Shane B (1992) Enhancement of biological activity by conjugation reactions. *J Nutr* 122: 615-624
93. Gerk PM, Li W, Vore M (2004) Estradiol 3-glucuronide is transported by the multidrug resistance-associated protein 2 but does not activate the allosteric site bound by estradiol 17-glucuronide. *Drug Metab Dispos* 32: 1139-1145
94. Mackenzie PI, Gregory PA, Gardner-Stephen DA, Lewinsky RH, Jorgensen BR, Nishiyama T, Xie W, Radomska-Pandya A (2003) Regulation of UDP Glucuronosyltransferase Genes. *Curr Drug Metab* 4: 249-257
95. Mackenzie PI, Hu DG, Gardner-Stephen DA (2010) The regulation of UDP-glucuronosyltransferase genes by tissue-specific and ligand-activated transcription factors. *Drug Metab Rev* 42: 95-10

UDP-glucuronyltransferases in detoxification and activation metabolism of endogenous compounds and xenobiotics

Barbara Fedejko, Zofia Mazerska✉

Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Chemical Faculty, Gdansk University of Technology, 11/12 Narutowicza St., 80-233 Gdansk, Poland

✉e-mail: zofia.mazerska@pg.gda.pl

Key words: activated glucuronidation, drug metabolism, UDP-glucuronosyltransferases, UGT isoenzymes, xenobiotic detoxification

ABSTRACT

Glucuronidation is a crucial pathway of metabolism and excretion of endogenous compounds and xenobiotics. UDP-glucuronyltransferases, UGT, catalyse transformations of bilirubine, steroids and thyroid hormones, bile acids as well as exogenous compounds, including drugs, carcinogens, environmental pollutants and nutrient components. From therapeutic point of view, the participation of UGTs in drug metabolism is of particular significance. Polymorphism of *UGT1A* and *UGT2B* genes resulted in various susceptibility of substrates to conjugation with glucuronic acid. Deactivation of xenobiotics and the following excretion of hydrophilic conjugates is a common task of glucuronidation, which should lead to detoxification. However, a lot of glucuronides were known, which expressed the comparable or even higher reactivity than that of the native compound. There are, among others, acyl glucuronides of carboxylic acids, morphine 6-O-glucuronide or retinoid glucuronides. They are able to bind cellular macromolecules with low or high strength and, as a consequence, their toxicity is saved or even increased, respectively.

STRESZCZENIE

Miozyny to zależne od aktywności białka motoryczne, zdolne do przekształcania energii chemicznej, zmagazynowanej w postaci ATP, w energię mechaniczną, generującą ruch. Miozyna VI jest uważana za wyjątkowe białko o unikalnych właściwościach i funkcjach w komórkach, ponieważ w odróżnieniu od innych, dotąd poznanych miozyn, przemieszcza się w kierunku końca „minus” filamentu aktynowego. Badania zmierzające do poznania lokalizacji komórkowej i biologicznej roli miozyny VI wskazują, że białko to bierze udział w wielu podstawowych procesach, takich jak endocytoza i sekrecja, podział i różnicowanie się komórek czy migracja. Funkcjonowanie miozyny VI w tak wielu różnorodnych procesach jest prawdopodobnie możliwe dzięki wiązaniu specyficznych partnerów w różnych typach komórek. Prezentowana praca opisuje budowę, właściwości kinetyczne i funkcje proponowane dla miozyny VI oraz przedstawia aktualne hipotezy dotyczące możliwych mechanizmów działania tego białka *in vivo*.

WPROWADZENIE

Miozyny to zależne od aktywności białka motoryczne występujące powszechnie w komórkach eukariotycznych, zdolne do przekształcania energii chemicznej zmagazynowanej w postaci ATP, w energię mechaniczną, generującą ruch. Miozyny zbudowane są w podobny sposób i funkcjonują w komórkach w formie monomerów lub dimerów, złożonych odpowiednio z jednego lub dwóch łańcuchów ciężkich. Każdy łańcuch ciężki zawiera zachowaną w ewolucji N-końcową domenę motoryczną (globularną główkę) o aktywności ATPazy i zdolności wiązania filamentu aktynowego, α -helikalną szyjkę oraz C-końcową pałeczkę (ogonek). Szyjka zawiera od 1 do 6 motywów IQ wiążących łańcuchy lekkie, którymi są specyficzne białka, najczęściej kalmodulina (CaM). Ogonek jest najbardziej zróżnicowaną domeną. Występuje w nim sekwencja umożliwiająca utworzenie superhelisy (ang. *coiled-coil*) zidentyfikowana u tych miozyn, które funkcjonują w formie dimerów. Zdolność wiązania aktywności i przekształcania energii chemicznej w kinetyczną dzięki hydrolizie ATP, umożliwia miozynom generowanie naprężeń i ruchów komórkowych podczas przebiegu procesów związanych ze wzrostem, zmianą kształtu, różnicowaniem, adhezją i migracją komórek oraz cytokinezą, a także wewnątrzkomórkowym transportem pęcherzyków, organeli i cząsteczek w cytoplazmie i jądrze komórkowym [1,2]. Wszystkie zidentyfikowane dotąd miozyny tworzą nadrodzinę białek obejmującą co najmniej 35 klas tych molekularnych motorów [3], wśród których wyróżnia się miozyny konwencjonalne i niekonwencjonalne [4]. Miozyny konwencjonalne tworzą klasę II, która obejmuje miozyny mięśniowe oraz strukturalnie i funkcjonalnie podobne do nich miozyny niemięśniowe. Miozyny klasy II zaangażowane są głównie w proces różnicowania komórek miogennych, tworzenie i funkcjonowanie aparatu skurczu w mięśniach oraz cytokinezę. Natomiast miozyny niekonwencjonalne, tworzące wszystkie pozostałe klasy, występują w różnych typach tkanek (także w mięśniach), lecz pod względem struktury i funkcji różnią się od białek zaliczanych do klasy II. Wśród nich wyróżnia się typowe, procesywne transportery komórkowe, zdolne do przeprowadzania wielokrotnych cykli katalitycznych przed oddysocjowaniem od filamentu aktynowego. Dzięki temu pokonują one znaczne odległości w relatywnie krótkim czasie, krocząc wzdłuż mikrofilamentów zawsze w kierunku ich końców „plus”. Właściwość ta wydaje się być krytyczną dla białka transportującego, gdyż umożliwia efektywny transport ładunku (carga).

Miozyna VI jest niekonwencjonalnym białkiem motorycznym cytoszkieletu aktynowego o charakterystycznej domenowej strukturze [5]. Jednak w odróżnieniu od innych, dotąd poznanych miozyn, miozyna VI przemieszcza się w kierunku końca „minus” filamentu aktynowego [6] i wykazuje szereg innych unikalnych właściwości. Wyjątkowo długi krok roboczy dimeru miozyny VI sugeruje potencjalne możliwości tego białka w transporcie wewnątrzkomórko-

Marta Lenartowska^{1,✉}

Jakub Walczewski^{2,✉}

¹Pracownia Biologii Rozwoju, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

²Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Fitopatologii, Radzików, Błonie

✉Pracownia Biologii Rozwoju, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; tel.: (56) 611 49 97, e-mail: mlenart@umk.pl

*Autor był studentem studiów I i II stopnia na kierunku biotechnologia Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMK

Artykuł otrzymano 29 grudnia 2010 r.
Artykuł zaakceptowano 7 lutego 2011 r.

Słowa kluczowe: miozyna VI, cytoszkielet aktynowy, białko kotwiczące, transport wewnątrzkomórkowy

Wykaz skrótów: CaM – kalmodulina; DWC – domena wiążąca ładunek (carga) w ogonku miozyny VI; Sv – zespół Snell's waltzer

Podziękowanie: Druk pracy jest finansowany z puli środków finansowych przeznaczonych na badania własne Pracowni Biologii Rozwoju UMK.

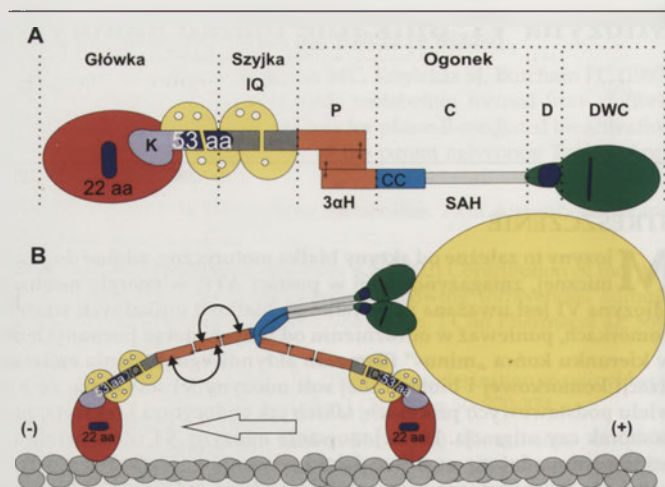
wym [7,8]. Z drugiej strony, tendencja do ścisłego i długotrwałego wiązania filamentu aktynowego, relatywnie niski stopień procesywności oraz sporadycznie wykonywane kroki wstecz w stosunku do głównego kierunku ruchu białka decydują o tym, że miozyna VI uważana jest za wyjątkowe białko motoryczne o unikalnych właściwościach i funkcjach w różnych typach komórek [5,9-11].

Miozyna VI po raz pierwszy została opisana u *Drosophila* [12], gdzie jej obecność ujawniono w wielu tkankach i narządach podczas cyklu życiowego [13]. U tego organizmu potwierdzono udział miozyny VI w procesie reorganizacji błon komórkowych w trakcie embriogenezy, w migrujących komórkach granicznych w jajniku, w asymetrycznie dzielących się neuroblastach, podczas morfogenezy komórek nabłonka i w trakcie spermatogenezy [14]. Miozynę VI odnaleziono także u wielu innych odległych ewolucyjnie gatunków zwierząt, jak *Caenorhabditis* i człowiek [15]. Obecności tego białka nie stwierdzono u *Dictyostelium*, drożdży i roślin [16]. U różnych organizmów odnaleziono wiele wariantów miozyny VI, które mogą być obecne w tym samym typie komórki lub być syntetyzowane w zależności od tkanki. U *Drosophila* zidentyfikowano trzy izoformy tego białka [12], natomiast u ssaków aż cztery [17]. Wielokrotnie ujawniono obecność miozyny VI w wyspecjalizowanych komórkach, głównie w bogatych w aktynę podbłonowych rejonach cytoplazmy, jak również w wpukleniach błony komórkowej, aparacie Golgiego i pęcherzykach cytoplazmatycznych różnych typów [10,11]. Dotychczas potwierdzono udział miozyny VI w różnicowaniu i migracji komórek, cytokinezie, komunikacji międzykomórkowej oraz wewnątrzkomórkowym transporcie pęcherzyków, organelli i specyficznych cząsteczek [5,7-11,14,18]. Ponadto, ujawniono obecność miozyny VI w jądrze komórkowym, gdzie białko to bierze udział w regulacji zależnej od polimerazy II RNA transkrypcji genów oraz w transporcie wewnątrzjądrowym [2,19,20].

CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA MIOZYNY VI

BUDOWA BIAŁKA

W strukturze pojedynczego łańcucha ciężkiego miozyny VI o masie cząsteczkowej ok. 140 kDa wyróżnia się (Ryc. 1A): N-kończową główkę o aktywności ATPazy i zdolności wiązania filamentu aktynowego; krótką szyjkę (tzw. ramię dźwigni), w której występuje pojedynczy motyw IQ wiążący cząsteczkę CaM oraz wielofunkcyjny ogonek [5,10,21,22]. W główce zidentyfikowano obecność unikalnej wstawki zbudowanej z 22 reszt aminokwasowych, istotnej dla mechanicznej koordynacji 2 domen motorycznych w cząsteczce potencjalnego dimeru (Ryc. 1A, wstawka 22 aa). Główkę z szyjką łączy subdomena, nazywana konwerterem, która uczestniczy w przekazywaniu energii mechanicznej uzyskanej z hydrolizy ATP. Pomiędzy konwerterem i szyjką występuje kolejna unikalna wstawka zbudowana z 53 reszt aminokwasowych, która pomimo braku motywu IQ wiąże drugą cząsteczkę CaM (Ryc. 1A, wstawka 53 aa). Wiązanie kalmoduliny przez tę unikalną wstawkę powoduje zmianę konformacji miozyny VI, co warunkuje ruch białka w kierunku końca „minus” filamentu aktynowego. W ogonku miozyny VI wyróżnia się fragmenty: proksymalny, centralny i dystalny oraz globularną domenę wiążącą ładunek (cargo; DWC). Fragment proksymalny tworzą trzy



Rycina 1. Schemat budowy łańcucha ciężkiego miozyny VI (A) oraz model dimeryzacji miozyny VI w wyniku związania ładunku (carga) (B). K - konwerter; P, C, D, DWC - fragmenty wielofunkcyjnego ogonka miozyny VI (odpowiednio: proksymalny, centralny, dystalny i domena wiążąca cargo), CC - sekwencja „coiled-coil”.

antyrownoległe α -helisy, które mogą ulegać rozwinięciu podczas dimeryzacji. Fragment centralny ogonka zawiera sekwencję prawdopodobnie tworzącą superhelisę oraz stabilną, pojedynczą α -helisę, tzw. element SAH. Uważa się, że obie te sekwencje są zaangażowane w stabilizację potencjalnego dimeru. W dystalnej strefie ogonka oraz w C-końcowej DWC zidentyfikowano kolejne dwie unikalne wstawki (Ryc. 1A, wstawki duża i mała), które warunkują powstawanie alternatywnych izoform tego białka.

Dotychczas zidentyfikowano zaledwie kilka białek wiązanych przez DWC w ogonku miozyny VI. Są to Dab2, GIPC i Sap97 - białka adaptorowe, uczestniczące w endocytozie zależnej od receptorów, błonowa kinaza białkowa LMTK2, pełniąca funkcję w procesie recyklicacji z udziałem endosomów, FIP2 (optyneuryna) i T6BP/NDP52 - białka związane z morfologią aparatu Golgiego i/lub z procesami wydzielania, białko wiążące tubulinę D-CLIP-190 oraz białka uczestniczące w procesie adhezji komórkowej - E-kadheryna i β -katenina [5,11]. Związanie określonego partnera decyduje o subkomórkowej lokalizacji miozyny VI i jej udziale w różnorodnych procesach komórkowych (Tab. 1).

WŁAŚCIWOŚCI KINETYCZNE MIOZYNY VI

Najbardziej charakterystyczną cechą miozyny VI jest kierunek jej ruchu do końca „minus” filamentu aktynowego [6] generowany przez zmianę konformacji białka w wyniku związania kalmoduliny przez unikalną wstawkę 53 aa. Krok roboczy dimeru miozyny VI jest wyjątkowo długi (~30-36 nm), co umożliwia udział białka w transporcie wewnątrzkomórkowym [23,24]. Jednak typowy transporter cargo, jakim jest miozyna V, potrafi wykonać aż około 40 podobnych kroków przed dysocjacją od mikrofilamentu, pokonując odległość ~1,5 μ m. Jest to możliwe dzięki bardzo długiemu ramieniu dźwigni, wyposażonemu w 6 konwencjonalnych motywów IQ [21]. Natomiast miozyna VI wykonuje tylko kilka zróżnicowanych pod względem długości kroków oraz sporadycznie kroki wstecz, pokonując zaledwie dystans ~200 nm [23-26]. Zdolność mechanicznej koordynacji obu domen motorycznych w dimerze miozyny VI (dzięki obec-

ności wstawki 22 aa), uważana pierwotnie za istotną dla procesywnego ruchu białka, umożliwia także długotrwałe wiązanie miozyny VI z filamentem aktynowym. Ponadto, badania *in vitro* dowodzą, że procesywny ruch miozyny VI jest możliwy tylko przy związaniu niewielkiego cargo, podczas gdy duże obciążenia generują naprężenia wewnątrz cząsteczki dimeru, powodując jego „zastyganie” w miejscu [27,28] a nawet wykonanie kroku wstecz [29]. Ujawniono również, że w gęstej sieci filamentów aktynowych monomery miozyny VI koordynują transport cargo równie wydajnie jak dimer w warunkach *in vitro* [30,31]. Wyniki te stały się podstawą do sformułowania hipotezy, zgodnie z którą miozyna VI jest nietypowym białkiem motorycznym, które w zależności od rodzaju wiążanego ładunku pełni funkcję transportera komórkowego lub białka kotwiczącego uczestniczącego w organizacji struktur aktynowych w komórce [18,22].

Kolejna kwestia dotyczy sposobu, w jaki miozyna VI wykonuje zaskakująco duży krok posiadając krótkie ramię dźwigni z pojedynczym motywem IQ. Wyniki badań kinetycznych prowadzonych w ciągu ostatniej dekady ujawniły, że miozyna VI zawiera elastyczny element zlokalizowany w ogonku tuż za motywem IQ-CaM, który wydłuża ramię dźwigni w wyniku dimeryzacji indukowanej związaniem cargo [26,32]. Pierwotna analiza sekwencji nowo odkrytej miozyny VI wskazywała, że głównym elementem strukturalnym ogonka jest sekwencja „coiled-coil”, występująca w miozynach II i V, odpowiedzialna za dimeryzację tych białek w warunkach *in vivo* [12,33]. Dlatego założono, że miozyna VI jest również dimerem. Badania *in vitro*, w których trwałą dimeryzację miozyny VI uzyskiwano z zastosowaniem białek zawierających sekwencje „coiled-coil” miozyny II lub zamka leucynowego potwierdziły, że dimer miozyny VI jest procesywnym motorem zdolnym do efektywnego transportu cargo na długich dystansach [23-25]. Jednak wyniki badań prowadzonych przez inne zespoły naukowe ujawniły, że miozyna VI izolowana z komórek jest mono-

merem, który nie wykazuje procesywnego ruchu wzdłuż mikrofilamentu [34], a sekwencja „coiled-coil” jest stabilną α -helisą, uniemożliwiającą dimeryzację [35]. Następnie dowiedziono, że monomery miozyny VI mogą być składane w procesywne dimery w rejonach komórki bogatych w aktynę [36]; proces ten jest indukowany wiązaniem dimerycznych lub monomerycznych partnerów [37,38]. Zaproponowano model, w którym oddziaływania pomiędzy DWC i domeną motoryczną w cząsteczce monomeru miozyny VI blokują formowanie dimeru [39]. Dopiero związanie partnera indukuje samorzutną dimeryzację miozyny VI. Wykonanie długiego kroku przez taki dimer miozyny VI jest możliwe dzięki obecności w ogonku stabilnej struktury zbudowanej z wiązki trzech α -helis oraz sztywniej subdomeny SAH, która stanowi konwencjonalne przedłużenie ramienia dźwigni u innych miozyn. Jednak najnowsze badania ujawniły, że wiązka trzech α -helis jest elastycznym elementem, który w cząsteczce monomeru miozyny VI występuje w postaci zwiniętej [32]. Związanie cargo indukuje dimeryzację miozyny VI z udziałem krótkiej sekwencji „coiled-coil” zlokalizowanej tuż za wiązką trzech trzech α -helis, co prowadzi do jej rozwinięcia i w konsekwencji wydłużenia ramienia dźwigni (Ryc. 1B). W tym modelu subdomena SAH jest strukturalnym elementem, który nie wpływa na długość kroku roboczego miozyny VI. Ponieważ dyfuzja funkcjonalnego dimeru w gęstej sieci aktyny może być utrudniona, hipoteza zakłada możliwość dyfuzji „zwiniętych” monomerów miozyny VI zachowujących aktywność ATPazy w miejsca docelowe, gdzie wiązanie specyficznego partnera indukuje proces dimeryzacji. Należy jednak pamiętać, że kwestia formy, w jakiej miozyna VI działa w warunkach *in vivo* nie została definitywnie rozstrzygnięta, dlatego wciąż bierze się pod uwagę możliwość funkcjonowania monomerów miozyny VI w roli transporterów komórkowych lub cząsteczek kotwiczących.

REGULACJA AKTYWNOŚCI KATALITYCZNEJ MIOZyny VI

Tabela 1. Partnerzy miozyny VI: ich miejsca wiązania w DWC ogonka miozyny VI, lokalizacja komórkowa i proponowane funkcje, wg [5,11].

Partner	Miejsce wiązania	Lokalizacja komórkowa	Proponowana funkcja
Dab2	WWY	błona komórkowa pęcherzyki klatrynowe	endocytoza receptorów LDLR adhezja i migracja komórek
GIPC	RRL	błona komórkowa pęcherzyki endocytarne aparat Golgiego	endocytoza transport receptorów w kompleksach Golgiego migracja komórek i cytokineza
Sap97	RRL	synapsy miejsca adhezji komórkowej	endocytoza/transport receptorów AMPA adhezja komórek
LMTK2	WWY	aparat Golgiego pęcherzyki cytoplazmatyczne	recykliczacja endocytarna
Optyneuryna	RRL	aparat Golgiego pęcherzyki cytoplazmatyczne	morfologia aparatu Golgiego egzocytoza/sekrecja
T6BP/NDP52	WWY	region aparatu Golgiego w pobliżu jądra komórkowego	wydzielanie komunikacja i adhezja komórek
D-CLIP 190	nieznane	mikrotubule	transport wewnątrzkomórkowy
E-kadheryna/ B-kenatyna	nieznane	miejsca adhezji komórkowej	adhezja i migracja komórek

Mechanizm regulacji aktywności miozyny VI jest słabo poznany. W cząsteczce białka odnaleziono kilka potencjalnych miejsc fosforylacji, ale tylko jedno z nich (reszta treoniny 406) zajmuje pozycję umożliwiającą bezpośrednią regulację aktywności ATPazy [10]. Fosforylacja przez kinazy białkowe w pozycji 406 wzmacnia wiązanie miozyny VI z filamentem aktynowym, co promuje zdolności kotwiczące białka [40]. Ponieważ w łańcuchu ciężkim miozyny VI odnaleziono 2 miejsca wiązania kalmoduliny, bierze się pod uwagę możliwość regulacji aktywności tego białka stężeniem Ca^{2+} [5,10,11]. Podwyższo-

ne stężenie tych jonów (powyżej 10 μM) wpływa ujemnie na kinetyczne parametry miozyny VI, takie jak aktywność ATPazy, tempo uwalniania ADP i ruch białka wzdłuż mikrofilamentu oraz właściwości kotwiczące. Natomiast optymalne stężenie Ca^{2+} warunkuje wiązanie miozyny VI do liposomów zawierających PIP_2 [41]. Co ciekawe, aktywność miozyny VI w jądrach samców *Drosophila* regulowana jest przez specyficzny rodzaj kalmoduliny, tzw. Androcam [42].

Promotor genu miozyny VI jest bezpośrednio aktywowany przez białko p53 w odpowiedzi na uszkodzenia DNA [43], natomiast pierwotny transkrypt podlega alternatywnemu składaniu, którego wynikiem jest powstanie izoform miozyny VI różniących się obecnością unikalnych wstawek w domenie ogonka [5,11]. Obecność jednej z nich (dużej lub małej), obu lub ich brak decyduje o lokalizacji wariantów miozyny VI w różnych typach komórek lub przedziałów komórkowych [17,44]. Niestety, nie wiadomo w jaki sposób te unikalne wstawki determinują mechanizm działania miozyny VI w odmiennych procesach komórkowych.

PROPONOWANE FUNKCJE MIOZyny VI

UDZIAŁ BIAŁKA W ENDOCYTOZIE

W 1994 roku zaobserwowano, że u *Drosophila* miozyna VI bierze udział w wewnątrzkomórkowym transporcie obłonionych struktur, co było pierwszą wskazówką, że białko to może uczestniczyć w endocytozie zależnej od receptorów [45]. Udział miozyny VI w tym procesie uzasadnia zdolność kroczenia wzdłuż filamentów aktynowych w kierunku ich końców „minus”, skierowanych do cytoplazmy komórki [46]. Rzeczywiście, miozyna VI jest obecna w komórkach aktywnych pod względem endocytozy, takich jak komórki rąbka szczoteczki jelita cienkiego, komórki nabłonka kanalików nerkowych i siatkówki oraz linie nowotworowe komórek nabłonka jelita, Caco-2 [8]. W komórkach tych miozyna VI zlokalizowana jest głównie w podbłonowej cytoplazmie oraz w wypustkach komórkowych i u ich podstawy, a więc w strefach bogatych w aktynę. Na poziomie subkomórkowym miozynę VI odnaleziono głównie w pęcherzykach endocytarnych, w których wykazuje zdolność asocjacji z szeregiem znanych białek adaptorowych uczestniczących w endocytozie, takich jak AP2, Dab2 i GIPC.

Wariant miozyny VI z dużą wstawką w ogonku wykryto w apikalnej strefie spolaryzowanych komórek Caco-2, gdzie występuje w pęcherzykach opłaszczonych klatryną oraz wpukleniach błony komórkowej [17]. Wyniki te potwierdzają udział miozyny VI w początkowych etapach endocytozy, podczas formowania i odrywania się pęcherzyków od błony komórkowej oraz ich wczesnego transportu, przed utratą opłaszczenia. W lokalizacji miozyny VI w pęcherzykach opłaszczonych klatryną pośredniczy białko Dab2, uważane za kluczowe w kontakcie błonowych receptorów powierzchniowych z maszyną endocytarną. Ten wielofunkcyjny łącznik wiąże się z adaptorem klatryny AP2 oraz motywem WWY, obecnym w DWC miozyny VI [8]. W komórkach nabłonka siatkówki ujawniono obecność wariantu miozyny VI bez dużej wstawki w ogonku w populacji pęcherzyków pozbawionych opłaszczenia [47]. W komórkach tych obserwowano lokalizację transferyny, klatryny i AP2

w podbłonowej cytoplazmie oraz wgłębieniach błony komórkowej, współwystępowanie miozyny VI i transferyny w pęcherzykach nieopłaszczonych oraz obecność transferyny we wczesnych endosomach. Wyniki te potwierdzają udział miozyny VI w procesie formowania pęcherzyków przejściowych, przed ich fuzją z wczesnym endosomem. W pęcherzykach pozbawionych opłaszczenia miozyna VI asocjuje z GIPC, innym adaptorem istotnym w procesie endocytozy [48,49].

Bez względu na typ komórki, spolaryzowanej lub nie-spolaryzowanej, miozyna VI jest obecna w rejonach komórki aktywnych w procesie endocytozy i oddziałuje z białkami, które warunkują prawidłowy przebieg tego procesu. Jednak mechanizm jej działania w różnych typach komórek nie jest uniwersalny i prawdopodobnie zależy od zdolności wiązania określonego cargo. Poprzez wiązanie aktyny w domenie motorycznej i Dab2 w DWC, krocząca ku środkowi komórki miozyna VI bierze udział w rekrutacji receptorów błonowych do powstających pęcherzyków endocytarnych, które następnie transportuje w głąb komórki [5,8]. Natomiast wiązanie GIPC umożliwia transport pęcherzyków „przejściowych” do wczesnego endosomu [47]. W obu przypadkach efektywna dyfuzja cargo w bogatych w aktynę podbłonowych regionach komórki jest możliwa dzięki funkcjonalnej domenie motorycznej miozyny VI [17,47]. Udział miozyny VI w transporcie pęcherzykowym podczas endocytozy potwierdzają badania, które ujawniły asocjację miozyny VI z innym białkiem zaangażowanym w drogę transportu zależną od receptorów. Jest nim transbłonowa kinaza białkowa LMTK2, wymagana dla efektywnego transportu wstecznego z udziałem tzw. recyklicującego endosomu [50].

Jednak ukierunkowany transport cargo z udziałem miozyny VI może być utrudniony w korowym regionie cytoplazmy, gdzie filamenty aktynowe tworzą rodzaj sieci. Również unikalne właściwości miozyny VI pozostają w sprzeczności z sugerowaną rolą typowego transportera cargo. Niewielka liczba wykonywanych kroków przed dysocjacją od mikrofilamentu wymuszałaby wielokrotne cykle wiązania miozyny VI z aktyną. Ponadto, wydłużony okres, w którym białko to pozostaje związane z filamentem aktynowym oraz wykonywane kroki wstecz potencjalnie obniżają efektywność transportu cargo. Dlatego brany jest pod uwagę także inny model udziału miozyny VI w procesie endocytozy, w którym polimeryzacja samej aktyny generuje siłę napędzającą przemieszczanie się pęcherzyków endocytarnych w głąb komórki. Wykazano, że prawidłowy przebieg endocytozy determinuje odpowiednia organizacja cytoszkieletu aktynowego, który w strefie szyjki pęcherzyka odrywającego się od błony komórkowej formuje strukturę przypominającą ogon komety [8]. Ponieważ polimeryzacja aktyny odbywa się przy błonie komórkowej [46], obecna w regionie podbłonowym komórki miozyna VI może wiązać poprzez DWC białka adaptorowe obecne w formującym się pęcherzyku i „wypychać” go w głąb komórki [18]. Polimeryzacja aktyny *per se* może wspomagać ten proces również w przestrzeni ogona komety, gdzie możliwa jest obecność kompleksu Arp2/3, który promuje nukleację aktyny. W tym modelu miozyna VI może regulować organizację cytoszkieletu aktynowego w miejscach powstawania pęcherzyków

endocytarnych przy błonie komórkowej oraz w strefach ich transportu [8,18].

PINOCYTOZA I FAGOCYTOZA

Szczególnym rodzajem endocytozy jest pinocytoza i fagocytoza, stanowiące sposób pobierania przez komórki fazy płynnej i cząstek stałych. Badania immunocytochemiczne prowadzone u *Amoeba* ujawniły obecność miozyny VI w kanalikach i pęcherzykach pinocytarnych oraz tworzących się wodniczkach trawiących i fagosomach [51]. Zablokowanie endogennej miozyny VI przy użyciu specyficznych przeciwciał skutkuje pojawieniem się defektów w przebiegu obu procesów. W badaniach tych wykazano też lokalizację miozyny VI w aparacie Golgiego, otoczce jądrowej, nukleoplazmie i błonie komórkowej oraz w wiązках mikrofilamentów. Ponieważ dużo niższy poziom sygnału reakcji immunocytochemicznej obserwowano na powierzchni pęcherzyków pinocytarnych i fagosomów, zakwestionowano udział miozyny VI w ich translokacji wzdłuż filamentów aktynowych. W zamian zaproponowano możliwość funkcjonowania miozyny VI w roli białka kotwiczącego na etapie powstawania pęcherzyków pinocytarnych i fagosomów z uwagi na obecność białka w powstających wgłębieniach błony komórkowej i w świetle wodniczek pokarmowych [51]. Rola miozyny VI w pozostałych miejscach lokalizacji, w których została odnaleziona u *Amoeba*, nie jest znana.

UDZIAŁ BIAŁKA W EGZOCYTOZIE

Rola cytoszkieletu i współdziałających z nim białek motorycznych w organizacji architektury i funkcji kompleksów Golgiego sugerowana jest od dawna [7]. Jakkolwiek główną rolę w transporcie nowo zsintetyzowanych białek do miejsc ich przeznaczenia w komórce przypisuje się mikrotubulom, badania ujawniły, że depolimeryzacja aktyny indukuje morfologiczne zmiany w strukturze aparatów Golgiego oraz upośledza przebieg egzocytozy. W hodowanych *in vitro* fibroblastach myszy miozynę VI wykryto w regionie *trans* aparatu Golgiego oraz w wypustkach krawędzi wiodącej komórki, takich jak filopodia i lamelipodia, gdzie poziom tego białka wzrastał po stymulacji hormonem wzrostu [52,53]. Przy braku funkcjonalnej miozyny VI w tych komórkach obserwowano defekty w budowie aparatów Golgiego i obniżenie poziomu sekrecji zasadowej fosfatazy SEAP, enzymu transportowanego na powierzchnię komórki [53]. Natomiast przywrócenie syntezy miozyny VI w zmutowanych fibroblastach skutkowało odtworzeniem właściwej morfologii aparatów Golgiego i zdolności wydzielniczych komórek. Mimo że wyniki tych badań potwierdziły udział miozyny VI w stabilizacji struktury i funkcji kompleksów Golgiego, mechanizm jej działania nie jest znany.

Pierwotnie zakładano, że miozyna VI transportuje pęcherzyki z cystern regionu *trans* aparatu Golgiego do rosnących wypustek krawędzi wiodącej komórki [52]. Jednak polimeryzacja aktyny odbywa się przy błonie komórkowej [46], co oznacza, że w formujących się wypustkach komórkowych mikrofilamenty zorientowane są końcami „minus” do wnętrza komórki. Fakt ten wyklucza udział miozyny VI w transporcie pęcherzyków bezpośrednio na powierzchnię komórki. W komórkach nerki szczura odnaleziono populację fila-

mentów aktynowych zlokalizowanych w pobliżu aparatów Golgiego i skierowanych końcami „plus” do regionów *trans* [7]. Tak zorientowane filamenty umożliwiają miozynie VI wspomaganie procesu pączkowania pęcherzyków w strefie *trans* oraz ich dyfuzję w pobliże mikrotubul, zdolnych do transportu na dłuższym dystansie [53]. U *Drosophila* miozyna VI wykazuje zdolność asocjacji z białkiem D-CLIP-190 wiążącym tubulinę [5], co wskazuje, że miozyna VI może pośredniczyć również w realizacji transportu pęcherzyków pomiędzy dwoma systemami cytoszkieletu. Inną kwestią jest potencjalna rola miozyny VI w morfologii aparatów Golgiego. Ponieważ białko to pozostaje związane z aktyną przez dłuższy czas, a w odpowiednich warunkach jest zdolne nawet „zastygać” na filamencie aktynowym, może „rozpinąć” błony cystern Golgiego na szkielecie zbudowanym z aktyny [53]. W tym modelu niezbędny jest udział specyficznego partnera, integralnego białka błonowego aparatu Golgiego, związanego w DWC ogonka miozyny VI. Takim kandydatem jest optyneuryna, która oddziałuje z miozyną VI w aparacie Golgiego i w recyklicującym endosomie [44,54]. W spolaryzowanych komórkach nabłonka wariant miozyny VI bez unikalnych wstawek w ogonku uczestniczy w procesie sortowania i transporcie nowo syntetyzowanych, bazolateralnych białek błonowych [44]. W transport tych białek zaangażowane jest także małe białko G (Rab8), które współwystępuje z miozyną VI i optyneuryną w recyklicującym endosomie, pośredniczącym w tym procesie [55]. Dlatego autorzy zakładają istnienie specyficznego kompleksu transportowego z udziałem tych trzech białek.

MIOZYNA VI W KOMÓRKACH WŁOSKOWATYCH UCHA WEWNĘTRZNEGO SSAKÓW

Miozyna VI jest zaangażowana w prawidłowe funkcjonowanie wyspecjalizowanych komórek nabłonka zmysłowego w narządzie spiralnym ślimaka (narząd Cortiego) w uchu wewnętrznym myszy. Komórki włoskowate, jako właściwe komórki słuchowe, posiadają na powierzchni regionu apikalnego zespoły cytoplazmatycznych wypustek (włosków słuchowych, tzw. stereocyliów), służących do odbierania sygnałów dźwiękowych. W komórkach tych u myszy typu dzikiego, miozyna VI zlokalizowana jest w bogatej w aktynę płycie kutikularnej u podstawy formujących się stereocyliów oraz w podbłonowej cytoplazmie apikalnego regionu komórki włoskowatej, uznawanej za strefę aktywną w procesie endocytozy [56-58]. U myszy z zespołem *Snell's waltzer (sv)* mutacje w genie kodującym miozynę VI wywołują znaczące obniżenie ekspresji mRNA tego genu oraz redukują poziom białka, co prowadzi do dezorganizacji stereocyliów, które ulegają fuzji i tworzą gigantyczne, niefunkcjonalne wypustki lub ich kompletny zanik [56,59]. Zastosowanie mikroskopii elektronicznej umożliwiło dokonanie obserwacji, z których wynika, że zaburzenia struktury komórek włoskowatych są związane z niewłaściwą organizacją błony komórkowej, która zamiast oddzielać od siebie pojedyncze włoski słuchowe, łączy je w grube, niefunkcjonalne pęczki [59]. Zlewianie się stereocyliów rozpoczyna się u ich podstawy w płycie kutikularnej, czemu towarzyszy akumulacja elementów cytoplazmatycznych w stereocyliach, z których normalnie są one eliminowane. Zaburzenia prowadzą do degeneracji komórek włoskowatych i utraty słuchu u myszy *sv*.

Wyniki tych badań potwierdzają funkcję miozyny VI w specjalizacji komórek włoskowatych, związanej z utrzymaniem integralności ich struktury. Ponieważ podbłonowa cytoplazma regionu apikalnego komórki włoskowatej jest miejscem aktywnej endocytozy, zaproponowano udział miozyny VI w transporcie elementów błonowych wzdłuż mikrofilamentów, co umożliwiłoby prawidłowy rozwój stereocyliów [8,60,61]. Jednak u myszy *sv* nie zaobserwowano istotnych zaburzeń w przebiegu endocytozy w komórkach włoskowatych [59]. Dlatego inny model zakłada funkcjonowanie miozyny VI w roli białka strukturalnego, które wiążąc aktynę obecną w płytce kutikularnej oraz partnera w błonie komórkowej może stabilizować miejsca kotwiczenia błony u podstawy stereocyliów [18,59]. Obecność sieci aktyny i miozyny VI w płytce kutikularnej oraz podbłonowej cytoplazmie wskazuje na możliwość tworzenia specyficznej bariery, powstrzymującej przepływ elementów cytoplazmatycznych do formujących się stereocyliów. W tym wypadku miozyna VI może uczestniczyć w wychwytywaniu organelli komórkowych u podstawy różnicującej się komórki [18]. Teorię zakładającą funkcjonowanie miozyny VI w roli białka kotwiczącego w komórkach włoskowatych potwierdzają obserwowane na elektronogramach nierówności w błonie komórkowej stereocyliów przy płytce kutikularnej występujące u myszy *sv* oraz fakt, że proces dezintegracji stereocyliów rozpoczyna się od ich podstawy [59]. Również kierunek ruchu miozyny VI do końca „minus” filamentu aktynowego uzasadnia generowanie napięć błony komórkowej kotwiczonej przy podstawie stereocyliów oraz tworzenie potencjalnych barier hamujących przepływ organelli komórkowych. Najnowsze badania dowodzą, że w procesie specjalizacji komórek włoskowatych bierze udział dimer miozyny VI [62].

SYNAPSY W KOMÓRKACH WŁOSKOWATYCH

Badania immunocytochemiczne wykazały, że u myszy miozyna VI obecna jest nie tylko w apikalnej strefie komórek włoskowatych, ale także w aktywnej strefie synaptycznej na styku komórki włoskowatej i afarentnego zakończenia nerwowego [63]. Na poziomie subkomórkowym ujawniono lokalizację miozyny VI w presynaptycznych ciałach gęstych otoczonych przez liczne pęcherzyki oraz w błonie presynaptycznej i pęcherzykach endocytarnych, co potwierdza proponowany od dawna udział miozyny VI w endocytozie. W strefie synaptycznej komórki włoskowatej wykazano także obecność otoferliny, transbłonowego białka pęcherzyków synaptycznych regulującego zależną od Ca^{2+} egzocytozę, którego brak również wywołuje zaburzenia słuchu u ssaków [64]. U mysich mutantów *sv*, obserwowano zaburzenia w rozwoju i funkcjonowaniu synaps w komórkach włoskowatych, związane głównie z obniżeniem aktywności wydzielniczej zależnej od Ca^{2+} [63]. Ponieważ w badaniach *in vitro* autorzy potwierdzili możliwość wiązania otoferliny z domeną DWC ogonka miozyny VI, oddziaływanie obu białek może mieć pośredni wpływ na egzocytozę w strefie synaptycznej komórek włoskowatych. Wiadomo, że efektywność tego procesu zależy od transportu wstecznego pęcherzyków synaptycznych (tzw. recyklingu błon). W komórkach włoskowatych są dwa regiony, w których źródłem pęcherzyków synaptycznych jest aktywna endocytoza, stre-

fa apikalna i synaptyczna. Ponieważ obie strefy są bogate w aktynę i miozynę VI, możliwy jest transport pęcherzyków wzdłuż filamentów aktynowych od strefy apikalnej w kierunku synapsy i/lub transport wsteczny w regionie synapsy realizowany z udziałem miozyny VI, której udział w endocytozie nie jest kwestionowany [63]. Potwierdzeniem funkcjonowania takiego mechanizmu jest fakt, że u myszy typu dzikiego w aktywnej strefie synaptycznej zaobserwowano kolokalizację otoferliny i miozyny VI, podczas gdy u myszy *sv* poziom otoferliny w komórkach włoskowatych był obniżony. W synapsach mózgu szczura odnaleziono inne białko, Sap97, które pośredniczy w transporcie nowo zsyntetyzowanych receptorów glutaminergicznych AMPA z cyrstern Golgiego do błony komórkowej i które wiąże miozynę VI w pęcherzykach opłaszczonych klatryną [65]. Asocjacji Sap97 i miozyny VI nie potwierdzono jednak w komórkach włoskowatych myszy, co wskazuje, że w zależności od rodzaju partnera miozyna VI uczestniczy w różnych typach transportu pęcherzykowego w regionie aktywnej synapsy.

MIOZYNA VI W POLARYZACJI I MIGRACJI KOMÓREK

Jednym z podstawowych mechanizmów warunkujących różnicowanie komórek w trakcie rozwoju jest ich asymetryczny podział. U *Drosophila* taki typ podziału jest charakterystyczny m.in. dla embrionalnych neuroblastów, w których potwierdzono obecność miozyny VI kodowanej przez gen *jaguar* [66]. Podczas podziału neuroblastu do regionu bazalnego komórki kierowane są białka, takie jak Prospero i Staufen oraz białko adaptorowe Miranda. Prawidłowa lokalizacja jest konieczna dla polaryzacji neuroblastu. Ustalono, że jednym z białek współwystępujących z białkiem Miranda jest miozyna VI, której brak u mutantów *jaguar* skutkuje zaburzeniami w subkomórkowej lokalizacji białka Miranda i jego partnerów [66]. Jakkolwiek mechanizm ukierunkowanej translokacji badanych białek w asymetrycznie dzielących się neuroblastach *Drosophila* nie został wyjaśniony, bierze się pod uwagę udział cytoszkieletu aktynowego i związanych z nim białek motorycznych. Z uwagi na unikalne właściwości kinetyczne miozyny VI, jej udział w efektywnym transporcie badanych białek jest jednak mało prawdopodobny. Natomiast funkcjonowanie miozyny VI w roli cząsteczki selektywnie kotwiczącej kompleksy białkowe w bazalnej strefie kory komórki bogatej w aktynę jest mocno uzasadnione [18].

Miozyna VI uczestniczy w morfogenezie i migracji komórek folikularnych w jajniku *Drosophila* [67]. Pęcherzyk jajowy u *Drosophila* składa się z oocytu, 15 komórek odżywczych i otaczających je somatycznych komórek folikularnych, formujących rodzaj nabłonka. We wczesnym stadium oogenezy, spośród komórek folikularnych w apikalnej strefie pęcherzyka jajowego różnicują się 2 komórki polarne. Rekrutują one wokół siebie zlepek komórek folikularnego nabłonka i wspólnie, jako tzw. komórki graniczne, rozpoczynają wędrówkę w kierunku oocytu. Obecność miozyny VI wykazano zarówno w komórkach folikularnych, jak i w migrujących komórkach granicznych [67]. U mutantów z wyciszoną ekspresją genu miozyny VI obserwowano zaburzenia w migracji komórek oraz obniżenie poziomów dwóch białek uczestniczących w procesie adhezji komórkowej, DE-kadheryny (kadheryna embrionalna u *Drosophi-*

la) i armadillo (homolog β -kateniny), których obecność jest wymagana podczas migracji komórek granicznych [67]. Kadheryny to glikoproteiny powierzchniowe odpowiedzialne za lokalne oddziaływania międzykomórkowe w trakcie rozwoju oraz stabilizację tkanek w dojrzałym organizmie. Natomiast kateniny stanowią rodzinę białek cytoplazmatycznych zasocjowanych z kadherynami w procesie adhezji komórkowej. Te dwa białka tworzą stabilny kompleks z miozyną VI w komórkach granicznych u osobników typu dzikiego, a każde z nich jest odpowiedzialne za prawidłową lokalizację pozostałych. Również w tym wypadku preferowany jest model, w którym rola miozyny VI polega na stabilizacji kompleksu białkowego DE-kadheryna/armadillo [67].

Molekularne mechanizmy pełzania komórek oparte są na tworzeniu wypustek cytoplazmatycznych, lamelipodiów i filopodiów, dzięki polimeryzacji aktyny przy błonie komórkowej w odpowiednie struktury, sieci lub wiązki. W krawędzi wiodącej komórki wielokrotnie obserwowano reorganizację aktyny z udziałem kompleksu Arp2/3, rekrutację kompleksów białek adhezyjnych w miejsca ich oddziaływań z substratem powierzchniowym, transport składników błony komórkowej oraz generowanie siły napędzającej ruch komórki z udziałem aktyny, białek motorycznych i kompleksów adhezyjnych zlokalizowanych w błonie komórkowej. Miozyna VI, wiążąc w domenę DWC kompleks adhezyjny zasocjowany z macierzą zewnątrzkomórkową, może tworzyć zakotwiczenie dla mikrofilamentów polimeryzujących w wypustkach cytoplazmatycznych migrującej komórki [67]. Model ten uwzględnia unikalne właściwości ruchu miozyny VI, która krocząc do cytoplazmy komórki wspomaga „wypychanie” filamentów aktynowych do rosnących wypustek komórkowych [7]. Udział miozyny VI w formowaniu wypustek komórkowych potwierdzają obserwacje dokonane w trakcie morfogenezy pełzających komórek nabłonka we wczesnej fazie embriogenezy u *Drosophila*. W komórkach tych miozynę VI odnaleziono również w krawędzi wiodącej komórki, a jej brak powodował zanikanie wypustek cytoplazmatycznych i w konsekwencji upośledzenie migracji komórek [68].

Udział miozyny VI potwierdzono również w regulacji funkcji motorycznych pełzających komórek ssaków. Badania wykazały, że w wpukleniach błony komórkowej krawędzi wiodącej mysich fibroblastów stymulowanych hormonem wzrostu obecna jest miozyna VI ufosforylowana w reszcie treoniny (T406) w domenę motorycznej [52]. Mechanizm działania miozyny VI w tym procesie nie jest znany. Autorzy zakładają, że w komórkach ssaków, podobnie jak w migrujących komórkach granicznych w jajniku *Drosophila*, miozyna VI wiąże białka uczestniczące w adhezji komórkowej. Badania prowadzone w jednowarstwowych hodowlach komórkowych nabłonka ssaków wskazują, że jednym z takich białek może być winkulina. Wykazano, że w późnym stadium dojrzewania tych komórek miozyna VI jest rekrutowana w miejscach styku błon komórkowych, tzw. połączeniach typu przylegania, występujących w komórkach nabłonkowych. W procesie tym uczestniczy winkulina, białko zlokalizowane w obwódkach przylegania włókien aktyny do błony komórkowej [69]. Wyniki te wskazują na współdziałanie miozyny VI, winkuliny oraz E-kadheryny w

organizacji cytoszkieletu aktynowego w miejscach lokalnego styku sąsiadujących komórek nabłonka ssaków.

Migracja komórek nowotworowych umożliwia wzrost masy guza oraz tworzenie przerzutów, w wyniku odrywania się komórek od guza pierwotnego i przenikania poprzez błonę podstawną oraz tkankę łączną do krwiobiegu. W procesie tym potwierdzono udział miozyny VI. Badania u ssaków wykazały podwyższony poziom tego białka w komórkach nowotworów złośliwych jajnika [70] i prostaty [71]. Zahamowanie ekspresji genu miozyny VI w nowotworowych komórkach jajnika obniża zdolność ich proliferacji w liniach komórkowych i warunkach *in vivo*, co sugeruje zaangażowanie miozyny VI w proces ich migracji. Jednak w migracji komórek nowotworowych jajnika nie jest wymagany udział E-kadheryny, co sugeruje odmienny od obserwowanego w komórkach granicznych jajnika *Drosophila* sposób działania miozyny VI [70]. Natomiast w liniach komórkowych LNCaP raka prostaty miozynę VI odnaleziono w strefie *trans* aparatów Golgiego, gdzie współwystępowała z białkami efektorowymi GIPC i LMTK2 [72]. Z tego powodu zaproponowano udział miozyny VI w wydzielaniu i transporcie nowo syntetyzowanych cząsteczek, w tym także czynników aktywujących angiogenezę nowotworu.

MIOZYNA VI W PROCESIE SPERMATOGENEZY

W końcowym stadium spermatogenezy u *Caenorhabditis* w wyniku asymetrycznego podziału mejotycznego spermatocyta II rzędu następuje rozdział elementów komórkowych do dwóch haploidalnych spermatyd i ciała resztkowego. Do spermatyd transportowane jest haploidalne jądro, mitochondria, jeden centrosom oraz tzw. ciała włókniste, zawierające specyficzne białka plemnikowe. Pozostałe organelle komórkowe oraz aktyna i tubulina pozostają w ciałku resztkowym i są degradowane. Zaproponowany mechanizm segregacji elementów komórkowych podczas późnej fazy spermatogenezy u *Caenorhabditis* uwzględnia udział mikrotubul i mikrofilamentów oraz współdziałających z nimi białek motorycznych. W powstającym podczas podziału przewężeniu pomiędzy spermatydą a ciałkiem resztkowym odnaleziono aktynę i miozynę VI [18]. U nicieni zawierających zmutowany gen kodujący miozynę VI sortowanie organelli i elementów cytoszkieletu jest zaburzone i wywołuje ich równomierną dystrybucję w spermatydzie i w ciałku resztkowym [73]. Defekt nie dotyczy jedynie lokalizacji jądra komórkowego, które niemal zawsze trafia do spermatydy. Powstające plemniki są нефunkcjonalne, co potwierdza udział miozyny VI w asymetrycznej cytokinezie spermatocyta II rzędu warunkującej prawidłowy rozwój plemników *Caenorhabditis*. Zaproponowano, że białko to bierze udział w ukierunkowanym transporcie organelli do komórek potomnych, z wyjątkiem jądra komórkowego, którego translokacja odbywałaby się w sposób niezależny od układu aktyna-miozyna [73]. Jednak ze względu na unikalne cechy miozyny VI, zakłada się także możliwość jej udziału w regulacji architektury cytoszkieletu aktynowego podczas tworzenia wewnątrzkomórkowych barier towarzyszących specjalizacji komórkowej [18,73]. U *Drosophila* miozyna VI wykazuje zdolność asocjacji z białkiem D-CLIP-190, należącym do grupy białek wiążących tubulinę [5]. Ponieważ u osobników typu dzikiego *Caenorhabditis*, w

przewężeniu pomiędzy spermatydą a ciałkiem resztkowym miozyna VI współwystępuje z aktyną i tubuliną, obie hipotezy są prawdopodobne. Miozyna VI może stabilizować oddziaływania pomiędzy dwoma systemami cytoszkieletu w celu utrzymania funkcjonalnej bariery wewnątrzkomórkowej lub realizacji transportu organelli wzdłuż mikrofilamentów do zakończeń mikrotubul.

Późna faza spermatogenezy u *Drosophila*, tzw. indywidualizacja prowadzi do powstania funkcjonalnych plemników pochodzących z jednej cysty, zawierającej 64 haploidalne spermatydy [74-77]. Podczas indywidualizacji dochodzi do eliminacji cytoplazmy z dojrzewających plemników, czemu towarzyszy reorganizacja błon, zanika błona cysty i tworzą się indywidualne błony komórkowe plemników. W procesie tym kluczową rolę odgrywają specyficzne kompleksy. Zawierają one charakterystyczne struktury aktynowe (tzw. stożki aktynowe), które tworzą się wokół jąder spermatyd, a następnie synchronicznym ruchem przesuwały się wzdłuż aksonem dojrzewających plemników. Stożki aktynowe są zbudowane z dwóch domen struktury, ich regiony frontowe tworzy gęsta sieć aktyny, a siłą napędzającą ruch stożków jest polimeryzacja filamentów aktynowych w ich domenach ogonowych [76,78]. Stabilne domeny frontowe stożków aktynowych działają jak „tłok strzykawki” wypychając cytoplazmę z dojrzewających plemników podczas synchronicznego ruchu 64 stożków wzdłuż aksonem. Wyniki badań dowodzą, że miozyna VI determinuje efektywny przebieg indywidualizacji.

Mutacje w promotorze genu *jaguar* u *Drosophila* (homolog genu miozyny VI u ssaków) prowadzą do zahamowania jego ekspresji w jądrach samców [74]. U *Drosophila* typu dzikiego miozyna VI zlokalizowana jest w podstawach stożków aktynowych, natomiast u mutantów miozyny VI struktura stożków jest zaburzona, co prowadzi do nieefektywnej eliminacji cytoplazmy, a w konsekwencji do zatrzymania procesu indywidualizacji i bezpłodności samców [74,76,77]. Mechanizm działania miozyny VI w procesie indywidualizacji spermatyd nie jest znany. Pierwotna hipoteza zakładała, że u podstawy stożków aktynowych zachodzi aktywna endocytoza pęcherzyków opłaszczonych klatryną, w

której uczestniczy miozyna VI [8]. Jednak wyniki badań nie potwierdziły aktywności endo- lub egzocytozy w kompleksach biorących udział w procesie indywidualizacji [76]. Wykazano też brak α -adaptyny wokół stożków aktynowych [75], co wyklucza możliwość formowania pęcherzyków opłaszczonych klatryną. Dlatego bardziej prawdopodobny jest model, w którym miozyna VI pełni rolę białka kotwiczącego, które stabilizuje strukturę stożków aktynowych [18]. Miozyna VI zlokalizowana jest u podstawy stożka aktynowego w gęstej sieci aktyny, w której przeważająca liczba filamentów aktynowych zorientowana jest końcami „minus” do podstawy stożka, zgodnie z kierunkiem jego ruchu [77]. Badania prowadzone na innych modelach komórkowych dowodzą, że miozyna VI wiążąc końce „minus” mikrofilamentów, blokuje proces depolimeryzacji aktyny [49]. Wykorzystując tę właściwość białko to może stabilizować domeny frontowe stożków aktynowych, chroniąc końce „minus” mikrofilamentów przed depolimeryzacją. W domenach tych miozyna VI współwystępuje z białkami regulującymi dynamikę aktyny, takimi jak kompleks Arp2/3 i jego aktywator, kortaktyna [75,78]. Brak miozyny VI wywołuje nieprawidłowe rozmieszczenie tych białek w stożkach aktynowych [75,77] co wskazuje, że miozyna VI może tworzyć unikalne kompleksy białkowe stabilizujące organizację aktyny w tych strukturach. Najnowsze wyniki badań dowodzą, że podczas indywidualizacji spermatyd u *Drosophila* nie jest wymagana dimeryzacja miozyny VI [79].

Tabela 2. Funkcje miozyny VI w wybranych procesach komórkowych (zestawienie przygotowane w oparciu o dane literaturowe zawarte w tekście artykułu).

Proces	Proponowana funkcja miozyny VI	
	Rola transportera cargo	Rola białka kotwiczącego
endocytoza	• rekrutacja receptorów błonowych • transport pęcherzyków opłaszczonych klatryną • transport pęcherzyków przejściowych • transport wsteczny z udziałem recykliczującego endosomu	• organizacja cytoszkieletu aktynowego w miejscach powstawania pęcherzyków przy błonie komórkowej • organizacja cytoszkieletu aktynowego w strefach transportu pęcherzyków
pinocytoza fagocytoza		• udział w powstawaniu pęcherzyków pinocytarnych i fagosomów
egzocytozy	• wspomaganie pączkowania pęcherzyków w regionie <i>trans</i> aparatu Golgiego • transport pęcherzyków z regionu <i>trans</i> w pobliże mikrotubul	• stabilizacja struktury aparatu Golgiego • udział w procesie sortowania nowo powstałych białek
funkcjonowanie komórek włoskowatych	• transport elementów błonowych u podstawy stereocyliów • transport pęcherzykowy w aktywnej strefie synaptycznej	• kotwiczenie błony komórkowej u podstawy stereocyliów • organizacja cytoszkieletu aktynowego podczas tworzenia barier powstrzymujących przepływ elementów cytoplazmatycznych do stereocyliów
polaryzacja komórek		• selektywne kotwiczenie kompleksów białkowych
migracja komórek		• stabilizacja kompleksów białkowych uczestniczących w adhezji komórkowej • udział w formowaniu wypustek komórkowych • organizacja cytoszkieletu aktynowego w połączeniach typu przylegania
spermatogeneza	• ukierunkowany transport organelli i elementów cytoszkieletu podczas asymetrycznej cytokinezy	• organizacja cytoszkieletu aktynowego podczas tworzenia barier towarzyszących specjalizacji komórkowej
procesy jądrowe	• transport do jądrowy i wewnątrzjądrowy	• organizacja i stabilizacja kompleksu polimerazy II

MIOZYNA VI W JĄDRZE KOMÓRKOWYM

Jedną z najbardziej zagadkowych kwestii jest rola miozyny VI w regulacji mechanizmów wewnątrzjądrowych [2]. W aktywnych transkrypcyjnie komórkach ssaków potwierdzono istotny poziom miozyny VI, która współwystępuje z nowo powstałymi transkryptami mRNA oraz kompleksem polimerazy II RNA aktywnych genów [19]. Zablokowanie miozyny VI przy użyciu swoistych przeciwciał powoduje obniżenie poziomu ekspresji określonych genów w warunkach *in vivo*. Inne badania dowodzą, że eksport miozyny VI z cytoplazmy do jądra komórkowego jest indukowany uszkodzeniami DNA, które aktywują zależną od czynnika transkrypcyjnego p53 strategię naprawy powstałych uszkodzeń [43]. Autorzy ujawnili także aktywację ekspresji genu miozyny VI po związaniu białka p53 w jego promotorze. Miozyna VI jest również obecna w jądrach komórkowych wydzielniczych komórek chromochłonnych rdzenia nadnercza szczura, w regionach pozbawionych chromatyny [20]. Możliwość zaangażowania systemu aktywa-miozyna w regulację aktywności transkrypcji jest sugerowana od dawna, dlatego udział miozyny VI w tym procesie jest uzasadniony. Na etapie inicjacji transkrypcji białko to może być zaangażowane w organizację i stabilizację kompleksu polimerazy II. Natomiast asocjacja miozyny VI z nowo powstałymi transkryptami polimerazy II, jego lokalizacja w obszarach poza chromatynowych oraz indukowany eksport z terenu cytoplazmy do jądra komórkowego odzwierciedla udział miozyny VI w transporcie wewnątrzjądrowym oraz translokacji specyficznych cząsteczek do jądra komórkowego [20,43].

PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich 18 lat, a więc od czasu odkrycia miozyny VI u *Drosophila*, ukazało się wiele prac opisujących budowę i właściwości kinetyczne tego białka oraz ujawniających jego obecność w nowych, nieznanych dotąd miejscach lokalizacji w komórkach różnych organizmów. Mnogość funkcji proponowanych dla miozyny VI i zachowana w toku ewolucji jej molekularna struktura świadczą o fundamentalnym znaczeniu biologicznym tego białka. W oparciu o uzyskane wyniki badań, nie zawsze jednoznaczne, skonstruowano wiele hipotez opisujących prawdopodobne mechanizmy działania miozyny VI, które z pewnością wymagają dalszej weryfikacji (Tab. 2). Podstawowym problemem jest trudność w identyfikacji specyficznych partnerów, z którymi białko to oddziałuje w różnych typach komórek. Kwestią sporną jest również forma, w jakiej miozyna VI funkcjonuje w warunkach *in vivo*, do tej pory nie ustalono, czy jest ona procesywnym dimerem czy monomerem. Prawdopodobnie, w zależności od rodzaju partnera wiązanego w określonym typie komórki lub przedziale komórkowym, to wyjątkowe białko działa w obu formach pełniąc unikalne funkcje, jako transporter ładunku lub białko kotwiczące.

PIŚMIENICTWO

1. De La Cruz EM, Ostap E (2004) Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr Opin Cell Biol* 16: 61-67
2. Sobczak M, Majewski Ł, Rędownicz MJ (2009) Miozyny w jądrze komórkowym. *Postępy Biochemii* 55: 239-246

3. Odronitz F, Kollmar M (2007) Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol* 8: R196
4. Rędownicz MJ (2007) Unconventional myosins in muscle. *Eur J Cell Biol* 86: 549-558
5. Roberts R, Lister I, Schitz S, Walker M, Veigel C, Trinick J, Buss F, Kendrick-Jones J (2004) Myosin VI: cellular functions and motor properties. *Phil Trans R Soc B* 359: 1931-1944
6. Wells AL, Lin AW, Chen LQ, Safer D, Cain SM, Hasson T, Carragher BO, Milligan RA, Sweeney HL (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* 401: 505-508
7. Buss F, Luzio JP, Kendrick-Jones J (2002) Myosin VI, an actin motor for membrane traffic and cell migration. *Traffic* 3: 851-858
8. Hasson T (2003) Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J Cell Sci* 116: 3453-3461
9. Lister I, Roberts R, Schmitz S, Walker M, Trinick J, Veigel C, Buss F, Kendrick-Jones J (2004) Myosin VI: a multifunctional motor. *Biochem Soc Trans* 32: 685-688
10. Sweeney HL, Houdusse A (2007) What can myosin VI do in cells? *Curr Opin Cell Biol* 19: 57-66
11. Buss F, Kendrick-Jones J (2008) How are the cellular functions of myosin VI regulated within the cell? *Bioch Biophys Res Commun* 369: 165-175
12. Kellerman KA, Miller KG (1992) An unconventional myosin heavy chain gene from *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 119: 823-834
13. Millo H, Bowles M (2007) The expression pattern and cellular localization of myosin VI during the *Drosophila melanogaster* life cycle. *Gene Exp Patt* 7: 501-510
14. Chibalina MV, Puri C, Kendrick-Jones J, Buss F (2009) Potential roles of myosin VI in cell motility. *Biochem Soc Trans* 37: 966-970
15. Sellers JR (2000) Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* 1496: 3-22
16. Berg JS, Powell BC, Cheney RE (2001) A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* 12: 780-794
17. Buss F, Arden SD, Lindsay M, Luzio JP, Kendrick-Jones J (2001) Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J* 20: 3676-3684
18. Frank DJ, Noguchi T, Miller KG (2004) Myosin VI: a structural role in actin organization important for protein and organelle localization and trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 16: 189-194
19. Vreugde S, Ferrai C, Miluzio A, Hauben E, Marchisio PC, Crippa MP, Bussi M, Biffo S (2006) Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* 23: 749-755
20. Majewski Ł, Sobczak M, Rędownicz MJ (2010) Myosin VI is associated with secretory granules and is present in the nucleus in adrenal medulla chromaffin cells. *Acta Bioch Pol* 57: 109-114
21. Spudisch JA, Sivaramakrishnan S (2010) Myosin VI: an innovative motor that challenged the swinging lever arm hypothesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 128-137
22. Sweeney HL, Houdusse A (2010) Myosin VI rewrites the rules for myosin motors. *Cell* 141: 573-582
23. Rock RS, Rice SE, Wells AL, Purcell TJ, Spudich JA, Sweeney HL (2001) Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13655-13659
24. Nishikawa S, Homma K, Komori Y, Iwaki M, Wazawa T, Hikikoshi Iwane A, Saito J, Ikebe R, Katayama E, Yanagida T (2002) Class VI myosin moves processively along actin filaments backward with large steps. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 311-317
25. De La Cruz EM, Ostap EM, Sweeney HL (2001) Kinetic mechanism and regulation of myosin VI. *J Biol Chem* 276: 32373-32381
26. Rock RS, Ramamurthy B, Dunn AR, Beccafico S, Rami BR, Morris C, Spink BJ, Franzini-Armstrong C, Spudich JA, Sweeney HL (2005) A flexible domain is essential for the large step size and processivity of myosin VI. *Mol Cell* 17: 603-609
27. Altman D, Sweeney HL, Spudich JA (2004) The mechanism of myosin VI translocation and its load-induced anchoring. *Cell* 116: 737-749

28. Sweeney HL, Park H, Zong AB, Yang Z, Selvin PR, Rosenfeld SS (2007) How myosin VI coordinates its heads during processive movement. *EMBO J* 26: 2682-2692
29. Chuan P, Spudich JA, Dunn AR (2010) Robust mechanosensing and tension generation by myosin VI. *J Mol Biol* 405: 105-112
30. Iwaki M, Tanaka H, Iwane AH, Katayama E, Ikebe M, Yanagida T (2006) Cargo-binding makes a wild-type single-headed myosin-VI move processively. *Biophys J* 90: 3643-3652
31. Sivaramakrishnan J, Spudich JA (2009) Coupled myosin VI motors facilitate unidirectional movement on an F-actin network. *J Cell Biol* 187: 53-60
32. Mukherjee M, Linas P, Kim HJ, Travaglia M, Safer D, Ménétrey J, Franzini-Armstrong C, Selvin PR, Houdusse A, Sweeney HL (2009) Myosin VI dimerization triggers an unfolding of a 3-helix bundle in order to extend its reach. *Mol Cell* 35: 305-315
33. Hasson T, Mooseker MS (1994) Porcine myosin-VI: characterization of a new mammalian unconventional myosin. *J Cell Biol* 127: 425-440
34. Lister J, Schmitz S, Walker M, Trinick J, Buss F, Veigel C, Kendrick-Jones J (2004) A monomeric myosin VI with a large working stroke. *EMBO J* 23: 1729-1738
35. Knight PJ, Thirumurugan K, Xu Y, Wang F, Kalverda AP, Stafford WF 3rd, Sellers JR, Peckham M (2005) The predicted coiled-coil domain of myosin 10 forms a novel elongated domain that lengthens the head. *J Biol Chem* 280: 34702-34708
36. Park H, Ramarnurty B, Travaglia M, Safer D, Chen LQ, Franzini-Armstrong C, Selvin PR, Sweeney HL (2006) Full-length myosin VI dimerizes and moves processively along actin filaments upon monomer clustering. *Mol Cell Biol* 21: 331-336
37. Phichith D, Travaglia M, Yang Z, Liu X, Zong AB, Safer D, Sweeney HL (2009) Cargo binding induces dimerization of myosin VI. *PNAS* 106: 17320-17324
38. Yu C, Feng W, Wei Z, Miyanoiri Y, Wen W, Zhao Y, Zhang M (2009) Myosin VI undergoes cargo-mediated dimerization. *Cell* 138: 537-548
39. Spink BJ, Sivaramakrishnan S, Lipfert J, Doniach S, Spudich JA (2008) Long single α -helical tail domains bridge the gap between structure and function of myosin VI. *Nat Struct Mol Biol* 15: 591-597
40. Naccache SN, Hasson T (2006) Myosin VI altered at threonine 406 stabilizes actin filaments *in vivo*. *Cell Motil Cytoskeleton* 63: 633-645
41. Spudich G, Chibalina MV, Au JS, Arden SD, Buss F, Kendrick-Jones J (2007) Myosin VI targeting to clathrin-coated structures and dimerization is mediated by binding to Disabled-2 and PtdIns(4,5)P₂. *Nat Cell Biol* 9: 176-183
42. Frank DJ, Martin SR, Gruender BNT, Lee YSR, Simonette RA, Bayley PM, Miller KG, Beckingham KM (2006) Androcam is a tissue-specific light chain for myosin VI in the *Drosophila* testis. *J Biol Chem* 281: 24728-24736
43. Jung EJ, Liu G, Zhou W, Chen X (2006) Myosin VI is a mediator of the p53-dependent cell survival pathway. *Mol Cell Biol* 26: 2175-2186
44. Au SYJ, Ihrke G, Kendrick-Jones F, Buss F (2007) Myosin VI is required for sorting of AP-1B dependent cargo to the basolateral domain in polarised MDCK cells. *J Cell Biol* 177: 103-117
45. Mermall V, McNally JG, Miller KG (1994) Transport of cytoplasmic particles catalysed by an unconventional myosin in living *Drosophila* embryos. *Nature* 369: 560-562
46. Cramer LP (1999) Organization and polarity of actin filament networks in the cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility. *Biochem Soc Symp* 65: 173-205
47. Aschenbrenner L, Lee T, Hasson T (2003) Myo6 facilitates the translocation of endocytic vesicles from cell peripheries. *Mol Biol Cell* 14: 2728-2743
48. Dance AL, Miller M, Seragaki S, Aryal P, White B, Aschenbrenner L, Hasson T (2004) Regulation of myosin-VI targeting to endocytic compartments. *Traffic* 5: 798-813
49. Naccache SN, Hasson T, Horowitz A (2006) Binding of internalized receptors to the PDZ domain of GIPC/synectin recruits myosin VI to endocytic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12735-12740
50. Chibalina MV, Seaman MN, Miller CC, Kendrick-Jones J, Buss F (2007) Myosin VI and its interacting protein LMTK2 regulate tubule formation and transport to the endocytic recycling compartment. *J Cell Sci* 120: 4278-4288
51. Sobczak M, Wasik A, Kłopotcka W, Rędownicz MJ (2008) Involvement of myosin VI immunoanalog in pinocytosis and phagocytosis in *Amoeba proteus*. *Biochem Cell Biol* 86: 509-519
52. Buss F, Kendrick-Jones J, Lionne C, Knight AE, Cote GP, Paul Luzio J (1998) The localization of myosin VI at the Golgi complex and leading edge of fibroblasts and its phosphorylation and recruitment into membrane ruffles of A431 cells after growth factor stimulation. *J Cell Biol* 143: 1535-1545
53. Warner CL, Stewart A, Luzio JP, Steel KP, Libby RT, Kendrick-Jones J, Buss F (2003) Loss of myosin VI reduces secretion and the size of the Golgi in fibroblasts from Snell's waltzer mice. *EMBO J* 22: 569-579
54. Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, Spudich G, Taylor MJ, Luzio JP, Kendrick-Jones J, Buss F (2005) Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol* 169: 285-295
55. Ang AL, Taguchi T, Francis S, Folsh H, Murrells LJ, Pypaert G, Warren I, Mellan I (2009) Recyclin endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J Cell Biol* 167: 531-543
56. Avraham KB, Hasson T, Steel KP, Kingsley DM, Russell LB, Mooseker MS, Copeland NG, Jenkins NA (1995) The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat Genet* 11: 369-375
57. Hasson T, Gillespie PG, Garcia JA, MacDonald RB, Zhao Y, Yee AG, Mooseker MS, Corey DP (1997) Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J Cell Biol* 137: 1287-1307
58. Rzdzińska AK, Schneider ME, Davies C, Riordan GP, Kachar B (2004) An actin molecular treadmill and myosins maintain stereocilia architecture and self-renewal. *J Cell Biol* 164: 887-897
59. Self T, Sobe T, Copeland NG, Jenkins NA, Avraham KB, Steel KP (1999) Role of myosin VI in the differentiation of cochlear hair cells. *Dev Biol* 214: 331-341
60. Rędownicz MJ (1999) Myosins and deafness. *J Musc Res Cell Motil* 20: 241-248
61. Sakaguchi H, Tokita J, Naoz M, Bowen-Pope D, Gov NS, Kachar B (2008) Dynamic compartmentalization of protein tyrosine phosphatase receptor Q at the proximal end of stereocilia: implication of myosin VI-based transport. *Cell Motil Cytoskeleton* 65: 528-538
62. Hertzano R, Shalit E, Rzdzińska AK, Dror AA, Song L, Ron U, Tan JT, Shitrit AS, Fuchs H, Hasson T, Ben-Tal N, Sweeney HL, Hrabe de Angelis M, Steel KP, Avraham KB (2008) A Myo6 mutation destroys coordination between the myosin heads, revealing new function in the stereocilia of mammalian inner ear hair cells. *PLoS Genet* 4: 1-14
63. Roux I, Hosie S, Johnson SL, Bahloul A, Cayet N, Nouaille S, Kros CJ, Petit C, Safieddine S (2009) Myosin VI is required for the proper maturation and function of inner hair cell ribbon synapses. *Hum Mol Gen* 18: 4615-4628
64. Roux I, Safieddine S, Nouvian R, Grati M, Simmler MC, Bahloul A, Perfettini I, Le Gall M, Rostaing P, Hamard G, Triller A, Avan P, Moser T, Petit C (2006) Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell* 127: 277-289
65. Wu H, Nash JE, Zamorano P, Garner CC (2002) Interaction of SAP97 with minus-end-directed actin motor myosin VI: implications for AMPA receptor trafficking. *J Biol Chem* 277: 30928-30934
66. Petritsch C, Tavasani G, Turck CW, Jan LY, Jan YN (2003) The *Drosophila* myosin VI jaguar is required for basal protein targeting and correct spindle orientation in mitotic neuroblasts. *Dev Cell* 4: 273-281
67. Geisbrecht ER, Montell DJ (2002) Myosin VI is required for E-cadherin-mediated border cell migration. *Nat Cell Biol* 4: 616-620
68. Mollo H, Leaper K, Lazou V, Bownes M (2004) Myosin VI plays a role in cell-cell adhesion during epithelial morphogenesis. *Mech Dev* 121: 1335-1351
69. Maddugoda MP, Crampton MS, Shewan AM, Yap AS (2007) Myosin VI and vinculin cooperate during the morphogenesis of cadherin cell-cell contacts in mammalian epithelial cells. *J Cell Biol* 178: 529-540
70. Yoshida H, Cheng W, Hung J, Montell D, Geisbrecht E, Rosen D, Liu, Naora H (2004) Lessons from border cell migration in the *Drosophila*

ovary: A role for myosin VI in dissemination of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8144–8149

71. Dunn TA, Chen S, Faith DA, Hicks JL, Platz EA, Chen Y, Ewing CM, Sauvageot J, Isaacs WB, De Marzo AM, Luo J (2006) A novel role of myosin VI in human prostate cancer. *Am J Pathol* 169: 1843–1854
72. Puri C, Chibalina MV, Arden SD, Kruppa A, Kendrick-Jones J, Buss F (2010) Overexpression of myosin VI in prostate cancer cells enhances PSA and VEGF secretion, but has no effect on endocytosis. *Oncogene* 29: 188–2000
73. Kelleher JF, Mandell MA, Moulder G, Hill KL, L'Hernault SW, Barstead R, Titus MA (2000) Myosin VI is required for asymmetric segregation of cellular components during *C. elegans* spermatogenesis. *Curr Biol* 10: 1489–1496
74. Hicks JL, Deng WM, Rogat AD, Miller KG, Bownes M (1999) Class VI unconventional myosin VI is required for spermatogenesis in *Drosophila*. *Mol Biol Cell* 10: 4341–4353
75. Rogat AD, Miller KG (2002) A role for myosin VI in actin dynamics at sites of membrane remodeling during *Drosophila* spermatogenesis. *J Cell Sci* 115: 4855–4865

76. Noguchi T, Miller KG (2003) A role of actin dynamics in individualization during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Development* 130: 1805–1816
77. Noguchi T, Lenartowska M, Miller KG (2006) Myosin VI stabilizes an actin network during *Drosophila* spermatid individualization. *Mol Biol Cell* 17: 2559–2571
78. Noguchi T, Lenartowska M, Rogat AD, Frank DJ, Miller KG (2008) Proper cellular organization during *Drosophila* individualization depends on actin structures composed of two domains, bundles and meshwork, that are differentially regulated and have different functions. *Mol Biol Cell* 19: 2363–2372
79. Noguchi T, Frank DJ, Isaji M, Miller KG (2009) Coiled-coil-mediated dimerization is not required for myosin VI to stabilize actin during spermatid individualization in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell* 20: 358–367

Myosin VI: the unique motor protein of the actin cytoskeleton

Marta Lenartowska^{1,✉}, Jakub Walczewski²

¹Laboratory of Developmental Biology, Institute of General and Molecular Biology, Faculty of Biology and Earth Sciences, Nicolaus Copernicus University, Gagarina 9, 87-100 Toruń, Poland

²Institute of Plant Breeding and Acclimatization, Department of Phytopathology, Radzików, 05-870 Błonie, Poland

✉e-mail: mlenart@umk.pl

Key words: myosin VI, actin cytoskeleton, anchoring protein, cargo transport

ABSTRACT

Myosins are actin-based motor proteins that use energy derived from ATP hydrolysis to generate force and move along actin filaments. Myosin VI is a unique motor protein because it moves towards the “minus” end of actin filament, which is the opposite direction to all of the other myosins studied so far, and therefore is thought to have unique properties and cellular functions. Localization and functional studies indicate that myosin VI plays a role in a variety of different intracellular processes, such as endocytosis and secretion as well as cell division, differentiation, and cell migration. These various functions of myosin VI are mediated by interaction with a range of different binding partners. In this review, we describe the structure, kinetic properties and functions proposed for myosin VI, and present current hypotheses on the mechanisms of functioning of this unique protein *in vivo*.

Molekularne i komórkowe mechanizmy działania kurkuminy – dobroczynny wpływ na organizm

Marta Sikora-Polaczek¹

Anna Bielak-Żmijewska²

Ewa Sikora²✉

¹Centrum Medyczne MACIERZYŃSTWO, Kraków

²Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, Warszawa

✉Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (22) 589 24 36, e-mail: e.sikora@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 21 lipca 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 4 października 2010 r.

Słowa kluczowe: apoptoza, hormeza, kurkumina, stan zapalny, stres oksydacyjny

Wykaz skrótów: RFT – reaktywne formy tlenu; RFA – reaktywne formy azotu

STRESZCZENIE

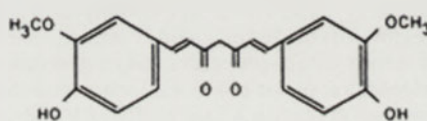
Kurkumina jest naturalnym związkiem otrzymywanym z kłączy ostryżu długiego. Jest ona aktywnym składnikiem kurkumy stosowanej od tysiącleci w medycynie tradycyjnej. Współczesna, bardzo bogata literatura naukowa opisuje przeciwnowotworowe, antyoksydacyjne i przeciwzapalne działanie kurkuminy. Na wielu modelach zwierzęcych wykazano, że kurkumina może być potencjalnym lekiem nie tylko przeciwnowotworowym, ale także stosowanym w przypadku wielu innych chorób, w etiologii których odgrywają rolę reaktywne formy tlenu oraz chroniczny łagodny stan zapalny. Kurkumina również chroni narządy przed uszkodzeniami indukowanymi toksynami. Na poziomie komórkowym hamuje ona proliferację oraz indukuje apoptozę, jednakże komórki prawidłowe są mniej podatne na działanie kurkuminy niż komórki nowotworowe. Znanych jest już wiele molekularnych mechanizmów działania kurkuminy. Wydaje się, że obserwowane efekty komórkowe najlepiej można opisać działaniem kurkuminy na stres komórkowy oraz hamowanie aktywności czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Kurkumina, mimo swojej niskiej biodostępności wywiera dobroczynne działanie na organizm. Postuluje się, że jest to możliwe dzięki jej hormetycznym właściwościom.



Ostryż długi



Kłącze i kurkuma



kurkumina

WPROWADZENIE

Kurkumina od tysięcy lat stosowana w medycynie naturalnej, dzisiaj przyciąga uwagę wielu badaczy i klinicystów jako tak zwany nutraceutyk oraz związek, który sam w sobie lub w postaci pochodnych może być w przyszłości stosowany w klinice, jako lek, lub preparat wspomagający leczenie choroby nowotworowej i choroby Alzheimera [1].

Kurkumina jest związkiem roślinnym znajdującym się w ekstrakcie z kłączy ostryżu długiego (*Curcuma longa*), stosowanym jako przyprawa znana pod nazwą *turmeric* (ang.) lub kurkuma. Jest też żółtym składnikiem indyjskiej przyprawy curry. Stosowana jest powszechnie jako bezpieczny związek (E100) nadający kolor wielu produktom spożywczym, takim jak margaryna, musztarda, makarony, czy napoje bezalkoholowe [2] (Ryc. 1).

Termin nutraceutyk (ang. *nutraceutical*) znany jest od dość dawna, gdyż został wprowadzony w 1989 roku przez lekarza Stephena DeFelice. Oznacza on substancję, która stanowi pokarm lub składnik pokarmu, przynoszącą korzyści prozdrowotne zarówno zapobiegając chorobie jak i wykazując zdolności

Rycina 1. Ostryż długi (<http://faculty.ksu.edu.sa/70917/Pictures%20Library/Forms/DispForm.aspx?ID=25>), kłącze, z którego ekstrahuje się kurkumę (<http://natureasmedicine.wordpress.com/2009/04/13/are-turmeric-capsules-any-good-find-out-now>) oraz wzór kurkuminy.

lecnicze [2]. W tym znaczeniu, kurkumina, podobnie jak i inne polifenole, które znajdują się w składnikach diety, jak na przykład czarnej i zielonej herbaty, czerwonym winie, orzeszkach ziemnych, czy też czekoladzie, ma pozytywny wpływ na nasz organizm. Jednakże jest jednym z niewielu naturalnych składników diety, który ma tak długą i bogatą tradycję w medycynie naturalnej oraz tak bogatą współczesną literaturę naukową. Zwłaszcza ostatnio ukazało się bardzo wiele prac zarówno oryginalnych jak i przeglądowych, poświęconych molekularnym, komórkowym i fizjologicznym mechanizmom działania kurkuminy [3-9]. Jest też jedna praca przeglądowa w języku polskim [10].

KURKUMINA W MEDYCYNIE NATURALNEJ

Początek historii kurkumy sięga kilku tysięcy lat do samych początków medycyny Ayurveda, oznaczającej naukę długiego życia [11], a dzisiaj zaliczanej do tak zwanej *Complementary and Alternative Medicine* (CAM). Kurkuma była używana na subkontynencie indyjskim nie tylko jako składnik diety, ale również jako środek leczniczy nie wywołujący żadnych szkodliwych efektów ubocznych.

W tradycyjnej hinduskiej i chińskiej medycynie stosowano ją jako środek przeciw nadmiernemu apetytowi, w leczeniu żółtaczki i innych schorzeń wątroby oraz układu trawiennego. Kurkuma była stosowana w leczeniu kolki, bólu zębów i klatki piersiowej oraz bólu męstruacyjnego. Stosowano ją także jako środek wspomagający gojenie ran i leczenie przebarwień skórnych [11]. Współczesna medycyna naturalna Wschodu zna kurkuminę, która jest najaktywniejszym składnikiem kurkumy, jako środek antyseptyczny, przeciwzapalny, antyoksydacyjny oraz przeciwnowotworowy. Kurkumina stosowana jest w leczeniu infekcji oczu, oparzeń, ugryzień, trądziku i innych schorzeń skóry. Jest również skuteczna w przypadku wielu schorzeń układu pokarmowego takich jak: biegunka, niestrawność, nadkwasota, wzdęcia i wrzody. Stosuje się ją jako środek antydepresyjny i łagodzący halucynacje spowodowane haszyszem i lekami psychotropowymi [12].

Świat Zachodu zawdzięcza kurkumę handlarzom arabskim, którzy zaczęli ją rozprowadzać w Europie w XV wieku. Jednakże dopiero panowanie Brytyjczyków w Indiach upowszechniło zastosowanie kurkumy jako składnika mieszanek ziół zwanych pod nazwą curry [11].

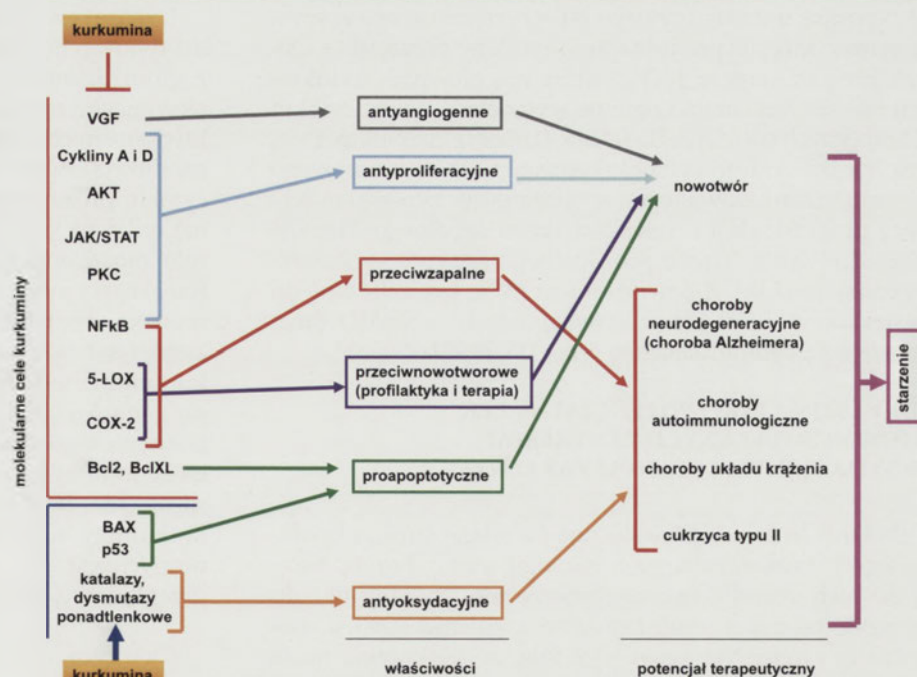
BIOLOGICZNA AKTYWNOŚĆ KURKUMINY JAKO ŚRODKA PREWENCYJNEGO I LECZNICZEGO

Nasza współczesna wiedza daje podstawy, aby sądzić, iż kurkumina może być stosowana jako środek nie tylko zapobiegający, ale także leczniczy w przypadku wielu chorób cywilizacyjnych takich jak: choroby neurodegeneracyjne, w tym choroba Alzheimera, choroby układu krążenia, cukrzyca, nowotwory,

reumatoidalne zapalenie stawów, przewlekłe zapalenie jelit, choroby infekcyjne płuc, alergia, astma, choroby autoimmunologiczne, AIDS, łuszczyca i prawdopodobnie wiele innych. Co zatem wiadomo na temat aktywności biologicznej kurkuminy, która uzasadniałaby takie wszechstronne i dobroczynne działanie tego związku? W następnych rozdziałach zostaną przedstawione najważniejsze wyniki badań podstawowych oraz przedklinicznych świadczące o pleiotropowym działaniu tego związku (Ryc. 2).

KURKUMINA JAKO ZWIĄZEK ANTYOKSYDACYJNY I PRZECIWZAPALNY

Reaktywne formy tlenu (RFT) jak również reaktywne formy azotu (RFA), stanowiące produkty normalnego metabolizmu komórki, mogą być zarówno pożyteczne jak i szkodliwe. W niskich stężeniach pełnią one rolę sygnalizacyjną w komórce, w tym indukują efekt mitogenny oraz biorą udział w ochronie przed szkodliwymi czynnikami (patogenami). Szkodliwe działanie RFT/RFA objawia się stresem komórkowym, który występuje w wyniku podwyższonego ich poziomu lub niewystarczającej enzymatycznej lub/i nieenzymatycznej obrony antyoksydacyjnej. Nadmiar RFT może uszkodzić lipidy, cukry, białka i DNA. Dlatego uważa się, że stres oksydacyjny ma fundamentalne znaczenie w etiologii wielu chorób, jak również w procesie starzenia. Głównym źródłem komórkowych RFT są mitochondria, które produkują jeden z ważniejszych wolnych rodników, mianowicie anionorodnik ponadtlenkowy. Tlenek azotu (NO•) natomiast produkowany jest przez syntazy tlenku azotu (NOS) w procesie przekształcania argininy do cytruliny. Pełni on wiele funkcji fizjologicznych takich jak: udział w neurotransmisji, prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego, rozszerzaniu naczyń oraz wewnątrzkomórkowej sygnalizacji. RFA mogą bezpośrednio uszkadzać DNA lub też wpływać na upośledzenie jego naprawy, poprzez zmianę funkcji białek w nią zaangażowanych. W



Rycina 2. Wybrane molekularne i komórkowe cele kurkuminy oraz jej dobroczynne działanie na organizm.

skład obrony antyoksydacyjnej wchodzi enzymy takie jak: dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa oraz katalaza. Nieenzymatyczne antyoksydanty to kwas askorbinowy, α -tokoferol, glutation, karotenoidy, flawonoidy i inne. Równowaga RTF/RFA jest bardzo ważna w utrzymaniu homeostazy całego organizmu [13,14]. Wyniki wielu badań wskazują na fakt, że kurkumina może mieć w tym zasadniczy udział.

Kurkumina wykazuje silne antyoksydacyjne właściwości porównywalne do witaminy C i E. Wykazano, że jest ona zmiataczem RFT/RFA, w tym rodnika ponadtlenkowego i hydroksylogowego oraz dwutlenku azotu, hamuje peroksydację lipidów w różnych modelach zwierzęcych oraz oksydacyjne uszkodzenia tkanek. Wykazano protekcyjne działanie kurkuminy przeciw uszkodzeniom mięśnia sercowego, związane z hamowaniem powstawania RFT [15]. Kurkumina aktywuje również enzymatyczną obronę antyoksydacyjną poprzez aktywację genów takich enzymów jak: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza i peroksydaza glutationu oraz s-transferaza glutationowa [16]. Wykazano również, że kurkumina podnosi poziom glutationu zarówno w komórkach prawidłowych [17] jak i nowotworowych [18]. Hamuje ona również aktywność NOS w mysich makrofagach, jak również syntezę NOS w wątrobie myszy w badaniach *in vivo*. Kurkumina indukuje też ekspresję genu oksygenazy hemowej (HO-1) w różnych komórkach [19]. HO-1 jest enzymem, który nie tylko rozkłada hem do tlenku węgla, żelaza i biliwerdyny, ale ma również bardzo duże znaczenie w odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny [20].

Odpowiedź komórki na stres oksydacyjny jest silnie powiązana z indukcją stanu zapalnego. Reaktywne formy tlenu pośredniczą w metabolizmie prostaglandyn oraz produkcji cytokin prozapalnych. Kurkumina wykazuje aktywność przeciwzapalną poprzez oddziaływanie z wieloma ścieżkami sygnalizacyjnymi zaangażowanymi w powstawanie stanu zapalnego. Przede wszystkim hamuje aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, regulującego ekspresję genów, których produktami są cytokiny prozapalne. Obniża również syntezę TNF- α , który jest głównym induktorem NF- κ B. Kurkumina hamuje wydzielanie wielu cytokin prozapalnych takich jak IL-1, IL-6, IL-8 oraz chemokin. Poza tym obniża syntezę cyklooksygenazy COX-2, kluczowego enzymu zaangażowanego w produkcję prostaglandyn, który ulega indukcji w miejscach stanu zapalnego. Hamuje syntezę również innego prozapalnego enzymu – lipooksygenazy (5-LOX). Z powodzeniem może być zaliczona do niesterydowych leków przeciwzapalnych – NSAID (ang. *non-steroidal anti-inflammatory drug*) [11,21,22].

KURKUMINA JAKO POTENCJALNY LEK CHOROBY ZWIĄZANYCH ZE STRESEM OKSYDACYJNYM I STANEM ZAPALNYM

Badania ostatnich lat wskazują na udział stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego w etiologii wielu chorób. Należą do nich choroby neurodegeneracyjne, choroby układu krążenia, cukrzyca, reumatoidalne zapalenie stawów, nowotwory i inne. Nie dziwi więc fakt, że kurkumina może zapobiegać i hamować rozwój tych chorób poprzez blokadę stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego. Poniżej przedsta-

wimy wybrane dane świadczące o korzystnym wpływie kurkuminy na poprawę parametrów charakteryzujących niektóre z wyżej wymienionych chorób.

Choroba Alzheimera (AD, ang. *Alzheimer disease*) jest postępującą chorobą neurodegeneracyjną powodującą zaburzenia poznawcze i behawioralne. Jest ona główną przyczyną demencji w krajach wysoko rozwiniętych. Autopsja mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera wykazuje obecność wewnątrzkomórkowych włókien fibrylarnych oraz wewnątrzkomórkowych złogów β -amyloidów (A β) zwanych płytkami starczymi. Są one wykrywane pośmiertnie w hipokampie, nowej korze i innych subkorowych strukturach. W etiologii choroby Alzheimera odgrywają rolę zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe. Istnieje coraz więcej dowodów na to, że w rozwoju choroby Alzheimera bardzo dużą rolę odgrywa stres oksydacyjny, i to zarówno w mózgu jak i w tkankach peryferyjnych. Produkty oksydacyjnej modyfikacji kwasów nukleinowych, białek, lipidów oraz produkty glikooksydacji, które są znanymi markerami stresu oksydacyjnego, znajdowano pośmiertnie w mózgach ludzi chorych, jak również w płynie mózgowo-rdzeniowym, osoczu, surowicy i moczu ludzi cierpiących na tę chorobę [23]. Coraz więcej danych świadczy o tym, że również stan zapalny, zarówno w mózgu, jak tkankach peryferyjnych, może być związany z patologią choroby Alzheimera [24]. Obecnie opublikowanych jest już kilkadziesiąt prac, których wyniki, uzyskane na zwierzęcych modelach choroby Alzheimera, wskazują na to, że kurkumina zmniejsza zaburzenia poznawcze, obniża stres oksydacyjny, hamuje stan zapalny w mózgu oraz zmniejsza akumulację beta-amyloidu, bardzo często poprzez niszczenie już istniejących złogów [3]. Opublikowano już wyniki pierwszych badań klinicznych osób dotkniętych tym schorzeniem, chociaż ze względu na niewielką grupę osób badanych na razie trudno jest jednoznacznie stwierdzić, czy kurkumina ma wpływ na hamowanie postępów tej choroby u ludzi.

Dysfunkcja układu krążenia (arterioskleroza) należy do typowych schorzeń wieku podeszłego i związana jest z gromadzeniem się uszkodzeń spowodowanych stresem oksydacyjnym oraz stanem zapalnym śródbłonna naczyń krwionośnych. Zmiany zapalne związane są ze zwiększoną produkcją cząstek adhezyjnych, zmienionym wydzielaniem cytokin prozapalnych, odkładaniem się LDL, żeby wymienić tylko niektóre. Sądzi się, że w procesie tym kluczową rolę może odgrywać podwyższona aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [25]. Co ciekawe, uważa się, że rozwojowi arteriosklerozy towarzyszy stale podwyższona aktywność oksygenazy hemowej, HO-1 [20]. Jak wiadomo, kurkumina jest inhibitorem NF- κ B oraz aktywuje ekspresję genu kodującego oksygenazę hemową. Podwyższenie poziomu tego enzymu przez kurkuminę tłumaczy się jako efekt obronny komórek polegający na adaptacyjnej aktywacji na stres [6]. Prac dotyczących dobroczynnego wpływu kurkuminy na hamowanie zwyrodnienia naczyń krwionośnych jest znacznie więcej. Zostały one zebrane w pracy przeglądowej [3].

Cukrzyca, to choroba, która może prowadzić do ślepoty, uszkodzenia nerek, zaburzeń zarówno naczyńniowych jak i kardiologicznych, choroby dziąseł [26]. Cukrzyca rów-

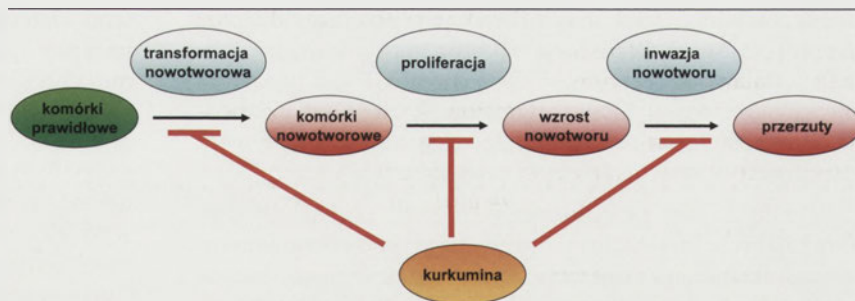
no typu I jak i II jest powiązana bezpośrednio z funkcją układu odpornościowego. Za zanik wysepek β -Langerhansa (typ I) mogą być odpowiedzialne zarówno limfocyty T jak i komórki odpowiedzi wrodzonej. Cukrzyca typu II charakteryzuje się natomiast insulinoopornością i towarzyszy jej podwyższony poziom cytokin prozapalnych takich jak: TNF- α , IL-1 β , IL-6 oraz innych [26]. Wpływ kurkuminy na objawy cukrzycy studiowano głównie na modelu indukowanej choroby u szczurów. Wykazano, że kurkumina zmniejsza hiperglikemię, poprawia parametry lipidowe, podnosi poziom insuliny, obniża poziom NF- κ B oraz wydzielanie TNF- α i tlenu azotu, redukując generalnie stres oksydacyjny [3,27].

Reumatoidalne zapalenie stawów należy do chorób autoimmunologicznych. Charakteryzuje się chronicznym stanem zapalnym i, podobnie jak w chorobach układu krążenia, zwiększoną produkcją cytokin prozapalnych takich jak: IL-1, IL-6, TNF- α . Cytokiny te są produkowane głównie w okolicach stawów, gdzie gromadzą się aktywowane makrofagi i komórki dendrytyczne [28,29]. Reumatoidalne zapalenie stawów związane jest także z podwyższonym poziomem zewnątrzkomórkowych metaloproteinaz (MMP). W destrukcji chrząstki ma szczególne znaczenie MMP-13, która jest produkowana przez chondrocyty i komórki synowialne. Tak więc, wydaje się, że kurkumina może hamować rozwój tego schorzenia poprzez blokowanie MMP oraz ścieżki związanej z NF- κ B [28].

Należy w tym miejscu wspomnieć również o chorobie nowotworowej, chociaż poświęcono jej cały następny rozdział. Znamy wiele dowodów na to, że stan zapalny i nowotwór są ze sobą powiązane w dwojaki sposób. Aktywacja onkogenów powoduje produkcję cytokin prozapalnych w transformowanych komórkach (ścieżka wewnętrzna) a chroniczny stan zapalny indukuje transformację nowotworową (ścieżka zewnętrzna), na co są już bogate dowody epidemiologiczne. Obydwie ścieżki (wewnętrzna i zewnętrzna) aktywują między innymi NF- κ B oraz STAT3, które z kolei indukują syntezę cytokin, chemokin, prostaglandyn oraz COX-2 [30]. Kurkumina może więc działać przeciwnowotworowo między innymi poprzez hamowanie stanu zapalnego.

KURKUMINA JAKO ZWIĄZEK CHEMOPREWENCYJNY I PRZECIWNOWOTWOROWY

Kancerogeneza, czyli powstawanie nowotworu, najogólniej rzecz ujmując polega na genetycznych zmianach w komórce spowodowanych mutacjami, niestabilnością chromosomową, aktywacją onkogenów i inaktywacją genów supresorów nowotworu, które to zmiany przekładają się na fenotyp komórki nowotworowej. Komórki nowotworowe charakteryzują się nieograniczonymi podziałami, niezależeniem od czynników wzrostu, zmniejszoną podatnością na apoptozę oraz zdolnością do tworzenia przerzutów [31]. W zwierzęcych modelach rozwój choroby nowotworowej przyjęto dzielić na fazy inicjacji, promocji i progresji [2]. Termin chemoprewencja lub chemoprofilaktyka, czyli zapobieganie chorobie, w tym przypadku nowotworowej,



Rycina 3. Wpływ kurkuminy na hamowanie powstawania i rozwoju nowotworu.

nie jest równoznaczny z chemioterapią, czyli leczeniem nowotworu przy pomocy związków chemicznych. Jednakże termin chemoprewencja używany jest często w przypadku zapobiegania chorobie nowotworowej na różnych etapach jej rozwoju, ale w zasadzie zanim nastąpią przerzuty. Natomiast przeciwnowotworowe działanie związku odnosi się do jego cytostatycznego efektu na komórki nowotworowe. W tym rozumieniu kurkumina ma działanie zarówno chemoprewencyjne (antykancerogenne) jak i przeciwnowotworowe (cytostatyczne, proapoptotyczne) [32,33]. Uproszczony schemat przeciwdziałania kurkuminy na różne etapy rozwoju nowotworu przedstawia rycina 3.

Chemoprewencyjne działanie kurkuminy wykazano w przypadku wielu typów nowotworów zwierzęcych indukowanych kancerogenami. I tak, kurkumina aplikowana na skórę lub podawana w diecie znacząco redukowała powstawanie guzów skóry myszy i szczurów na skutek działania kancerogenów. Podobnie, obecna w diecie kurkumina hamowała kancerogenezę w wątrobie myszy i szczurów. Najwięcej badań poświęcono ochronnemu działaniu kurkuminy w stosunku do nowotworów układu pokarmowego, wykazując jej skuteczność w przypadku raka okrężnicy mutantów mysich szczególnie podatnych na ten typ nowotworu oraz zwierzęcych nowotworów przełyku i żołądka. Kurkumina okazała się być skutecznym związkiem prewencyjnym również w przypadku guzów płuc i piersi [10,32,33].

Przeciwnowotworowe działanie kurkuminy przejawia się poprzez zahamowanie proliferacji i indukcję śmierci komórkowej, co wykazano przede wszystkim w badaniach *in vitro*. *In vivo* kurkumina zapobiega przerzutom [32] i hamuje angiogenezę [34]. Śmierci komórkowej indukowanej przez kurkuminę zostanie poświęcony następny rozdział. W tym miejscu zostanie krótko przedstawiony problem hamowania przez kurkuminę metastazy i związanej z nią angiogenezy. Metastaza to proces, w którym komórki nowotworowe wędrują poprzez układ krwionośny z tkanki, w której powstały do innych, nieraz bardzo odległych narządów i tam się zasiedlają, czyli tworzą przerzuty. W swojej wędrowności komórki nowotworowe muszą pokonać wiele barier, w tym błonę podstawną zbudowaną głównie z kolagenu IV. W pokonaniu tej bariery pomagają im metaloproteiny (MMP), z których dwie MMP-2 i MMP-9 degrading kolagen IV. Wykazano, że kurkumina jest inhibitorem tych metaloproteinaz wydzielanych przez komórki nowotworowe. Komórki raka prostaty przeszczepione myszom, wykazywały znaczące zahamowanie wzrostu oraz spadek aktywności MMP-2 i MMP-9 pod wpływem kurkuminy. Podobnie u myszy, którym przeszczepiono komórki raka

piersi człowieka, kurkumina hamowała przerzuty do płuc i syntezę MMP-9, COX-2, NF- κ B oraz naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna, VEGF [35]. VEGF jest typowym czynnikiem stymulującym angiogenezę, która jest niezbędna do wzrostu guza i obniżenie jego ekspresji pod wpływem kurkuminy obserwowane było również przez innych [34].

Wyniki badań przedklinicznych oraz podstawowych, obrazujących molekularny mechanizm przeciwnowotworowego działania kurkuminy, są na tyle obiecujące, że rozpoczęto już badania kliniczne ludzi chorych na nowotwory okrężnicy, prostaty oraz czerniaka.

WPLYW KURKUMINY NA ŚMIERĆ I PODZIAŁY KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Badania *in vivo* prowadzone na gryzoniach ujawniły skuteczność kurkuminy w redukcji indukowanych guzów, wskazując tym samym, że może ona indukować śmierć komórek nowotworowych. Wyniki uzyskane na komórkach różnych linii nowotworowych wskazują na wysoką cytotoksyczność kurkuminy stosowanej w stężeniach od kilku do kilkunastu μ M [36]. Zasadniczo rozróżnia się trzy rodzaje śmierci komórkowej. Jest to nekroza, apoptoza i autofagia [37]. Chociaż jeszcze do niedawna uważano, że nekroza jest śmiercią przypadkową, prowadzącą do beładnej destrukcji komórki, a apoptoza stanowi tzw. śmierć programowaną. Dzisiaj tak ostre rozróżnienie nie ma już uzasadnienia, gdyż bardzo często nekroza może kończyć się apoptozą lub apoptoza może zachodzić bez udziału kaspaz dając pozorne symptomy nekrozy. Natomiast autofagia, zwana czasem II typem śmierci (I typ to apoptoza) okazuje się być procesem prowadzącym do przetrwania komórek. Apoptoza to proces zwany *self-killing* (ang.), gdyż komórka uruchamiając ścieżkę apoptozy ulega nieodwracalnemu samounicestwieniu a powstające ciała apoptotyczne ulegają fagocytozie przez makrofagi lub komórki sąsiadujące. Natomiast autofagia zwana jest *self-eating* (ang.), gdyż komórka w warunkach stresu degraduje cząsteczki lub całe organella. Proces ten może zakończyć się śmiercią, ale coraz częściej uważa się, że jest to sposób na przeżycie, podobnie jak starzenie komórkowe (ang. *senescence*). Jak dotychczas brak jest danych o indukcji starzenia komórkowego przez kurkuminę i tylko dwie prace dotyczące indukcji przez ten związek autofagii komórek glejaka [38,39]. Nasze wstępne wyniki wskazują, że kurkumina może indukować w komórkach raka okrężnicy HCT116 zarówno starzenie komórkowe jak i autofagię (Mosieniak i wsp., dane niepublikowane). Natomiast są już dziesiątki prac traktujących o indukcji apoptozy przez kurkuminę. Nasze własne badania wykazały indukcję przez kurkuminę katastrofy mitotycznej, czyli śmierci komórki w fazie mitozy, spowodowanej nieprawidłowościami w funkcjonowaniu wrzeciona mitotycznego. Komórki umierające w tej fazie cyklu zwykle uruchamiają egzekutorową fazę apoptozy, można więc ten rodzaj śmierci komórkowej traktować jak apoptozę [40,41].

Wyróżnia się dwa podstawowe szlaki apoptozy: szlak zewnętrzny (ang. *extrinsic*) pobudzany za pośrednictwem receptorów śmierci, obecnych w błonie komórkowej, prowadzący do aktywacji kaspazy 8 oraz szlak wewnętrzny (ang. *intrinsic*), który można podzielić na indukowany przez

stres siateczki śródplazmatycznej i związany z aktywacją kaspazy 12 oraz klasyczny szlak wewnętrzny, zależny od mitochondriów i aktywacji kaspazy 9 [42]. Wewnętrzna droga apoptozy uruchamiana jest poprzez stres i uszkodzenia DNA. Wszystkie szlaki prowadzą do aktywacji kaspazy 3, głównej kaspazy egzekutorowej apoptozy, i mogą ulegać wzajemnemu pobudzaniu i wzmacnianiu. Kluczowym elementem sygnałowym ścieżki mitochondrialnej jest uwolnienie cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy i utworzenie tzw. apoptosomu, kompleksu aktywującego kaspazę 9. Kaspazy efektorowe (3,6,7) katalizują degradację licznych białek komórkowych oraz aktywują specyficzną endonukleazę (DFF/CAD), prowadzącą do oligonukleosomowej fragmentacji DNA. Uwolnienie cytochromu c (oraz innych białek) z mitochondrialnej przestrzeni międzymbłonnej jest regulowane przez białka z rodziny Bcl-2. Rodzina białek Bcl-2 jest bardzo liczna i zawiera zarówno białka proapoptotyczne jak i anty-apoptotyczne. Regulują one nie tylko proces apoptozy, ale także nekrozy i autofagii.

Bardzo ważną rolę w regulacji procesu apoptozy zarówno „zewnętrznej” jak i „wewnętrznej” odgrywa białko p53, które bierze udział w przekazywaniu sygnału o uszkodzeniach DNA. Białko p53 pełni rolę przełącznika pomiędzy zatrzymaniem cyklu komórkowego i naprawą uszkodzeń, a uruchomieniem programu apoptozy, jeśli uszkodzenia są zbyt rozległe. W tym drugim przypadku p53 aktywuje białka z rodziny Bcl-2, które z kolei przekazują sygnał do mitochondriów. Komórki nowotworowe to takie, które „wymknęły” się starzeniu i śmierci komórkowej, gdyż zmiany genetyczne, które w nich występują związane są ze wzmocnieniem ścieżek prożyciowych, z jednej strony, i z drugiej strony osłabieniem ścieżek prowadzących do śmierci komórkowej [42]. Dlatego wiele komórek nowotworowych jest opornych na radio- i chemioterapię. Zadziwiający jest fakt, że kurkumina jest w stanie wyidukować śmierć komórkową we wszystkich badanych komórkach nowotworowych, nie wyłączając w tym tych opornych na inne proapoptotyczne czynniki. Można to wytłumaczyć tym, że kurkumina, w zależności od typu komórek i zmian genetycznych w nich występujących, aktywuje różne szlaki poprzez indukcję ekspresji genów białek proapoptotycznych oraz hamowanie ekspresji genów białek antyapoptotycznych. Analiza mikromacierzy wykazała zmianę ekspresji pod wpływem kurkuminy 104 z 214 badanych genów związanych z apoptozą komórek raka piersi [43]. Kurkumina indukuje śmierć zarówno komórek zwierzęcych jak i człowieka, pochodzących z guzów litych, białaczek i chłoniaków. I tak, pod wpływem kurkuminy wykazano śmierć komórek linii nowotworowych okrężnicy, wątroby, płuc, piersi, przysadki, jajników, prostaty, pęcherza, astrocytów, gleju i neuroblastomy, czerniaka i wielu innych [44]. Nasze własne badania wykazały, że kurkumina skutecznie indukowała śmierć komórek promielocytarnych HL-60 [45,46] oraz wywodzących się z nich opornych na apoptozę komórek HCW-2 [40], komórek człowieka i myszy z ekspresją genu Bcr/Abl [41] oraz limfoidalnych komórek Jurkat [18,47,48]. Wśród apoptotycznych ścieżek indukowanych przez kurkuminę można znaleźć zarówno zewnętrzną mitochondrialną i zależną od stresu siateczki śródplazmatycznej, jak i wewnętrzną a także zależną od p53 i związaną z hamowaniem przez kurkuminę NF- κ B. Co ciekawe, chociaż kurkumina jest związkiem o

właściwościach antyoksydacyjnych, to jednak bardzo często w indukcji apoptozy wykazuje właściwości prooksydacyjne. [49]. Kurkumina może indukować również nietypową apoptozę. Jest też wiele danych mówiących o uwrażliwianiu przez kurkuminę komórek na radio- i chemioterapię oraz o synergistycznym działaniu z innymi związkami.

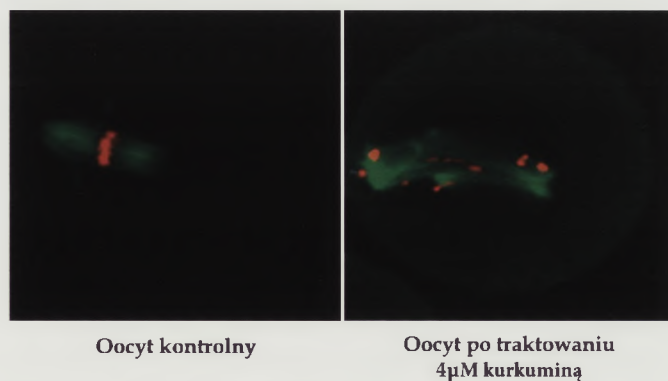
Komórki nowotworowe, w odróżnieniu od prawidłowych, nie podlegają limitowi podziałów, tylko dzielą się w nieskończoność [31]. Kurkumina indukuje w nich nie tylko śmierć, ale także zatrzymuje podziały poprzez oddziaływanie na punkty kontroli cyklu komórkowego. Wykazano wielokrotnie, że zmniejsza ekspresję genu cykliny D1. Cyklina D1 wiąże się z kinazami (Cdk4/6) punktu kontroli przejścia z fazy G1 do S cyklu komórkowego (tak zwany punkt restrykcyjny), powodując fosforylację białka Rb, które hyperfosforylowane uwalnia czynnik transkrypcyjny E2F1, aktywujący geny niezbędne do syntezy DNA. Tak więc, kurkumina pośrednio, poprzez obniżenie ekspresji genu cykliny D1 oraz podwyższenie ekspresji genów inhibitorów zależnych od cyklin kinaz rodziny Kip, takich jak p21 i p27, hamuje syntezę DNA, podwyższa ekspresję p53, co w efekcie może prowadzić do apoptozy, albo zatrzymania komórek w fazie G1 cyklu komórkowego. Hamuje też proliferację komórek i indukuje ich śmierć poprzez hamowanie aktywności prożyciowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [50].

WPLYW KURKUMINY NA ŚMIERĆ I PODZIAŁY KOMÓREK PRAWDŁOWYCH

O ile jest bardzo dużo prac mówiących o hamowaniu podziałów i indukcji śmierci komórek nowotworowych, o tyle można doliczyć się zaledwie kilkunastu prac dotyczących hamowania proliferacji i indukcji śmierci przez kurkuminę komórek prawidłowych. Pierwsza praca jaka się ukazała na ten temat pochodzi z roku 1996 i mówi o tym, że kurkumina indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych i unieśmiertelnionych fibroblastach (NIH 3T3), ale nie w embrionalnych fibroblastach szczura i prawidłowych fibroblastach skóry człowieka [51]. Również w jednej z ostatnich prac wykazano, że kurkumina dopiero w stężeniu 40 μ M indukuje śmierć prawidłowych fibroblastów człowieka, podczas gdy już 10 μ M stężenie daje taki sam efekt w komórkach nowotworu okrężnicy HCT116 [52]. Co prawda, trudno jest porównywać prawidłowe fibroblasty, o których wiadomo, że są dosyć odporne na apoptozę, z komórkami nowotworowymi pochodzenia śródbłonkowego. W innej pracy wykazano, że kurkumina w sposób zależny od czasu i stężenia indukuje apoptozę w unieśmiertelnionych fibroblastach myszy, podczas gdy prawidłowe nabłonkowe komórki płuc człowieka pozostawały niewrażliwe na kurkuminę stosowaną w tych samych stężeniach (do 30 μ M) [53]. Inni natomiast wykazali, że fibroblasty człowieka izolowane z dziąseł, są wrażliwe na kurkuminę, która hamuje ich proliferację i indukuje śmierć komórkową, ale w stężeniach wyższych, bo sięgających 80 μ M [54]. Ostatnio wykazano, że kurkumina skutecznie indukuje śmierć fibroblastów skóry człowieka w stężeniu powyżej 25 μ M [55]. Kurkumina była również skutecznym induktorem apoptozy fibroblastów pochodzących z maziówki stawów osób chorych na reumatoidalne zapalenie stawów, ale dopiero w stężeniu 50 μ M i wyższym

[56]. Kurkumina stosowana w podobnym stężeniu (50 μ M) skutecznie indukowała śmierć komórkową w limfoidalnych komórkach gryzoni oraz komórkach krwi obwodowej człowieka zarówno spoczynkowych jak i stymulowanych do proliferacji [45,57]. Natomiast w stężeniu 5-krotnie niższym kurkumina indukowała śmierć komórek nowotworowych raka piersi (MCF-7), po uprzednim zatrzymaniu ich w fazie G2/M cyklu komórkowego. Stosowana w tym samym stężeniu przejściowo hamowała proliferację prawidłowych komórek nabłonkowych zatrzymując je w fazie G0/G1 bez oznak śmierci komórkowej [58]. W podobnie niskim stężeniu kurkumina hamowała proliferację komórek śródbłonka żyły pępowinowej człowieka (tzw. HUVEC), jednakże bez indukcji śmierci komórkowej. Pojedyncze prace traktują o indukcji śmierci komórkowej przez kurkuminę keratinocytów, osteoklastów, komórek mięśni gładkich naczyń, śródbłonka żyły pępowinowej oraz neuronów kory szczura.

Wydaje się, że słabsza podatność komórek prawidłowych niż nowotworowych na indukcję apoptozy przez kurkuminę może wynikać ze stosowania różnych stężeń w przypadku komórek prawidłowych i nowotworowych oraz z nie zawsze typowego obrazu śmierci jaką ona indukuje. Wykazaliśmy na przykład, że w limfocytach T człowieka kurkumina indukuje apoptozę, ale bez typowej dla tego rodzaju śmierci oligonukleosomowej degradacji DNA [57]. Aggarwal i wsp. uważają, że komórki nowotworowe, w odróżnieniu od większości komórek prawidłowych, mają aktywny czynnik transkrypcyjny NF- κ B, który jest głównym celem kurkuminy [59]. Nasze własne badania prowadzone na oocytach i zarodkach myszy, w których to komórkach nie dochodzi do aktywacji NF- κ B, wykazały, że kurkumina indukuje śmierć poprzez działanie na kinazę CDK1 i wrzeciono podziałowe, jednakże dopiero w dość wysokim stężeniu, 30 μ M i wyższym [60]. Rycina 4 przedstawia przykładowe oocyty mysie kontrolne i traktowane 40 μ M kurkuminą. Po traktowaniu kurkuminą widoczne są zaburzenia wrzeciona podziałowego i nieprawidłowa segregacja chromosomów. Obserwowane przez nas zaburzenia wrzeciona podziałowego dotyczą zarówno komórek mejotycznych jak i mitotycznych [60]. Wydaje się więc, że faktycznie kurkumina może indukować śmierć w komórkach prawidłowych, jednakże uruchomienie ścieżek śmierci komórkowej wymaga w tym przypadku znacznie wyższych stężeń kurkuminy. Fakt ten potwierdza znaczenie kurkuminy jako potencjal-



Rycina 4. Efekt działania kurkuminy na wrzeciono podziałowe mysich oocytów. Kolor czerwony przedstawia DNA, a kolor zielony β tubulinę wybarwioną odpowiednio barwnikiem DRAQ5 oraz przeciwciałem przeciwko β tubulinie sprzężonym z fluorochromem FITC.

nego leku przeciwnowotworowego bezpiecznego dla organizmu. Kurkumina hamuje również proliferację i aktywację limfocytów T, B, NK i dendrocytów, co sprawia, że jest ona nie tylko czynnikiem przeciwzapalnym, ale także wykazuje właściwości immunosupresyjne [61].

KURKUMINA A GOJENIE RAN I OCHRONA PRZECIWKO USZKODZENIOM NARZĄDÓW

Pomimo tego, że kurkumina jest induktorem śmierci komórek, to jednak, jako składnik diety, jest czynnikiem kardio-, nefro- i hepatoprotekcyjnym. Może również stanowić ochronę przeciw uszkodzeniom innych narządów, w tym płuc, jąder i przede wszystkim skóry.

Dobroczynne działanie kurkuminy w gojeniu się ran skórnych jest znane od bardzo dawna. Gojenie ran można podzielić na trzy etapy: (1) faza stanu zapalnego i tworzenia się wysięku oraz usuwania komórek uszkodzonych, czyli oczyszczanie rany oraz krzepnięcie krwi; (2) faza proliferacji i ziarnowacenia tkanki; (3) faza różnicowania, dojrzewania, tworzenia nabłonka i blizny [62]. W skrócie można powiedzieć, że w gojeniu się ran mamy do czynienia, ze śmiercią, proliferacją, dojrzewaniem i migracją komórek. Kurkumina przyspiesza gojenie się ran poprzez redukcję stresu oksydacyjnego, indukcję migracji komórek, przyspieszanie ich proliferacji, indukcję śmierci, podwyższanie syntezy kolagenu, indukcję angiogenezy [62]. Wydaje się, że działania kurkuminy w regulacji tego skomplikowanego procesu fizjologicznego są przeciwstawne (np. indukcja śmierci, proliferacji), chociaż efekt końcowy jest pozytywny. Prawdopodobnie mogą mieć tutaj znaczenie lokalne i czasowe różnice w stężeniach kurkuminy oraz jej hormetyczne działanie (patrz ostatni rozdział). W początkowej fazie stosunkowo wysokie stężenia kurkuminy mogą przyspieszać śmierć uszkodzonych komórek poprzez wzmocnienie stresu oksydacyjnego, a w późniejszych fazach niższe stężenie (kurkumina jest dość szybko metabolizowana) może sprzyjać indukcji proliferacji i protekcji przeciwko śmierci. Ostatnio wykazano, że kurkumina w stężeniu powyżej 25 μM indukuje śmierć fibroblastów, natomiast w niższym stężeniu (5 μM) zapobiega jej [63].

Ochrona układu sercowo-naczyniowego przez kurkuminę manifestuje się na wielu płaszczyznach. Przede wszystkim antyoksydacyjne i przeciwzapalne działanie kurkuminy zapobiega arteriosklerozie, o czym wspomiano już wcześniej. Duże znaczenie w tym działaniu ochronnym ma wpływ kurkuminy na poziom cholesterolu i peroksydację lipidów, w tym utlenianie cholesterolu. Jak wiadomo utleniony cholesterol powoduje uszkodzenie ścian naczyń krwionośnych i może prowadzić do ataku i zawału serca. Badania prowadzone na królikach karmionych dietą wysokocholesterolową oraz kilkuset ochotnikach wykazały, że kurkumina obniża poziom „złego” (LDL), podwyższa poziom „dobrego” cholesterolu (HDL) oraz obniża poziom trójglicerydów [64]. Ponadto kurkumina zapobiega agregacji płytek krwi i obniża poziom fibrynogenu. Zapobiega też szkodliwym skutkom niedotlenienia – reperfuzji, co może mieć znaczenie w przypadku wylewów krwi [2,64].

Antyoksydacyjne właściwości kurkuminy oraz jej pochodnych leżą również u podłoża ochrony nerek, zwłaszcza w przypadku uszkodzeń powodowanych cukrzycą oraz wątroby w zatruciach szkodliwymi związkami, w tym alkoholowym [64]. Kurkumina wykazuje również ochronne działanie w przypadku płuc, gdy uszkodzenia indukowano różnymi czynnikami [65].

Ostatnio ukazało się kilka prac publikujących wyniki dotyczące ochronnego działania kurkuminy na jądra samców myszy i szczurów, w których indukowano uszkodzenia, w tym również stresem oksydacyjnym, co potwierdziły nasze własne badania [44].

BIODOSTĘPNOŚĆ I TOKSYCZNOŚĆ KURKUMINY

Kurkumina jest związkiem o masie cząsteczkowej 368.38. Po raz pierwszy wyizolowano ją w 1815 roku, a strukturę ustalono w 1910 roku. Jest ona dwuferulometanem (Ryc. 1) i stanowi około 77% w dostępnym preparatach występujących pod ogólną nazwą kurkuminy, w skład których wchodzi jeszcze dwa inne kurkuminoidy [11]. Jest związkiem hydrofobowym i w związku z tym dobrze rozpuszcza się w acetonie, etanolu i DMSO. Badania prowadzone na zwierzętach oraz wolontariuszach wykazały, że kurkumina posiada bardzo niską biodostępność i jest dość szybko metabolizowana. Badania prowadzone na szczurach wykazały, że kurkumina podawana doustnie w bardzo wysokiej dawce, bo 1g/kg wagi ciała, jest w 75% wydalana z kałem i tylko śladowe jej ilości znaleziono w moczu. Ponad 60% wydalonej z kałem kurkuminy stanowiły jej metabolity. Kiedy kurkuminę wstrzykiwano dożylnie lub dootrzewnowo gromadziła się głównie w woreczku żółciowym w postaci pochodnych glukuronidów tetra- i heksa-kurkuminy. Zasadniczo kurkumina tworzy w jelicie i wątrobie nieaktywne biologicznie koniugaty glukuronidowe i siarczanowe, a także ulega redukcji [66]. Dane uzyskane podczas I fazy testów klinicznych, generalnie potwierdzają spostrzeżenia dokonane na zwierzętach o niskiej biodostępności kurkuminy [2]. Najwyższa ustna dawka jaką stosowano u ludzi (8 g/dobę) dawała najwyższe stężenie w surowicy nie przekraczające 2 μM . Jednakże, zarówno w badaniach na zwierzętach jak i na wolontariuszach wykazano, że aktywny składnik pieprzu piperyna znacząco podwyższa biodostępność kurkuminy i u ludzi wskaźnik jej biodostępności podawanej w ilości 2 g razem z 20 mg piperiny poprawił się aż o 2000% [67].

Kurkumina jest naturalnym składnikiem diety, ale dawki stosowane w klinice znacznie przekraczają te stosowane w diecie. Dlatego badania przedkliniczne i kliniczne I fazy, nastawione na sprawdzenie toksyczności związku, zarówno w przypadku kurkuminy jak i innych potencjalnych leków, są niezbędne. Dotychczasowe ich wyniki wskazują, że kurkumina podawana przez kilka miesięcy w dziennej dawce 3,6 g lub nawet 8 g nie powodowała żadnych ubocznych skutków. Szacuje się, że Hindusi spożywają praktycznie przez całe życie około 2 g kurkumy dziennie, co stanowi ekwiwalent mniej niż 100 mg kurkuminy [68].

Na pytanie jak przy tak niskiej biodostępności kurkuminy może ona wywoływać tyle dobroczynnych efektów

postaramy się odpowiedzieć w ostatnim rozdziale. W tym miejscu jednak należy nadmienić, że prowadzi się badania w kierunku syntezy pochodnych kurkuminy, które przy zachowaniu aktywności charakteryzowałyby się znacznie wyższą biodostępnością, oraz znalezieniu jak najlepszego sposobu dostarczania jej do tkanek docelowych. I tak wykazano, że związek ten podawany w liposomach miał wyższą aktywność jako inhibitor NF- κ B, co przekładało się na wydajniejsze hamowanie wzrostu komórek raka trzustki *in vitro* i *in vivo* [69]. Ponadto czynione są próby syntezy fosfolipidów połączonych z kurkumina oraz nanocząsteczek kurkuminy zwiększających jej stabilność i biodostępność [66].

CELE KOMÓRKOWE KURKUMINY

Kurkumina ma w komórce bardzo dużo celów molekularnych, których identyfikacja wydaje się postępować bardzo szybko. Z niektórymi częściami kurkumina wiąże się, a aktywność innych reguluje w sposób pośredni. Większość z nich została zebrana przez Aggarwala i Sunga [66]. Na rycinie 2 pokazano niektóre z nich. Docelowe dla kurkuminy cząsteczki, z którymi nie wiąże się ona bezpośrednio, mogą być aktywowane lub hamowane. Kurkumina aktywuje wiele czynników transkrypcyjnych (m.in. p53, NrF2, ATF3, PPAR- γ), które wpływają na aktywność genów docelowych. Wpływa na indukcję p21 przez p53 oraz aktywację genu oksygenazy hemowej (HO-1) przez NrF2 a także hamowanie ekspresji genu cykliny D1 przez PPAR- γ . Z kolei inne czynniki transkrypcyjne są hamowane przez kurkumina. Do jednych z pierwszych zbadanych cząstek docelowych należy czynnik transkrypcyjny AP-1, którego obniżenie wiązania z DNA pod wpływem kurkuminy wykazano w 1991 roku [70].

Grupa Aggarwala zidentyfikowała po raz pierwszy czynnik transkrypcyjny NF- κ B jako cel molekularny kurkuminy. Zgodnie z dzisiejszą wiedzą wydaje się, że może on być jednym z bardziej uniwersalnych celów kurkuminy (poza czynnikiem transkrypcyjnym AP-1, który jest zaangażowany w regulację genów odpowiedzi na stres oksydacyjny) [59]. Wynika to z faktu, że NF- κ B ma działanie antyapoptotyczne oraz pełni funkcje w regulacji odporności zarówno nabytej jak i wrodzonej. I tak, NF- κ B aktywuje wiele genów, których produkty białkowe biorą udział w kontroli stanu zapalnego (enzymy COX-2 i 5-LOX, cytokiny IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α ; cząstki adhezyjne: CXCR4), proliferacji (c-myc, cyklina D1, surwiwina), apoptozy (Bcl-2, Bcl-xl, XIAP, IAP-1, IAP-2, cFlip, surwiwina) oraz angiogenezy (MMP-2, MMP-9, ICAM-1, VCAM-1).

NF- κ B stanowi rodzinę składającą się z pięciu białek: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 i p52/p100. Białka te rezydują w cytoplazmie w postaci homo- lub heterodimerów i są związane z białkami z rodziny inhibitorów I κ B. Po stymulacji komórki, na przykład do podziałów, inhibitory ulegają fosforylacji, a następnie degradacji przez proteasom. Uwolniony NF- κ B ulega translokacji do jądra i związaniu z DNA [71]. Aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- κ B może być również regulowana poprzez acetylację na różnych poziomach [72]. Mianowicie, po pierwsze acetylacja histonów reguluje dostępność genów regulowanych przez

NF- κ B, po drugie acetylacji ulega kinaza IKK fosforylująca inhibitor I κ B, i po trzecie acetylowane są podjednostki p50 i p65 NF- κ B. Acetylacja białek histonowych regulowana jest przez deacetylazy (HDAC) oraz acetylotransferazy (HAT). Zasadniczo acetylacja reszty lizynowej histonów powoduje rozluźnienie chromatyny i udostępnienie DNA czynnikom transkrypcyjnym. W związku z tym wiele koaktywatorów transkrypcji ma funkcje transacetylaz odpowiedzialnych za acetylację histonów.

Wydaje się, że kurkumina działa głównie poprzez hamowanie aktywności kinazy IKK fosforylującej inhibitorową jednostkę kompleksu [73]. Aczkolwiek wykazano również, że kurkumina indukuje hypoacetylację histonów poprzez hamowanie aktywności acetylotransferaz, w tym białka CBP/p300, które jest koaktywatorem transkrypcji [74]. Niewykluczone, że kurkumina może też wpływać na acetylację innych białek, nie związanych z regulacją aktywności genów, takich jak na przykład α -tubulina, która podlega procesom acetylacji/deacetylacji.

KURKUMINA A HOMEOSTAZA ORGANIZMU

Homeostaza jest to zdolność komórki lub całego organizmu do utrzymania wewnętrznej równowagi poprzez uruchomienie biochemicznych i fizjologicznych procesów. Ponieważ, na każdy organizm działają różne stresogenne czynniki, zakłócające wewnętrzną równowagę, istnieje ciągła tendencja do jej przywracania [75]. Jednakże zdolność organizmu do utrzymania homeostazy jest ograniczona. Po pierwsze, wszystkie organizmy rozmnażające się płciowo starzeją się, czyli charakteryzują się stopniowym spadkiem homeostazy zakończonym śmiercią, a po drugie występuje wiele czynników chorobotwórczych, którym organizm sam, bez interwencji, nie potrafi poddać. Istnieje jednak wiele zewnętrznych czynników, które pomagają w przywróceniu homeostazy organizmu. Należy do nich wiele naturalnych i syntetycznych leków. Znamy już dzisiaj dużo związków roślinnego pochodzenia, które mają dobroczynne działanie poprzez przywracanie homeostazy organizmu. Należy do nich kurkumina. Ostatnio zaproponowaliśmy nawet, że może ona spowalniać starzenie się organizmu, chociaż dotychczas brak jest danych o wpływie kurkuminy na długość życia [8].

Ali i Rattan uważają, że kurkumina może mieć tak zwane hormetyczne działanie, czyli należy do związków, które nazwali hormetykami [76]. Hormeza, to zjawisko polegające na tym, że różne czynniki w zależności od nasilenia/stężenia mogą działać dobroczynnie (mała dawka) lub destrukcyjnie (duża dawka) (Ryc. 5). Nasze własne badania prowadzone *in vitro* wykazały, że faktycznie występuje dwufazowe działanie kurkuminy. W niższych dawkach (10 μ M) stymuluje ona dojrzewanie oocytów i podziały wczesnych zarodków, natomiast wyższe dawki (30 μ M) je hamują [60]. Kurkumina, jak się wydaje, nie ma *in vivo* działania szkodliwego, gdyż nawet w bardzo wysokich dawkach nie jest toksyczna. Wiąże się to z jej niską biodostępnością, której następstwem jest niskie stężenie związku w surowicy. Jest ono jednakże wystarczające, aby zapobiegać stanom zapalnym oraz eliminować komórki nowotworowe. Wysoka cytotoksyczność kurkuminy w przypadku komórek no-

wotworowych, w odróżnieniu od komórek prawidłowych, wynika prawdopodobnie z podwyższonej aktywności NF- κ B w tych pierwszych. Zaproponowaliśmy [8], aby zaliczyć kurkuminę do tak zwanych fitohormen, czyli związków roślinnych o pozytywnym działaniu na organizm zwierzęcy. Rośliny, w obronie przed szkodliwym wpływem środowiska (susza, promieniowanie UV, pasożyty i owady), wytworzyły mechanizmy obronne w postaci niskocząsteczkowych związków, które ze względu na podobieństwo molekularnych szlaków u roślin i zwierząt działają podobnie u jednych i drugich.

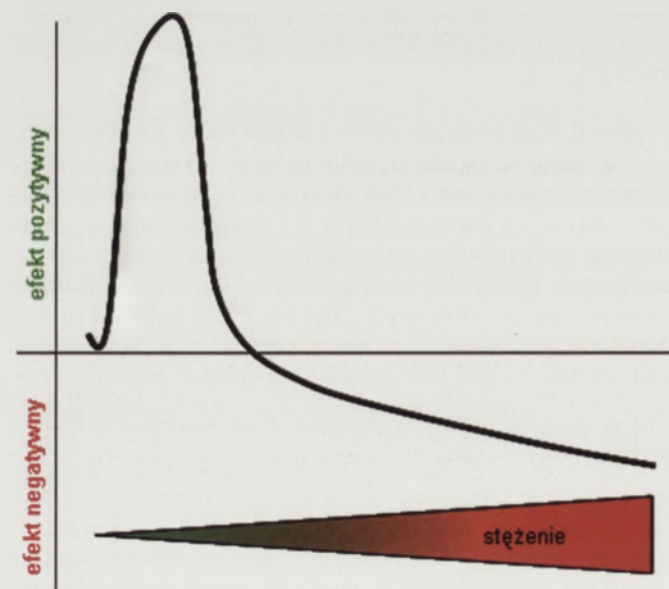
Czy jednak tak wielki optymizm związany z kurkuminą jest w pełni uzasadniony? Czy nie będzie ona miała szkodliwych efektów ubocznych, jeśli już nauczymy się, jak dostarczać ją do organizmu w dawkach znacznie przewyższających te, które powodują pozytywny efekt jaki obserwuje się przy jej niskiej biodostępności? Kurkumina, badana *in vitro* w stężeniach znacznie przewyższających te osiągalne w organizmie, indukuje przecież śmierć nie tylko komórek nowotworowych, ale również prawidłowych. Ostatnio zaczęły pojawiać się doniesienia wnoszące pewną dozę sceptycyzmu w całkowicie dobroczynne działanie kurkuminy. Otóż, jak wiadomo kurkumina jest związkiem chelatującym metale dwuwartościowe, w tym żelazo. Ma to korzystny wpływ, jeśli chodzi o jej antyoksydacyjne działanie, natomiast wykazano, że może ona powodować poważny niedobór żelaza u zwierząt doświadczalnych [77]. Badania te jednak nie znalazły jak na razie potwierdzenia w przypadku człowieka. Wydaje się więc, że kurkumina jako nutraceutyk, czyli składnik diety, jest zupełnie bezpieczna i nie ma przeciwwskazań w jej spożywaniu.

PIŚMIENNICTWO

1. Singh S (2007) From exotic spice to modern drug? Cell 130: 765-768
2. Strimpakos AS, Sharma RA (2008) Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. Antioxid Redox Signal 10: 511-545
3. Aggarwal BB, Harikumar KB (2009) Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative,

cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. Int J Biochem Cell Biol 41: 40-59

4. Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Tharakan ST, Sung B, Anand P (2008) Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. Planta Med 74: 1560-1569
5. Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, Tharakan ST, Misra K, Priyadarsini IK, Rajasekharan KN, Aggarwal BB (2008) Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. Biochem Pharmacol 76: 1590-1611
6. Calabrese V, Bates TE, Mancuso C, Cornelius C, Ventimiglia B, Cambria MT, Di Renzo L, De Lorenzo A, Dinkova-Kostova AT (2008) Curcumin and the cellular stress response in free radical-related diseases. Mol Nutr Food Res 52: 1062-1073
7. Khan N, Afaq F, Mukhtar H (2008) Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. Antioxid Redox Signal 10: 475-510
8. Salvioli S, Sikora E, Cooper EL, Franceschi C (2007) Curcumin in Cell Death Processes: A Challenge for CAM of Age-Related Pathologies. Evid Based Complement Alternat Med 4: 181-190
9. Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Piwocka K (2010) The promise of slow down ageing may come from curcumin. Curr Pharm Des 16: 884-892
10. Wolanin K, Piwocka K (2008) Kurkumina – od medycyny naturalnej do kliniki. Kosmos 57: 53-65
11. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H (2007) Curcumin: the Indian solid gold. Adv Exp Med Biol 595: 1-75
12. Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM, Torti SV (2008) Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. Cell Mol Life Sci 65: 1631-1652
13. Bartosz G (2008) Druga twarz tlenu. Wydawnictwo Naukowe PWN
14. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 39: 44-84
15. Manikandan P, Sumitra M, Aishwarya S, Manohar BM, Lokanadam B, Puvanakrishnan R (2004) Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischaemia in rats. Int J Biochem Cell Biol 36: 1967-1980
16. Menon VP, Sudheer AR (2007) Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. Adv Exp Med Biol 595: 105-125
17. Jaruga E, Bielak-Zmijewska A, Sikora E, Skierski J, Radziszewska E, Piwocka K, Bartosz G (1998) Glutathione-independent mechanism of apoptosis inhibition by curcumin in rat thymocytes. Biochem Pharmacol 56: 961-965
18. Piwocka K, Jaruga E, Skierski J, Gradzka I, Sikora E (2001) Effect of glutathione depletion on caspase-3 independent apoptosis pathway induced by curcumin in Jurkat cells. Free Radic Biol Med 31: 670-678
19. Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Green CJ (2000) Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. Free Radic Biol Med 28: 1303-1312
20. Loboda A, Jazwa A, Grochot-Przeczek A, Rutkowski AJ, Cisowski J, Agarwal A, Jozkowicz A, Dulak J (2008) Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal 10: 1767-1812
21. Aggarwal BB, Shishodia S (2004) Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning. Ann N Y Acad Sci 1030: 434-441
22. Aggarwal BB, Shishodia S (2006) Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. Biochem Pharmacol 71: 1397-1421
23. Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA (2006) Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol 65: 631-641
24. Gupta A, Pansari K (2003) Inflammation and Alzheimer's disease. Int J Clin Pract 57: 36-39



Rycina 5. Krzywa obrazująca hormetyczne działanie dowolnego czynnika.

25. Csiszar A, Wang M, Lakatta EG, Ungvari Z (2008) Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB. *J Appl Physiol* 105: 1333-1341
26. King GL (2008) The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol* 79: 1527-1534
27. Weisberg SP, Leibel R, Tortoriello DV (2008) Dietary curcumin significantly improves obesity-associated inflammation and diabetes in mouse models of diabetes. *Endocrinology* 149: 3549-3558
28. Bright JJ (2007) Curcumin and autoimmune disease. *Adv Exp Med Biol* 595: 425-451
29. Packard RR, Libby P (2008) Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 54: 24-38
30. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454: 436-444
31. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70
32. Kuttan G, Kumar KB, Guruvayoorappan C, Kuttan R (2007) Antitumor, anti-invasion, and antimetastatic effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595: 173-184
33. Surh YJ, Chun KS (2007) Cancer chemopreventive effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595: 149-172
34. Bhandarkar SS, Arbiser JL (2007) Curcumin as an inhibitor of angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 595: 185-195
35. Aggarwal BB, Shishodia S, Takada Y, Banerjee S, Newman RA, Bueso-Ramos CE, Price JE (2005) Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. *Clin Cancer Res* 11: 7490-7498
36. Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diederich M (2008) Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 76: 1340-1351
37. Lockshin RA, Zakeri Z (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2405-2419
38. Aoki H, Takada Y, Kondo S, Sawaya R, Aggarwal BB, Kondo Y (2007) Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas *in vitro* and *in vivo* through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol* 72: 29-39
39. Shinojima N, Yokoyama T, Kondo Y, Kondo S (2007) Roles of the Akt/mTOR/p70S6K and ERK1/2 signaling pathways in curcumin-induced autophagy. *Autophagy* 3: 635-637
40. Magalska A, Sliwinska M, Szczepanowska J, Salvioli S, Franceschi C, Sikora E (2006) Resistance to apoptosis of HCW-2 cells can be overcome by curcumin- or vincristine-induced mitotic catastrophe. *Int J Cancer* 119: 1811-1818
41. Wolanin K, Magalska A, Mosieniak G, Klinger R, McKenna S, Vejda S, Sikora E, Piwocka K (2006) Curcumin affects components of the chromosomal passenger complex and induces mitotic catastrophe in apoptosis-resistant Bcr-Abl-expressing cells. *Mol Cancer Res* 4: 457-469
42. Bielak-Zmijewska A (2003) Mechanizmy oporności komórek nowotworowych na apoptozę. *Kosmos* 52: 157-171
43. Ramachandran C, Rodriguez S, Ramachandran R, Raveendran Nair PK, Fonseca H, Khatib Z, Escalon E, Melnick SJ (2005) Expression profiles of apoptotic genes induced by curcumin in human breast cancer and mammary epithelial cell lines. *Anticancer Res* 25: 3293-3302
44. Sikora-Polaczek M (2010) Wpływ kurkuminy na przeżywalność komórek rozrodczych oraz podziały i śmierć preimplantacyjnych zarodków myszy. Praca doktorska Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Instytut Zoologii, Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu
45. Bielak-Zmijewska A, Koronkiewicz M, Skierski J, Piwocka K, Radziszewska E, Sikora E (2000) Effect of curcumin on the apoptosis of rodent and human nonproliferating and proliferating lymphoid cells. *Nutr Cancer* 38: 131-138
46. Mosieniak G, Sliwinska M, Piwocka K, Sikora E (2006) Curcumin abolishes apoptosis resistance of calcitriol-differentiated HL-60 cells. *FEBS Lett* 580: 4653-4660
47. Piwocka K, Zablocki K, Wieckowski MR, Skierski J, Feiga I, Szopa J, Drela N, Wojtczak L, Sikora E (1999) A novel apoptosis-like pathway, independent of mitochondria and caspases, induced by curcumin in human lymphoblastoid T (Jurkat) cells. *Exp Cell Res* 249: 299-307
48. Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Magalska A, Piwocka K, Mosieniak G, Kalinowska M, Widlak P, Cymerman IA, Bujnicki JM (2006) Curcumin induces caspase-3-dependent apoptotic pathway but inhibits DNA fragmentation factor 40/caspase-activated DNase endonuclease in human Jurkat cells. *Mol Cancer Ther* 5: 927-934
49. Kang J, Chen J, Shi Y, Jia J, Zhang Y (2005) Curcumin-induced histone hypoacetylation: the role of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol* 69: 1205-1213
50. Karunakaran D, Joseph J, Kumar TR (2007) Cell growth regulation. *Adv Exp Med Biol* 595: 245-268
51. Jiang MC, Yang-Yen HF, Yen JJ, Lin JK (1996) Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines. *Nutr Cancer* 26: 111-120
52. Watson JL, Hill R, Lee PW, Giacomantonio CA, Hoskin DW (2008) Curcumin induces apoptosis in HCT-116 human colon cancer cells in a p21-independent manner. *Exp Mol Pathol* 84: 230-233
53. Shankar S, Srivastava RK (2007) Bax and Bak genes are essential for maximum apoptotic response by curcumin, a polyphenolic compound and cancer chemopreventive agent derived from turmeric, *Curcuma longa*. *Carcinogenesis* 28: 1277-1286
54. Atsumi T, Tonosaki K, Fujisawa S (2006) Induction of early apoptosis and ROS-generation activity in human gingival fibroblasts (HGF) and human submandibular gland carcinoma (HSG) cells treated with curcumin. *Arch Oral Biol* 51: 913-921
55. Scharstuhl A, Mutsaers HA, Pennings SW, Szarek WA, Russel FG, Wagener FA (2009) Curcumin-induced fibroblast apoptosis and *in vitro* wound contraction are regulated by antioxidants and heme oxygenase: implications for scar formation. *J Cell Mol Med* 13: 712-725
56. Park C, Moon DO, Choi IW, Choi BT, Nam TJ, Rhu CH, Kwon TK, Lee WH, Kim GY, Choi YH (2007) Curcumin induces apoptosis and inhibits prostaglandin E₂ production in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med* 20: 365-372
57. Magalska A, Brzezinska A, Bielak-Zmijewska A, Piwocka K, Mosieniak G, Sikora E (2006) Curcumin induces cell death without oligonucleosomal DNA fragmentation in quiescent and proliferating human CD8+ cells. *Acta Biochim Pol* 53: 531-538
58. Choudhuri T, Pal S, Das T, Sa G (2005) Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. *J Biol Chem* 280: 20059-20068
59. Aggarwal BB (2004) Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 6: 203-208
60. Bielak-Zmijewska A, Sikora-Polaczek M, Nieznanski K, Mosieniak G, Kolano A, Maleszewski M, Styrna J, Sikora E (2010) Curcumin disrupts meiotic and mitotic divisions via spindle impairment and inhibition of CDK1 activity. *Cell Prolif* 43: 354-364
61. Jagetia GC, Aggarwal BB (2007) "Spicing up" of the immune system by curcumin. *J Clin Immunol* 27: 19-35
62. Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK (2007) Beneficial role of curcumin in skin diseases. *Adv Exp Med Biol* 595: 343-357
63. Scharstuhl A, Mutsaers HA, Pennings SW, Szarek WA, Russel FG, Wagener FA (2009) Curcumin-induced fibroblast apoptosis and *in vitro* wound contraction are regulated by antioxidants and heme oxygenase: implications for scar formation. *J Cell Mol Med* 13: 712-725
64. Miriyala S, Panchatcharam M, Rengarajulu P (2007) Cardioprotective effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595: 359-377
65. Venkatesan N (2000) Pulmonary protective effects of curcumin against paraquat toxicity. *Life Sci* 66: PL21-8
66. Aggarwal BB, Sung B (2009) Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci* 30: 85-94

67. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS (1998) Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med* 64: 353-356
68. Chainani-Wu N (2003) Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med* 9: 161-168
69. Li L, Braiteh FS, Kurzrock R (2005) Liposome-encapsulated curcumin: *in vitro* and *in vivo* effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. *Cancer* 104: 1322-1331
70. Huang TS, Lee SC, Lin JK (1991) Suppression of c-Jun/ AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5292-6
71. Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18: 2195-224
72. Quivy V, Van Lint C (2004) Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochem Pharmacol* 68: 1221-1229
73. Shishodia S, Singh T, Chaturvedi MM (2007) Modulation of transcription factors by curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595: 127-148
74. Marcu MG, Jung YJ, Lee S, Chung EJ, Lee MJ, Trepel J, Neckers L (2006) Curcumin is an inhibitor of p300 histone acetyltransferase. *Med Chem* 2: 169-174
75. Stewart JA (2006) The detrimental effects of allostasis: allostatic load as a measure of cumulative stress. *J Physiol Anthropol* 25: 133-145
76. Ali RE, Rattan SI (2006) Curcumin's biphasic hormetic response on proteasome activity and heat-shock protein synthesis in human keratinocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1067: 394-399
77. Jiao Y, Wilkinson Jt, Di X, Wang W, Hatcher H, Kock ND, D'Agostino R, Jr., Knovich MA, Torti FM, Torti SV (2009) Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator. *Blood* 113: 462-469

Molecular and cellular mechanisms of curcumin action- beneficial effect on organism

Marta Sikora-Polaczek¹, Anna Bielak-Żmijewska², Ewa Sikora^{2,✉}

¹Maternity Center, 7a Białoprawnicka St., 31-221 Cracow, Poland

²Laboratory of Molecular Bases of Aging, Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur St., 02-093 Warsaw, Poland

✉e-mail: e.sikora@nencki.gov.pl

Key words: apoptosis, curcumin, hormesis, low grade inflammation, oxidative stress

ABSTRACT

Curcumin is a natural compound derived from rhizome of *Curcuma longa*. It is an active compound of turmeric used from millennia in traditional medicine. At present there is a very rich scientific documentation describing curcumin as an anticancer, antioxidative and anti-inflammatory compound. Research on animal models revealed its not only anticancer activity but also potency as a drug against many other diseases of low grade inflammatory origin. Curcumin also counteracts many induced organ injuries. On the cellular level curcumin inhibits proliferation and induces apoptosis, however it is less cytotoxic for cancer than normal cells. There are many molecular targets of curcumin but stress signaling pathways and inhibition of NF-κB transcription factor seems to be the most common. Despite its low bioactivity curcumin can exert beneficial influence on organism, thus confirming its hormetic propensity.

STRESZCZENIE

ATPazy typu P są dużą, wszechobecną i zróżnicowaną nadrodziną białek błonowych, zaangażowaną w wiele procesów transportowych praktycznie we wszystkich organizmach żywych. Charakterystyczną cechą tych enzymów jest tworzenie w cyklu katalitycznym ufosforylowanego intermediatu i wrażliwość na wanadan. Kierując się podobieństwem struktury pierwszorzędowej oraz specyficznością substratową, ATPazy typu P podzielono na pięć ewolucyjnie powiązanych rodzin. Rodziny te charakteryzują się podobnym planem budowy i mechanizmem działania, a także obecnością specyficznych dla poszczególnych rodzin domen białkowych, które odpowiadają za różnorodność substratową. Najczęściej są to pojedyncze łańcuchy polipeptydowe, które cechuje obecność od 8 do 12 segmentów transbłonowych, duża centralna pętla cytosolowa z zachowaną w ewolucji sekwencją wiążącą ATP oraz koniec polipeptydowy N i C zlokalizowany po stronie cytoplazmatycznej błony. W poniższej pracy przedstawiono najważniejsze informacje o roślinnych ATPazach typu P, które wydają się odgrywać ważną i niezastąpioną rolę w przystosowywaniu się roślin do zmiennych warunków środowiskowych.

WPROWADZENIE

Wszystkie żywe komórki otoczone są błonami biologicznymi, oddzielającymi ściśle kontrolowane środowisko wewnętrzne od otoczenia. U *Eucariota* również wewnątrz komórek podzielone jest systemem błon wewnętrznych na przedziały o zróżnicowanym składzie i funkcjach. Prawidłowy metabolizm komórkowy i właściwe funkcjonowanie całego organizmu wymaga selektywnego i kontrolowanego transportu substancji przez wszystkie błony komórkowe. Transport przez błony większości substancji tj. jony, cukry czy aminokwasy, odbywa się za pośrednictwem odpowiednich układów transportujących [1-3]. ATPazy typu P stanowią ważną grupę błonowych białek transportujących. Zaliczane są one do rodziny pierwotnych transporterów, odpowiedzialnych za aktywne przenoszenie substancji przez błony komórkowe, wykorzystujących bezpośrednio energię uwalnianą w trakcie hydrolizy enolowego wiązania fosforanowego ATP [4]. Ze względu na ogrom substancji, jakie mogą transportować, białka te pełnią rozmaite funkcje w żywych komórkach. U zwierząt odpowiadają za tworzenie różnicy potencjałów elektrycznych w tkance nerwowej, powodują zakwaszanie środowiska w żołądku, odpowiedzialne są za wchłanianie składników odżywczych w jelitach, jak i zmniejszenia napięcia mięśni. W komórkach drożdży i roślin białka te uczestnicząc w aktywnym transporcie różnorodnych grup kationów tj. K^+ , Na^+ , H^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} oraz aminofosfolipidów, odpowiadają za utrzymanie gradientu elektrochemicznego i generowanie siły wykorzystywanej przez szeroką klasę transporterów wtórnych (PM H^+ -ATPaza), przekazywanie sygnału wewnątrzkomórkowego (Ca^{2+} -ATPazy), dostarczanie do przedziałów komórkowych jonów metali niezbędnych do syntezy aktywnych biologicznie metaloprotein (Zn^{2+} -ATPaza oraz Cu^{2+} -ATPaza), usuwanie z cytoplazmy toksycznych jonów, a także tworzenie asymetrii błon lipidowych [1].

Liczne w ostatnich latach projekty sekwencjonowania genomów pozwoliły na identyfikację dużej grupy ATPaz typu P u większości żyjących organizmów, ujawniając, iż nadrodzina ta jest o wiele większa niż uważano dotychczas. Wszystkie poznane sekwencje zebrano w internetowej bazie danych ATPaz typu P (ang. *The P-type ATPase database*) i udostępniono pod adresem <http://Patbase.kvl.dk>. Pokazują one obecność pomp zarówno u *Archea* i *Bacteria* jak i u *Eucariota*. O ile w komórkach archebakterii i bakterii występują nieliczne (jedna u *Methanococcus jannaschii* i cztery u *Escherichia coli*) to w genomie drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) znaleziono już 16 genów kodujących te białka, a w komórkach zwierząt ponad 30. Największą liczbę genów kodujących ATPazy typu P zidentyfikowano jednak u roślin. I tak, u rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) znaleziono 46 takich sekwencji, a u ryżu (*Oryza sativa*) 42 [1,2]. Tak duża liczba tych białek w komórkach roślinnych wskazuje na możliwość udziału po-

Anna Wdowikowska

Grażyna Kłobus

Instytut Biologii Roślin, Zakład Fizjologii Roślin Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław

Instytut Biologii Roślin, Zakład Fizjologii Roślin, ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław; tel.: (71) 375 41 11, e-mail: anna.wdowikowska@gmail.com

Artykuł otrzymano 8 stycznia 2010 r.
Artykuł zaakceptowano 7 kwietnia 2010 r.

Słowa kluczowe: transport pierwotny, P- ATPazy, błony komórkowe, cykl katalityczny;

Wykaz skrótów: CaM (ang. *calmodulin*) - kalmodulina; PM (ang. *plasma membrane*) - błona plazmatyczna; PMCA (ang. *plasma membrane Ca^{2+} -ATPase*) - Ca^{2+} -ATPaza z błony plazmatycznej; reduktaza HMG-CoA - reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A; SERCA (ang. *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*) - Ca^{2+} -ATPaza zlokalizowana w siateczce sarkoplazmatycznej i śródplazmatycznej

szczególnych transporterów w różnorodnych procesach fizjologicznych.

Z powyższych przykładów wynika, iż pompy jonowe stanowią olbrzymią i niezastąpioną rodzinę białek u niemalże wszystkich organizmów wyższych. Coraz więcej pojawia się prac nad roślinnymi ATPazami typu P, dlatego też interesującym wydaje się zestawienie dotychczasowej wiedzy na ich temat. Poniższa praca dokonuje przeglądu pomp błonowych ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w organizmach roślinnych, pochodzenia i specyficzności substratowej poszczególnych białek oraz budowy w kontekście występowania specyficznych domen białkowych.

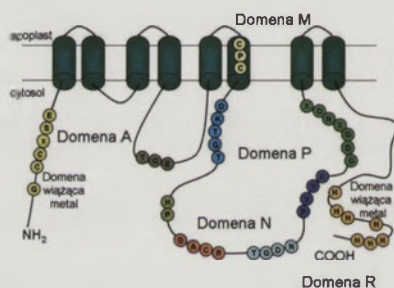
BUDOWA I MECHANIZM DZIAŁANIA ATPaz TYPU P

Trwające już ponad 20 lat badania nad strukturą roślinnych ATPaz typu P, pokazały, że są to białka monomeryczne o masie 70-150 kDa i charakterystycznej topologii, zawierające zachowane w ewolucji regiony (Ryc. 1). Analizy krystalograficzne wielu ATPaz typu P ujawniły, że łańcuch polipeptydowy każdego białka tworzy w obrębie błony 8 do 12 helis stanowiących około 20% masy białka. Hydrofilowe fragmenty łańcuchów, łatwo usuwane podczas tra-

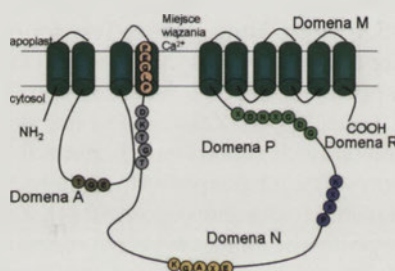
wienia proteolitycznego, eksponowane są do cytoplazmy w formie małej i dużej pętli (Ryc. 1). W ATPazach należących do rodzin II, III, IV i V mała pętla cytoplazmatyczna łączy ze sobą 2 i 3 α -helisę (Ryc. 1B-F), a w białkach z podrodziny IB 4 i 5 α -helisę (Ryc. 1A) [5]. Duża pętla cytoplazmatyczna jest aktywna katalitycznie i znajduje się zazwyczaj pomiędzy helisami 4 i 5 (Ryc. 1B-F), z wyjątkiem podrodziny IB, gdzie zlokalizowana jest między helisami 6 i 7 (Ryc. 1A) [1,5,6]. Do cytoplazmy eksponowane są także końce łańcucha polipeptydowego z wolną grupą aminową (N-) i karboksylową (C-). Wszystkie ATPazy typu P posiadają zachowane w ewolucji domeny wspólne dla wszystkich białek należących do omawianej nadrodziny (są to domeny A, P, N M i R) oraz specyficzne domeny, charakterystyczne tylko dla białek należących do poszczególnych rodzin (Ryc. 1) [7]. Domena A (ang. *Actuator domain*) regulująca aktywność transportującą białek, obejmuje fragment łańcucha polipeptydowego z wolną grupą aminową, dwa (cztery w przypadku ATPaz typu IB) segmenty transbłonowe i małą pętlę cytoplazmatyczną z zachowanym w ewolucji motywem S/TGE (wyjątek stanowią białka należące do ATPaz typu IV) [5,7,8]. Domenę P (ang. *Phosphorylation domain* - domena podlegająca fosforylacji), zlokalizowaną w dużej pętli cytoplazmatycznej, cechuje obecność trzech zachowanych w ewolucji motywów o zdefiniowanych funkcjach. Są to: motyw DKTGT[LIVM] [TIS], z resztą kwasu asparaginowego (D), podlegającego odwracalnej fosforylacji podczas wiązania ATP [4]; motyw PxxK, który może oddziaływać z tlenem pochodzącym od reszty fosforanowej ATP [5] i motyw GDGxNDxP, który prawdopodobnie wiąże jony Mg^{2+} . Pomiędzy dwoma pierwszymi motywami domeny P, w centralnej części dużej pętli, zlokalizowana jest domena N (ang. *Nucleotide-binding domain* - domena wiążąca nukleotyd) z zachowanym w ewolucji motywem KGxxE-/D, odpowiadającym za wiązanie ATP [8]. U ATPaz typu IB domena N jest krótsza, a jej sekwencja jest bardziej zmienna (Ryc. 1A). Kolejna domena M (ang. *Membrane domain*), obejmuje 2 (ATPazy typu IB) lub 6 (pozostałe typy ATPaz) transbłonowych α -helis w pobliżu końca C- łańcucha. Ostatnia domena charakterystyczna dla ATPaz typu P, z wyjątkiem podrodziny IIB, to regulatorowa domena R (ang. *Re-*

gulatorowa domena R (ang. *Regulator domain*), cechuje obecność trzech zachowanych w ewolucji motywów o zdefiniowanych funkcjach. Są to: motyw DKTGT[LIVM] [TIS], z resztą kwasu asparaginowego (D), podlegającego odwracalnej fosforylacji podczas wiązania ATP [4]; motyw PxxK, który może oddziaływać z tlenem pochodzącym od reszty fosforanowej ATP [5] i motyw GDGxNDxP, który prawdopodobnie wiąże jony Mg^{2+} . Pomiędzy dwoma pierwszymi motywami domeny P, w centralnej części dużej pętli, zlokalizowana jest domena N (ang. *Nucleotide-binding domain* - domena wiążąca nukleotyd) z zachowanym w ewolucji motywem KGxxE-/D, odpowiadającym za wiązanie ATP [8]. U ATPaz typu IB domena N jest krótsza, a jej sekwencja jest bardziej zmienna (Ryc. 1A). Kolejna domena M (ang. *Membrane domain*), obejmuje 2 (ATPazy typu IB) lub 6 (pozostałe typy ATPaz) transbłonowych α -helis w pobliżu końca C- łańcucha. Ostatnia domena charakterystyczna dla ATPaz typu P, z wyjątkiem podrodziny IIB, to regulatorowa domena R (ang. *Re-*

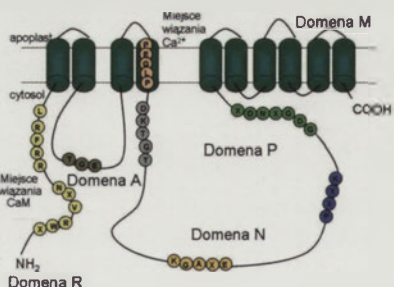
A. Typ IB: HMA2



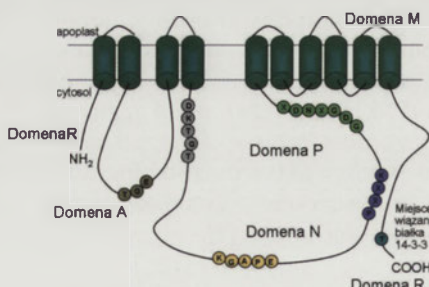
B. Typ IIA: ECA1



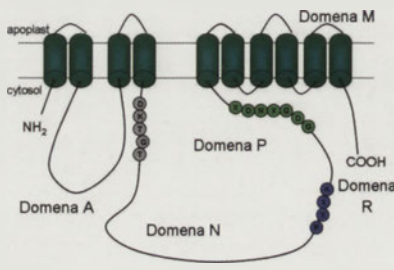
C. Typ IIB: ACA8



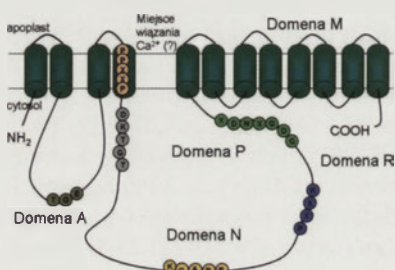
D. Typ IIIA: AHA3



E. Typ IV: ALA1



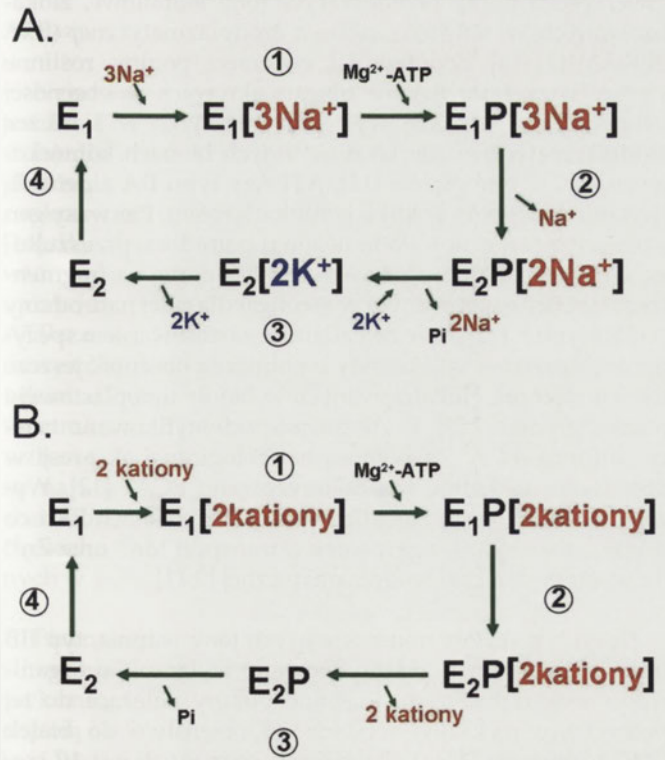
F. Typ V: MIA



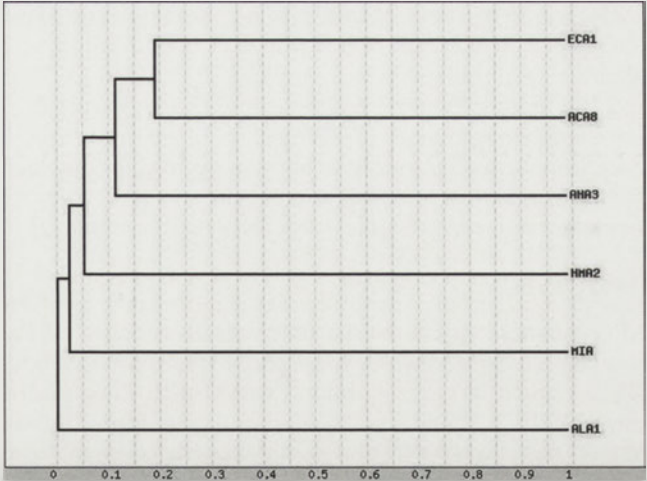
Rycina 1. Modele strukturalne przedstawicieli rodziny ATPaz typu P u *Arabidopsis thaliana* wraz z zaznaczonymi motywami charakterystycznymi dla każdego typu (wyszczególnionymi w obrębie pętli cytosolowych i domen transbłonowych). Wszystkie białka zbudowane są z jednego łańcucha polipeptydowego, składającego się z 8 do 12 segmentów transbłonowych, dużej pętli cytosolowej z sekwencją wiążącą ATP oraz końcami N i C zlokalizowanymi po stronie cytoplazmatycznej. Na rycinie zaznaczono także domeny N, P, M, A i R charakterystyczne dla wszystkich typów. A - typ IB HMA2 (na podstawie [8], zmienione); B - typ IIA ECA1; C - typ IIB ACA8, na podstawie [11], zmienione); D - typ IIIA AHA3; E - typ IV ALA1; F - typ V MIA.

gulatory domain) obejmującą hydrofilowy fragment łańcucha z wolną grupą karboksylową [7].

Mechanizm działania roślinnych pomp jonowych szczegółowo poznano już wiele lat temu. Opisuje go tzw. cykl katalityczny Post-Albers, który pierwotnie opisywał działanie pompy Na^+/K^+ -ATPazy u zwierząt (Ryc. 2A) [4]. Mechanizm ten określany nazwą „Ping-Pong”, polega na sukcesywnym transporcie jednego (roślinne ATPazy typu P, Ryc. 2B) lub dwóch jonów (np. Na^+/K^+ -ATPazy komórek zwierzęcych, Ryc. 2A) w poprzek błony, sprzężonej z hydrolizą ATP i zmianami konformacyjnymi białka transportującego. Czterostopniowy cykl katalityczny ATPaz typu P w uproszczeniu można zapisać wg schematu przedstawionego na rycinie 2. W pierwszej fazie cyklu następuje związanie specyficznego jonu (liganda), co umożliwia jednocześnie przyłączenie do białka enzymatycznego Mg^{2+} -ATP i fosforylację enzymu (faza 1, Ryc. 2) [9]. Liczba związanych kationów w tej fazie reakcji jest różna dla różnych typów ATPaz. I tak, w przypadku roślinnych ATPaz typu IIA i B oraz ATPaz typu IIIA, E_1P wiąże dwa kationy (Ryc. 2B), podczas gdy ufosforylowana pierwsza forma Na^+/K^+ -ATPazy przyłącza trzy jony sodu (Ryc. 2A). W tej fazie cyklu katalitycznego utworzony fosfoenzym o wysokiej energii własnej, w obecności ADP może odtwarzać cząsteczkę ATP. W drugiej fazie reakcji, w wyniku zmian konformacyjnych fosfoenzymu następuje przesunięcie związanego kationu z jednej strony błony na drugą (faza 2, Ryc. 2A i B). W przypadku ATPaz typu P katalizujących przeciwny transport dwóch jonów zmiany konformacyjne redukują liczbę miejsc wiążących kationy do dwóch (Ryc. 2A). Zmiana konformacji E_1P w E_2P



Rycina 2. Cykl katalityczny Post-Albers dla ATPaz typu P. Schemat przedstawia główne fazy cyklu katalitycznego (1-4) powiązanego z transportem dwóch jonów na przykładzie pompy Na^+/K^+ -ATPazy występującej u zwierząt (A) oraz jednego jonu (kationu) w przypadku roślinnych ATPaz typu P (B). Szczegółowy opis schematu jest zamieszczony w tekście.



Rycina 3. Drzewo filogenetyczne przedstawicieli rodziny ATPaz typu P u *Arabidopsis thaliana*, utworzone w oparciu o podobieństwo sekwencji reszt aminokwasowych (pochodzących ze strony GenBank database, www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/). Sekwencje porównano w programie ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), natomiast drzewo filogenetyczne wygenerowano za pomocą programu TreeTop Phylogenetic Tree Prediction (www.genebee.msu.su/services/phree_reduced.html). Długość poszczególnych odgałęzień drzewa obrazuje skala zamieszczona pod ryciną.

wiąże się ze zmianą powinowactwa do transportowanego kationu z wysokiej na niską, uwolnieniem kationu i jednocześnie defosforylacją białka enzymatycznego (faza 3, Ryc. 2A i B). W ostatnim etapie reakcji następuje spontaniczne przejście formy E_2 w formę E_1 (faza 4, Ryc. 2A i B) [4,10]. Forma E_2 wszystkich ATPaz typu P zamiast reszty fosforanowej może przyłączać ortowanadan, co uniemożliwia przejście enzymu w formę E_1 i w konsekwencji hamuje aktywność enzymu [4].

KLASYFIKACJA ATPaz TYPU P

Skrót „P” w nazwie ATPaz typu P nawiązuje do wytwarzania w trakcie katalizy enzymatycznej ufosforylowanej formy przejściowej białka (ang. *phosphorylated intermediate*) w jego centrum aktywnym. Pierwszą ATPazę typu P odkrył w 1957 roku Jens Skou, który badając wpływ kationów na tkankę nerwową u krabów, dowiódł, że potencjał błonowy w tych komórkach generowany jest przez ATPazę w obecności jonów K^+ . Dziś wiadomo, że enzym ten znany jako Na^+/K^+ -ATPaza odpowiada za transport jonów K^+ i Na^+ w poprzek błony aksonów wszystkich organizmów zwierzęcych [3]. W następnych latach zidentyfikowano kolejne pompy jonowe u różnych organizmów i w różnych tkankach: Ca^{2+} -ATPazę w siateczce sarkoplazmatycznej mięśni, H^+/K^+ -ATPazę zakwaszającą środowisko wewnętrzne w żołądku zwierząt, czy H^+ -ATPazę generującą potencjał błonowy u grzybów i roślin [4].

W literaturze przedmiotu można znaleźć wiele kryteriów podziału ATPaz typu P uwzględniających specyficzności wobec substratu, pochodzenie czy liczbę domen transbłonowych. Najczęstszym kryterium podziału tej grupy enzymów jest jednak podobieństwo sekwencji białkowych. Opierając się o analizy porównawcze sekwencji reszt aminokwasowych, ATPazy typu P podzielono na pięć rodzin (Ryc. 3), a w każdej wyodrębniono dwie lub trzy podrodziny [4]. Poszczególne podrodziny wykazują specyficzność wobec tej

samej grupy jonów [2,4]. Zaobserwowano, że ATPazy typu P należące do tej samej podrodziny są homologiczne nawet u odległych ewolucyjnie organizmów. Przykładem jest podrodzina pomp transportująca jony metali ciężkich (ATPaza typu IB), która u bakterii, roślin i człowieka wykazuje duże podobieństwo sekwencji [8]. Wnioskować zatem można, iż specyficzność wobec jonów w obrębie podrodzin powstała bardzo wcześnie w procesie ewolucyjnym - jeszcze przed podziałem organizmów na *Archea*, *Bacteria* i *Eucariota* [2].

ATPazy TYPU I

Przypuszcza się, że białka należące do rodziny ATPazy typu I są najstarszą ewolucyjnie grupą spośród wszystkich ATPaz typu P. Wyszczególniono wśród nich dwie podrodziny: IA i IB. ATPazy typu IA występują nielicznie i tylko u bakterii, najczęściej w formie kompleksu białkowego. Przykładem jest Kdp, K⁺-ATPaza u *E. coli*, w skład której wchodzi cztery białka błonowe: KdpF, KdpA, KdpB, KdpC. Podjednostka KdpB zawiera domenę katalityczną oraz miejsce wiązania jonu. Ponadto jest to najmniejsza ATPaza typu P, z sześcioma domenami transbłonowymi i masie 72 kDa [4]. ATPazy typu IB występują zarówno u prokariota, jak i eukariota, uwzględniając grzyby, owady, rośliny i zwierzęta. Odpowiadają za transport jonów metali ciężkich przez błony i utrzymanie ich homeostazy w komórce [5]. Pierwsze badania dotyczące tej grupy białek, przeprowadzono na bakteriach *Enterococcus hirae*. Udowodniono, że ATPazy typu IB u bakterii uczestniczą nie tylko w transporcie jonów metali do komórki w warunkach deficytu tych jonów w środowisku (np. białko CopA transportujące Cu(I)), ale także podczas usuwania ich nadmiaru z cytoplazmy (np. CopB) [5]. Ze względu na szczególne narażenie roślin na działanie metali ciężkich obecnych w glebach, wydaje się oczywiste, że roślinne błony komórkowe obfitują w pompy transportujące jony metali. Zidentyfikowano osiem ATPaz typu IB u rzodkiewnika (tzw. HMA1-8, ang. *Heavy Metal Associated*), dziewięć u ryżu i dziesięć u jęczmienia. Podzielono je na białka transportujące jony jednowartościowe Cu/Ag oraz transportujące jony dwuwartościowe Zn/Cd/Pb/Co. Te ostatnie występują, co ciekawe, tylko u prokariota i fotosyntetyzujących eukariota [5,8]. Badania z udziałem transgenicznym roślin *Arabidopsis* z mutacjami w obrębie genów kodujących ATPazy typu IB oraz heterologiczna ekspresja genów roślinnych pomp transportujących jony metali w komórkach drożdży lub w komórkach *E. coli*, pozwoliły określić ich funkcje. Jak wykazano, z jednej strony, transportery te dostarczają jony metali niezbędnych do syntezy specyficznych metaloprotein do wszystkich przedziałów komórki roślinnej (np. HMA6 i 8), z drugiej uczestniczą w usuwaniu nadmiernej ich ilości z cytoplazmy do wakuoli lub apoplastu (np. HMA3 i 4) [5]. Pod względem budowy, występowania w tkankach i specyficzności wobec jonów, transportery te nie są grupą jednorodną [8]. Nie tworzą kompleksów białkowych, posiadają osiem domen transbłonowych i zazwyczaj długie końce N- i C- (Ryc. 1A). Region znajdujący się pomiędzy motywami DKTGT i GDGxND oraz domena N są zdecydowanie krótsze u tych ATPaz, niż u pozostałych grup. Nie posiadają także zachowanego w ewolucji motywu KGxxE/D występującego w większości ATPaz typu P [8]. Obecne są tu natomiast specyficzne rejony białkowe tj. CPx i locus HP. Region CPx (cysteina-

prolina-histydyna/cysteina/seryna) znajduje się w szóstej domenie transbłonowej, a mutacje w obrębie tej sekwencji eliminują aktywność transportową AtHMA4 u *Arabidopsis*. Locus HP, z resztą glutaminową i histydynową stanowi najprawdopodobniej miejsce wiązania ATP [8]. Ponadto na końcach łańcucha z wolną grupą karboksylową i aminową znajdują się zachowane w ewolucji domeny odpowiedzialne za wiązanie jonów metali do transportera, bogate w reszty histydyny i cysteiny (Ryc. 1A) [1].

ATPazy TYPU II

Dla roślin i zwierząt istotnym przedstawicielem tej grupy jest ATPaza transportująca jony wapnia. Ca²⁺-ATPaza odgrywa ważną rolę w przekazywaniu sygnałów, ponieważ reguluje stężenie jonów wapnia zarówno w cytoplazmie jak i poszczególnych przedziałach wewnątrzkomórkowych. Prawdopodobnie zaangażowana jest też w adaptacje roślin do stresów biotycznych i abiotycznych [11]. Jony Ca²⁺, poza funkcją wewnątrzkomórkową, wtórnego przekaźnika sygnału, pełnią także ważną rolę w procesie sortowania i pakowania białek, stabilizacji ich struktury oraz aktywacji [11].

Na podstawie wrażliwości na kalmodulinę, roślinne Ca²⁺-ATPazy podzielono na dwie podrodziny: IIA (ECA, ang. *ER-type Ca²⁺-ATPase*) oraz IIB (ACA, ang. *Autoinhibited Ca²⁺-ATPase*) [12]. Białka typu IIA (Ryc. 1B) występują u archeobakterii, bakterii i w komórkach rozmaitych organizmów eukariotycznych [12]. U roślin białka te wykazują wysokie podobieństwo struktury pierwszorzędowej (około 50% homologii) do najlepiej scharakteryzowanej grupy zwierzęcych pomp przenoszących jony wapniowe, zlokalizowanych w siateczce sarko- i śródplazmatycznej (tzw. SERCA) [11-13]. Podobnie jak zwierzęce pompy, roślinne Ca²⁺-ATPazy typu IIA nie ulegają aktywacji w obecności kalmoduliny, jednakże występują nie tylko w siateczce śródplazmatycznej, ale także w innych błonach komórkowych, np. w tonoplaście [11]. ATPazy typu IIA zidentyfikowano do tej pory w kilku gatunkach roślin. Pierwszy gen należący do tej grupy sklonowano u pomidora, przeszukując bibliotekę cDNA z użyciem sondy opartej na fragmencie sekwencji zachowanym w ewolucji dla całej nadrodziny ATPaz typu P [12]. Kolejne badania z zastosowaniem specyficznych przeciwciał ujawniły u pomidora obecność jeszcze dwóch izoform, zlokalizowanych w błonie tonoplastowej i plazmolemowej [12]. U *Arabidopsis* zidentyfikowano cztery izoformy ECA. Za pomocą heterologicznej ekspresji w drożdżach dokładnie scharakteryzowano ECA1 [12]. Wykazano, że białko to zlokalizowane jest w błonach ER i co więcej, może być zaangażowane w transport Mn²⁺ oraz Zn²⁺ do wnętrza siateczki śródplazmatycznej [2,11].

Drugi typ ATPaz transportujących jony wapnia, typ IIB (Ryc. 1C), jak dotąd zidentyfikowano wyłącznie u organizmów eukariotycznych. Roślinne pompy należące do tej podrodziny wykazują wysokie podobieństwo do białek PMCA zwierząt [11]. U *Arabidopsis* poznanych jest 10 izoform (ACA), a u ryżu 11 [2,12]. W odróżnieniu od zwierzęcych ATPaz typu IIB zlokalizowanych jedynie w błonach plazmatycznych, roślinne ACA występują w błonach chloroplastów (np. ACA1), siateczki śródplazmatycznej

(np. ACA2), tonoplastu (np. ACA4) oraz plazmolemy (np. ACA8) [1,2]. Wyróżniającą cechą tych pomp jest obecność terminalnej domeny autoinhibitorowej, zlokalizowanej na końcu łańcucha z wolną grupą aminową, zawierającą miejsce wiązania kalmoduliny (CaM) [2]. Charakterystyka biochemiczna białek podrodziny IIB pokazała, iż pompy zlokalizowane w plazmolemie cechuje nieznacznie większe powinowactwo do kalmoduliny niż pompy tego typu obecne w błonach wewnętrznych. Wykazują one także niższą specyficzność wobec nukleotydu, dlatego oprócz ATP mogą hydrolizować także GTP i ITP [11]. Interesujący jest także fakt, iż w błonach siateczki śródplazmatycznej komórek korzeni *Arabidopsis* występują jednocześnie pompy transportujące jony wapnia należące do podrodziny IIA (ECA1) jak i IIB (ACA2) [11]. Istnieją trzy hipotezy wyjaśniające to nieczęste zjawisko. Pierwsza zakłada, iż oba typy białek mają inne domeny funkcjonalne, druga zakłada różnice w regulacji czynnikami zewnętrznymi, zaś trzecia przypisuje dodatkową specyficzną aktywność każdej z pomp, tj. transport Mn^{2+} przez ECA1 [11]. Ponadto zaskakującego odkrycia dokonano u kukurydzy. W błonach wewnętrznych komórek kukurydzy wykazano obecność Ca^{2+} -ATPazy, CAP1, łączącej cechy białek typu IIA i białek typu IIB. Białko CAP1 jest homologiem ECA, ale posiada dłuższy C- koniec z miejscem wiązania kalmoduliny [11].

Wśród ATPaz typu II wyróżnia się jeszcze dwie grupy białek: IIC i IID. Do pierwszej należą Na^{+}/K^{+} -ATPaza i H^{+}/K^{+} -ATPaza, a do drugiej Na^{+} -ATPaza. Wszystkie ATPazy należące do podrodzin IIC i IID występują jedynie w komórkach zwierząt i grzybów [1,4].

ATPazy TYPU III

Najważniejszym przedstawicielem białek typu trzeciego jest H^{+} -ATPaza z błony plazmatycznej należąca do podrodziny IIIA (Ryc. 1D). Występuje ona u roślin, grzybów i glonów, a także u archebakterii i odpowiada za jednokierunkowy transport protonów z cytoplazmy do apoplastu [14]. Powstały gradient protonów jest wykorzystywany dla wtórnego transportu wielu cząstek tj. cukry, aminokwasy i jony [4]. U zwierząt funkcję tę spełnia po części Na^{+}/K^{+} -ATPaza należąca do podrodziny IIC [7]. Pompom protonowym, oprócz wspomnianej funkcji, przypisuje się także udział w wielu procesach fizjologicznych tj. regulacja wewnątrzkomórkowego pH oraz potencjału osmotycznego, wzrost ściany komórkowej, czy udział w odpowiedzi rośliny na warunki środowiskowe (zasolenie, uszkodzenia mechaniczne, niska/wysoka temperatura, akumulacja metali ciężkich, atak patogenów, niedobór składników mineralnych w podłożu) [15,16].

Plazmolemowa H^{+} -ATPaza to pierwsze sklonowane roślinne białko błonowe, o masie cząsteczkowej ok. 100 kDa, wykazujące silną asymetrię. Charakteryzuje się pokazną częścią hydrofilową po stronie cytoplazmatycznej, obejmującą końce N i C oraz dwie długie pętle cytoplazmatyczne (Ryc. 1D) [4,7]. Fragment łańcucha z wolną grupą karboksylową stanowi domenę autoinhibitorową. Aktywacja enzymu wymaga fosforylacji reszty treoninowej w pozycji 947 [17], znajdującej się na końcu C i przyłączenia białka 14-3-3

[7]. Ostatnie badania dowiodły, iż także koniec N jest bezpośrednio zaangażowany w regulację aktywności enzymu. Heterologiczna ekspresja genu kodującego roślinną H^{+} -ATPazę w komórkach drożdży pokazała, iż aktywacja enzymu następuje w wyniku destabilizacji lub całkowitego usunięcia końca N białka. Modyfikacje te powodowały wzrost stopnia fosforylacji reszty treoniny na końcu C jak również przyłączanie się białka 14-3-3. H^{+} -ATPaza z błony plazmatycznej należy do pierwszej grupy ATPaz typu P, u której obydwa końce łańcucha polipeptydowego pełnią funkcję regulatorową [17]. W ostatnich latach zidentyfikowano pokązną grupę genów kodujących H^{+} -ATPazy, tworzące rodzinę multigenową. W genomie *Arabidopsis* znaleziono 12 takich genów, u tytoniu 9, a w komórkach ryżu 10 (<http://www.ncbi.nih.gov>). Tak duża liczba genów H^{+} -ATPazy u roślin sugeruje możliwość wielopłaszczyznowej regulacji aktywności pompy protonowej i udziału poszczególnych izoform w różnorodnych procesach fizjologicznych [6,18]. Na podstawie podobieństwa sekwencji nukleotydowych i białkowych H^{+} -ATPazy podzielono na 5 klas [18]. Pierwsze dwie grupują białka, których geny ulegają ekspresji w wielu organach roślin uprawianych w różnych warunkach środowiskowych. Należą tu m.in. geny *AHA1* i *AHA2* rzodkiewnika, kodujące białka regulujące podstawowy metabolizm komórki (ang. *housekeeping enzymes*) [19]. Pozostałe trzy klasy obejmują białka tkankowo specyficzne lub wymagające do syntezy odpowiedniego bodźca środowiskowego [6]. Przykładem są białka kodowane przez geny *AHA3*, *AHA9* i *AHA10*, których ekspresja ma miejsce odpowiednio tylko w komórkach przewodzących, w ziarnach pyłku, bądź w nasionach [2]. Należy wspomnieć, że oprócz ATPaz typu IIIA, występują także ATPazy typu IIIB, obecne jedynie u bakterii. Prawdopodobnie odpowiadają one za transport jonów Mg^{2+} przez błony [4].

ATPazy TYPU IV

Opisane powyżej białka należące do rodzin ATPaz typu I - III odpowiadają głównie za transport jonów. ATPazy typu IV zdolne są do przenoszenia o wiele większych cząstek o charakterze hydrofobowym [10]. Jest to stosunkowo niedawno odkryta grupa białek, występująca jedynie u organizmów eukariotycznych, co wskazuje na późniejsze wyodrębnienie tej grupy w procesie ewolucji, już po rozdzieleniu się bakterii i archeobakterii [20]. Błony komórek eukariotycznych cechuje różny skład lipidowy warstwy wewnętrznej i zewnętrznej. Ta asymetria powoduje, iż każda z warstw błony ma odmienne własności biofizyczne związane z ich indywidualnymi funkcjami. Ciasno upakowane sfingolipidy i sterole w zewnętrznej warstwie błony stabilizują ją i są szczególną barierą oddzielającą wnętrze komórki od środowiska zewnętrznego. Natomiast duża ilość aminofosfolipidów po wewnętrznej stronie błony oraz na powierzchni endo- i egzozomów utrzymuje zdolność tych błon do fuzji [10]. Próby poznania mechanizmu tworzenia się asymetrii lipidowej błon komórkowych skierowały uwagę badaczy na grupę białek transporterowych, przenoszących lipidy z jednej do drugiej warstwy błony, zwanych flipazami (ang. *flippases*). Uważa się, że białka należące do ATPaz typ IV mogą odgrywać ważną rolę w generowaniu takiej asymetrii błon poprzez przenoszenie specyficznych lipidów w jej obrębie [10]. Prawdopodobnie aktywność

transportowa tych białek odpowiada także za miejscowe zmiany krzywizny błony, poprzedzające powstawanie pęcherzyków błonowych [20]. Podjęto próby wyjaśnienia, w jaki sposób białka te nabyły zdolność transportu lipidów w czasie ewolucji. Istnieją dwie koncepcje wyjaśniające ten problem. Pierwsza zakłada, iż transportery te ewoluowały z Ca^{2+} -ATPaz, które oprócz miejsca wiążącego kation, posiadają na terenie 10 segmentu transmembranowego pierwotne miejsce wiążące fosfolipidy, ale tylko wtedy, gdy białko przybiera konformację E_2 [10]. Zwolennicy drugiej koncepcji uważają, iż obecność miejsca wiązania fosfolipidów nie jest wystarczające, by przeprowadzić translokację lipidów i dlatego zakładają, że powstanie tych ATPaz było bardziej skomplikowane i wymagało fuzji z dodatkowym białkiem [10].

Jak dotąd, niewiele jest doniesień dotyczących funkcji ATPaz typu IV w organizmach eukariotycznych. Wiadomo, że u człowieka zaburzenie funkcji tego białka objawia się poważnymi schorzeniami związanymi z ograniczonym transportem cząsteczek hydrofobowych przez błony komórkowe [20]. U drożdży opisano pięć białek należących do tej rodziny: Neo1p, obecnych w błonach endosomów, Drs2p i Dnf3p występujących w błonach aparatu Golgiego oraz dwa białka zlokalizowane w plazmolemie: Dnf1p i Dnf2p [20,21]. U pasożyta *Leishmania donovani* skorelowano działanie ATPaz typu IV z pobieraniem militefozyny, pochodnej fosfocholiny, wykorzystywanej w leczeniu leishmaniozy. U roślin scharakteryzowano je jedynie u *Arabidopsis*, wykazując obecność 12 białek nazwanych ALA (ang. *Aminophospholipid ATPase*) [20]. Do tej pory określono funkcje tylko dwóch spośród tych białek: ALA1 (Ryc. 1E) i ALA3. Heterologiczna ekspresja genów kodujących ALA1 w drożdżach wykazała zdolność do transportu fluorescencyjnego analogu fosfolipidów. Uważa się, że ALA1 podobnie jak drożdżowe Drs2, odpowiada za fliping aminofosfolipidów [22]. Wykazano także udział ALA1 w kształtowaniu odporności rośliny na chłód, gdyż jak udowodniono, mutacje w genie zwiększały wrażliwość roślin na niską temperaturę. Natomiast białko ALA3 bierze udział w tworzeniu pęcherzyków sekrecyjnych z błon Golgiego. Prawidłowe funkcjonowanie ALA3 wymaga obecności białka ALIS1, przedstawiciela rodziny białek błonowych (ang. *ALA-interacting Subunit*). Sugeruje się, że białko ALIS1 jest podjednostką ATPazy ALA3, a kompleks ALA3-ALIS1 prawdopodobnie stanowi ważny element aparatu Golgiego, warunkujący prawidłowe procesy sekrecji w trakcie rozwoju rośliny [20].

ATPazy TYPU V

ATPazy typu V stanowią najsłabiej poznaną rodzinę ATPaz typu P i podobnie jak ATPazy typu IV reprezentują najmłodszą ewolucyjnie grupę, obecną jedynie w komórkach eukariotycznych [23]. Nieliczne doniesienia sugerują, iż zlokalizowane są one w błonach ER, gdzie zaangażowane są w usuwanie bądź procesy naprawcze nieprawidłowo sfałdowanych białek [23]. Pomimo, że nieznana jest ich specyficzność substratowa, przypisuje się im kilka ważnych funkcji takich jak: glikozylacja i udział w biosyntezie ściany komórkowej, transport białek specyficznych dla aparatu Golgiego, kontrola orientacji białek w błonie, czy regulacja procesu degradacji reduktazy HMG-CoA (reduktaza 3-hy-

droksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A) [1,23]. Dodatkowo wykazano, iż mutacja w genie *MIA* kodującym ATPazy typu V u *Arabidopsis*, spowodowała wyraźne zmiany w ekspresji genów zaangażowanych w sekrecję białek [23]. Białka te posiadają specyficzny motyw PPxxP (Ryc. 1F), który odpowiada sekwencji PEGLP znajdującej się w czwartym segmencie transbłonowym typu II- Ca^{2+} -ATPaz (Ryc. 1B i C), uczestniczącym w wiązaniu jonów Ca^{2+} [23]. Badania na drożdżach z delecją *spf1*, jednego z dwóch genów kodujących ATPazę typu V sugerują, iż produkt tego genu może być właśnie Ca^{2+} -ATPazą, odgrywającą rolę w utrzymaniu homeostazy Ca^{2+} w komórce [1]. Na podstawie analiz bioinformatycznych opartych na porównaniu reszt aminokwasowych, wyróżniono dwie podrodziny omawianych ATPaz: VA (1 białko) oraz VB (0-4 białek, zależnie od gatunku). Obydwie podrodziny różnią się najprawdopodobniej specyficznością substratową, co sugerują różnice w budowie motywu wiążącego jony. U podrodziny ATPaz VA jest to sekwencja PP(D/E)LPxE, a u VB sekwencja PP(A/V)PAX. Ponadto białka VB zlokalizowano u wszystkich analizowanych eukariotów, z wyjątkiem Królestwa Excavata, do którego należy m.in. *Giardia lamblia*, Królestwa Amebozoa oraz *Arabidopsis* i *Oryza*. Zdecydowanie największa liczba ATPaz typu VB występuje u zwierząt: znaleziono trzy białka u nicienia *Caenorhabditis elegans* oraz cztery u myszy domowej i człowieka [23].

PODSUMOWANIE

ATPazy typu P stanowią dużą grupę białek błonowych odpowiadających za pierwotny transport rozmaitych związków przez błony biologiczne. Poznanie sekwencji genomów coraz większej liczby organizmów, jak również analizy funkcjonalne w drożdżach, charakterystyka mutantów *Arabidopsis* oraz analizy porównawcze sekwencji aminokwasowych ATPaz typu P przyczyniły się do określenia struktury i funkcji wielu z nich. Niemniej jednak wiele kwestii pozostaje wciąż do wyjaśnienia, m.in. pochodzenie ewolucyjne, mechanizmy regulacji, a także specyficzność substratowa tych białek. Powyższe przykłady badań u roślin niewątpliwie pokazują niezastąpioną rolę tych transporterów w prawidłowym funkcjonowaniu roślin na każdym etapie rozwoju, a także w różnych warunkach środowiskowych. Wciąż nierozstrzygnięta pozostaje kwestia mnogości izoform u roślin. Być może jest to spowodowane zjawiskiem poliploidalności albo duplikacji genów, która zaszła w czasie ewolucji. Rośliny, prowadząc osiadły tryb życia, narażone są na częste zmiany warunków środowiskowych. Być może duża liczba ATPaz typu P, tak ważnych w procesach adaptacyjnych, umożliwia roślinom szybką reakcję fizjologiczną na te zmiany. Hipotezę tę potwierdzać może różnorodność substratowa w obrębie rodzin ATPaz, ekspresja poszczególnych izoform w różnych organach i komórkach oraz ich obecność w różnych błonach biologicznych. Rozwijające się w ostatnim czasie badania z wykorzystaniem genów reporterowych oraz analizy z zastosowaniem mikromacierzy umożliwiające kompleksowe przebadanie dużej grupy transporterów ATPaz typu P u wielu roślin i w różnych warunkach środowiskowych, być może pozwolą odpowiedzieć na te pytania [1].

PIŚMIENICTWO

1. Axelsen KB, Palmgren MG (2001) Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiol* 126: 696-706
2. Baxter I, Tchieu J, Sussman MR, Boutry M, Palmgren MG, Gribskov M, Harper JF, Axelsen (2003) Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and Rice. *Plant Physiol* 132: 618-628
3. Apell HJ (2003) Structure function relationship in P-type ATPases - a biophysical approach. *Physiol Biochem Pharmacol* 150: 1-35
4. Kuhlbrandt W (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Mol Cell Bio* 5: 282-295
5. Migocka M (2006) Rola pierwotnych pomp metalowych (P_{18} -ATPaz) w utrzymaniu homeostazy metali ciężkich w komórkach roślinnych. *Post Biol Komórki* 33: 657- 666
6. Młodzińska E, Kłobus G (2006) Pompy protonowe plazmolemy i ich regulacja w komórkach roślinnych. *Post Biol Komórki* 33: 197-211
7. Duby G, Boutry M (2009) The plant plasma membrane proton pump ATPase a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Eur J Physiol* 457: 645-655
8. Williams LE, Mills RF (2005) P1B-ATPases- an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci* 10: 491-502
9. Weidemuller C, Hauser K (2009) Ion transport and energy transduction of P-type ATPases: implications from electrostatic calculations. *Biochim Biophys Acta* 1787: 721-729
10. Lenoir G, Williamson P, Holthuis JCM (2007) On the origin of lipid asymmetry: the flip side of ion transport. *Curr Opin Chem Biol* 11: 1-8
11. Kabała K, Kłobus G (2005) Plant Ca^{2+} -ATPases. *Acta Physiol Plant* 27: 559-574
12. Geiser M, Axelsen KB, Harper JF, Palmgren MG (2000) Molecular aspects of higher plant P-type Ca^{2+} -ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1465: 52-78
13. Toyoshima C (2008) Structural aspects of ion pumping by Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 276: 3-11
14. Portillo F (2000) Regulation of plasma membrane H^+ -ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* 1469: 31-42
15. Kłobus G, Janicka-Russak M (2004) Modulation by cytosolic components of proton pump activities in plasma membrane and tonoplast from *Cucumis sativus* roots during salt stress. *Physiol Plant* 121: 84-92
16. Santi S, Cesco S, Varanini Z, Pinton R (2005) Two plasma membrane H^+ -ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants. *Plant Physiol Biochem* 43:287-292
17. Ekberg K, Palmgren MG, Veierskov B, Buch-Pedersen MJ (2010) A novel mechanism of P-type ATPase autoinhibition involving both termini of the protein. *J Biol Chem* 289: 7344-7350
18. Arango M, Gevaudant F, Oufattole M, Boutry M (2003) The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. *Planta* 216: 355-365
19. Gaxiola R, Palmgren MG, Schumacher K (2007) Plant proton pumps. *FEBS Lett* 581: 2204-2214
20. Paulsen LR, Lopez-Marques RL, McDowell SC, Okkeri J, Licht D, Schulz A, Pomorski T, Harper JF, Palmgren MG (2008) The Arabidopsis P4-ATPase ALA3 localizes to the Golgi and requires a β -subunit to function in lipid translocation and secretory vesicle formation. *Plant Cell* 20: 658-676
21. Pomorski T, Lombardi R, Riezman H, Devaux PF, Meer G, Holthuis JCM (2003) DRS2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. *Mol Biol Cell* 14: 1240-1254
22. Gomes E, Jakobsen MK, Axelsen KB, Geisler M, Palmgren MG (2000) Chilling tolerance in Arabidopsis involves ALA1, a member of a new family of putative aminophospholipid translocases. *Plant Cell* 12: 2441-2453
23. Moller AB, Asp T, Holm PB, Palmgren MG (2008) Phylogenetic analysis of P5 P type ATPases, a eucaryotic lineage of secretory pathway pumps. *Mol Phylogenet Evol* 46: 619-634

Plant P- type ATPases

Anna Wdowikowska[✉], Grażyna Kłobus

Institute of Plant Biology, Department of Plant Physiology, University of Wrocław, 6/8 Kanonia St., 50-328 Wrocław, Poland

[✉]e-mail: anna.wdowikowska@gmail.com

Key words: primary transport, P-type ATPases, plasma membrane, catalytic cycle

ABSTRACT

P-type ATPases are a superfamily of membrane proteins involved in many physiological processes that are fundamental for all living organisms. Using ATP, they can transport a variety of ions and other substances across all types of cell membranes against a concentration electrochemical gradient. P-type ATPases form a phosphorylated intermediate and are sensitive to vanadate. Based on evolutionary relations and sequence homology, P-type ATPases are divided into five major families. All P-type ATPases share a simple structure and mechanism, but also possess domains characteristic for each family, which are crucial for substrate specificity. These proteins usually have a single subunit with eight to twelve transmembrane segments, a large central cytoplasmic domain with the conservative ATP binding site along with N and C termini exposed to the cytoplasm. Because of variety of proteins that belong to P-type ATPase superfamily, in this review the comparison of functional and structure properties of plant cells P-type ATPases is presented, as well as their important role in adaptation to environmental stress.

Magdalena Wujak

Michał Komoszyński✉

Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Biochemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń

✉Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Biochemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń; tel.: (56) 611 45 20, e-mail: michkom@chem.uni.torun.pl

Artykuł otrzymano 6 maja 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 19 lipca 2010 r.

Słowa kluczowe: roślinne NTPDazy, apirazy, funkcja, ektonukleotydy, geny NTPDaz roślinnych, kasety ABC

Wykaz skrótów: adn (ang. *adenine*) – adenina; ado (ang. *adenosine*) – adenozyne; apy (ang. *apyrase*) – apiraza; ATP (ang. *adenosine triphosphate*) – trifosforan adenozyne; NPA (ang. *1-naphthylphthalamic acid*) – kwas N-(1-naftylo)ftalamowy; NTPDaza (ang. *nucleoside triphosphate diphosphohydrolase*) – tri-difosfohydrolaza nukleotydów; 5'-NUC (ang. *5'-nucleosidase*) – 5'-nukleotydaza; Pi – ortofosforan; PPADS (ang. *pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate*) – kwas 2',4'-disulfonopirydoksylofosforano-6-azofenylowy; RB2 (ang. *reactive blue 2*) – reaktywny błękit; XDP – difosforan nukleozydu

STRESZCZENIE

W niniejszym artykule przeglądowym przedstawiono informacje o rezultatach najnowszych badań dotyczących funkcji NTPDaz (apiraz) roślinnych. Omawiane enzymy to białka rozpuszczalne lub integralne białka błonowe. Ich obecność stwierdzono w różnych przedziałach komórkowych. Apirazy hydrolizują wiązania pirofosforanowe di- i trifosforanów nukleotydów. Ich wspólną cechą jest podobna budowa, niska specyficzność substratowa i aktywacja w obecności jonów dwuwartościowych. W apoplazmie apirazy uczestniczą w zwrotnym wychwytywaniu produktów degradacji nukleotydów. Enzymy te katalizują bowiem reakcję hydrolizy ATP do AMP; AMP jest następnie degradowany przez inne ektonenzymy do adeniny, rybozy i ortofosforanu. Częsteczki te z udziałem odpowiednich transporterów i kanałów są transportowane do komórki. Rezultaty niektórych badań wskazują, że apirazy mogą również uczestniczyć w regulacji syntezy skrobi i przekazywaniu sygnałów. Ich aktywność jest także niezbędna do prawidłowego rozwoju i wzrostu bulw oraz korzeni. U roślin strączkowych z kolei aktywują proces symbiozy z bakteriami korzeniowymi. NTPDazy, które znajdują się wewnątrz komórek, katalizując reakcję hydrolizy nukleotydów, zmieniają wewnątrzkomórkowy stosunek ATP:ADP:AMP. Sugeruje to, że większość z opisanych funkcji apiraz może wynikać ze stanu energetycznego komórki.

WPROWADZENIE

ATP to najbardziej uniwersalna cząsteczka nie tylko wśród nukleotydów, ale również i innych związków obecnych w komórkach organizmów żywych. ATP jest substratem wykorzystywanym w syntezie kwasów nukleinowych i wielu koenzymów oraz wtórnych cząsteczek sygnałowych. Jest uniwersalnym środkiem wymiany energii swobodnej i składnikiem ładunku energetycznego komórki. Stężenie tego nukleotydu w komórkach reguluje szybkość przemian tworzących energetycznie użyteczne cząsteczki [1]. Wreszcie ATP jest również cząsteczką sygnałową [2-9]. U zwierząt ektonukleotydy w tym ATP i ADP, aktywują receptory nukleotydowe typu P2 [2-8]. Receptory te uczestniczą w aktywacji i regulacji licznych procesów fizjologicznych. W układzie krwionośnym aktywują agregację płytek i regulują ciśnienie krwi [2-6], z kolei w układzie nerwowym biorą udział w neurotransmisji i neuromodulacji. Są również sygnałem bólu [6-9]. Wyczerpujący przegląd funkcji receptorów nukleotydowych znajdziemy w obszernych publikacjach prof. Burnstock'a [3,5,7,9].

Stężenie nukleotydów, tak w komórce jak i poza nią, regulują enzymy należące do kilku klas i rodzin takich jak: fosfatazy, kinazy, pirofosfatazy/fosfodiesterazy nukleotydów (NPPazy), ATPazy i tri-difosfohydrolazy nukleotydów (NTPDazy) [2,5,10-12]. Właściwości i funkcje NTPDaz zwierząt zostały bardzo dobrze poznane i opisane. Synteza NTPDaz zachodzi we wszystkich typach komórek zwierzęcych [10,11,13-16]. Oznacza to, że enzymy te są istotnym składnikiem metabolizmu i mają wpływ na szereg procesów fizjologicznych zależnych lub regulowanych przez nukleotydy. NTPDazy uczestniczą w procesach proliferacji, różnicowania i apoptozy [14,15]. Degradując ektonukleotydy, wpływają również na rozwój procesów zapalnych [5,14,15]. Większość dotychczas opisanych NTPDaz zwierzęcych to białka błonowe z centrum aktywnym znajdującym się po zewnętrznej stronie błony komórkowej (ekto-NTPDazy) lub enzymy rozpuszczalne (egzo-NTPDazy) uwalniane do przestrzeni międzykomórkowej lub płynów tkankowych, takich jak krew i płyn mózgowo-rdzeniowy [10-16]. Enzymy te regulują stężenie nukleotydów znajdujących się poza komórką lub w płynach fizjologicznych i w ten sposób uczestniczą w sygnalizacji purynowej [2-8,10,15]. NTPDaza1 zwierząt jest analogiem apirazy roślin [12,15].

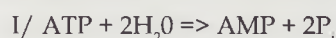
W skutek historycznych uwarunkowań NTPDazy roślinne nazywa się często apirazami. Mimo wcześniejszego odkrycia i opisanie enzymów roślinnych wiedza na temat ich funkcji w roślinach jest niepełna i wymaga dalszych intensywnych badań. Dopiero w ostatnich kilku latach pojawiło się kilka prac dostarczających interesujących informacji na temat budowy i ekspresji genów roślinnych

NTPDaz oraz przypuszczalnych funkcji kodowanych przez nie białek. Badania te dotyczą ich udziału w regulacji procesów wzrostu i rozwoju rośliny, w tym kiełkowania ziarna pyłku i dojrzewania bulw [17-25]. Inne badania koncentrują się na procesach sygnalizacji oraz ich udziale w reakcjach odpornościowych roślin [24-32]. Białka te z uwagi na wysoką aktywność katalityczną oraz brak glikozylacji mogą być wykorzystywane w leczeniu chorób degeneracyjnych układu nerwowego, udarów czy też zawałów serca [15,16,33,34].

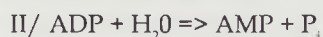
WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE, BUDOWA I LOKALIZACJA APIRAZ ROŚLINNYCH

Apirazy ziemniaka (difosfohydrolazy ATP – EC 3.6.1.5) to najlepiej scharakteryzowane enzymy należące do rodziny NTPDaz roślin [23,34-37]. Po raz pierwszy enzym ten został opisany przez Meyerhof'a w 1945 roku [36]. Była to rozpuszczalna apiraza izolowana z komórek bulw ziemniaka (*Solanum tuberosum*). Z ziemniaka wyizolowano i oczyszczono dwie izoformy apirazy, jednak sklonowano tylko jedną jej formę [36,37].

Apirazy hydrolizują wiązania bezwodnikowe dwu- i trójfosforanów nukleozydów w obecności jonów metali dwuwartościowych zgodnie ze schematem I i II [33-37]:



lub



Końcowymi produktami reakcji są AMP i dwie lub jedna cząsteczka ortofosforanu. Apirazy nie hydrolizują wiązań estrowych nukleotydów i nieorganicznego pirofosforanu [34-37,38]. Najwyższa aktywność hydrolizy obserwowana jest w obecności jonów Ca^{2+} lub Mg^{2+} [11,37]. Inne dwuwartościowe kationy, takie jak Mn^{2+} , Co^{2+} oraz Zn^{2+} stymulują jej aktywność ze znacznie mniejszym efektem [37,39]. Dla apirazy z *S. tuberosum* stwierdzono, że jony Ca^{2+} wzmacniają aktywność hydrolityczną względem ADP, a Mg^{2+} – względem ATP [37]. Aktywność enzymatyczna apiraz może być również modulowana przez lektyny oraz związki bifunkcyjne [11,39]. Wszystkie NTPDazy, niezależnie od pochodzenia, charakteryzują się niską specyficznością substratową, a szybkość hydrolizy ATP nie jest ograniczona stężeniem wolnego ADP [37,39]. Są również niewrażliwe na inhibitory alkalicznych fosfataz i ATPaz typu P, V, F [11,15,36,38].

Białka kodowane przez geny apiraz roślinnych są pojedynczym łańcuchem polipeptydowym o masie cząsteczkowej 45-50 kDa [23,36-37,39,41]. Struktura wszystkich dotychczas wyizolowanych genów apiraz roślinnych sugeruje, że na końcu aminowym białek znajduje się sekwencja peptydu sygnałowego oraz sekwencje jednej lub dwóch domen transbłonowych [18,19,23,40]. Enzymy występują w dwóch formach – rozpuszczalnej lub błonowej [18,19,23,36]. Centrum katalityczne apiraz związanych z błoną znajduje się po stronie ekstracytoplazmatycznej [18,35,36]. Na podstawie sekwencji nukleotydowej stwierdzono, że apirazy roślin i zwierząt zawierają zachowane w ewolucji rejony określane

jako ACR (ang. *apyrase conserved regions*) [12,15,34-36]. Badania prowadzone nad apirazami zwierząt sugerują, że rejony ACR odpowiadają za specyficzność, wiązanie, hydrolizę substratu oraz oddziaływanie z jonami metali [11,15]. Skonstruowany *ab initio* model struktury przestrzennej apirazy ziemniaka sugeruje, że w proces katalizy zaangażowane są reszty aminokwasowe Thr127 i Thr55 oraz Glu170 i Glu78. Dwustopniowy mechanizm hydrolizy zakłada, że obie reszty treoniny są nukleofilami odpowiedzialnymi za rozerwanie wiązań bezwodnikowych (γ i β) ATP. Dodatkowo w procesie tym niezbędne są Glu170 i Glu78. Obecność dwóch nukleofilów w centrum katalitycznym wyjaśnia różnice w aktywności hydrolitycznej między apirazami a innymi enzymami rodziny NTPDaz [35].

Obecność NTPDaz roślin stwierdzono w różnych przedziałach komórkowych [18,21-23,39,41-42]. Aktywność apirazy oznaczono w mikrosomach grochu, pszenicy, ziemniaka i bawełny [34]. Apirazę wyizolowano również z błony jądrowej zarodka i z cytoszkieletu grochu [41,42]. U soi (*Glycine soja*) zidentyfikowano dwie apirazy (GS50 i GS52), z których jedna jest apirazą obecną w świetle aparatu Golgiego, a druga z nich jest ektoapirazą związaną z błoną komórkową [44]. Z kolei z korzeni fasoli indyjskiej (*Dolichos biflorus*) wyizolowano lektynę o aktywności apirazy. Enzym ten zawiera cztery rejony o sekwencji reszt aminokwasowych identycznej z ACRami spotykanymi u apiraz [43,44].

GENY NTPDaz ROŚLINNYCH I ICH EKSPRESJA

Geny kodujące NTPDazy znaleziono w genomach kręgowców, bezkręgowców, roślin, drożdży oraz pierwotniaków [15,23,34,36]. Do dnia dzisiejszego w różnych gatunkach roślin zidentyfikowano blisko 18 genów kodujących apirazy. Dwie sekwencje kodujące apirazę z ziemniaka zidentyfikowali Riewe i wsp. [23]. Komoszyński i wsp. wyizolowali osiem genów kodujących apirazę ziemniaka. Sekwencje reszt aminokwasowych wyznaczone na ich podstawie są identyczne w 93-99% (dane nieopublikowane, umieszczone w bazie NCBI). W mimozie wstydlivej znaleziono jeden gen kodujący apirazę, a w komórkach bawełny dwa [2,22,45]. W roślinach strączkowych zidentyfikowano łącznie dwanaście genów kodujących apirazy [23,40,43-45]. Na podstawie analizy genomu rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) znaleziono siedem genów kodujących apirazy. Dwa z nich (*AtAPY1* i *AtAPY2*) zostały sklonowane. Określono profil ich ekspresji i podjęto próbę oceny ich funkcji fizjologicznych. Sekwencje reszt aminokwasowych tych białek są identyczne w 87%, co sugeruje, że enzymy te mogą brać udział w różnych procesach metabolicznych [18,19,21,39].

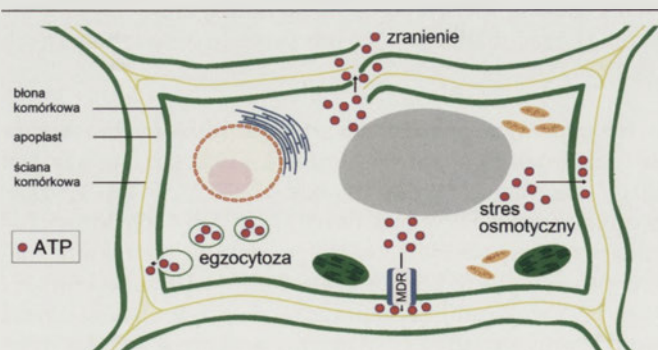
Na podstawie analizy zawartości mRNA można stwierdzić, że poziom ekspresji genów kodujących apirazy jest różny dla różnych typów tkanek [18,19,23,39-45]. Wyższy poziom transkryptów obserwuje się w tkankach, które charakteryzują się szybkim wzrostem oraz w tych, które ulegają procesowi różnicowania [18,23,39,44]. Steinebrunner i wsp. [21] wykazali, że najwyższą ekspresję genów apiraz rzodkiewnika (*AtAPY1* i *AtAPY2*) wykazują szybko dzielące i różnicujące się tkanki oraz organy. Należą do nich łagiewka pyłkowa, etiolowane hypokotyle, wierzchołek

korzenia oraz miejsca akumulacji auksyny i jej transportu, a także komórki wykazujące wysoką ekspresję genów kodujących białka PIN [18,19]. Ponadto w elementach regulatorowych *cis* obu tych genów występują charakterystyczne motywy sekwencji, których aktywność regulowana jest przez światło oraz auksynę. Stwierdzono, że światło czerwone powoduje obniżenie liczby transkryptów apirazy w hypokotylu, co wywołuje zahamowanie wzrostu korzeni [18]. U ziemniaka apiraza występuje przede wszystkim w komórkach tkanek korzenia, kwiatów, pędu i bulw, natomiast w liściach i tkankach łodygi ilość mRNA jest niewielka lub żadna [23]. Niskim poziomem transkryptów apirazy charakteryzują się liście rzodkiewnika i grochu [18,39,40]. U innych roślin obserwuje się zbliżone profile ekspresji tych enzymów [41-45].

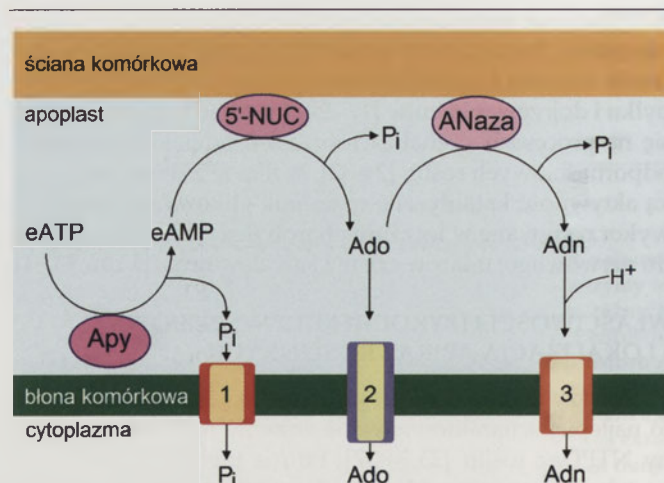
ŹRÓDŁA I METABOLIZM EKTONUKLEOTYDÓW W ROŚLINACH

ATP jest związkiem wysokoenergetycznym. Zmieniające się stężenia tego nukleotydu w komórce kontrolują wiele szlaków metabolicznych. Hydroliza obecnych w tej cząsteczce wiązań bezwodnikowych dostarcza energii dla szeregu endoergicznych reakcji i procesów niezbędnych do wzrostu i rozwoju komórki [1]. ATP może pojawiać się w przestrzeni poza komórką na drodze egzocytozy z pęcherzyków wydzielniczych lub być transportowany z udziałem transporterów ABC (białek zawierających kasetę wiążącą ATP) [17,24-30,48]. Nukleotyd ten jest również uwalniany z komórek roślinnych podczas stresu osmotycznego lub w wyniku utraty integralności błony komórkowej spowodowanej uszkodzeniem mechanicznym lub atakiem patogenów (Ryc. 1) [27-30]. Jego źródłem mogą być również mikroorganizmy żyjące w glebie [17,30].

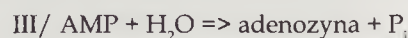
Zewnątrzkomórkowy ATP (eATP) nie jest transportowany do wnętrza komórki, jednak związek ten zawiera elementy strukturalne, których synteza wymaga wysokich nakładów energii (adenina, ryboza) [1,17,48]. Wielu autorów sądzi, że podstawową funkcją roślinnych apiraz jest kontrola stężenia ATP znajdującego się w apoplacie (Ryc. 2.) [23,46-50]. Ektoapirazy hydrolizują ATP zgodnie ze schematem I i II. Jak dotąd nie zostały zidentyfikowane białka, które umożliwiałyby transport AMP do wnętrza komórki [48]. Ten nukleotyd jest hydrolizowany do ortofosforanu i adenozyne przez obecną w apoplacie 5'-nukleotydazę (schemat III).



Rycina 1. Źródła ATP w apoplacie. MDR – transporter ABC z kasetą wiążącą ATP. Szczegółowy opis ryciny w tekście. Wg [26] zmodyfikowana.



Rycina 2. Metabolizm ektonuukleotydów w apoplacie. Apy – apiraza; 5-NUC – 5'-nukleotydaza; ANaza – N-glikozydaza; Pi – ortofosforan; H⁺ – kation wodorowy; Ado – adenozyne; Adn – adenina; 1 – kanał jonowy; 2 – transporter adenozyne; 3 – transporter adeniny. Szczegółowy opis ryciny w tekście. Wg [50] zmodyfikowana.



Powstająca w tej reakcji adenozyne może być transportowana do wnętrza komórki za pośrednictwem białkowych transporterów na drodze symportu z jonami wodorowymi lub ulegać dalszej degradacji do adeniny i rybozy [47,48]. Powstające w powyższych reakcjach ortofosforan jest transportowany do komórki z udziałem kanałów anionowych [49]. Rezultaty badań Rewie i wsp. [23] sugerują, że w przestrzeni międzykomórkowej znajduje się również N-glikozydaza (nazwana przez autorów ANazą) [47]. Jej wysoka specyficzna aktywność względem adenozyne umożliwia efektywne odzyskiwanie adeniny i rybozy z cząsteczek adenozyne (schemat IV).



Stwierdzono, że aktywność ANazy zależy od aktywności ektoapiraz. Wynika to z dwóch powodów. Po pierwsze, stężenie adenozyne zależy od aktywności apiraz i 5'-nukleotydazy. Po drugie aktywność 5'-nukleotydazy jest uzależniona od stężenia ATP i ADP, które hamują aktywność tego enzymu [10,16,47].

Ektoapiraza obecna w apoplacie może być enzymem rozpuszczalnym lub słabo zasocjowanym z błoną komórkową [22,23,39,47]. Inna hipoteza sugeruje, że ektoapiraza i pozostałe enzymy uczestniczące w metabolizmie eATP, związane są ze ścianą komórkową [48]. Wielu autorów podziela opinię, że apirazy, regulując poziom zewnątrzkomórkowego ATP, uczestniczą w katabolizmie ATP i funkcjonują jako regulatory zewnątrzkomórkowego stanu energetycznego [17,23,47]. Obecne w apoplacie apirazy dzięki wysokiej aktywności katalitycznej, którą ogranicza jedynie dostępność substratu, hydrolizują ATP (niezależnie od źródła jego pochodzenia) i błyskawicznie zwiększają pulę zewnątrzkomórkowego ortofosforanu, który np. może być wykorzystywany przez ryzosferę [17,47,49]. Naszym zdaniem podstawową funkcją apiraz oraz innych enzymów metabolizujących ektonuukleotydy jest umożliwienie odzys-

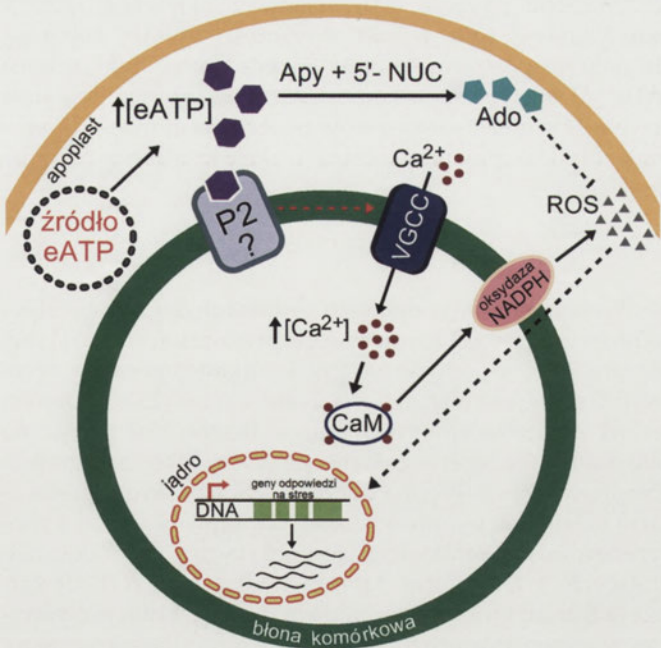
skania przez komórkę, z udziałem stosownych kanałów i transporterów, takich produktów degradacji nukleotydów jak ortofosforan, adenozyne, adenina i ryboza (Ryc. 2).

PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU Z UDZIAŁEM eATP

Istnieją hipotezy, że zewnątrzkomórkowy ATP mógłby pełnić w roślinach funkcję sygnalizacyjną [17,20,23-30]. Niektórzy badacze twierdzą, że u roślin istnieją receptory podobne do receptorów nukleotydowych (P1 i P2) zwierząt, jednak jak dotąd nie odnaleziono ich w roślinach [20,26-29]. Sekwencje reszt aminokwasowych receptorów zwierząt nie są zachowane w ewolucji [20,24,28]. Istnieją wyraźne różnice zarówno w sekwencji jak i strukturze pomiędzy receptorami nukleotydowymi zidentyfikowanymi u ssaków i alg [20,28]. Autorzy sugerują, że niski stopień zachowania w ewolucji sekwencji kodujących receptory P1 i P2 jest głównym problemem utrudniającym ich identyfikację w genomie roślinnym [17,20,27,30].

W doświadczeniach dotyczących wytwarzania nadtlaków przez oksydazę NADPH w odpowiedzi na wzrost stężenia zewnątrzkomórkowego ATP zauważono, że po dodaniu do środowiska ATP linie transgeniczne *A. thaliana* wykazujące nadekspresję genu *apy2*, charakteryzują się niższym poziomem syntezy rodnika ponadtlenkowego [27-29]. Jednocześnie zmniejsza się ilość transkryptów genu *pal1* (kodującego białko fenyloalanina-amoniak), który jest indukowany przez reaktywne formy tlenu (ROS) [24]. Obserwuje się również zmniejszoną transkrypcję genów *LOX2* oraz *ACS6* kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę dwóch hormonów roślinnych – kwasu jasmonowego i etylenu [24,29]. Oba te hormony uczestniczą w odpowiedziach obronnych roślin (w tym na zranienie). W doświadczeniach dotyczących transmisji sygnału z udziałem eATP u roślin, zauważono, że użycie PPADS – inhibitora receptorów adenozyne i RB2 – niespecyficznego inhibitora receptorów nukleotydowych, zmniejsza ekspresję powyższych genów [24,27-29]. Na podstawie tych wyników autorzy proponują następujący model szlaku przekazywania sygnałów z udziałem eATP (Ryc. 3.). Podczas stresu wywołanego czynnikami biotycznymi lub abiotycznymi, jak również stymulacja mechaniczna powoduje wypływ ATP z komórki [17,24-26,30]. eATP wiąże się do receptora, co powoduje napływ jonów wapnia do cytoplazmy [17,26-28]. Aktywacja przez jony Ca^{2+} kalmoduliny zwiększa aktywność oksydazy NADPH i tym samym podnosi poziom reaktywnych form tlenu, takich jak rodnik ponadtlenkowy [17,27-38]. Zwiększenie ilości ROS powoduje aktywację genów kodujących białka związane z mechanizmami obronnymi i odpowiedzią (adaptacją) na działające bodźce środowiskowe [17,24,26,27,30]. Należy do nich kinaza białkowa aktywowana mitogenem (MAPK3), która poprzez fosforylację reguluje aktywność docelowych białek [27]. W tym przypadku autorzy sugerują, że ektoapirazy, z uwagi na ich wysoką aktywność, mogłyby, przez hydrolizę eATP, modulować lub wyciszać szlaki sygnalizacyjne, w których eATP funkcjonuje jako cząsteczka sygnałowa [20,25,27,28,31].

Wyniki badań z zastosowaniem mikromacierzy DNA pokazują, że wyciszenie genów apirazy zwiększa blisko dwukrotnie ekspresję genów kodujących białka należące



Rycina 3. Model sygnalizacji zewnątrzkomórkowej z udziałem eATP. Apy – apiraza; 5'-NUC – 5'-nukleotyda; P2 – hipotetyczny receptor typu P2; VGCC – kanał wapniowy bramkowany napięciem; CaM – kalmodulina; ROS – reaktywne formy tlenu; Ado – adenozyna. Szczegółowy opis ryciny w tekście. Wg [29] zmodyfikowana.

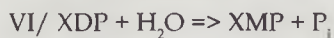
do rodziny ekstensyn [23]. Ekstensyny są bogate w glikozylowaną hydroksyprolinę. Zlokalizowane są w ścianie komórkowej od strony apoplastu i pełnią funkcje strukturalne oraz sygnalizacyjne. Udowodniono, że ich aktywność wpływa na procesy zaangażowane w rozpoznanie ziarna pyłku, zapłodnienie, rozwój zarodka, podział komórki, różnicowanie oraz starzenie się komórek [23,50]. Białka te są również zaangażowane w odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny [50]. Autorzy sugerują, że ekstensyny mogą uczestniczyć w transmisji sygnału z udziałem eATP. Zważywszy, że najważniejszą funkcją apirazy w apoplastach jest kontrola zewnątrzkomórkowego stężenia ektonukleotydów, enzymy te mogą również regulować ten szlak sygnalizacyjny [23]. W tym przypadku celem procesów prowadzonych z udziałem apirazy i ekstensyn może być zwiększenie żywotności komórek oraz kontrola ich polarnego wzrostu [23,30,50].

ROLA APIRAZY W SYNEZIE SKROBI

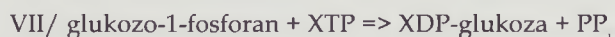
Bardzo wysoka ekspresja mRNA apirazy w bulwach ziemniaka (organach służących akumulacji tego polisacharydu) jest argumentem sugerującym, że apiraza jest zaangażowana w proces biosyntezy skrobi [23,36,46,47]. Ponadto wiele etapów biosyntezy tego cukru jest regulowanych substratami (ATP i ADP) i produktami (ortofosforan) reakcji katalizowanych przez apirazę [1,23,47]. Podczas 140-dniowego rozwoju bulw ziemniaka jednocześnie rośnie ilość skrobi i aktywność apirazy. Wraz ze wzrostem syntezy skrobi stężenie XDP powinno rosnać (schemat V), jednak obserwowany poziom tego związku w bulwach nie odpowiadał ilości zsyntetyzowanej skrobi (był niższy).



Obniżone stężenie ADP, śladowa aktywność kinazy adenylanowej oraz wzrost aktywności apirazy sugerują, że podczas dojrzewania bulw enzym ten reguluje stężenie ADP [23,46]. Obecna w komórkach apiraza umożliwia stałą szybkość syntezy wielocukrów poprzez degradację difosfonukleotydów, przeprowadzając reakcję zgodnie ze schematem VI :



Wiadomo, że w komórkach roślinnych degradacja i biosynteza cukrów jest kontrolowana przez ortofosforan [1,46]. Zauważono, że podczas nagłego spadku temperatury poniżej 0°C następuje wzrost ilości monocukrów [23,46]. Obrona przed zachodzącymi zmianami w środowisku polega na uruchomieniu rezerw cukrów prostych, które są zgromadzone w postaci skrobi. Podczas hydrolizy skrobi (fosforolizy) niezbędny jest ortofosforan. Gwałtowny wzrost zapotrzebowania na ortofosforan jest pokrywany ze źródeł znajdujących się w komórce. Apiraza, hydrolizując ATP, dostarcza substratu (ortofosforanu) do hydrolizy skrobi i uczestniczy w odpowiedziach na zachodzące w środowisku zmiany temperatury. Apiraza może również kontrolować proces akumulacji skrobi, ponieważ mutacja obu genów *AtAPY1* i *AtAPY2* powoduje, że skrobia akumuluje się w komórkach w postaci wyraźnie większych ziaren [21]. W doświadczeniach, w których użyto linie transgeniczne ziemniaka, w których wyciszono transkrypcję genów kodujących ziemniaczane apirazy, obserwowano wzrost ilości transkryptów białek zaangażowanych w syntezę skrobi, takich jak syntaza sacharozy, mitochondrialne i plastydowe translokazy ATP/ADP oraz translokaza glukozy-6-fosforanu [23]. Enzymy te stymulują wzrost liczby ziaren skrobi w bulwach ziemniaka. Obniżona aktywność apirazy skoordynowana jest ze wzrostem liczby transkryptów podjednostki pirofosforylazy ADP-glukozy (AGPazy) [23]. AGPa jest kluczowym enzymem w biosyntezie skrobi i przeprowadza reakcję przeniesienia glukozy z fosforanu glukozy na XDP (schemat VII):



Aktywność AGPazy regulowana jest przez utlenianie i redukcję grup -SH cysteiny [23]. Autorzy sugerują, że reakcje te mogą być katalizowane przez zależną od NADPH plastydową reduktazę tioredoksyny, ponieważ w warunkach obniżonej syntezy apiraz rośnie ekspresja genu kodującego ten enzym [23]. Powyższe wyniki sugerują, że aktywność apiraz wpływa na proces biosyntezy skrobi na poziomie transkrypcji, jednak nieznane są mechanizmy, w jaki sposób apirazy mogłyby regulować syntezę białek zaangażowanych w tym procesie. Naszym zdaniem obserwowane zmiany nie są wynikiem bezpośredniej regulacji aktywności genów przez apirazy, lecz są związane z podwyższeniem ilości ADP i obniżeniem w komórkach bulw puli ortofosforanu (fosforoliza) i AMP, a więc tych związków, które wpływają na ładunek energetyczny i potencjał fosforylacyjny komórki. Powyższe zmiany mogą mieć istotny wpływ na tempo wzrostu i rozwój bulw ziemniaka.

UDZIAŁ APIRAZ W KONTROLI WZROSTU ROŚLIN

Linie transgeniczne ziemniaka, w których wyciszono geny apiraz konstruktem znajdującym się pod kontrolą konstytutywnego promotora wirusa mozaiki kalafiora (CaMV 35S) charakteryzowały się mniejszą o 90% aktywnością apiraz w porównaniu z roślinami kontrolnymi [23]. Obniżona aktywność apirazy skorelowana jest ze zmianami morfologicznymi w tkankach i organach rosnących pod ziemią. Są to tkanki, w których ekspresja genów apiraz w warunkach fizjologicznych jest najwyższa [23]. Skutkiem wyciszenia genów apiraz jest otrzymanie mniejszych roślin, u których widoczny jest zahamowany wzrost pędów, a bulwy tych roślin są liczniejsze i mniejsze [23]. Zastosowanie organospecyficznego promotora B33 umożliwiło wyciszenie ekspresji genów apiraz tylko w bulwach rośliny. W tym przypadku nie doszło do zahamowania wzrostu całych roślin, natomiast bulwy ziemniaka były wydłużone oraz zawierały nieznacznie podwyższoną zawartość skrobi [23]. Przedstawione wyżej badania sugerują, że apirazy uczestniczą w regulacji wzrostu rośliny. Wyniki badań przeprowadzonych na grochu sugerują, że znajdująca się w aparacie Golgiego apiraza o wysokiej aktywności względem UDP, uczestniczy w biosyntezie składników ściany komórkowej [23,40,42], jednak w komórkach bulw ziemniaka, w których wyciszono geny apiraz nie obserwowano różnic w ilości celulozy i kwasu uronowego, składników ściany komórkowej [23]. Brak tych zmian wskazuje, że apirazy nie są zaangażowane w proces biosyntezy tych cząsteczek. Wiemy jednak, że aktywność ektoapiraz powoduje wzrost stężenia jonów fosforanowych poza komórką, co obniża pH apoplastu. Zakwaszenie to może aktywować syntezę ściany komórkowej (tzw. kwaśny wzrost ściany komórkowej) [21,23,51].

W minionej dekadzie pojawiło się w literaturze szereg prac dotyczących roli apiraz rzodkiewnika w procesie kiełkowania ziarna pyłku [18-21,42]. Wyniki tych badań sugerują udział omawianych enzymów w regulacji ekspresji genów w komórkach męskiego gametofitu. Użycie konstruktorów utworzonych z promotora genów *AtAPY1* lub *AtAPY2* i genu kodującego białko reporterowe (β -glukuronidazę), umożliwiło identyfikację tkanek, w których dochodzi do transkrypcji genów apirazy. Wyniki tych doświadczeń wskazują, że ich wysoka ekspresja ma miejsce tylko w kwiatach zawierających dojrzałe ziarna pyłku, podczas gdy jest ledwie zauważalna w niedojrzałych ziarnach [19]. Pozbawienie ciągłości obu genów kodujących apirazy (*AtAPY1* i *AtAPY2*) przez umieszczenie w ich sekwencji fragmentu T-DNA pozwoliło na utworzenie mutantów, ze zmodyfikowanym jednym lub dwoma genami tego enzymu [19,21]. Analiza fenotypów uzyskanych roślin transgenicznych wykazała, że pojedyncze mutanty były podobne morfologicznie do roślin typu dzikiego [19]. Nie obserwowano również różnic tak w szybkości kiełkowania ziaren pyłku jak i w budowie gametofitów. Podwójny nokaut genów *AtAPY1* i *AtAPY2* był letalny, jeśli dwa znokautowane allele pochodziły od gametofitu męskiego [19,21]. Uzyskany w tych warunkach gametofit był niedojrzały i fizjologicznie nieaktywny. Powyższe zmiany powodowały również spowolnienie procesu rozwoju i wydłużania łagiewki pyłkowej. Nokaut obu genów apiraz całkowicie hamował proces zapylania, a uzyskane nasiona nie kiełkowały [19,21]. Oznacza to, że

aktywność apirazy odgrywa ważną rolę w procesie rozmnażania rzodkiewnika. Powyższą hipotezę potwierdziły badania nad wpływem ATP, substratu apirazy, na kiełkowanie ziaren pyłku. W doświadczeniach tych wykazano, że ATP w stężeniu 2 mM całkowicie hamuje kiełkowanie tych roślin, podczas gdy ADP, tylko w pewnym stopniu. Z kolei 4 mM AMP, który nie jest hydrolizowany przez apirazę, hamował proces kiełkowania tylko w 10% [19]. Zastosowanie NGXT1913, silnego inhibitora aktywności apirazy lub poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko apirazom rzodkiewnika również hamowało proces kiełkowania. Na podstawie powyższych wyników autorzy sugerują, że wysoki poziom zewnątrzkomórkowego ATP może być przyczyną męskiej sterility u rzodkiewnika [19]. Tak więc, brak aktywności apirazy powoduje wzrost ilości niehydrolizowanego ATP oraz obniżenie puli dostępnego AMP i P_i , czego widocznym skutkiem są morfologiczne i funkcjonalne zmiany męskiego gametofitu [19,21]. Zdaniem autorów regulacja procesu rozmnażania u rzodkiewnika przez apirazę jest wynikiem ich katalitycznej funkcji polegającej na obniżaniu stężenia nukleotydów w komórkach i tkankach. Autorzy sugerują, że apirazy są niezbędne w utrzymaniu odpowiedniego (wyraźnie stromego) gradientu ATP przez błonę komórkową, który ułatwiłby lub umożliwiłby transport substancji niezbędnych podczas procesu kiełkowania i wzrostu [18-21]. Naszym zdaniem powyższe doświadczenia należy traktować ostrożnie. Milimolowe stężenia ATP (a takich używali autorzy w swoich badaniach) oraz hamowanie aktywności apirazy powoduje utrzymywanie się wysokiego stężenia ATP w pobliżu błon. Wiele badań wskazuje, że wysokie stężenia ATP są dla komórek cytotoksyczne i powodują tworzenie w błonach plazmatycznych porów o średnicy pozwalającej na przenikanie przez nie cząsteczek o masie do 1000 Da [17,26].

Analiza z zastosowaniem konstruktów składających się z β -glukuronidazy i promotorów genu *AtAPY1* i *AtAPY2* (*AtAPY1*:GUS i *AtAPY2*:GUS) wykazała, że oba geny ulegają wysokiej ekspresji w szybko dzielących się tkankach roślinnych i charakteryzujących się wysoką aktywnością wydzielniczą. Są to przede wszystkim wierzchołki korzeni głównych jak i bocznych, etiolowane hypokotyle oraz łagiewki pyłkowe [18]. W tych obszarach stwierdzono największe stężenie zewnątrzkomórkowego ATP [25]. Wyniki te sugerują, że funkcja apirazy może być związana z kontrolą wzrostu rośliny. Rozwój rośliny regulowany jest przez szereg czynników, z których światło oraz auksyny pełnią najistotniejsze funkcje [18,52]. Auksyna jest hormonem roślinnym, którego dystrybucja w tkankach zachodzi na drodze transportu polarnego [52]. Badania Tang'a i wsp. (2003) wykazały, że egzogeny ATP powoduje akumulację auksyny w wierzchołkach korzeni siewek rzodkiewnika i kukurydzy oraz hamuje proces grawitropizmu. Podobny rezultat otrzymano stosując NPA, inhibitor transportu auksyny [18,52]. Powyższe obserwacje sugerują, że apirazy mogą również uczestniczyć w regulacji transportu auksyn.

U rzodkiewnika światło czerwone z udziałem fitochromu hamuje wydłużanie hypokotyli i jednocześnie gwałtownie zmniejsza ekspresję genów apirazy w tej tkance [18,21]. Oznacza to, że u rzodkiewnika oba procesy są regulowane przez światło. Światło czerwone nie wydłuża hypokotyli

roślin pozbawionych ekspresji genów kodujących fitochrom, natomiast aktywuje ekspresję genów apirazy [18]. Świadczy to o negatywnej regulacji ekspresji genów apirazy przez fitochrom. Stwierdzono, że w promotorach genów apirazy występują charakterystyczne sekwencje, których aktywność regulowana jest przez światło oraz auksynę [18,39]. Potwierdzeniem sugestii, że apirazy uczestniczą w procesach regulacji wzrostu tkanek roślin są obserwacje wskazujące, że hamowanie ekspresji dwóch z siedmiu genów apirazy (metodą RNAi i T-DNA) hamuje wzrost hypokotyli siewek [18,21]. Brak obecności transkryptów apirazy przejawia się krótszymi korzeniami oraz mniejszą strefą elongacji. Uzyskane rośliny mają karłowaty fenotyp ze zmniejszoną ilością korzeni bocznych i pędów [18]. Stąd wniosek, że aktywność apirazy jest bezwzględnym warunkiem prawidłowego wzrostu i rozwoju siewki w postaci dorosłej rośliny.

OPORNOŚĆ NA SUBSTANCJE TOKSYCZNE

Zjawisko oporności wielolekowej (MDR, ang. *Multi Drug Resistance*) jest biologicznym procesem obserwowanym u zwierząt, roślin, drożdży i bakterii, który przejawia się opornością komórek na ksenobiotyki [53]. Podstawowym składnikiem mechanizmu MDR są transportery ABC, które uczestniczą w usuwaniu z komórki szkodliwych substancji. Białka te należą do nadrodziny zawierającej kasety wiążącą ATP [53]. P-glikoproteiny, kodowane przez geny *MDR1*, wykorzystują energię zgromadzoną w znajdującym się poza komórką ATP do usuwania z komórki substancji toksycznych [31,53]. Dotychczasowe badania wskazują, że transport ATP poza komórkę może być regulowany przez zmianę potencjału membranowego lub aktywację receptorów nukleotydowych [20,26-29]. W doświadczeniach z wykorzystaniem siewek rzodkiewnika stwierdzono, że obniżenie aktywności zewnątrzkomórkowych ATP-az zwiększa wrażliwość tych roślin na ksenobiotyki [31,32]. Natomiast nadekspresja *PsNTP9* (gen apirazy z grochu zwyczajnego) lub *AtPGP1* (homolog genu *MDR*) umożliwia kiełkowanie nasion *A. thaliana* na podłożu zawierającym toksynę (cykloheksimid) i lepszy wzrost siewek na podłożu zawierającym toksyczne stężenia 2-izopentenyladeniny [31]. Nadprodukcja białka MDR lub apirazy zwiększa oporność roślin na herbicydy w porównaniu z roślinami niestransformowanymi. Najwyższą oporność obserwowano w doświadczeniach, w których oba te geny ekspresymowano w komórkach rzodkiewnika jednocześnie, natomiast hamowanie aktywności apirazy wyraźnie obniża wrażliwość tych roślin na toksynę [31,32]. Na tej podstawie autorzy sformułowali hipotezę, że hydroliza zewnątrzkomórkowego ATP przez NTPDazy i fosfatazy może być niezbędnym elementem procesów regulujących aktywność transporterów ABC.

KONTROLA WCZESNYCH ETAPÓW SYMBIOZY BAKTERII Z RODZAJU RHIZOBIUM Z ROŚLINAMI STRĄCZKOWYMI

Z korzeni fasoli indyjskiej wyizolowano ektoapirazę, zdolną do wiązania czynnika nodulacji (Nod) z bakterii *Rhizobium* [46]. Ten rodzaj ektoapirazy zlokalizowano na powierzchni komórek epidermy młodych korzeni, w miejscu pierwotnego kontaktu bakterii symbiotycznych z rośliną [46]. U lucerny (*Medicago truncatula*) zidentyfikowano sześć

genów apiraz [46]. Poziom mRNA dwóch z nich (*MtAPY1* i *MtAPY4*) wzrasta wyraźnie po 3-6 godzinach od inokulacji korzeni bakteriami *Sinorhizobium meliloti* [47]. U soi stwierdzono obecność dwóch genów apiraz, *G550* i *G552*. Podczas pierwszych sześciu godzin od inokulacji *Bradyrhizobium japonicum*, następuje wyraźny wzrost ilości transkryptów genu *G552* [44,45]. Zastosowanie specyficznych przeciwciał skierowanych wobec apirazy lub wyciszenie ekspresji jej genu technologią RNAi hamuje u soi i fasoli proces brodawkowania [44,45]. Na włosnikach korzeni tych roślin pojawiają się tylko małe, nie zawierające bakteroidów brodawki. Uzyskany fenotyp korzeni przypomina fenotyp korzeni mutantów, u których brak jest ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w procesie brodawkowania [45]. Dalsze badania wykazały, że wyciszenie genu wczesnej nodulacji *enod40* silnie hamuje rozwój primordiów i dojrzewanie brodawek. Linie transgeniczne *Lotus japonicus*, do których wprowadzono gen apirazy *G552* pod kontrolą konstytutywnego promotora, charakteryzują się większą podatnością na infekcję przez bakterie symbiotyczne oraz zwiększoną ilością brodawek na korzeniach [45]. Z kolei dodanie ADP do pożywki, w której rosły rośliny z wyciszonym genem *G552*, znosi częściowo efekty wyciszenia ekspresji genów ektoapiraz i powoduje pojawienie się dobrze rozwiniętych bakteroidów otoczonych symbiosomem [45]. Obecność ADP podwyższa również ekspresję genu *enod40*, przy niezmiennym poziomie transkryptów mRNA kodujących apirazę *G552*. Dodanie ATP w stężeniu od 10 do 200 μ M nie ma wpływu na proces nodulacji i liczbę wytworzonych brodawek u roślin z wyciszonym genem ektoapirazy [45]. Powyższe wyniki sugerują, że ADP pełni kluczową rolę podczas pierwszych etapów tworzenia brodawek przez bakterie symbiotyczne.

Procesy depolaryzacji błony, aktywność hormonów, zmiany poziomu wapnia i przekazywanie sygnału są ściśle związane z tworzeniem brodawek przez bakterie symbiotyczne. 1 mM eATP depolaryzuje potencjał błonowy włosników korzeni rzodkiewnika i jest czynnikiem zapewniającym właściwy wzrost i rozwój rośliny [27,30]. Dodanie apirazy z *S. tuberosum* do pożywki, na której rosła lucerna, hamuje wzrost korzeni włosnikowych, co umożliwia inicjację procesu symbiozy bakterii z rodzaju *Rhizobium* z roślinami strączkowymi [43]. eATP w stężeniu 1 mM hamuje grawitropizm korzeni i polarny transport auksyn [52]. Inne badania wskazują, że ATP znajdujący się poza komórką zwiększa poziom wapnia w komórce, co jest istotnym elementem wczesnych etapów infekcji bakteriami z rodzaju *Rhizobium* [30,44]. Z kolei zwiększenie cytoplazmatycznego poziomu wapnia jest związane z regulacją ekspresji genów [17,26-30]. Z drugiej strony istnieją badania, w których ATP aktywuje syntezę etylenu, inhibitora procesu brodawkowania i może hamować nodulację [30,43,44,52]. Powyższe badania wyraźnie wskazują, że ATP może uczestniczyć w różnych, często przeciwstawnych, procesach regulujących brodawkowanie. Ektoapirazy roślin, hydrolizując eATP, zapewniają odpowiedni stosunek ADP/ATP, co jest niezbędne dla utrzymania równowagi pomiędzy wzrostem korzeni oraz żywotnością rośliny, a procesami symbiozy z bakteriami glebowymi z rodzaju *Rhizobium* [17,25,30,42-45,52].

PODSUMOWANIE

NTPDazy (apirazy) to rodzina enzymów rozpowszechniona w królestwie roślin. Enzymy te hydrolizują nukleotydy tri- i difosforanowe, głównie ATP i ADP, do ortofosforanu i AMP. W wielu roślinach białka te kodowane są przez kilka genów, których poziom ekspresji jest różny w różnych tkankach i organach. Na podstawie wyników badań przeprowadzonych na rzodkiewniku udowodniono, że ekspresja genów apiraz (*AtAPY1* i *AtAPY2*) jest regulowana przez auksynę oraz światło, jednak wciąż niewiele wiadomo o mechanizmach regulacji ekspresji genów apiraz w innych organizmach roślinnych. Niektóre z roślinnych apiraz są ektoenzymami, jednak większość zidentyfikowanych apiraz roślinnych zlokalizowanych jest w jądrze, cytosolu i aparacie Golgiego. Zróżnicowany poziom syntezy oraz lokalizacja subkomórkowa sugerują, że roślinne apirazy mogą uczestniczyć w różnych procesach metabolicznych.

U roślin strączkowych produkcja ADP przez ekto-NTPDazy stanowi jeden z kluczowych elementów aktywujących inicjację symbiozy tych roślin z bakteriami z rodzaju *Rhizobium*. Wielu autorów sugeruje, że apirazy roślinne, które metabolizują ATP poza komórką, mogą uczestniczyć w regulacji procesów przekazywania sygnałów. Proponowane modele przekazywania sygnałów zakładają istnienie hipotetycznych receptorów nukleotydowych o strukturze odmiennej od receptorów zwierzęcych typu P2, jednak do dnia dzisiejszego w żadnym genomie roślinnym nie zidentyfikowano ich homologów. U wielu gatunków roślin udowodniono udział apiraz w procesach wzrostu i rozwoju organów roślinnych, takich jak łagiewka pyłkowa, korzenie oraz bulwy. W rozważaniach dotyczących funkcji apiraz należy wziąć pod uwagę ich wpływ na ładunek energetyczny komórki, bowiem regulacja stężenia składników tego parametru (ATP, ADP, i AMP) wpływa na wiele szlaków metabolicznych, a więc także na niektóre procesy omawiane w tej publikacji. Ekto-NTPDazy apoplastu również degradują nukleotydy di- i trifosforanowe, jednak w tym przypadku zasadniczym celem działania ektoapiraz, oraz innych ektonukleotydaz i ektonukleozydaz, jest uzyskanie takich produktów jak adenozyina i/lub adenina oraz ortofosforan. Częsteczki te są transportowane do komórki z udziałem odpowiednich transporterów i kanałów jonowych (wychwyt zwrotny) i wykorzystywane do resyntezy nukleotydów. Rosnące poza komórką stężenie ortofosforanu zakwasza środowisko, co ma istotny wpływ na wzrost ściany komórkowej.

Wciąż pozostają bez odpowiedzi pytania, jakie funkcje pełnią rozpuszczalne apirazy i jaka jest rola pozostałych izoenzymów NTPDaz w komórkach rzodkiewnika, lucerny i ziemniaka. nierozstrzygnięta jest również kwestia pokrewieństwa filogenetycznego apiraz roślinnych. Znajomość filogenezy tych białek mogłaby ułatwić określenie ich funkcji u innych roślin. Poza badaniami nad funkcją NTPDaz roślinnych istotne są również badania ich właściwości fizykochemicznych oraz opracowanie wydajnych metod ich nadprodukcji i oczyszczania. Zainteresowanie tą rodziną enzymów jest duże również z powodów czysto praktycznych, bowiem apirazy stosuje się podczas sekwencjonowania kwasów nukleinowych, oznaczania aktywności cykla-

zy adenylanowej oraz bioluminometrycznym monitoringu ATP [54]. Enzymy te są coraz częściej brane pod uwagę jako białka terapeutyczne, które mogą być użyte do leczenia niektórych schorzeń układu nerwowego i krwionośnego.

PIŚMIENNICTWO

1. Geigenberger P, Riewe D, Fernie AR (2009) The central regulation of plant physiology by adenylates. *Trends Plant Sci* 15: 98-105

2. Deli T, Csernoch L (2008) Extracellular ATP and cancer: an overview with special reference to P2 purinergic receptors. *Pathol Oncol Res* 14: 219-231

3. Burnstock G (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64: 1471-1483

4. Gachet C (2008) P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost* 99: 446-472

5. Burnstock G (2009) Purinergic regulation of vascular tone and remodeling. *Auton Autacoid Pharmacol* 29: 63-72

6. Ralevic V (2009) Purines as neurotransmitters and neuromodulators in blood vessels. *Curr Vasc Pharmacol* 7: 3-14

7. Burnstock G (2009) Purines and sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol* 194: 333-392

8. Trang T, Beggs S, Salter MW (2006) Purinoceptors in microglia and neuropathic pain. *Pflugers Arch* 452: 645-652

9. Burnstock G (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27: 166-176

10. Yegutkin GG (2008) Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signaling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783: 673-694

11. Zimmermann H (2006) Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp* 276: 113-128

12. Komoszyński M, Wojtczak A (1996) Apyrases (ATP-diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochem Biophys Acta* 1310: 233-241

13. Vorhoff T, Zimmermann H, Pelletier J, Sévigny J, Braun N (2005) Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: predicted secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin. *Purinergic Signal* 1: 259-270

14. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Olson KE, Islam N, Pinsky DJ, Levi R (2005) Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Semin Thromb Hemost* 31: 234-246

15. Robson S, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2: 409-430

16. Schetinger MR, Morsch VM, Bonan CD, Wyse AT (2007) NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 31: 77-98

17. Chivasa S, Ndimba BK, Simon WJ, Lindsey K, Slabas AR (2005) Extracellular ATP functions as an endogenous external metabolite regulating plan cell viability. *Plant Cell* 17: 3019-3034

18. Wu J, Steinebrunner I, Sun Y, Butterfield T, Torres J, Arnold D, Gonzalez A, Jacob F, Reichler S, Roux SJ (2007) Apyrases (nucleoside triphosphate-diphosphohydrolases) play a key role in growth control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 144: 961-975

19. Steinebrunner I, Wu J, Sun Y, Corbett A, Roux SJ (2003) Disruption of Apyrases Inhibits Pollen Germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131: 1638-1647

20. Reichler SA, Torres J, Rivera AL, Cintolesi VA, Clark G, Roux SJ (2009) Intersection of two signalling pathways: extracellular nucleotides regulate pollen germination and pollen tube growth via nitric oxide. *J Exp Bot* 60: 2129-2138

21. Wolf C, Hennig M, Romanovicz D, Steinebrunner I (2007) Developmental defects and seedling lethality in apyrase AtAPY1 and AtAPY2 double knockout mutants. *Plant Mol Biol* 64: 657-672

22. Clark G, Torres J, Finlayson S, Guan X, Handley C, Lee J, Kays JE, Chen ZJ, Roux SJ (2010) Apyrase (nucleoside triphosphate-diphospho-

hydrolase) and extracellular nucleotides regulate cotton fiber elongation in cultured ovules. *Plant Physiol* 152: 1073-1083

23. Riewe D, Grosman L, Fernie A R, Wucke C, Geigenberger P (2008) The potato-specific apyrase is apoplastically localized and has influence on gene expression, growth, and development. *Plant Physiol* 147: 1092-1109

24. Jeter CR, Roux SJ (2006) Plant responses to extracellular nucleotides: Cellular processes and biological effects. *Purinergic Signal* 2: 443-449

25. Kim SY, Sivaguru M, Stacey G (2006) Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling. *Plant Physiol* 142: 984-992

26. Roux SJ, Steinebrunner I (2007) Extracellular ATP: an unexpected role as a signaler in plants. *Trends Plant Sci* 12: 522-527

27. Demidchik V, Shang Z, Shin R, Thompson E, Rubio L, Laohavisit A, Mortimer J C, Chivasa S, Slabas AR, Glover BJ, Schachtman DP, Shabala SN, Davies JM (2009) Plant extracellular ATP signalling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca²⁺ channels. *Plant J* 58: 903-913

28. Wu SJ, Wu JY (2008) Extracellular ATP-induced NO production and its dependance on membrane Ca²⁺ flux in elicitation of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *J Exp Bot* 59: 4007-4016

29. Song CJ, Steinebrunner I, Wang X, Stout SC, Roux SJ (2006) Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 140: 1222-1232

30. Chivasa S, Tome D, Murphy AM, Hamilton JM, Lindsey K, Carr JP, Slabas AR (2009) Extracellular ATP: A modulator of cell death and pathogen defense in plants. *Plant Signal Behav* 4: 1078-1080

31. Windsor B, Roux SJ, Lloyd A (2003) Multiherbicide tolerance conferred by AtPgp1 and apyrase overexpression in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* 21: 328-433

32. Mulwa R, Mwanza L (2006) Biotechnology approaches to developing herbicide tolerance/selectivity in crops. *Afr J Biotechnol* 5: 396-404

33. Atkinson B, Dwyer K, Enjoji K, Robson SC (2006) Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis* 36: 217-222

34. Komoszyński M (1996) Comparative studies on animal and plant apyrases (ATP diphosphohydrolase EC 3.6.1.5) with application of immunological techniques and various ATPase inhibitors. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 113: 581-591

35. Kozakiewicz A, Neumann P, Banach M, Komoszyński M, Wojtczak A (2008) Modeling studies of potato nucleoside triphosphate diphosphohydrolase NTPDase1: an insight into the catalytic mechanism. *Acta Biochim Pol* 55: 141-150

36. Handa M, Guidotti G (1996) Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* 218: 916-923

37. Kettlun AM, Espinosa V, Garcia L, Valenzuela MA (2005) Potato tuber isoapyrases: Substrate specificity, affinity labeling, and proteolytic susceptibility. *Phytochemistry* 66: 975-982

38. Windsor JB, Thomas C, Hurley L, Roux SJ, Lloyd AM (2002) Automated colorimetric screen for apyrase inhibitors. *Biotechniques* 33: 1024, 1026, 1028-1030

39. Steinebrunner I, Jeter C, Song C, Foux SJ (2003) Molecular and biochemical comparison of two different apyrases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 38: 913-922

40. Shibata K, Abe S, Davies E (2001) Structure of the coding region and mRNA variants of the apyrase gene from pea (*Pisum sativum*). *Acta Physiol Plant* 23: 3-13

41. Shibata K, Morita Y, Shunnosuke A, Stankovic B, Davies E (2000) Apyrase from pea stems: isolation, purification, characterization and identification of a NTPase from the cytoskeleton fraction of pea stem tissue. *Plant Physiol Biochem* 37: 881-888

42. Yoneda M, Davies E, Morita EH, Abe S (2009) Immunohistochemical localization of apyrase during initial differentiation and germination of pea seeds. *Planta* 231: 47-56

43. McAlvin CB, Stacey G (2005) Transgenic expression of the soybean apyrase in *Lotus japonicus* enhances nodulation. *Plant Physiol* 137: 1456-1462
44. Govindarajulu M, Kim SY, Libault M, Berg RH, Tanaka K, Stacey G, Taylor CG (2009) GS52 Ecto-apyrase plays a critical role during soybean nodulation. *Plant Physiol* 149: 994-1004
45. Cohn JR, Uhm T, Ramu S, Nam YW, Kim DJ, Penmetza V, Wood TC, Denny RL, Young ND, Cook DR, Stacey G (2001) Differential regulation of a family of apyrase genes from *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 122: 2104-2119
46. Riewe D, Grosman L, Zauber H, Wucke C, Fernie AR, Geigenberger P (2008) Metabolic and developmental adaptations of growing potato tubers in response to specific manipulations of the adenylate energy status. *Plant Physiol* 146: 1579-1598
47. Riewe D, Grosman L, Fernie AR, Zauber H, Wucke C, Geigenberger P (2008) A cell wallbound adenosine nucleosidase is involved in the salvage of extracellular ATP in *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Physiol* 49: 1572-1579
48. Mohlmann T, Mezher Z, Schwerdtfeger G, Neuhaus HE (2001) Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 509: 370-374
49. Ward JM, Mäser P, Schroeder JI (2009) Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. *Annu Rev Physiol* 71: 59-82
50. Roberts K, Shirsat AH (2006) Increased extensin levels in *Arabidopsis* affect inflorescence stem thickening and height. *J Exp Bot* 57: 537-545
51. Durachko DM, Cosgrove DJ (2009) Measuring plant cell wall extension (creep) induced by acidic pH and by alpha-expansin. *J Vis Exp* 11: 1263
52. Tang W, Brady SR, Sun Y, Muday GK, Roux SJ (2003) Extracellular ATP inhibits root gravitropism at concentrations that inhibit polar auxin. *Plant Physiol* 131: 147-154
53. Aszalos A (2008) Role of ATP-binding cassette (ABC) transporters in interactions between natural products and drugs. *Curr Drug Metab* 9: 1010-1018
54. Nourizad N, Ehn M, Gharizadeh B, Hober S, Nyren P (2003) Methylo-trophic yeast *Pichia pastoris* as a host for production of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Protein Expr Purif* 27: 229-237

Functions of plant apyrases

Magdalena Wujak, Michał Komoszyński✉

Department of Biochemistry, Institute of General and Molecular Biology, University of Nicolaus Copernicus, 7 Gagarina St., 87-100 Toruń, Poland

✉e-mail: michkom@chem.uni.torun.pl

Key words: plant NTPDases, apyrases, metabolic function, ectonucleotides, plant NTPDase genes, ABC cassette

ABSTRACT

This publication presents results of the recent studies on plant NTPDases (apyrases). The structure and major physicochemical properties of these enzymes are reviewed. The attention has been paid to metabolic functions of apyrases from *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*. Apyrases constitute a family of proteins hydrolyzing phosphoanhydride bonds of nucleoside tri- and di-phosphates. They share common features like a similar structure, broad nucleotide substrate specificity and divalent cation requirement for their catalytic activity. The presence of plant NTPDases was detected in various cellular compartments. They are soluble or membrane-bound proteins. In hydrolytic processes catalyzed by activity of apoplastic apyrases and other ectoenzymes, adenine, ribose and orthophosphate are produced. These compounds are transported to the cell. Apyrases have been speculated to be involved in the regulation of starch synthesis and signal transmission. Their activity is necessary for development and growth of tubers and roots. Enzymes from leguminous plants activate the symbiosis with root nodule bacteria. Considering the fact, that NTPDases change the nucleotide concentration in cells and tissues, most of described functions may be related to the regulation of the energy charge of cell.

STRESZCZENIE

Proteom *Arabidopsis thaliana* zawiera 667 proteaz. Kilkadziesiąt spośród nich to białka chloroplastów, kodowane przez geny jądrowe będące ortologami genów kodujących enzymy proteolityczne bakterii. Przyjmuje się, że proteazy chloroplastowe stanowią element kontroli jakości i obrotu metabolicznego białek chloroplastów. Kontrola jakości białek chloroplastów przejawia się obróbką prekursorów białek do postaci dojrzałej i degradacją białek o niewłaściwej strukturze, zaś kontrola obrotu metabolicznego przyjmuje formę degradacji białek, które przestały być potrzebne komórce, spełniwszy już swoją funkcję. Niektóre proteazy chloroplastowe zależne od ATP, należące do rodziny FtsH (ang. *Filamentous temperature sensitive H*), zwłaszcza FtsH2 i FtsH5, pełnią wiele ważnych zadań z punktu widzenia prawidłowego funkcjonowania chloroplastu i całej rośliny, zarówno w optymalnych, jak i stresowych warunkach środowiskowych. Dowodzą tego poważne zmiany fenotypowe u mutantów pozbawionych tych enzymów. Dotąd zidentyfikowano jednak niewiele białek chloroplastowych, które ulegają hydrolizie z udziałem proteaz z tej rodziny (wśród nich białka Lhcb1, Lhcb3, PsbA i białko Rieskego), a wiedza na temat ich budowy i molekularnych mechanizmów hydrolizy jest ograniczona w porównaniu z wiedzą odnoszącą się do bakteryjnych proteaz FtsH. Jeszcze skromniejsza jest wiedza dotycząca zależnego od ATP enzymu Lon4, jedynego chloroplastowego ortologa dobrze poznanej proteazy Lon (ang. *Long*) z *E. coli*.

WPROWADZENIE

W komórkach każdego organizmu żywego, także roślin, stale przebiegają procesy degradacji różnych cząsteczek biologicznych, w tym białek. W pewnych sytuacjach białka roślinne mogą podlegać beenzymatycznej fragmentacji pod działaniem reaktywnych form tlenu [1], jednak w zdecydowanej większości przypadków degradacja białek roślinnych ma charakter ściśle regulowanej hydrolizy katalizowanej przez enzymy proteolityczne [2]. Regulacyjna hydroliza białek i) jest elementem ich obrotu metabolicznego; ii) stanowi ważny składnik systemu kontroli jakości białek; iii) odgrywa istotną rolę w przebiegu szlaków sygnalizacyjnych uruchamianych w odpowiedzi na działanie różnych bodźców zewnętrznych lub wewnątrzkomórkowych i regulujących wiele ważnych procesów komórkowych, wśród nich ekspresję genów, cykl komórkowy, różnicowanie, kierowanie i sortowanie białek, fazę egzekucyjną programowanej śmierci komórkowej i inne.

Obrót metaboliczny białek roślinnych przebiega w bardzo zróżnicowanym tempie – czas półtrwania indywidualnych cząsteczek waha się od 3-120 min. (białka krótkożyjące) do 24-72 godz. (białka długożyjące). Białka krótkożyjące są wydajnie degradowane z wykorzystaniem funkcjonującego w cytoplazmie systemu ubikwityna-proteasom 26S. Podatność na kierowanie na szlak zależnej od ubikwityny degradacji nadają krótkożyjącym białkom zarówno określone motywy struktury pierwszorzędowej, jak i elementy struktury wyższych rzędów. Motywami sekwencyjnymi, którym przypisuje się szczególnie wysoką korelację z czasem półtrwania cząsteczki białka są: N-końcowa reszta aminokwasowa (reguła N-końca) oraz sekwencja PEST. Białkami najbardziej niestabilnymi (najefektywniej kierowanymi na szlak degradacji zależnej od ubikwityny) są te, w których N-końcowa reszta aminokwasowa jest F, L, N, K lub R [3], a sygnałem rozpoznawanym przez system ubikwityna-proteasom 26S jest N-końcowa reszta aminokwasowa oraz jedna z wewnętrznych reszt lizyny [4]. Z kolei sekwencja PEST jest hydrofilową domeną cząsteczki białka o długości co najmniej 12 reszt aminokwasowych (wśród nich co najmniej jedna reszta P, E/D oraz S/T), sąsiadującą z resztami K, R i H. PEST nadaje białku cechę niestabilności przez to, że jest sygnałem do ubikwitynacji [5,6]. Sygnałem, który czyni z określonych białek substraty zależnej od ubikwityny degradacji może być ponadto niewłaściwa struktura drugo- lub trzeciorzędowa (denaturacja cząsteczki) [4]. Oznacza to, że w sposobie funkcjonowania systemu ubikwityna-proteasom 26S splata się element regulacji obrotu metabolicznego białek (degradacja zależna od motywów

Małgorzata Baranek
Magda Grabsztunowicz
Bogna Sikora
Grzegorz Jackowski✉

Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

✉ Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; tel.: (61) 82 9 58 91 e-mail: grzesiek@amu.edu.pl

Artykuł otrzymano 1 kwietnia 2010 r.
Artykuł zaakceptowano 10 czerwca 2010 r.

Słowa kluczowe: chloroplast, hydroliza, domena AAA⁺, proteaza, rodzina FtsH, rodzina Lon

sekwencyjnych) z elementem kontroli jakości białek (degradacja zależna od denaturacji). Najliczniejsza populacja enzymów współtworzących system ubikwityna-proteasom 26S jest jednak powiązana funkcjonalnie z przebiegającymi z udziałem tego systemu szlakami sygnalizacyjnymi. Sądzi się, że na tor zależnej od ubikwityny degradacji są kierowane te spośród białek uczestniczących w szlakach sygnałowych, a należą one także do białek krótkożyjących, które posiadają w swojej strukturze sygnały determinujące obrót metaboliczny i kontrolę jakości substratów białkowych [7]. W tym sensie trzy główne funkcje regulacyjnej hydrolizy białek, przynajmniej w tym jej aspekcie, który wiąże się z systemem ubikwityna-proteasom 26S, są ściśle ze sobą powiązane, właściwie nieodróżnialne. Białka długożyjące są degradowane w sposób nieselektywny, głównie z udziałem procesów autofagicznych. W wariacie makroautofagicznym duży fragment cytoplazmy (który może obejmować całe organelle) zostaje otoczony podwójną błoną z wytworzeniem pęcherzyka autofagosomalnego podlegającego następnie fuzji z centralną wodniczką lityczną, w której dochodzi do degradacji białkowych składników ładunku autofagosomu. W wariacie mikroautofagicznym mały fragment otoczenia tonoplastu zostaje wprowadzony do światła wodniczki litycznej przez lokalną inwaginację tonoplastu i uwolnienie w świetle wodniczki powstałego pęcherzyka. Ładunek pęcherzyka zostaje zdegradowany przez liczne enzymy hydrolityczne, w tym proteazy wakuolarnie [8]. W wakuolach magazynujących białka w nasionach w czasie embriogenezy niektórych gatunków roślin zidentyfikowano proteazy uczestniczące w obróbce (ograniczona proteoliza) form prekursorowych białek zapasowych do form dojrzałych [9]. Tak więc w funkcjonowaniu proteaz wakuolarnych, podobnie jak w przypadku proteasomów znajdujemy zarówno elementy kontroli obrotu metabolicznego, jak i kontroli jakości substratów białkowych. Brakuje danych na temat motywów nadających cząsteczkom białek podatność na degradację ze strony proteaz zlokalizowanych w wakuolach.

Chloroplasty są jednymi z organeli komórki roślinnej, obok mitochondriów, peroksysomów i siateczki śródplazmatycznej, wewnątrz których ma miejsce degradacja białek katalizowana przez autonomiczne proteazy, działające niezależnie od systemu ubikwityna-proteasom 26S i białek uczestniczących w procesie autofagii. O istnieniu proteaz chloroplastowych wiadomo od stosunkowo niedawna, tzn. od czasu gdy dowiedziono, że podczas inkubacji *in vitro* chloroplastów wyizolowanych z liści grochu część z białek chloroplastów ulega degradacji zależnej od światła i ATP [10] oraz wykazano, że degradacja w takim układzie może także przebiegać w sposób niezależny od ATP [11].

Według bazy danych Merops (wersja 9.1) w skład proteomu *Arabidopsis thaliana* wchodzi 667 enzymów proteolitycznych; część tej populacji (kilkadziesiąt) stanowią proteazy kierowane do chloroplastów. Liczne geny jądrowe *A. thaliana* kodujące proteazy chloroplastowe są ortologiczne względem genów kodujących proteazy eubakterii (w szczególności dobrze poznane w przypadku *Escherichia coli*) i cjanobakterii. Nie jest to rzeczą zaskakującą, zważywszy, że według powszechnie akceptowanej teorii endosymbiotycznego pochodzenia chloroplastów, organelle te powstały

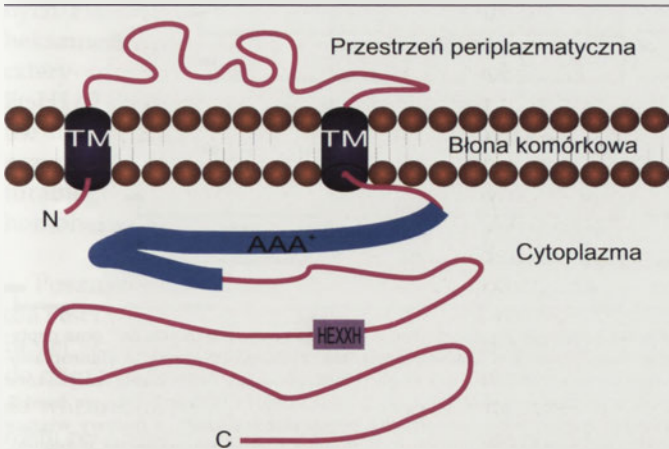
drogą przekształceń wolno żyjących fotosyntetyzujących organizmów praprokariotycznych, które wniknęły do heterotroficznej komórki praeukariotycznej i pozostały w niej jako endosymbionty. Przyjmuje się bowiem, że w toku ewolucji doszło do tasowania się materiału genetycznego gospodarza z materiałem praprokariotycznego endosymbionta, w wyniku czego część genów endosymbionta została przeniesiona do genomu gospodarza. Powszechnie zakłada się, że proteazy chloroplastowe stanowią element kontroli jakości oraz obrotu metabolicznego białek chloroplastów. Według ogólnie akceptowanych poglądów kontrola jakości białek chloroplastów przejawia się odcinaniem sekwencji tranzytowych i eksportowych na N-końcach białek importowanych do chloroplastów z cytoplazmy w formie prekursorowej, a także degradacją białek, które uległy mutacji lub uszkodzeniu na skutek kontaktu rośliny z czynnikami stresowymi, wreszcie białek syntetyzowanych w nadmiernych ilościach bądź sortowanych do niewłaściwego przedziału chloroplastu. Kontrola obrotu metabolicznego białek chloroplastów natomiast przejawia się w degradacji białek, które w określonym momencie spełniły już swoją rolę i przestają być potrzebne. Produkty takiego procesu mogą zostać przetransportowane do innych części rośliny i tam wykorzystane do budowy nowych związków; w szczególności dotyczy to degradacji białek chloroplastowych w trakcie starzenia liści. Przekonanie o doniosłości roli proteaz chloroplastowych jest powszechne, mimo iż rzeczywista wiedza na temat ich funkcji pozostaje w istocie bardzo fragmentaryczna. Także wiedza odnosząca się do struktury wyższego rzędu proteaz chloroplastowych jest bardzo skromna, zdecydowana większość informacji nie pochodzi bezpośrednio z doświadczeń, ale jest dedukowana w oparciu o wyniki uzyskiwane dla proteaz bakteryjnych, poznanych zdecydowanie lepiej.

Część proteaz chloroplastowych funkcjonuje w sposób zależny od ATP. Wszystkie one posiadają zachowaną w ewolucji domenę AAA⁺, co umieszcza te białka w rozbudowanej superrodzinie AAA⁺ (ang. *Atpases Associated with diverse cellular Activities*). Białka należące do tej rodziny biorą udział w wielu procesach zachodzących w komórkach bakteryjnych i eukariotycznych, m.in. w fuzji błon, biogenezie organeli, naprawie DNA, regulacji transkrypcji, apoptozie, kontroli cyklu komórkowego [12]. Domena AAA⁺ zawiera elementy strukturalne wiążące i hydrolizujące ATP, hydroliza ATP jest bowiem niezbędna, by umożliwić rozfałdowanie i translokację uszkodzonego (denaturowanego) białka – substratu przez ciasny otwór wejściowy do wnętrza komory katalitycznej enzymu, w obrębie której zachodzi właściwa degradacja. Niektóre spośród proteaz chloroplastowych zależnych od ATP są zbudowane w taki sposób, że domena AAA⁺ oraz właściwa domena katalityczna znajdują się w obrębie tego samego łańcucha polipeptydowego, w przypadku innych domeny te są umiejscowione w dwóch różnych łańcuchach polipeptydowych, należących do dwóch odrębnych białek współtworzących holoenzym [13,14]. Praca niniejsza podsumowuje aktualny stan wiedzy na temat struktury, funkcji i roli w życiu organizmu roślinnego przedstawicieli dwóch rodzin proteaz chloroplastowych zależnych od ATP – FtsH i Lon, na tle danych odnoszących się do ich bakteryjnych ortologów (będących u *E. coli* produktami genów *FTSH* i *LON*). Domena AAA⁺ i domena katalityczna cząsteczek tych proteaz jest zlokali-

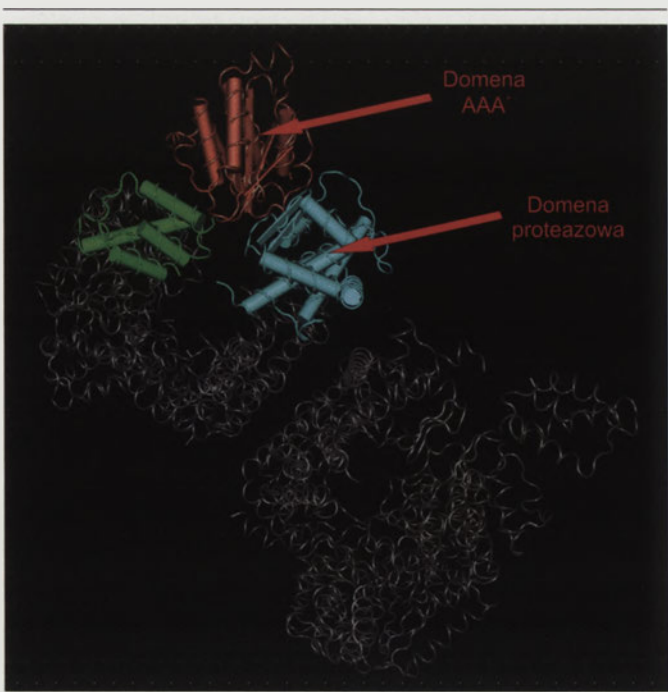
zowana w obrębie tego samego łańcucha polipeptydowego. Grupa proteaz chloroplastowych funkcjonujących w sposób nie wymagający wiązania i hydrolizy ATP została omówiona w towarzyszącej pracy przeglądowej.

BUDOWA I FUNKCJE BAKTERYJNYCH PROTEAZ FtsH

Proteaza FtsH (ang. *Filamentous temperature sensitive H*) z *E. coli* (w dalszej części rozdziału określana po prostu jako FtsH) jest najlepiej poznany i najbardziej typowym enzymem i dawcą nazwy rodziny „*FtsH peptidase (Escherichia coli)*”. Rodzinę tę (M41 według bazy Merops) tworzą enzymy, które łączy znaczący stopień podobieństwa sekwencji aminokwasowej do FtsH. M41 należy do klanu MA, grupującego metaloproteazy posiadające w swoim centrum katalitycznym motyw HEXXH, wiążący trzy jony Zn²⁺. Funkcję katalityczną pełnią cząsteczki wody związane z jonami Zn²⁺; dwa spośród tych jonów pozostają zasocjowane z resztami H [15], trzeci zaś z resztą E w pozycji 479 [16]. Pojedynczy polipeptyd FtsH ma długość 647 reszt aminokwasowych (71 kDa) i jest integralnym składnikiem błony komórkowej. Na jego strukturę składają się dwie hydrofilne domeny zlokalizowane w cytoplazmie - krótka, N-końcowa (pozycje 1-7) i długa, C-końcowa (pozycje 127-647), a także dwie transblonowe α-helisy położone blisko N-końca cząsteczki, spojone periplazmatyczną pętlą łączącą [17]. W obrębie cytoplazmatycznej domeny C-końcowej znajdują się rejon kluczkowe dla pełnienia przez cząsteczkę jej biologicznych funkcji - motyw wiążący i hydrolizujący ATP (domena AAA⁺ - pozycje 144-398) oraz centrum katalityczne (pozycje 417-421, Ryc. 1). W obrębie domeny AAA⁺ zlokalizowane są, przesuwając się w kierunku od N- do C-końca, charakterystyczne motywy - dwie zachowane w ewolucji ośmioaminokwasowe sekwencje określane jako Walker A i Walker B oraz tzw. rejon wtórnej homologii (SRH, ang. *Secondary Homology Region*). Obecność motywów Walker A i Walker B jest wspólną cechą budowy domeny AAA⁺ białek należących do superrodziny AAA⁺, ale rejon SRH jest w tej rodzinie czymś wyjątkowym; białka posiadające ten rejon wyróżnia się w obrębie superrodziny AAA⁺ jako grupę AAA. FtsH *E. coli* i innych bakterii jest jedynym prokaryotycznym reprezentantem grupy białek AAA [17].



Rycina 1. Schemat topografii cząsteczki FtsH *E. coli*. Dwie transblonowe α-helisy (TM) położone blisko N-końca cząsteczki są połączone krótką periplazmatyczną pętlą łączącą, a długa cytoplazmatyczna domena C-końcowa obejmuje domenę AAA⁺ oraz centrum katalityczne wiążące Zn²⁺ (HEXXH). Schemat opracowano w oparciu o dane zawarte w pracy [17].



Rycina 2. Struktura krystaliczna heksamerycznej cząsteczki FtsH *Thermotoga maritima*. Heksameryczną cząstkę holoenzymu tworzą dwa trimery, z których każdy zbudowany jest z połówki składającej się z domen AAA⁺ oraz z połówki składającej się z domen proteazowych. Domeny proteazowe trimerów są zwrócone do siebie. Zielonym kolorem oznaczono odcinek cząsteczki FtsH położony pomiędzy domeną AAA⁺ i domeną proteazową. MMDB ID: 37656, PDB ID: 2CEA.

Krzywda i wsp. [18] stworzyli model heksameru domeny AAA⁺ FtsH *E. coli* opierając się na podobieństwie sekwencji aminokwasowej tej domeny do sekwencji bakteryjnego białka NSF-D2 o dobrze rozpoznanej organizacji heksamerycznej [19]. Struktura krystaliczna FtsH została poznana w odniesieniu do FtsH innej eubakterii - *Thermotoga maritima* [20]. Uzyskane dane jednoznacznie dowodzą, iż holokompleks FtsH u tego gatunku jest heksamerem, który tworzą dwa trimericzne pierścienie. Każdy z dwóch pierścieni składa się z górnej połówki utworzonej przez trzy domeny AAA⁺ i dolnej, utworzonej przez trzy domeny proteazowe (Ryc. 2). Pierścienie są względem siebie zorientowane w taki sposób, że sześć domen proteazowych sąsiaduje ze sobą tworząc komorę katalityczną holoenzymu. Najprawdopodobniej także u innych bakterii, w tym *E. coli*, heksamer jest formą, w jakiej FtsH występuje *in vivo*, zgodnie z modelem Krzywdy i wsp.[18].

FtsH *E. coli* katalizuje degradację znacznej liczby substratów białkowych, wśród których są zarówno białka cytoplazmatyczne, jak i błonowe. Wśród substratów cytoplazmatycznych znaleziono między innymi dwa białka związane z homeostazą lipidów błonowych (lipooksygenaza i transferaza 3-dezoksy-D-manno-oktulozonanu), apoflawodoksyny, podjednostki RpoH polimerazy RNA mającej charakter białka szoku cieplnego, a także kilku białek ɔC bakteriofaga ɔ związanych z jego cyklem litycznym [21]. Degradując liczne cytoplazmatyczne białka własne oraz wirusowe FtsH odgrywa bardzo istotną rolę dla utrzymania homeostazy komórki poprzez kontrol  biosyntezy składników b lony komórkowej, ekspresji genów kodujących b laka szoku cieplnego i decyzji co do losów faga ɔ (liza/lizogenia). Lista b l ek b lonowych, których degradacj  katalizuje FtsH

jest nieco krótsza i obejmuje podjednostkę SecY translokazy SecYAE, podjednostkę α syntazy ATP oraz YccA, białko o nieznanym celu [22,23]. W każdym z tych przypadków rola FtsH polega na degradacji wspomnianych białek w sytuacji, gdy ich cząsteczki uległy denaturacji na skutek działania czynników stresowych lub nie zostały połączone z partnerami z tego samego kompleksu wielobiałkowego. Niewystępujące w formie kompleksów podjednostki wielobiałkowych kompleksów i denaturowane białka błonowe mogą agregować między sobą. Agregaty tego rodzaju są silnie toksyczne dla komórki, a zatem nie dopuszczając do agregacji FtsH okazuje się białkiem niezbędnym do przeżycia komórki *E. coli* w warunkach stresowych.

FtsH rozpoznaje rozpuszczalne substraty białkowe wykorzystując różne mechanizmy. W niektórych przypadkach sygnałem do degradacji jest tzw. znacznik SSrA, sekwencja zbudowana z jedenastu reszt aminokwasowych, dodawana do końca potencjalnego substratu białkowego, kiedy jego translacja zostaje zatrzymana [24]. Niekiedy sygnałami tymi mogą być inne C-końcowe sekwencje lub motywy znajdujące się wewnątrz struktury liniowej cząsteczki substratu [21]. Sądzi się, że degradacja rozpuszczalnych substratów z udziałem FtsH rozpoczyna się od oddziaływania cząsteczki sygnałowej z domeną AAA⁺ enzymu oraz pomiędzy domeną AAA⁺ oraz cząsteczką ATP. Motywy Walker A i B bezpośrednio rozpoznają i hydrolizują ATP, a motyw SRH miałby odgrywać rolę pomocniczą w przeprowadzaniu hydrolizy ATP. Według powszechnie akceptowanego modelu energia pochodząca z hydrolizy ATP jest wykorzystywana do rozkładania substratu i jego wprowadzenia przez wąski por w pierścieniu domen AAA⁺ do wnętrza komory katalitycznej, w której dochodzi do degradacji substratu [21]. FtsH działa w sposób procesywny, tzn. katalizuje degradację substratu na wiele fragmentów, przy czym C- lub N-koniec każdego kolejno powstającego fragmentu jest rozpoznawany jako miejsce startu następnej rundy hydrolizy. Degradacja substratów wbudowanych w błonę komórkową jest nieco bardziej złożona niż substratów rozpuszczalnych w związku z tym, że rejony transbłonowe i pętle periplazmatyczne tego rodzaju substratów przed rozpoczęciem degradacji nie kontaktują się ze zlokalizowanym w cytoplazmie centrum katalitycznym FtsH. Według Kihary i wsp. [25] w trakcie hydrolizy cząsteczka błonowego substratu podlega dyslokacji przez błonę w kierunku cytoplazmy (być może przez kanał, jaki mogą tworzyć odcinki transbłonowe FtsH), tak, że ostatecznie transbłonowe helisy i pętle periplazmatyczne substratu oddziałują z centrum katalitycznym enzymu. Dyslokacja ta najprawdopodobniej jest uzależniona od energii pochodzącej z hydrolizy ATP.

BUDOWA I FUNKCJE CHLOROPLASTOWYCH PROTEAZ FtsH

Genom jądrowy *A. thaliana* zawiera 12 genów kodujących białka FtsH ortologicznych względem FtsH *E. coli* [26]. Wszystkie dane opisane w dalszej części pracy odnoszą się do proteaz chloroplastowych FtsH *A. thaliana*, o ile nie wymieniono innego gatunku rośliny.

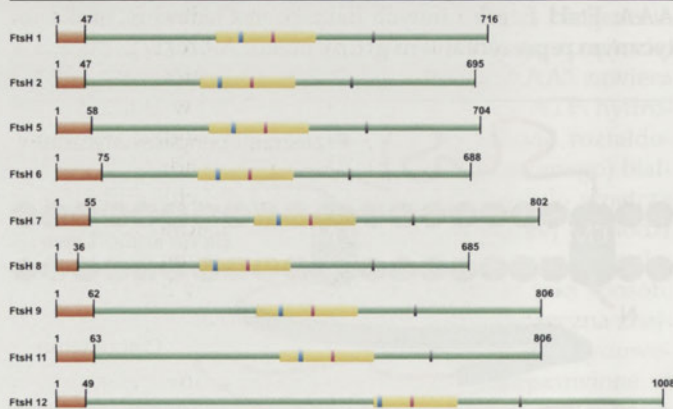
Sądzi się, że produkty białkowe FTSH1, FTSH2, FTSH5, FTSH 6, FTSH7, FTSH8, FTSH9, FTSH12 kierowane są do

chloroplastów, produkty FTSH3, 4 i 10 do mitochondriów, a izoforma FtsH11 jest kierowana zarówno do chloroplastów, jak i mitochondriów [27,28]. Produkty czterech genów kodujących chloroplastowe izoformy proteaz FtsH (1, 2, 5 i 8) zostały zidentyfikowane jako białka integralnie związane z błoną tylakoidową [27,29,30]. Akumulacji w błonach tylakoidów produktów pozostałych pięciu genów (FtsH6, 7, 9, 11 i 12) nie dowiedziano dotąd bezpośrednio metodami biochemicznymi, co może oznaczać, iż w błonach tylakoidów znajdują się bardzo niewielkie ilości tych enzymów.

Produkty genów FTSH1/5, FTSH2/8 oraz FTSH7/9 *A. thaliana* stanowią pary o znacznym stopniu podobieństwa sekwencyjnego, zaś FtsH6, 11 i 12 nie wykazują znaczącego podobieństwa ani do reprezentantów wspomnianych par, ani do siebie nawzajem [26]. Struktura wszystkich chloroplastowych izoform FtsH obejmuje dwie hydrofilowe domeny zlokalizowane w stromie chloroplastów, krótką, N-kończową i długą, C-kończową, a także dwie transbłonowe α -helisy położone blisko N-końca cząsteczki, połączone hydrofilową pętlą zlokalizowaną w świetle tylakoidu. W obrębie C-końcowej hydrofilowej domeny zlokalizowanej w stromie znajduje się domena AAA⁺ (wraz z rejonem SRH) oraz centrum katalityczne wiążące Zn²⁺ [29] (Ryc. 3).

BIAŁKA FtsH1, 2, 5, 8

Transkrypcja FTSH1, 2, 5 i 8 jest modulowana w odpowiedzi na niektóre krótkoterminowe (2,5 h) stresy, w najsilniejszym stopniu na podwyższone natężenie światła. Działanie tego stresu powodowało 2-20-krotne wzmocnienie (w zależności od genu) akumulacji transkryptów wszystkich genów kodujących te izoformy; niewielkie wzmocnienie akumulacji transkryptów FTSH2 i 8 obserwowano ponadto w odpowiedzi na krótkoterminową ekspozycję na podwyższoną temperaturę [30]. Sądzi się, że sens fizjologiczny wzmocnienia transkrypcji FtsH1, 2, 5 i 8 w warunkach krótkoterminowej ekspozycji na podwyższone natężenie światła i podwyższoną temperaturę polega na stworzeniu



Rycina 3. Rozmieszczenie domen AAA⁺, motywów wiążących Zn²⁺ oraz peptydów tranzytowych w liniowej strukturze cząsteczek prekursorów chloroplastowych proteaz z rodziny FtsH. W obrębie domen AAA⁺ (żółte kasety) zaznaczono położenie motywów Walker A (niebieskie kreski) i Walker B (różowe kreski). Peptydy tranzytowe oznaczono jako pomarańczowe kasety, a motywy wiążące Zn²⁺ jako szare kreski. Informacje o długości i sekwencji cząsteczek indywidualnych chloroplastowych proteaz z rodziny FtsH oraz o rozmieszczeniu domen AAA⁺, motywów Walker A, Walker B oraz lokalizacji motywów wiążących Zn²⁺ zaczerpnięto z bazy danych NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Długość peptydów tranzytowych określano z użyciem serwera Target P 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>).

warunków do podwyższonej akumulacji izoform FtsH1, 2, 5 i 8, podejmujących hydrolizę białek chloroplastowych, w masowej skali uszkodzonych działaniem tych krótkoterminowych stresów. W warunkach długoterminowej (5 h) ekspozycji na podwyższone natężenie światła nie obserwuje się jednak wzmocnienia akumulacji transkryptów *FTSH1*, 2, 5 i 8 (Adamiec i Jackowski, dane niepublikowane), co może oznaczać, że intensywna degradacja białek chloroplastowych uszkodzonych przez światło o podwyższonym natężeniu wymaga tylko krótkoterminowego, przejściowego podwyższenia ekspresji *FTSH1*, 2, 5 i 8.

Akumulacja gotowych białek FtsH1, 2, 5 i 8 podlega przestrzenno-czasowej koordynacji, najprawdopodobniej na poziomie montażu holoenzymu, a mianowicie brak jednej z izoform prowadzi do wzrostu podatności pozostałych izoform na degradację, co mogłoby skutkować niemożliwością uformowania holoenzymu pod nieobecność jakiegokolwiek izoformy. Udowodniono jednak, że *in vivo* FtsH1 może być zastępowana przez FtsH5 [31], a FtsH2 przez FtsH8 [32], tak więc do uformowania w pełni funkcjonalnego holoenzymu nie są niezbędne wszystkie cztery izoformy, wystarczy obecność dwóch spośród nich: FtsH1 lub FtsH5 oraz FtsH2 lub FtsH8. Poziom akumulacji FtsH1 i FtsH2 może być regulowany przez degradację ich cytoplazmatycznych prekursorów. Dowiedziono, że białko CHIP posiadające aktywność ligazy ubikwitynowej może katalizować ubikwitylację cząsteczek cytoplazmatycznych prekursorów FtsH1/FtsH2 i, kierując prekursory na szlak degradacji zależnej od proteasomów 26S, obniżać poziom dojrzałych form tych proteaz wewnątrz chloroplastu [33]. W normalnych warunkach FtsH2 jest najobficiej reprezentowaną spośród chloroplastowych izoform FtsH; FtsH5 to druga, FtsH8 trzecia, a FtsH1, czwarta izoforma co do poziomu akumulacji [30].

FtsH2 i 5 najprawdopodobniej tworzą w błonie tylakoidów heteroheksameryczny holoenzym, na co wskazuje wspólna migracja tych izoform podczas sączenia molekularnego jednej z frakcji zebranych po ultrawirowaniu w gradiencie sacharozy produktów upłynnienia błon tylakoidowych, a także wyniki koimmunoprecypitacji [27]. Z kolei analiza profili dwukierunkowej elektroforezy produktów upłynnienia błon tylakoidowych mutantów pozbawionych FtsH1 i FtsH2 może sugerować, że w skład heteroheksamerycznego holoenzymu mogą wchodzić wszystkie cztery omawiane izoformy FtsH [32]. Żadnej z proteaz FtsH1/2/5/8 (ani żadnej innej proteazy chloroplastowej) nie udało się dotąd wykrystalizować, trudno zatem snuć przypuszczenia co do ewentualnego podobieństwa strukturalnego potencjalnych heteroheksamerów FtsH1/2/5/8 i homoheksameru FtsH *Thermotoga maritima*.

Poszukiwania fizjologicznych substratów białkowych dla FtsH1, 2, 5 i 8 wśród białek chloroplastowych przyniosły raczej skromne rezultaty, prawie wyłącznie odnoszące się do degradacji, do jakiej dochodzi w liściach w odpowiedzi na warunki stresowe. Wyniki badań *in vitro* z wykorzystaniem rekombinowanego białka FtsH1 sugerują mianowicie, że izoforma ta odgrywa istotną rolę w hydrolizie białka PsbA (D1) uszkodzonego podczas ekspozycji rośliny na podwyższone natężenie światła. Rola ta miałaby polegać na degradacji N-końcowego fragmentu białka o wielkości

23 kDa, powstającego przez nacięcie uszkodzonego PsbA w obrębie pętli DE eksponowanej do stromy [34]; o zainicjowanie nacięcia uszkodzonego PsbA podejrzewana jest proteaza Deg2 [35]. Wyniki innych badań sugerują wszakże, iż raczej FtsH2 lub FtsH5, a nie FtsH1 mogą być odpowiedzialne za degradację uszkodzonego PsbA w warunkach ekspozycji na podwyższone natężenie światła. Wskazywałaby na to podwyższona wrażliwość na fotoinhibicję *in vivo* mutantów pozbawionych izoform FtsH2(*var2*) i FtsH5(*var1*) w stosunku do roślin szczepu dzikiego [36] i brak różnic we wrażliwości na fotoinhibicję pomiędzy szczepem dzikim i mutantem pozbawionym izoformy FtsH1 [26]. Podwyższona wrażliwość może być skutkiem niezdolności mutantów *var1* i *var2* do degradacji uszkodzonego PsbA i tym samym ich niezdolności do przeprowadzania pełnego cyklu naprawczego fotosystemu II (PS II). Sugeruje się, że któraś z izoform FtsH1/2/5/8 może być także odpowiedzialna za degradację cząsteczek białka Rieskego niezasocjowanych z innymi składnikami kompleksu cytochromowego b6f, akumulujących się w warunkach doświadczalnych *in vitro* na powierzchni błony tylakoidowej, od strony stromy [37]. Rekombinowana FtsH1 posiada ponadto zdolność do trawienia *in vitro* нефизjologicznego substratu - β -kazeiny [34]. Nie dysponujemy żadnymi informacjami odnoszącymi się do molekularnych mechanizmów hydrolizy białek katalizowanej przez FtsH1/2/5/8 (ani, tym bardziej przez inne chloroplastowe izoformy FtsH), w tym żadnymi porównaniami aktywności degradacyjnej *in vivo* względem białek integralnych i peryferycznych błony tylakoidowej.

Istotną rolę w poznaniu znaczenia FtsH1/2/5/8 dla funkcjonowania chloroplastu i całego organizmu roślinnego przypisuje się wynikom badań nad fenotypem mutantów pozbawionych tych proteaz, rosnących w komfortowych warunkach środowiskowych. Najwięcej informacji przyniosły badania nad mutantami *var2* (*ftsH2*) i *var1* (*ftsH5*), ponieważ wyciszenie *FTSH2* i *FTSH5* prowadzi do poważnych efektów fenotypowych, co ma oczywisty związek przyczynowo-skutkowy z wysokim poziomem akumulacji FtsH2 i FtsH5 w roślinach szczepu dzikiego (mutanty *ftsH1* oraz *ftsH8* nie są nosicielami żadnych fenotypowych różnic względem roślin szczepu dzikiego) [27].

Mutant *ftsH2*, określane także jako *var2* (ang. *yellow-variegated1*) cechuje się pstrolistnością, tzn. obecnością na blaszce liściowej zielonych i białko-żółtych sektorów [38-41]. Liście *var2* wyglądają jak u roślin typu dzikiego, jednak pierwszy rozwijający się liść jest w większości przypadków biały. Później rozwijające się liście są pstre, białko-żółto-zielone z nieco malejącym wraz z upływem czasu stosunkiem powierzchni sektorów białko-żółtych do powierzchni sektorów zielonych. Zielone sektory zawierają chloroplasty o normalnej ultrastrukturze, podczas gdy zdecydowana większość plastydów w białych sektorach to struktury silnie zwakuolizowane, z bardzo słabo rozwiniętym systemem błon wewnętrznych, co oznacza, że FtsH2 odgrywa istotną rolę we wczesnych stadiach biogenezy tych błon [38,42]. Chloroplasty komórek zielonych sektorów *var2* funkcjonują w warunkach stresu fotooksydacyjnego, wzmacnianego przez ekspozycję rośliny na światło o podwyższonym natężeniu. Warunki stresowe prowadzą do wzmocnienia ekspresji genów kodujących izoformy mitochondrialnej alternatywnej

oksydazy, a to oznacza, że FtsH2 odgrywa także istotną rolę w ekspresji genów mitochondrialnych związanych z metabolizmem oddechowym [43].

Fenotyp mutantu *ftsH5*, określanego także jako *var1* jest podobny do *var2*, ale słabiej wyrażony [44], co ma bezpośredni związek z niższym poziomem akumulacji FtsH5 *in vivo* [30]. Wygląd liścieni jest taki sam, jak u szczepu dzikiego, jednak już pierwsze prawdziwe liście są pstre. W kolejno rozwijających się liściach liczba biało-żółtych sektorów przypadających na każdy liść zmniejsza się wraz z upływem czasu tak, że dojrzała roślina jest nieodróżnialna od rośliny typu dzikiego [44]. Kształt liści pozostaje niezmienny w stosunku do roślin szczepu dzikiego. Komórki występujące w zielonych sektorach zawierają chloroplasty o niezmiennionej strukturze tylakoidów i stosów granowych. W porównaniu ze szczepem dzikim występuje zwiększona liczba plastoglobuli [44]. Podobnie jak w przypadku mutantu *var2* komórki sektorów białych są pozbawione funkcjonalnych chloroplastów, zawierają natomiast anormalne plastydy o bardzo słabo rozwiniętym systemie błon tylakoidowych. Obserwacje te wskazują zatem, że FtsH5 jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju systemu tylakoidowego chloroplastu, podobnie jak FtsH2 [44].

BIAŁKA FtsH6, 7, 9, 11, 12

Transkrypcja *FTSH7,9* i *12* jest wzmacniana 2-4 razy (w zależności od genu) w odpowiedzi na krótkoterminową (2,5 h) ekspozycję rośliny na podwyższone natężenie światła [30], natomiast w warunkach długoterminowej ekspozycji roślin na podwyższone natężenie światła (5 h) nie obserwuje się wzmocnienia transkrypcji (Adamiec i Jackowski, dane niepublikowane).

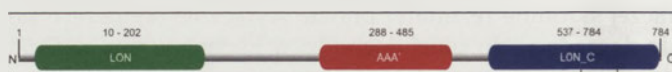
Wyniki badań z wykorzystaniem mutantów *ftsH6* dowiodły, że wśród fizjologicznych substratów dla FtsH6 znajdują się Lhcb1 i Lhcb3, apobiałka LHCII - głównej peryferycznej anteny energetycznej fotosystemu II. FtsH6 katalizuje degradację Lhcb1, do jakiej dochodzi w ciągu 24 h ekspozycji roślin na podwyższone natężenie światła i jest odpowiedzialna za degradację Lhcb3 związaną przyczynowo-skutkowo ze starzeniem się indywidualnie zaciemnianych liści [45,46]. W przypadku Lhcb1 rola FtsH6 polega najprawdopodobniej na rozpoznawaniu zmienionej pod działaniem stresu struktury drugo- i trzeciorzędowej tego apobiałka i katalizowaniu jego hydrolizy. Z kolei w odniesieniu do Lhcb3 sugeruje się, że w toku starzenia liści apobiałko to staje się podatne na degradację w wyniku hydrolizy białek blokujących FtsH dostęp do Lhcb3. Hydrolizę tę miałyby katalizować niezidentyfikowane jeszcze proteazy, działające w sposób zależny od starzenia [46,47]. Trudno ocenić jaką rolę odgrywa FtsH6 dla funkcjonowania chloroplastu i całej rośliny w komfortowych warunkach środowiskowych, ponieważ fenotyp mutantów *ftsH6* jest w takich warunkach nieodróżnialny od roślin szczepu dzikiego [27,46].

Nie udało się dotąd zidentyfikować żadnego fizjologicznego substratu dla FtsH7, 9, 11 i 12. Pewne dane odnoszące się do roli w funkcjonowaniu rośliny w komfortowych i stresowych warunkach środowiskowych zgromadzono jedynie dla FtsH11. Analiza fenotypu mutantów *ftsH11* dowiodła,

że prawidłowe działanie tego enzymu jest niezbędne dla kształtowania się odporności rośliny na umiarkowanie i znacznie podwyższoną temperaturę oraz dla nabywania termotolerancji [48]. Co ciekawe, ekspozycja rośliny na podwyższoną temperaturę nie skutkuje stymulacją transkrypcji *FTSH11* [30]. FtsH11 jest kierowany zarówno do chloroplastów jak i mitochondriów [28], dlatego można zakładać, że defekty wywołane brakiem tego enzymu dotyczą zarówno mitochondriów jak i chloroplastów, a ich suma prowadzi do nadwrażliwości mutantów *ftsH11* na podwyższoną temperaturę.

BUDOWA I FUNKCJE BAKTERYJNYCH PROTEAZ LON

Proteaza Lon z *E. coli* (w dalszej części rozdziału określane po prostu jako Lon) jest najlepiej poznany i najbardziej typowym enzymem i dawcą nazwy rodziny „*lon protease family*”. Rodzinę tę (S16 według bazy Merops) tworzą enzymy, które łączy znaczący stopień podobieństwa sekwencji aminokwasowej do Lon. S16 należy do klanu SJ, obejmującego trzy rodziny endopeptydaz serynowych, których centrum katalityczne stanowi diada S-K. Funkcję katalityczną pełni grupa hydroksylowa reszty seryny [49,50]. Pojedynczy polipeptyd Lon ma długość 784 reszt aminokwasowych i jest rozpuszczalnym białkiem cytoplazmatycznym (87 kDa). W jego strukturze można zidentyfikować trzy zachowane w ewolucji, hydrofilne domeny: N-końcowa (zwana N lub LON, reszty 10-202), centralnie umiejscowiona domena AAA⁺ (reszty 288-485) oraz C-końcowa domena zwana P lub LON_C (reszty 537-784) (Ryc. 4). Domena LON prawdopodobnie uczestniczy w rozpoznawaniu i wiązaniu substratów, domena AAA⁺ pełni funkcję ATPazy (wiązanie i hydroliza ATP), a C-końcowa domena (zwana P lub LON C) jest domeną proteolityczną [49]. Domena AAA⁺ cząsteczki Lon obejmuje dwa moduły strukturalne określane jako α/β (N-końcowy) i α (C-końcowy). W obrębie modułu α/β odnajdujemy motywy Walker A i Walker B charakterystyczne dla wszystkich białek posiadających domenę AAA⁺, a także inne ugrupowania funkcjonalne, istotne dla efektywnego wiązania i hydrolizy ATP, a mianowicie „sensor-1” i „palec arginiowy”. Z kolei w obrębie modułu α umiejscowiony jest motyw „sensor-2” [51]. W oparciu o wyniki analizy rentgenostrukturalnej kryształów domeny proteolitycznej (którą oczyszczono przez wytrawienie chymotrypsyną z kompletnej, rekombinowanej cząsteczki Lon) zaproponowano, że holoenzym tworzy *in vivo* strukturę homoheksameryczną z modulem α jako pośrednikiem w oddziaływaniach monomerów w obrębie heksameru. Sześć domen proteolitycznych formuje w przestrzeni strukturę o kształcie spłaszczonej półkuli; węższe ujęcie półkuli tworzą N-końce domeny, a sześć diad katalitycznych znajduje się w obrębie kanału łączącego oba ujścia półkuli, mającego charakter komory katalitycznej [49].



Rycina 4. Rozmieszczenie domen charakterystycznych dla rodziny S16 (według klasyfikacji stosowanej w bazie danych Merops) w liniowej strukturze cząsteczki proteazy Lon *Escherichia coli*. Domena LON uczestniczy w rozpoznawaniu i wiązaniu substratów, domena AAA⁺ pełni funkcję ATPazy (wiązanie i hydroliza ATP), a LON C jest domeną proteazową. Czerwone romby oznaczają diadę katalityczną S-K. Schemat opracowano w oparciu o dane zawarte w bazie NCBI.

Bakteryjna proteaza Lon uczestniczy w degradacji cytoplazmatycznych białek uszkodzonych wskutek działania niekorzystnych czynników środowiskowych (np. białek o niewłaściwej długości łańcucha polipeptydowego bądź niewłaściwej strukturze trzeciorzędowej), a ponadto jest zaangażowana w obrót metaboliczny krótkożyjących białek regulatorowych, których specyficzna i szybka degradacja jest kluczowym zjawiskiem dla prawidłowego wzrostu komórek (np. SulA - czynnika wstrzymującego przedwczesną segregację uszkodzonego DNA do komórek potomnych podczas procesu naprawczego DNA) [52].

Nie ma, jak dotąd, jednoznacznych informacji na temat tożsamości motywów nadających cząsteczkom białek podatność na degradację ze strony Lon. Istniejące dane sugerują, że istotną rolę w rozpoznawaniu i wiązaniu substratów odgrywa N-końcowa domena LON cząsteczki, a także moduł α domeny AAA⁺ [53], podczas gdy motywy Walker A, Walker B, „sensor-1” i „palec arginiowy” uczestniczą w wiązaniu i hydrolizie ATP, niezbędnej dla wprowadzenia substratu do wnętrza komory katalitycznej [51,54].

BUDOWA I FUNKCJE CHLOROPLASTOWYCH PROTEAZ LON

Genom jądrowy *A. thaliana*, zawiera cztery geny ortologiczne względem Lon *E. coli*. Produkt LON1 jest kierowany do mitochondriów, LON2 do peroksysomów, LON4 zarówno do chloroplastów jak i mitochondriów, a LON3 jest najprawdopodobniej pseudogenem [55, 56]. Natomiast wiedza na temat budowy i funkcji Lon4 jest nadzwyczaj skromna i ogranicza się do informacji, że poziom transkrypcji genu kodującego to białko jest dość niski, a wewnątrzchloroplastowa pula enzymu pozostaje związana silnymi oddziaływaniami z błoną tylakoidową od strony stromy [56].

PIŚMIENNICTWO

- Ishida H, Makino A, Mae T (1999) Fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species occurs near Gly-329. *J Biol Chem* 274: 5222-5226
- Clarke A (2005) Plant proteases – an appetite for destruction. *Physiol Plant* 123: 359-361
- Bachmair A, Finley D, Varshavsky A (1986) *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234: 179-196
- Jadhav T, Wooten MW (2009) Defining an embedded code for protein ubiquitynylation. *J Proteomics Bioinform* 2: 316-333
- Rogers S, Wells R, Rechtsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-368
- Won KA, Reed SI (1996) Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *EMBO J* 15: 4182-4193
- Vierstra RD (2009) The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Rev* 10: 385-397
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsuni Y, Olsen L, Yoshimoto K (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* 2: 2-11
- Shimada T, Yamada K, Kataoka M, Nakaune S, Koumoto Y, Kuroyanagi M, Tabata S, Kato T, Shinozaki K, Seki M, Kobayashi M, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2003) Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 278: 32292-32299
- Liu X, Jagendorf A (1984) ATP-dependent proteolysis in pea chloroplasts. *FEBS Lett* 166: 248-252

- Liu X, Jagendorf A (1986) Neutral peptidases in the stroma of pea chloroplasts. *Plant Physiol* 81: 603-608
- Ogura T, Wilkinson AJ (2001) AAA⁺ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes Cells* 6: 575-597
- Sauer RT, Bolon D, Burton BM, Burton RE, Flynn JM, Grant RA, Hersch GL, Joshi SA, Kenniston JA, Levchenko I, Neher SB, Oakes ES, Siddiqui SM, Wah DA, Baker TA (2004) Sculpting the proteome with AAA⁺ proteases and disassembly machines. *Cell* 119: 9-18
- Adam Z, Rudella A, van Wijk KJ (2006) Recent advances in the study of Clp, FtsH and other proteases located in chloroplasts. *Curr Opin Plant Biol* 9: 23-34
- Tomoyasu T, Gamer J, Bukau B, Kanemori M, Mori H, Rutman AJ (1995) *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor σ^{32} . *EMBO J* 14: 2551-2560
- Saikawa N, Ho K, Akiyama Y (2002) identification of glutamic acid 479 as the gluzincin coordinator of zinc in FtsH (HflB). *Biochemistry* 41: 1861-1868
- Narberhaus F, Obrist M, Fuhrer F, Langklotz S (2009) Degradation of cytoplasmic substrates by FtsH, a membrane-anchored protease with many talents. *Res Microbiol* 160: 652-659
- Krzywda S, Brzozowski AM, Verma C, Karata K, Ogura T, Wilkinson A (2002) The crystal structure of the AAA domain of the ATP-dependent protease FtsH of *Escherichia coli* at 1.5Å resolution. *Structure* 10: 1073-1083
- Lenzen CU, Steinmann D, Whiteheart SW, Weis WI (1998) Crystal structure of the hexamerization domain at N-methylmaleimidesensitive fusion protein. *Cell* 94: 525-536
- Bieniossek C, Niederhauser B, Baumann UM (2009) The crystal structure of apo-FtsH reveals domain movements necessary for substrate unfolding and translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 21579-21584
- Narberhaus F, Obrist M, Fuhrer F, Langklotz S (2009) Degradation of cytoplasmic substrates by FtsH, a membrane-anchored protease with many talents. *Res Microbiol* 160: 652-659
- Akiyama Y, Kihara A, Tokuda H, Ito K (1996) FtsH(HflB) is an ATP-dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins. *J Biol Chem* 271: 31196-31201
- Akiyama Y, Kihara A, Ito K (1996) Subunit α of proton ATPase F_0 sector is a substrate of the FtsH protease in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 399: 26-28
- Herman C, Thevenet D, Boulloc P, Walker GC, D'Ari R (1998) Degradation of carboxyterminal- targeted cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). *Genes Dev* 12: 1348-1355
- Kihara A, Akiyama Y, Ito K (1999) Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. *EMBO J* 18: 2970-2981
- Adam Z, Zaltsman A, Sinvany-Villalobo G, Sakamoto W (2005) FtsH proteases in chloroplasts and cyanobacteria. *Physiol Plant* 123: 386-390
- Sakamoto W, Zaltsman A, Adam Z, Takahashi Y (2003) Coordinated regulation of and complex formation of *yellow-variegated1* and *yellow-variegated2* chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes. *Plant Cell* 15: 2843-2855
- Urantowska A, Knorpp C, Olczak T, Kołodziejczak M, Jańska H (2005) Plant mitochondria contain two i-AAA-like complexes. *Plant Mol Biol* 59: 239-252
- Lindahl M, Tabak S, Cseke L, Pichersky E, Andersson B, Adam Z (1996) Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsH protease in chloroplasts of higher plants. *J Biol Chem* 271: 29329-29334
- Sinvany-Villalobo G, Davydov O, Ben-Ari G, Zaltsman A, Raskind A, Adam Z (2004) Expression in multigene families. Analysis of chloroplast and mitochondria proteases. *Plant Physiol* 135: 1336-1345
- Yu F, Park S, Rodermel SR (2005) Functional redundancy of AtFtsH metalloproteases in thylakoid membrane complexes. *Plant Physiol* 138: 1957-1966
- Yu F, Park S, Rodermel SR (2004) The *Arabidopsis* FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *Plant J* 37: 864-876
- Shen G, Zach A, Zhang H (2007) The E3 ligase AtCHIP ubiquitynylates FtsH1, a component of the chloroplast FtsH protease, and affects protein degradation in chloroplasts. *Plant J* 52: 309-321

34. Lindahl M, Spetea C, Hundal T, Oppenheim AB, Adam Z, Andersson B (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* 12: 419-431
35. Haussuhl K, Andersson B, Adamska I (2000) A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO J* 20: 713-722
36. Bailey S, Thompson E, Nixon PJ, Horton P, Mullineaux CW, Robinson C, Mann NH (2002) A critical role of the Var2 FtsH homologue of *Arabidopsis thaliana* in the photosystem II repair cycle *in vivo*. *J Biol Chem* 277: 2006-2011
37. Ostersetzer O, Adam Z (1997) Light-stimulated degradation of an unassembled Rieske FeS protein by a thylakoid-bound protease: the possible role of the FtsH protease. *Plant Cell* 9:957-965
38. Chen M, Choi YD, Voytas D, Roderick S (2000) Mutations in the *Arabidopsis thaliana* VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplastic FtsH protease. *Plant J* 22: 303-313
39. Martinez-Zapater JM (1993) Genetic analysis of variegated mutants in *Arabidopsis*. *J Hered* 84: 138-140
40. Sakamoto W (2003) Leaf-variegated mutations and their responsible genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet Syst* 78: 1-9
41. Takechi K, Sodmergen, Murata M, Motoyoshi F, Sakamoto W (2000) The yellow variegated (VAR2) locus encodes a homologue of FtsH, an ATP-dependent protease in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 41: 1334-1346
42. Kato Y, Miura E, Matsushima R, Sakamoto W (2007) White leaf sectors in *yellow-variegated2* are formed by viable cells with undifferentiated plastids. *Plant Physiol* 144: 952-960
43. Yoshida K, Watanabe C, Kato Y, Sakamoto W, Noguchi K (2008) Influence of chloroplastic photo-oxidative stress on mitochondrial alternative oxidase capacity and respiratory properties: a case study with *Arabidopsis yellow-variegated 2*. *Plant Cell Physiol* 49: 592-603
44. Sakamoto W, Tamura T, Hanba-Tomita Y, Sodmergen, Murata M (2002) The VAR1 locus of *Arabidopsis* encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles. *Genes to Cells* 7: 769-780
45. Garcia-Lorenzo M, Zelisko A, Jackowski G, Funk C (2005) Degradation of the main photosystem II light-harvesting complex. *Photochem Photobiol Sci* 4: 1065-1071
46. Zelisko A, Garcia-Lorenzo M, Jackowski G, Jansson S, Funk C (2005) AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13699-13704
47. Zelisko A, Jackowski G (2004) Senescence-dependent degradation of Lhcb3 is mediated by a thylakoid membrane-bound protease. *J Plant Physiol* 161: 1157-1170
48. Chen J, Burke JJ, Velten J, Xin Z (2006) FtsH11 plays a critical role in *Arabidopsis* thermotolerance. *Plant J* 48: 73-84
49. Botos I, Melnikov E, Cherry S, Tropea JE, Khalatova A, Rasulova F, Dauter Z, Maurizi MR, Rotanova TV, Wlodawer A, Gutchina A (2004) The catalytic domain of *Escherichia coli* Lon protease has a unique fold and Ser-Lys dyad in the active site. *J Biol Chem* 279: 8140-8148
50. Rotanova TV, Melnikov EE, Tsiurulnikov KB (2003) A catalytic Ser-Lys Dyad in the active site of the ATP-dependent Lon protease from *Escherichia coli*. *Bioorg Khim* 20: 114-125
51. Botos I, Melnikov E, Cherry S, Khalatova A, Rasulova F, Tropea JE, Maurizi MR, Rotanova TV, Gutchina A, Wlodawer A (2004) Crystal structure of the AAA⁺ domain of *E. coli* Lon protease at 1.9 Å resolution. *J Struct Biol* 146: 113-122
52. Nishii W, Maruyama T, Matsuo R, Muramatsu T, Takahashi K (2002) The unique sites in SulA protein preferentially cleaved by ATP-dependent Lon protease from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 269: 451-457
53. Smith CK, Baker TA, Sauer RT (1999) Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6678-6682
54. Hattendorf DA, Lindquist SI (2002) Analysis of the AAA sensor-2 motif in the C-terminal ATPase domain of Hsp104 with a site-specific fluorescent probe of nucleotide binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2732-2737
55. Ostersetzer O, Kato Y, Adam Z, Sakamoto W (2007) Multiple intracellular locations of Lon protease in *Arabidopsis*: evidence for the localization of AtLon4 to chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 48: 881-885
56. Rigas S, Daras S, Laxa M, Marathias N, Fasseas C, Sweetlove LJ, Hatzopoulos P (2007) Role of Lon1 protease in post-germinative growth and maintenance of mitochondria function in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 181: 588-600

ATP-dependent FtsH and Lon chloroplast proteases

Małgorzata Baranek, Magda Grabsztunowicz, Bogna Sikora, Grzegorz Jackowski✉

Department of Plant Physiology, Institute of Experimental Biology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, 89 Umultowska St., 61-614 Poznań, Poland

✉e-mail: grzesiek@amu.edu.pl

Key words: AAA⁺ domain, chloroplast, hydrolysis, FtsH family, Lon family, protease

ABSTRACT

Arabidopsis thaliana proteome contains 667 proteases; some tens of them are chloroplast-targeted proteins, encoded by genes orthologous to the ones coding for bacterial proteolytic enzymes. It is thought that chloroplast proteases are involved in chloroplasts' proteins turnover and quality control (maturation of nucleus-encoded proteins and removal of nonfunctional ones). Some ATP-dependent chloroplast proteases belonging to FtsH family (especially FtsH2 and FtsH5) are considered to be involved in numerous aspects of chloroplast and whole plant maintenance under non-stressing as well as stressing conditions. This notion is supported by severe phenotype appearance of mutants deficient in these proteases. In contrast to seemingly high physiological importance of chloroplast members of FtsH protease family, only a few individual proteins have been identified so far as their physiological targets (i.e. Lhcb1, Lhcb3, PsbA and Rieske protein). Our knowledge regarding structure and molecular mechanisms of these enzymes' action is limited when compared with what is known about FtsHs of bacterial origin. Equally limited is the knowledge about ATP-dependent Lon4 protease being the single known chloroplast-targeted ortholog of Lon protease of *Escherichia coli*.

STRESZCZENIE

Część proteaz chloroplastowych nie wymaga dla swej aktywności enzymatycznej wiązania i hydrolizy ATP, prawdopodobnie dlatego, że do komory katalitycznej tych proteaz mogą wnikać substraty nie wymagające efektywnego rozfałdowania, zależnego od ATP. Najlepiej poznanymi niezależnymi od ATP proteazami chloroplastowymi są cztery przedstawiciele grupy Deg (ang. *degradation*; Deg1, 2, 5 i 8), białka kodowane u *Arabidopsis thaliana* przez geny ortologiczne względem genów kodujących proteazy DegP, DegQ i DegS *Escherichia coli*. Wiedza na temat budowy i funkcji proteaz chloroplastowych Deg jest znacznie skromniejsza od wiedzy odnoszącej się do bakteryjnych proteaz Deg. Proteazy Deg5 i Deg8 tworzą heterododekamer związany z błoną tylakoidu od strony światła tylakoidu, katalizujący, we współpracy z Deg1 i którąś z proteaz z rodziny FtsH, degradację białka PsbA uszkodzonego na skutek ekspozycji rośliny na światło o podwyższonym natężeniu. W ten sposób wspomniane proteazy uczestniczą w mechanizmie odporności roślin na fotoinhibicję. Rola proteazy Deg2 w degradacji uszkodzonego PsbA nie została jednoznacznie wyjaśniona. Rekombinowana Deg1 katalizuje także reakcję degradacji PsbO i plastocyaniny *in vitro*, ale nie ma pewności czy aktywność ta występuje *in vivo*.

WPROWADZENIE

W niektórych przedziałach komórki roślinnej, chloroplastach, mitochondriach, peroksosomach i świetle siateczki śródplazmatycznej, funkcjonują autonomiczne proteazy składające się, wraz z enzymami proteolitycznymi proteasomów 26S i wakuoli litycznych (autofagia), na system enzymatycznej degradacji białek komórkowych. Szereg genów jądrowych *Arabidopsis thaliana* kodujących proteazy kierowane do chloroplastu wykazuje ortologię względem genów kodujących proteazy bakteryjne, co tłumaczy się, na gruncie hipotezy endosymbiotycznego pochodzenia chloroplastów, jako wynik tasowania się materiału genetycznego praeukariotycznego gospodarza z materiałem praprokariotycznego endosymbionta, w wyniku czego część genów endosymbionta została przeniesiona do genomu gospodarza. Stan zaawansowania badań nad strukturą i rolą fizjologiczną proteaz chloroplastowych w życiu rośliny jest bardzo skromny [1], co uderzająco kontrastuje ze znaczną wiedzą jaką udało się zbudować w odniesieniu do proteaz bakteryjnych [2].

Część spośród proteaz chloroplastowych funkcjonuje w sposób zależny od ATP. Stan wiedzy na temat ich struktury, funkcji i roli w życiu organizmu roślinnego został zrelacjonowany w towarzyszącej pracy przeglądowej. Wśród proteaz chloroplastowych, o których dysponujemy pewną wiedzą, jest jednak także grupa Deg (u *A. thaliana* geny jądrowe, które je kodują są ortologiczne względem *DEGP*, *DEGQ* i *DEGS* *E. coli*), do której należą enzymy funkcjonujące w sposób niezależny od ATP. Proteazy Deg *E. coli* katalizują degradację białek nie posiadając zdolności do wiązania i hydrolizy ATP, mimo iż model ich struktury czwartorzędowej wykazuje pewne podobieństwo do modelu struktury czwartorzędowej zależnych od ATP proteaz *E. coli* z rodzin FtsH i Lon (Deg, FtsH i Lon są proteazami beczkokształtnymi), co więcej zdenaturowane substraty białkowe muszą zostać rozfałdowane by móc dostać się do komory katalitycznej holoenzymu Deg tak, jak w przypadku FtsH i Lon. Powody, dla których proteazy Deg „obywają się”, w odróżnieniu od FtsH i Lon, bez wiązania i hydrolizy ATP nie zostały w pełni wyjaśnione. Najprawdopodobniej kluczowe znaczenie ma fakt, że kanały w strukturze holoenzymu Deg prowadzące do wnętrza komory katalitycznej są znacznie szersze w porównaniu do analogicznych kanałów w strukturze FtsH i Lon. Oznaczałoby to bowiem, że białka, substraty Deg, nie muszą być dokładnie rozfałdowane (a do dokładnego rozfałdowania byłaby niezbędna energia pochodząca z hydrolizy ATP) by móc precyzyjnie się do komory katalitycznej [3]. Praca niniejsza stanowi podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat struktury, funkcji i roli w życiu organizmu roślinnego proteaz chloro-

Magda Grabsztunowicz

Robert Luciński

Małgorzata Baranek

Bogna Sikora

Grzegorz Jackowski✉

Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

✉Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; tel.: (61) 829 58 91, e-mail: grzesiek@amu.edu.pl

Artykuł otrzymano 1 kwietnia 2010 r.
Artykuł zaakceptowano 10 czerwca 2010 r.

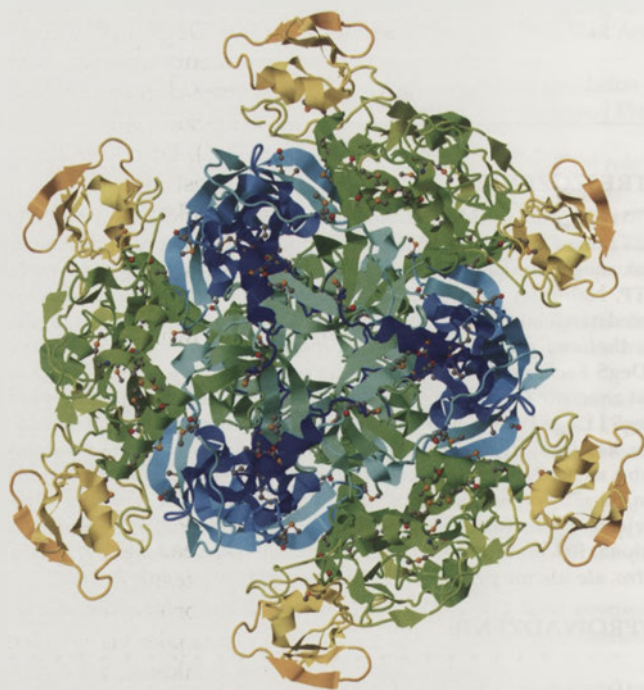
Słowa kluczowe: chloroplast, Deg, hydroliza, domena PDZ, proteaza

plastowych Deg, kodowanych u *A. thaliana* przez geny ortologiczne względem *DEGP*, *DEGQ* i *DEGS* *E. coli*.

BUDOWA I FUNKCJE BAKTERYJNYCH PROTEAZ DEG

DegP z *E. coli* (w dalszej części rozdziału określana po prostu jako DegP) jest najlepiej poznanym bakteryjnym reprezentantem obszernej rodziny S1 proteaz typu serynowego. Rodzinę tę tworzą enzymy wykazujące znaczący stopień podobieństwa sekwencji aminokwasowej do holotypu, chymotrypsyny A z wołu (*Bos taurus*). DegP należy do klanu PA, w skład którego wchodzi proteazy serynowe charakteryzujące się posiadaniem centrum katalitycznego w formie triady HDS. Funkcję katalityczną pełnią grupy -OH reszty seryny (S) oraz cząsteczki wody związane z ugrupowaniem imidazolowym reszty histydyny (H) [4]. Pojedynczy polipeptyd DegP ma długość 448 reszt aminokwasowych (46,8 kDa), jest cząsteczką o charakterze hydrofilnym, zlokalizowaną w periplazmie. Na strukturę DegP składają się N-końcowe domeny proteazowe (reszty 1- 259) oraz dwie domeny PDZ (skrót PDZ pochodzi od nazw trzech białek: PSD-95 (ang. *Post Synaptic Density protein*), Dlg oraz ZO-1) – PDZ1 (reszty 260- 358) i PDZ2 (reszty 359- 448). W skład domeny proteazowej wchodzi kluczowa dla sprawowania przez enzym jego funkcji katalitycznej triada HDS – H (reszta 105), D (reszta 135) i S (reszta 210), z kolei domeny PDZ zawierają zachowane w ewolucji motywy umożliwiające oddziaływanie cząsteczki enzymu z C-końcem substratów [5]. Struktura krystaliczna DegP została poznana dzięki analizie kryształów rekombinowanego enzymu; uzyskane dane wskazują, że holoenzym jest beczkowskkształtnym heksamerem zbudowanym z dwóch trimerycznych pierścieni (Ryc. 1) [6]. Wnętrze heksameru stanowi komora katalityczna, do której eksponowane są aktywne katalitycznie reszty aminokwasowe domeny proteazowej; inne odcinki domeny proteazowej budują wieczko i dno heksameru. Ze względu na to, że odcinki te są bardzo ściśle upakowane [6] zasugerowano, że droga substratów do wnętrza komory katalitycznej prowadzi nie przez wieczko i denko, ale boczne ściany beczki, które buduje sześć domen PDZ1 i sześć domen PDZ2. Najnowsze dane sugerują, że w obecności substratów DegP może, poprzez stymulację oddziaływać każdego z indywidualnych trimerów z trzema innymi trimerami, prowadzić do tworzenia struktur składających się z 12 lub 24 cząsteczek DegP [7,3].

DegP katalizuje degradację licznych substratów białkowych zlokalizowanych w periplazmie, denaturowanych pod działaniem stresu cieplnego (co najmniej 37°C) i osmotycznego; aktywność tego enzymu jest niezbędna dla przeżycia komórek *E. coli* podczas ekspozycji na wspomniane stresy [8]. Wśród szczególnie dobrze poznanych substratów DegP znajduje się niewłaściwie sfałdowany MalS, enzym z grupy amylaz [8] oraz PapSA i PapG, białka z grupy P pilin [9]. Mechanizm rozpoznawania zdenaturowanych białek periplazmatycznych jako substratów dla DegP nie został w pełni wyjaśniony. W większości opisanych przypadków DegP rozpoznaje hydrofobowe, C-końcowe reszty aminokwasowe zdenaturowanego substratu [3]. Sądzi się, że rozpoznanie substratu przez domeny PDZ budujące ściany beczkowskkształtnej cząsteczki DegP skutkuje wprowadzeniem substratu do komory katalitycznej i uruchomieniem scena-



Rycina 1. Struktura cząstki heksameru DegP *Escherichia coli*. Widok z góry ujawniający rozmieszczenie trzech domen proteazowych stanowiących wieczko beczkowskkształtnej cząstki (kolor ciemnoniebieski i jasnoniebieski oznacza różne elementy struktury drugorzędowej tej domeny), a także sześciu domen PDZ1 (kolor jasnozielony) i sześciu domen PDZ2 (kolor żółty) stanowiących boczne ściany cząstki. Trzy domeny PDZ1 proteazowe stanowiące denko beczkowskkształtnej cząstki są niewidoczne. PDB ID: 1KY9.

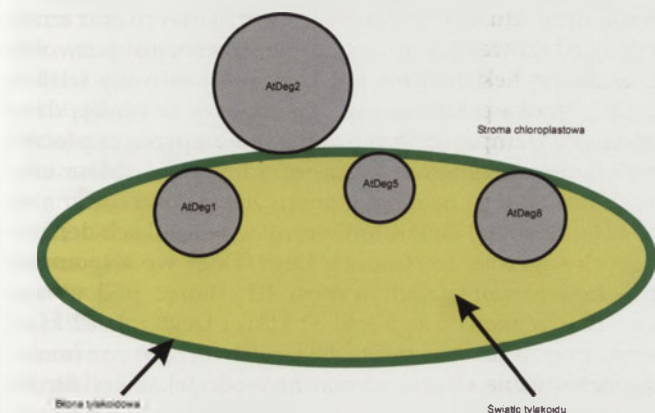
riusza procesywną degradacji, tzn. cięcia substratu na wiele fragmentów w taki sposób, że C-koniec każdego nowego powstałego fragmentu jest rozpoznawany jako sygnał rozpoczynający kolejną rundę hydrolizy. Ostatecznie substraty są degradowane do fragmentów o długości 9-20 reszt aminokwasowych [3]. Domeny PDZ budujące ściany heksamerycznego holoenzymu DegP pozostawiają wiele przestrzeni dla wprowadzanego do komory katalitycznej substratu. Okoliczność ta jest wysoce prawdopodobną przyczyną, dla której substraty DegP, w odróżnieniu od substratów proteaz z rodziny FtsH, nie muszą zostać przed degradacją silnie rozfałdowane, a DegP funkcjonuje w sposób niezależny od ATP. Niektóre dane doświadczalne sugerują, że wprowadzenie substratu do komory katalitycznej DegP jest poprzedzone indukowanym przez rozpoznanie substrat-enzym demontażem heksameru do dwóch trimerów [10]. Co interesujące, białka periplazmatyczne, które uległy niewielkiej denaturacji (temperatura otoczenia bakterii 28°C) nie są degradowane z udziałem DegP. W takich przypadkach enzym traci aktywność proteolityczną, a zyskuje aktywność białka opiekuńczego i przywraca substratom poprawną strukturę drugorzędową. DegP łączy zatem w jednej cząsteczce funkcje proteazy i białka opiekuńczego, a zależna od temperatury konwersja białko opiekuńcze-proteaza polega zapewne na osiągnięciu przez enzym w 37°C struktury umożliwiającej uformowanie w przestrzeni triady katalitycznej, co nie jest możliwe w 28°C z powodu niewłaściwej konformacji reszty seryny 210 [8].

W komórkach *E. coli* znaleziono dwie inne proteazy Deg–DegS i DegQ. Obydwie są, podobnie jak DegP, białkami periplazmatycznymi; najważniejsze elementy ich struktury to N-końcowa domena proteazowa oraz domena/y PDZ, zlokalizowana/ne blisko C-końca cząsteczki (DegS posiada pojedynczą, a DegQ dwie domeny PDZ). DegQ wykonuje funkcje podobne do DegP [11], a DegS jest między innymi zaangażowana w uruchamianą w warunkach stresowych kaskadę proteolityczną, która doprowadza do aktywacji czynnika σ^E polimerazy RNA i inicjacji transkrypcji genów kodujących różne białka opiekuńcze pomagające przywrócić właściwą strukturę białkom zdenaturowanym w warunkach stresowych [12].

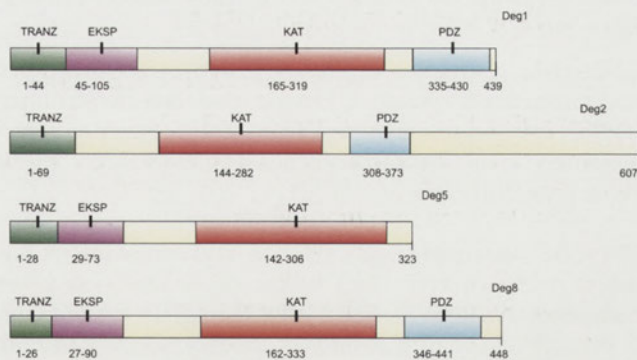
BUDOWA I FUNKCJE CHLOROPLASTOWYCH PROTEAZ Deg

Genom jądrowy *A. thaliana* zawiera 16 genów kodujących białka ortologiczne względem proteaz Deg z *E. coli*, określanych jako *DEG1-DEG16*. Najwcześniej opisanym produktem białkowym tych genów była proteaza nazwana DegP1 ponieważ została zidentyfikowana jako białko związane peryferycznie od strony światła tylakoidu z błonami tylakoidowymi chloroplastów grochu, w reakcji krzyżowej przy udziale przeciwciał skierowanych przeciwko DegP z *E. coli* [13]. Identyfikowane później chloroplastowe proteazy będące ortologami DegP1 przez pewien czas konsekwentnie nazywano DegPx, gdzie wyróżnik x nawiązywał do kolejności identyfikacji enzymu, jednak Huesgen i wsp. [14] zaproponowali, aby uprościć nazewnictwo tej grupy chloroplastowych proteaz przez rezygnację z zapisu DegPx na rzecz Degx, tym bardziej, że ortologi DegP1 wcale nie są bardziej podobne do DegP niż do DegQ czy DegS z *E. coli*. Propozycja została zaakceptowana przez specjalistów zajmujących się tą grupą proteaz, jakkolwiek baza danych NCBI wciąż opisuje chloroplastowe ortologi DegP, DegQ i DegS z *E. coli* jako DegPx. Wszystkie dane opisane w dalszej części pracy odnoszą się do proteaz chloroplastowych Deg *A. thaliana*, o ile nie wymieniono innego gatunku roślinnego.

Istniejące dane doświadczalne dowodzą lokalizacji Deg1, 2, 5 i 8 w chloroplastach, mianowicie Deg1, 5 i 8 jako białek



Rycina 2. Rozmieszczenie Deg1, 2, 5 i 8 wewnątrz chloroplastu. Średnice kół reprezentujących indywidualne proteazy Deg są proporcjonalne do ich mas cząsteczkowych. Schemat opracowano w oparciu o dane zawarte w pracy [14].



Rycina 3. Rozmieszczenie domen proteazowych, domen PDZ, peptydów tranzytowych i peptydów eksportowych w liniowej strukturze cząsteczki chloroplastowych proteaz Deg. Dane dotyczące lokalizacji domen proteazowych zaczerpnięto z bazy danych NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Długość peptydów tranzytowych określano z użyciem serwera Target P 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>). Długość peptydów eksportowych została określona manualnie w oparciu o lokalizację granicznego motywu A-x-A [29]. Tranzyt – peptyd tranzytowy; Eks – peptyd eksportowy; Kat- domena proteazowa.

związanych peryferycznie z błoną tylakoidową od strony światła tylakoidu, a Deg2 jako enzymu związanego peryferycznie z błoną tylakoidową od strony stromy (Ryc. 2) [15-17]. Deg3, 4, 10-12 i 14 są umiejscowione w mitochondriach, a Deg15 w peroksisomach [14,18]. Analiza sekwencji aminokwasowej prekursorów produktów pozostałych genów *DEG* za pomocą programów predykcyjnych sugeruje, że trzy spośród nich (Deg6, 9 i 16) mogą być kierowane do chloroplastów, ale brak potwierdzenia doświadczalnego tego przypuszczenia. Nie dysponujemy danymi o wewnątrzkomórkowej lokalizacji produktów genów *DEG7* i *DEG13*.

Struktura wszystkich chloroplastowych izoform Deg obejmuje domenę proteazową zlokalizowaną od strony N-końca cząsteczki, a w przypadku Deg1, 2 i 8 także pojedynczą domenę PDZ umiejscowioną blisko C-końca cząsteczki (Deg5 jest pozbawiona tej domeny) (Ryc. 3).

Deg 1

Proteaza Deg1 została zidentyfikowana jako białko związane peryferycznie od strony światła tylakoidu z błonami tylakoidowymi chloroplastów grochu, w reakcji krzyżowej przy udziale przeciwciał skierowanych przeciwko DegP z *E. coli* [13]. Nieco później Deg1 odkryto także u *A. thaliana* (AtDeg1), a lokalizacja wewnątrz chloroplastu okazała się taka sama, jak w przypadku grochu [16,19].

Transkrypcja *DEG1* jest modulowana w odpowiedzi na krótkoterminową (2,5 h) ekspozycję roślin na światło o podwyższonym natężeniu; działanie tego stresu powodowało ok. 4-krotny wzrost poziomu akumulacji transkryptów *DEG1*. Krótkoterminowa ekspozycja roślin na niską lub wysoką temperaturę nie zmieniła tego poziomu [20]. Nie dysponujemy danymi odnoszącymi się do akumulacji dojrzałego białka Deg1 w odpowiedzi na kontakt ze światłem o podwyższonym natężeniu, wiadomo natomiast, że akumulacja dojrzałego białka Deg1 jest regulowana w odpowiedzi na podwyższoną temperaturę. W chloroplastach grochu na skutek 4-godzinnej ekspozycji roślin na temp. 40°C zaobser-

wowano niemal dwukrotny wzrost poziomu tej proteazy [13].

Niewiele wiadomo o strukturze drugo- i trzeciorzędowej Deg1; można przypuszczać, że jest podobna do struktury DegP *E. coli*. Rekombinowana Deg1 jest mieszaniną formy monomerycznej i heksamarycznej, obydwie formy są aktywne proteolitycznie *in vitro* [21].

Wyniki badań prowadzonych z wykorzystaniem mutantów pozbawionych Deg1 wskazują, że izoforma ta jest zaangażowana w hydrolizę białka PsbA(D1) uszkodzonego podczas ekspozycji rośliny na podwyższone natężenie światła. Rola Deg1 miałaby polegać na nacinaniu uszkodzonego PsbA w dwóch miejscach: w obrębie pętli CD (światło tylakoidu) z uwolnieniem C-końcowego fragmentu 16 kDa oraz w obrębie C-końcowej pętli zanurzonej w świetle tylakoidu, połączone z wytworzeniem fragmentu 5,2 kDa [22]. Z kolei rekombinowana Deg1 degradowuje *in vitro* fizjologiczne substraty chloroplastowe PsbO i plastocyaninę [21]. Aktywność enzymatyczna rekombinowanej proteazy Deg1 *in vitro* wobec β -kazeiny (substrat niefizjologiczny) jest zależna od dwóch czynników: temperatury i pH. Tempo degradacji rośnie w zakresie temperatur 15–42°C (w temperaturze 55°C degradacja jest jeszcze intensywniejsza). Dokładnie nie wiadomo, w jaki sposób wzrost temperatury zwiększa tempo degradacji, czy wpływa na poprawę aktywności enzymu, czy wywołuje rozkładowanie substratu powodując, że staje się on łatwiej dostępny dla proteazy. Najbardziej wydajna degradacja β -kazeiny *in vitro* przez rekombinowany Deg1 ma miejsce w zakresie pH między 5,5 a 7,0, przy czym maksimum aktywności przypada na pH 6,0, a niewielka alkalizacja środowiska reakcyjnego powoduje silne obniżenie tempa degradacji [22].

Mutanty *deg1* wykazują się podwyższoną wrażliwością na fotoinhibicję, najprawdopodobniej na skutek ich niezdolności do degradacji uszkodzonego PsbA, która jest warunkiem syntezy nowych kopii PsbA i przeprowadzania pełnego cyklu naprawczego fotosystemu II (PS II). Oprócz podwyższonej wrażliwości na fotoinhibicję u mutantów *deg1* obserwuje się ograniczony wzrost i wcześniejsze zakwitanie. Liście mutantu są cienkie o kolorze blade zielonym, co wynika z obniżonej zawartości chlorofilu b [22]. Tak więc proteaza Deg1 jest niezbędna zarówno dla prawidłowego przebiegu ontogenezy rośliny w optymalnych warunkach środowiskowych, jak i dla odporności rośliny na warunki stresowe (światło o podwyższonym natężeniu).

Deg2

Transkrypcja *DEG2* jest ok. 3-krotnie wzmacniana w odpowiedzi na krótkoterminową ekspozycję rośliny (2,5 h) na światło o podwyższonym natężeniu, ale podobnie jak w przypadku Deg1, nie obserwuje się modulującego wpływu niskiej i wysokiej temperatury na akumulację transkryptów *DEG2* [20]. W innych badaniach wykazano hamujący wpływ krótkoterminowego (2 h) stresu solnego, oksydacyjnego, wysokiej temperatury i desykcji na akumulację transkryptów *DEG2* [15]. W przypadku ekspozycji na światło o podwyższonym natężeniu, stres solny i desykcję, na wzmocnienie akumulacji transkryptów nakłada się wzmoc-

nienie akumulacji gotowego białka, ale wysoka temperatura i stres oksydacyjny stymulując transkrypcję jednocześnie obniżają poziom akumulacji białka Deg2 [15].

Nie dysponujemy żadnymi danymi na temat struktury drugo- i trzeciorzędowej Deg2 ani na temat tworzenia przez ten enzym *in vivo* ewentualnych struktur oligomerycznych. W poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie o funkcje fizjologiczne Deg2 przeprowadzono badania *in vitro* z wykorzystaniem rekombinowanego enzymu. Otrzymane wyniki sugerują, że enzym ten zaangażowany jest w degradację białka PsbA uszkodzonego podczas ekspozycji rośliny na podwyższone natężenie światła. Rola Deg2 ma polegać na trawieniu fotouszkodzonego PsbA w obrębie pętli DE eksponowanej w stronę stromy. W wyniku katalizowanej przez Deg2 hydrolizy powstawać mają dwa fragmenty PsbA; N-końcowy 23 kDa (podlegający być może dalszej fragmentacji z udziałem proteaz z rodziny FtsH [24]) i C-końcowy 10 kDa. Uważa się, że proces ten zależy od GTP [15,25]. Istnieją jednak pewne wątpliwości, czy reakcja taka istotnie przebiega *in vivo*. Badania z wykorzystaniem dwóch linii mutantów *deg2* dowiodły, że obrót metaboliczny PsbA w mutantach i w roślinie typu dzikiego przebiegał w podobnym tempie w odpowiedzi na ekspozycję roślin na podwyższone natężenie światła. Może to sugerować, że ubytek Deg2 jest kompensowany przez podwyższoną ekspresję innych proteaz degradowujących PsbA lub też że *in vivo* Deg2 jednak nie uczestniczy w degradacji fotouszkodzonego D1 [26]. Również brak różnic we wrażliwości na fotoinhibicję pomiędzy mutantami *deg2* i roślinami szczepu dzikiego czyni mało prawdopodobną tezę o udziale Deg2 w degradacji uszkodzonego PsbA [26]. Badania wykonane z wykorzystaniem rekombinowanej proteazy Deg2 dowodzą, że maksymalną aktywność proteolityczną wobec żelatyny (substrat niefizjologiczny) obserwuje się w alkalicznym zakresie pH [15]. Trudno na aktualnym etapie badań określić jaka jest rola Deg2 w przebiegu procesów wzrostowo-rozwojowych w optymalnych warunkach środowiskowych, mutanty *deg2* wydają się nie różnić fenotypowo od roślin szczepu dzikiego, jednak porównanie fenotypów nie było dokładne [26].

Deg5

Analiza globalnych współczynników koekspresji genów kodujących białka zlokalizowane w świetle tylakoidu w szerokim spektrum czynników środowiskowych oraz zmieniającego się kontekstu czasoprzestrzennego pozwoliła na ustalenie, że *DEG5* nie jest koekspresjonowany ściśle z *DEG8* [27], co jest interesujące, zważywszy że istnieją dane sugerujące możliwość formowania *in vivo* przez cząsteczki Deg5 heterooligomerów z cząsteczkami Deg8. Masa cząsteczkowa takiego heterooligomeru została oszacowana na 460 kDa. Rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących sugeruje, że stosunek Deg5/Deg8 we wspomnianych heterokompleksach wynosi 1:1. Biorąc pod uwagę masy cząsteczkowe Deg5 (ok. 32 kDa) i Deg8 (ok. 42 kDa) można domniemywać, że Deg5 i Deg8 tworzą *in vivo* homohexamery łączące się ze sobą w heterododekamery. Struktury te nie są zasocjowane z cząstkami PSII [17].

Informacje dotyczące fizjologicznych substratów Deg5 są bardzo skromne. Sugeruje się, że proteaza ta uczestniczy w

degradacji białka PsbA uszkodzonego podczas ekspozycji roślin na światło o podwyższonym natężeniu [17] i wysoką temperaturę [28]. W tym pierwszym przypadku rola Deg5 (i może zarazem Deg8 współtworzącego z Deg5 funkcjonalny heterokompleks) miałyby polegać na nacinaniu uszkodzonego PsbA w obrębie zlokalizowanej w świetle tylakoidu pętli CD, z wytworzeniem fragmentów o masach cząsteczkowych 18 i 16 kDa [17]. Mutanty *deg5* wykazują się podwyższoną wrażliwością na fotoinhibicję [17], najprawdopodobniej tak jak w przypadku mutantów *deg1* na skutek ich niezdolności do degradacji uszkodzonego PsbA, która jest warunkiem syntezy nowych kopii PsbA i przeprowadzania pełnego cyklu naprawczego PS. Tak więc Deg5 może odgrywać ważną rolę w ochronie rośliny przed fotoinhibicją *in vivo*. Trudno ocenić jaka może być rola Deg5 w przebiegu procesów wzrostu i rozwoju rośliny w warunkach bezstresowych ponieważ w takich warunkach mutant *deg5* nie różni się fenotypowo od roślin szczepu dzikiego [17].

Deg8

Dowodzono, że krótkoterminowa (2,5 h) ekspozycja *A. thaliana* na wysokie natężenie światła powoduje 4-krotny wzrost poziomu transkryptu *DEG*, ale efektu takiego nie obserwowano w przypadku ekspozycji na wysoką oraz niską temperaturę [20]. W szerokim spektrum czynników środowiskowych oraz zmieniającego się kontekstu czasoprzestrzennego *DEG8* jest ściśle koekspresjonowany z *DEG1* [27], co może oznaczać, że produkty tych genów degradują tę samą pulę substratów w tych samych warunkach. Przypuszczenie to znajduje potwierdzenie w fakcie, że proteazie Deg8, podobnie jak Deg1, przypisuje się udział w degradacji białka PsbA uszkodzonego podczas ekspozycji roślin na światło o podwyższonym natężeniu. Zadanie Deg8 (a właściwie heterokompleksu enzymatycznego z Deg5) ma polegać na cięciu uszkodzonego PsbA w obrębie zlokalizowanej w świetle tylakoidu pętli CD, z wytworzeniem fragmentów o masach cząsteczkowych 18 kDa (C-końcowy) i 16 kDa (N-końcowy) [17]. Ścisła koekspresja *DEG1* i *DEG8* może także oznaczać, że cząsteczki enzymów kodujących przez wymienione geny tworzą *in vivo* heterokompleks, brak jest jednak danych doświadczalnych, które potwierdzałyby taką ewentualność.

Badania nad aktywnością enzymatyczną przeprowadzone na rekombinowanej proteazie Deg8 pokazały, że enzym ten, w odróżnieniu od rekombinowanej Deg5, wykazuje aktywność proteolityczną *in vitro* wobec нефизjologicznego substratu jakim jest β -kazeina, przy czym nie obserwowano takiej aktywności w stosunku do form α i κ kazeiny [17]. Mutanty *deg8* wykazują się podwyższoną wrażliwością na fotoinhibicję [17], najprawdopodobniej na skutek niezdolności do degradacji uszkodzonych cząsteczek PsbA. Podobna skala wrażliwość na fotoinhibicyjne działanie światła o wysokim natężeniu mutantów *deg8* i *deg5*, dwukrotnie większa wrażliwość podwójnego mutantu *deg5deg8* oraz charakterystyczne dla niego, wyraźnie wolniejsze tempo degradacji PsbA w warunkach wysokiej temperatury, w stosunku do tempa degradacji tego białka u pojedynczych mutantów *deg5* i *deg8* sugerują, że w zakresie degradacji białka (pod działaniem obu stresów) PsbA Deg8 i Deg5 pełnią funkcje synergistyczne [17,28]. Mutant *deg8* wzrastający

i rozwijający się w optymalnych warunkach środowiskowych nie różni się fenotypem od roślin szczepu dzikiego i dlatego na razie nie rozumiemy jakie zadania pełni Deg8 w takich warunkach.

PIŚMIENNICTWO

- Garcia-Lorenzo M, Sjodin A, Jansson S, Funk C (2006) Protease gene families in *Populus* and *Arabidopsis*. BMC Plant Biol 6: 30
- Narberhaus F, Obrist M, Fuhrer F, Langklotz S (2009) Degradation of cytoplasmic substrates by FtsH, a membrane-anchored protease with many talents. Res Microbiol 160: 652-659
- Krojer T, Pangerl K, Kurt J, Sawa J, Stingl C, Mechtler K, Huber R, Ehrmann M (2008) Interplay of PDZ and protease domain of DegP ensures efficient elimination of misfolded proteins. Proc Natl Acad Sci USA 105: 7702-7707
- Polgar L (2004) The catalytic triad of serine peptidase. Cell Mol Life Sci 62: 2161-2172
- Harris BZ, Lim WA (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. J Cell Sci 114: 3219-3231
- Krojer T, Garrido-Franco M, Huber R, Ehrmann M, Clausen T (2002) Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. Nature 416: 455-459
- Jiang J, Zhang X, Chen Y, Wu Y, Zhou ZH, Chang Z, Sui SF (2008) Activation of DegP chaperone-protease via formation of large cage-like oligomers upon binding to substrate proteins. Proc Natl Acad Sci USA 105: 11939-11944
- Spiess C, Biel A, Ehrmann M (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. Cell 97: 339-347
- Jones CH, Danese PN, Pinkner JS, Silhavy TJ, Hultgren SJ (1997) The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. EMBO J 16: 6394-6406
- Jomaa A, Damjanovic D, Leong V, Ghirlando R, Iwanczyk J, Ortega J (2007) The inner cavity of *Escherichia coli* DegP protein is not essential for molecular chaperone and proteolytic activity. J Bacteriol 189: 706-716
- Pallen MJ, Wren BW (1997) The HtrA family of serine proteases. Mol Microbiol 26: 209-221
- Walsh NP, Alba BM, Bose B, Gross CA, Saurer RT (2003) OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. Cell 113: 61-71
- Itzhaki H, Naveh L, Lindahl M, Cook M, Adam Z (1998) Identification and characterization of DegP, a serine protease associated with the luminal side of thylakoid membrane. J Biol Chem 273: 7094-7098
- Huesgen PF, Schuhmann H, Adamska I (2005) The family of Deg proteases in cyanobacteria and chloroplast of higher plants. Physiol Plant 123: 413-420
- Haussuhl K, Andersson B, Adamska I (2001) A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. EMBO J 20: 713-722
- Peltier JB, Emanuelsson O, Kalume DE, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, Liberles DA, Soderberg L (2002) Central functions of the luminal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. Plant Cell 14: 211-236
- Sun X, Peng L, Guo J, Chi W, Ma J, Lu C, Zhang L (2007) Formation of Deg5 and Deg8 Complexes and Their Involvement in the Degradation of Photodamaged Photosystem II Reaction Center D1 Protein in *Arabidopsis*. Plant Cell 19: 1347-1361
- Helm M, Luck C, Prestele J, Hierl G, Huesgen PF, Frohlich T, Arnold GJ, Adamska I, Gorg A, Lottspeich F, Gietl C (2007) Dual specificities of the glyoxysomal/peroxisomal processing protease Deg15 in higher plants. Proc Natl Acad Sci USA 104: 11501-11506
- Schubert M, Petersson UA, Haas BJ, Funk C, Schroder WP, Kieselbach T (2002) Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 277: 8354-8365

20. Sinvany-Villalobo G, Davydov O, Ben-Ari G, Zaltsman A, Raskind A, Adam Z (2004) Expression in multigene families. Analysis of chloroplast and mitochondrial proteases. *Plant Physiol* 135: 1336-1345
21. Chassin Y, Kapri-Pardes E, Sinvany G, Arad T, Adam Z (2002) Expression and characterization of the thylakoid lumen protease DegP1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130: 857-864
22. Kapri-Pardes E, Naveh L, Adam Z (2007) The thylakoid lumen protease Deg1 is involved in the repair of photosystem II from photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 1039-1047
23. Chassin Y, Kapri-Pardes E, Sinvany G, Arad T, Adam Z (2002) Expression and characterization of the thylakoid lumen protease DegP1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130: 857-864
24. Lindahl M, Spetea C, Hundal T, Oppenheim AB, Adam Z, Andersson B (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* 12: 419-431
25. Spetea C, Hundal T, Lohmann F, Andersson B (1999) GTP bound to chloroplast thylakoid membranes is required for light-induced, multi-enzyme degradation of the photosystem II D1 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 339-347
26. Huesgen PF, Schuhmann H, Adamska I (2006) Photodamaged D1 protein is degraded in *Arabidopsis thaliana* mutants lacking the Deg2 protease. *FEBS Lett* 580: 6929-6932
27. Granlund I, Hall M, Kieselbach T, Schröder WP (2009) Light induced changes in protein expression and uniform regulation of transcription in the thylakoid lumen of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 4: 1-11
28. Sun X, Wang L, Zhang L (2007) Involvement of Deg5 and Deg8 proteases in the turnover of the photosystem II reaction center D1 protein under heat stress in *Arabidopsis thaliana*. *Chin Sci Bull* 52: 1742-1745.
29. Robinson C, Mant A (2005) Biogenesis of the thylakoid membrane, W: Moller SG (red) *Plastids*. Blackwell Publishing, Oxford, str. 180-213

Chloroplast Deg proteases

Magda Grabsztunowicz, Robert Luciński, Małgorzata Baranek, Bogna Sikora, Grzegorz Jackowski✉

Department of Plant Physiology, Institute of Experimental Biology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, 89 Umultowska St., 61-614 Poznań, Poland

✉e-mail: grzesiek@amu.edu.pl

Key words: chloroplast, Deg, hydrolysis, PDZ domain, protease

ABSTRACT

For some chloroplast proteases ATP binding and hydrolysis is not necessary for their catalytic activity, most probably because even strongly unfolded substrates may penetrate their catalytic chamber. Deg1, 2, 5 and 8 are the best known of *Arabidopsis thaliana* ATP- independent chloroplast proteases, encoded by orthologues of genes coding for DegP, DegQ and DegS proteases of *Escherichia coli*. Current awareness in the area of structure and functions of chloroplast Degr is much more limited vs the one about their bacterial counterparts. Deg5 and Deg8 form a catalytic heterododecamer which is loosely attached to luminal side of thylakoid membrane. The complex catalyses – supported by Deg1 and one of FtsH proteases – the degradation of PsbA damaged due to plant exposition to elevated irradiance and thus these protease are of key importance for the plants' sensitivity to photoinhibition. Deg2 role in the disposal of damaged PsbA has not been elucidated. Recombinant Deg1 may degrade PsbO and plastocyanin *in vitro* but it is not clear whether this reaction is performed *in vivo* as well.

Zewnątrzkomórkowe enzymy hydrolityczne wytwarzane przez grzyby owadobójcze – rola w procesie infekcji

STRESZCZENIE

Grzyby owadobójcze mają wielki potencjał w biologicznej kontroli populacji owadów szkodliwych. Patogeny grzybowe są obiecującym źródłem insektycydów i znakomitą alternatywą chemicznych pestycydów. Grzyby te mają unikalny mechanizm porażania owadów. Jako naturalni ich wrogowie, atakują bezpośrednio kutikulę żywicieli poprzez kombinację nacisku mechanicznego i enzymów degradujących kutikulę. Grzyby owadobójcze wytwarzają wiele enzymów proteo-, chityno- i lipolitycznych, które uznawane są za kluczowe czynniki w mikozie owadów. Rola zewnątrzkomórkowych enzymów w patogenezie, nadal nie jest w pełni poznana. Dogłębne zrozumienie mechanizmu porażania owadów przez grzyby owadobójcze może pomóc w produkcji bardziej bezpiecznych dla środowiska i wydajniejszych mikoinsektycydów.

WPROWADZENIE

Rosnąca odporność owadów szkodliwych na chemiczne pestycydy oraz nadmierne ich stosowanie zagrażające bioróżnorodności, skłania do stosowania bioinsektycydów powstałych na bazie naturalnych wrogów owadów jakimi są bakterie, wirusy, nicienie oraz grzyby entomopatogenne [1,2]. Obecnie znanych jest około 1000 gatunków grzybów owadobójczych, które mogą porażać owady [3]. Jako mikoinsektycydy czy mikoakarycydy zarejestrowanych jest 13 gatunków grzybów patogennych, przy czym w biologicznej kontroli owadów szkodliwych przeważają grzyby o wysokim potencjale biobójczym jak *Metarhizium anisopliae* i *Beauveria bassiana* [3-6]. *M. anisopliae* wykorzystuje się na szeroką skalę do zmniejszania liczebności populacji szarańczy, koników polnych, chrabaszca majowego, korników, szkodnika lasów szarka komośnika *Bothynoderes punctiventris*, stonki ziemniaczanej, jedwabnika czy nałanka czarnego *Anisoplia austriaca* [4,7-10]. W 2005 roku w Australii do biologicznej kontroli owadów zastosowano wyprodukowany z *M. anisopliae* preparat Green Guard™, a w 2009 roku na wielką skalę do zwalczania szarańczy i koników polnych inny preparat Green Muscle™ [11]. Mikropestycydy wytwarzane są również z innych gatunków grzybów entomopatogennych jak *Verticillium lecanii* do zwalczania mszyc, *Hirsutella thompsonii* czy opatentowany w Polsce preparat z *B. bassiana*. Do produkcji biopreparatów mogą posłużyć nawet saprotrofy jak grzyb *Conidiobolus coronatus* (Zygomycota), który skutecznie poraża różnorodne gatunki owadów [12-14].

Badania przeprowadzone z użyciem mikroskopu elektronowego pokazują, iż kutikula owadów nie posiada na tyle dużych otworów by mogła przeniknąć przez nie strzępka grzyba owadobójczego [15]. Jak wiadomo, średnica samych porów w kutikuli owadów wynosi 1 µm lub jest mniejsza [16], natomiast strzępek grzybów ma 2-10 µm (<http://en.wikipedia.org/wiki/Fungus>). Dla grzybów entomopatogennych przerwanie powłok ciała insekta jest kluczowym etapem w patogenezie. Kutikula owadów jest nie tylko barierą oddzielającą grzyb od jamy ciała owada obfitującej w substancje pokarmowe, ale również sama ze względu na dużą zawartość białek i chityny, stanowi znakomite źródło substancji odżywczych, które patogen może wykorzystać do reprodukcji i rozwoju [17]. Dlatego też, aby grzyby entomopatogenne mogły pokonać barierę w postaci twardej kutikuli, musiały wytworzyć w toku ewolucji skuteczne mechanizmy jej penetracji. Stwierdzono, iż grzyby entomopatogenne infekują owady należące do różnych rodzajów jak *Coleoptera*, *Diptera*, *Homoptera*, *Hymenoptera* czy *Isoptera* [18]. Mimo, trwających badań nad mechanizmem infekcji owadów, niestety nadal nie jest to proces w pełni poznany i rozumiany [19].

PRZEBIEG INFEKCJI GRZYBOWEJ

Kutikula owadów stanowi znakomitą barierę chroniącą ciało owada przed wirusami, bakteriami i pierwotniakami, nie stanowi jednak dostatecznie skutecznej obrony przed entomopatogennymi grzybami i nicieniami, które wykształciły mechanizmy jej aktywnej penetracji. Grzyby wykazujące aktywność

Emilia Włóka

Instytut Parazytologii Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

Instytut Parazytologii Polskiej Akademii Nauk, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa; tel.: (22) 697 89 73, e-mail: milka@twarda.pan.pl

Artykuł otrzymano 15 kwietnia 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 14 sierpnia 2010 r.

Słowa kluczowe: *Conidiobolus coronatus*, grzyby owadobójcze, *Galleria mellonella*, proteazy, chitynazy, lipazy

owadobójczą spotkać można w obrębie większości grup systematycznych królestwa *Fungi* [20]. Zdecydowana ich większość należy do *Zygomycetes* i *Deuteromycetes*. Wśród *Zygomycetes* najlepiej wyspecjalizowane w infekowaniu owadów są grzyby z rzędu *Entomophthorales* [10]. Najbardziej znane grzyby owadobójcze nie wykazujące specyficzności w wyborze właściwego żywiciela należą do grzybów niedoskonałych (*Deuteromycetes*). Przedstawicielami *Deuteromycetes* są grzyby należące do rodzajów *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium*, *Hirsutella* czy *Paecilomyces* [10]. Do tej pory najlepiej przebadanym grzybem entomopatogennym pod względem przebiegu mikozy jest *M. anisopliae*. Stwierdzono, iż unikalny sposób niszczenia powłok ciała owadów zapewniają temu grzybowi dwa czynniki: nacisk mechaniczny struktury inwazyjnej na kutikulę oraz produkowane i uwalniane do otoczenia enzymy proteo-, chityno- i lipolityczne degradujące kutikulę stawonogów [21].

Porażenie owadów przez grzyby owadobójcze składa się z kilku etapów (Ryc. 1). Głównym źródłem inwazji są zarodniki grzyba, z których rozwijają się strzępki inwazyjne [20-22] (Ryc. 1A). Prawdopodobieństwo zarażenia owadów grzybami entomopatogennymi zwiększa fakt, iż większość z nich bytuje w glebie i na roślinach, a więc zajmuje siedliska typowe również dla owadów. W przypadku owadomorków (*Entomophthoraceae*) możliwość infekcji grzybowej potęguje zdolność do wyrzeliwania zarodników na znaczne odległości.

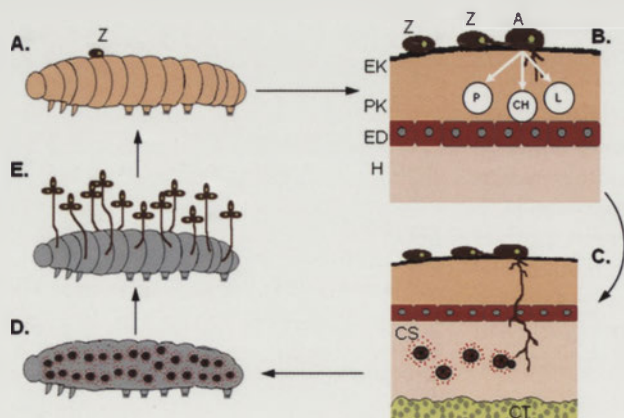
Bezpośredni kontakt owada z patogenem, nie gwarantuje jeszcze rozpoczęcia mikozy. Proces infekcji grzybowej inicjuje dopiero adhezja konidiów do epikutikuli owada (Ryc. 1B). Często infekcja rozpoczyna się w przestrzeniach pomiędzy segmentami, gdzie konidia mogą się dobrze zakotwiczyć [15]. Stwierdzono, iż adhezja zarodników do epikutikuli owadów przebiega dwuetapowo: w pierwszym udział biorą siły hydrofobowe i elektrostatyczne, w drugim uczestniczą enzymy wydzielane przez grzyba oraz niskocząsteczkowe białka zwane hydrofobinami [23,24].

Warunkiem koniecznym do wykiełkowania zarodnika jest wysoka wilgotność [25] oraz źródło węgla [19,26]. Źród-

łem węgla dla zarodnika mogą być m.in. węglowodany jak glikogen czy trehaloza, która u *M. anisopliae* może dostarczać glukozę niezbędną we wczesnym stadium kiełkowania zarodnika [27]. Uważa się, iż konidia same dysponują rezerwami azotu wystarczającymi do syntezy białek biorących udział w procesie kiełkowania. Prawdopodobnie źródło węgla ma większe znaczenie podczas kiełkowania niż źródło azotu [19]. Dowiedziono, iż na zarodnikowanie i kiełkowanie grzybów owadobójczych silny wpływ ma również temperatura. W trzech izolatach *Neozygites floriana*, u których badano w różnych temperaturach zdolność grzybni do zarodnikowania oraz zdolność zarodników do kiełkowania stwierdzono, iż istnieją optymalne temperatury zarówno zarodnikowania (25°C), jak i kiełkowania grzybni (25°C i 29°C) [28].

U niektórych grzybów entomopatogennych, jak np. u *Uromyces appendiculatus* czy *M. anisopliae*, penetracja kutikuli owada poprzedzona jest wytworzeniem przez kiełkujący zarodnik przyłgi zwanej appresorium (Ryc. 1B) [25,29]. Appresorium to twór wielokomórkowy, bardzo ściśle przylegający do kutikuli owada i ułatwiający przerwanie powłok jego ciała poprzez mechaniczny na ściany kutikuli. W początkowej fazie infekcji enzymy degradujące okrywę ciała owadów wytwarzane są na terenie appresorium [30]. Niektóre gatunki grzybów owadobójczych jak *Conidiobolus coronatus* nie tworzą appresorium, a z kiełkującego zarodnika bezpośrednio powstaje strzępka inwazyjna zdolna do penetracji kutikuli owada. Rosnąca strzępka grzyba wywiera nacisk na epikutikulę owada i wydziela znaczne ilości enzymów proteo-, chityno- i lipolitycznych, które trawią poszczególne komponenty kutikuli (Ryc. 1B) [17,31]. Produkty uwalniane podczas hydrolizy enzymatycznej stanowią pokarm dla grzyba. W zależności od wrót infekcji strzępka inwazyjna przerywa okrywę ciała żywiciela, tchawki, jelita lub układ rozrodczy. Rosnąca strzępka infekcyjna po pokonaniu ostatniej bariery w postaci epidermy, przedostaje się do jamy ciała owada (hemocel) i namnaża się [3] (Ryc. 1C). Odróżnicowuje się następnie na ciała strzępkowe (okryte ścianą komórkową) jak u grzyba *M. anisopliae* lub na tzw. protoplasty (pozbawione ściany komórkowej) jak w przypadku grzyba *C. coronatus*. Zarówno ciała strzępkowe, jak i protoplasty charakteryzuje brak reszt cukrowych na powierzchni, co pozwala ominąć patogenowi bariery obronne owada, gdyż cukrowe komponenty rozpoznawane są przez układ obronny insekta jako ciało obce. Mimo, iż w początkowym etapie mikozy struktury inwazyjne gromadzą się tylko wokół miejsca infekcji, to jednak w bardzo szybkim czasie dochodzi do kolonizacji jamy ciała zaatakowanego owada (Ryc. 1D). U niektórych entomopatogenów ciała strzępkowe tworzą tzw. blastosporę, swobodnie krążące w hemolimfie, wytwarzające następnie drugorzędowe strzępki zasiedlające tkanki żywiciela. Kolonizację umożliwia rozprzestrzenienie się ich w ciele owada wraz z hemolimfą [15]. Grzyb zajmuje odwłok, głowę lub inne tkanki: u *Entomophthora weberi* Flakon, pasożyta larw *Raphidia ophiopsis* Weber grzyb infekuje tylko odwłok, podczas gdy infekcja *E. muscae* obejmuje całe ciało.

Postępujący proces infekcji prowadzi do destrukcji ciała żywiciela poprzez penetrację i mechaniczne uszkodzenia jego narządów wewnętrznych, wyczerpywanie substancji pokarmowych skumulowanych w hemolimfie owada oraz



Rycina 1. Mechanizmy porażania owada przez grzyb entomopatogenny (zmodyfikowano wg [25,29]). Oznaczenia: A - appresorium, CH - chitynazy, CS - ciała strzępkowe, CT - ciało tłuszczowe, ED - epiderma, EK - epikutikula, H - hemocel, L - lipazy, P - proteazy, PK - prokutikula, Z - zarodnik. Inne objaśnienia w tekście pracy.

uwalnianie toksyn (na schemacie toksyny zaznaczone są jako czerwone kropki wokół ciał strzępkowych, CS) [12,14]. Bogus i Szczepanik [32] stwierdzili udział mikotoksyn grzyba *C. coronatus* już w początkowej fazie infekcji owadów. O udziale toksyn grzybowych w patogenezie świadczy fakt, iż zmiany patologiczne w tkankach ofiary pojawiają się, zanim tkanki te zostaną zaatakowane przez entomopatogena [25]. Zarażone owady giną z powodu rozwijającego się grzyba i jego metabolitów. W wyniku postępującej mikozy ciało owada, staje się miękkie i zwiotczałe, stanowiąc zawieszinę kropeł tłuszczu i struktur patogenu. W końcu strzępki szybko absorbują płyny z wnętrza ciała owada, przez co ciało ofiary zmienia swoją konsystencję ze zwiotczalej i miękkiej w twardą. Jest to faza mumifikacji ciała owada.

Etapem końcowym patogeny jest saprotroficzny wzrost grzyba na ciele zaatakowanego owada i wytworzenie struktur służących do namnażania się (Ryc. 1E). Ciało ofiary pokrywają liczne konidia zdolne do infekowania kolejnego owada [3]. Etap sporulacji może przebiegać wewnątrz ciała owada (ciała strzępkowe lub komórki grzyba przypominające strzępki po sprzęgnięciu się ze sobą tworzą zygosporę) lub na zewnątrz (patogen ponownie wytrawia dziury w oskórku ofiary, przez które „wydostaje się” na zewnątrz jego ciała i tworzy konidiofory) [10]. Grzyb jest już gotowy do kolejnego cyklu infekcji.

ENZYMY GRZYBÓW OWADOBÓJCZYCH

Grzyby owadobójcze mogą porażać stawonogi, gdyż w przeciwieństwie do bakterii i wirusów, nie muszą być spożyte z pokarmem [19], a o powodzeniu mikozy decyduje zdolność do bezpośredniego ataku kutikuli [3]. To właśnie enzymy trawiące okrywę ciała owadów tworzą dogodne wrota do wrośnięcia strzępki inwazyjnej w kutikulę [20]. Dzięki enzymom grzyb może pokonać twardą barierę w postaci kutikuli, która odgradza go od obfitującej w substancje pokarmowe hemolimfy [33]. Enzymy hydrolityczne proteo-, chityno- i lipolityczne wytwarzane przez grzyb podczas mikozy są uznawane za kluczowy czynnik wirulencji grzybów owadobójczych [34]. Kutikula owadów składa się z wosku, lipidów, białek i chityny [20]. Najbardziej zewnętrzną warstwą kutikuli jest epikutikula (bardzo cienka 1-3 μm), pokryta przez warstwę cementu i wosków [26]. Pod kutikulą znajdują się kolejne warstwy: prokutikula i epiderma [19]. Szacuje się, iż w kutikuli stawonogów przeważają białka, a chityna stanowi 25-50% wszystkich pozostałych składników kutikuli [20]. Z uwagi na dominujący udział białek w kutikuli owadów, uważa się, iż jako pierwsze atakują okrywę ciała insektów proteazy odsłaniając chitynowe fibrylle, które mogą być następnie trawione przez chitynazy. Najmniej znaczącą rolę w patogenie przypisuje się enzymom lipolitycznym.

ROLA PROTEAZ

Proteazy są licznie wytwarzane przez grzyby owadobójcze, nicienie, ssaki czy owady [35]. Spośród wszystkich enzymów to proteazy uważa się za najważniejszy czynnik decydujący o wirulencji grzybów owadobójczych. Proteazy [EC 3.4.-.-], jak powszechnie wiadomo to enzymy proteolityczne mające zdolność hydrolizy wiązań peptydowego. W zależności od jego położenia w polipeptydzie enzymy proteolityczne dzielimy na endo- i egzoproteazy, natomiast

ze względu na rodzaj centrum aktywnego klasyfikuje się je na: proteazy aspartylowe, cysteinowe, glutaminowe, metaloproteazy, asparaginowe, serynowe, treoninowe i proteazy o nieznanym mechanizmie katalizy (<http://merops.sanger.ac.uk>).

W patogenie całkowita degradacja białkowych komponentów kutikuli owadów możliwa jest dzięki synergicznemu działaniu licznych endo- i egzoproteaz. Endopeptydazy hydrolizują wiązania peptydowe wewnątrz łańcucha polipeptydowego białek na fragmenty peptydowe o różnej długości, które z kolei są substratem dla egzoproteaz hydrolizujących je do wolnych aminokwasów. Egzoproteazy odszczepiające skrajne N- i C-końcowe reszty aminokwasowe są klasyfikowane jako aminopeptydazy i karboksypeptydazy. Uwolnione dzięki zharmonizowanej aktywności proteaz aminokwasy są następnie wykorzystywane przez grzyb w jego procesach metabolicznych.

Uważa się, iż to właśnie ilość i rodzaj proteaz decyduje o zjadliwości entomopatogenów [29]. Potwierdza to fakt, iż u mutantów grzyba *M. anisopliae* wykazujących deficyt enzymów proteolitycznych zaobserwowano spadek zjadliwości [36]. Dotychczas najlepiej scharakteryzowane zostały proteazy wytwarzane przez grzyb *M. anisopliae* oraz w mniejszym stopniu przez *B. bassiana*. U *M. anisopliae* wykryto kilka endoproteaz: pierwszą (Pr1), drugą (Pr2), czwartą (Pr4), metaloproteazę oraz proteazę trzecią (Pr3) [17].

Proteaza Pr1 została zaklasyfikowana do proteaz serynowych i produkowana jest w znacznych ilościach podczas formowania appresorium oraz przez strzępki penetracyjne [29]. Uważa się, iż Pr1 odgrywa znaczącą rolę podczas patogeny, na co wskazuje obecność enzymu w kutikuli owadów zaatakowanych przez grzyb *M. anisopliae*, szerokie spektrum specyficzności substratowej (kazeina, kolagen, elastyna, albumina bydłęca) oraz wysoka aktywność wobec białek kutikularnych [37]. Pr1 posiada masę cząsteczkową równą 28,6 kDa. Występuje w postaci czterech izomerów, o zróżnicowanych pI w zakresie od 9,0 do 10,2. Pr1 uznawana jest za jeden z najważniejszych czynników wirulencji zarówno u *M. anisopliae* [38,39], *Cordyceps sinensis* [40] jak i u *B. bassiana* [41].

Pr2 to kwaśna proteaza hydrolizująca białka, w skład których wchodzi wiązania tworzone przez reszty argininy i lizyny. Enzym ten, podobnie jak Pr1, zidentyfikowano w kutikuli zainfekowanych owadów [37] oraz w filtratach postinkubacyjnych grzyba *M. anisopliae*, w których Pr2 występuje w wielu izomerycznych formach [30].

W warunkach *in vitro* kutikula owadów indukuje syntezę proteaz grzybowych. Freimoser i wsp. [42] w badaniach z wykorzystaniem grzyba *C. coronatus* stwierdzili, iż zarówno niezesklerytyzowana kutikula z *Manduca sexta*, jak i zesklerytyzowana z karalucha *Blaberus giganteus* indukują u tego entomopatogena wytwarzanie znacznych ilości proteaz. To wskazuje, że nawet fakultatywne grzyby owadobójcze mają bardzo „plastyczny” aparat enzymatyczny zdolny do wytwarzania różnorodnych enzymów w odpowiedzi na zróżnicowane źródła pokarmu, takie jak chociażby ciała owadów.

Prowadzone w ostatnich latach badania nad mechanizmem porażania u *M. anisopliae* wskazują, że same zarodniki grzyba wytwarzają enzymy proteo-, chityno- i lipoli-

tyczne. Wspomniani Santi i wsp. [43] wykazali obecność w zawieszynie zarodników wielu enzymów proteolitycznych (przeważającą ich pulę stanowiły właśnie Pr1 i Pr2), ponadto siedmiu różnych enzymów chitynolitycznych i dwóch enzymów lipolitycznych. Segers i wsp. [44] stwierdzili, iż Pr1 obecna w zarodnikach *M. anisopliae* zdolna jest do hydrolizy krótkich kwasów tłuszczowych, a zatem może brać udział w początkowej fazie adhezji zarodników poprzez modyfikację powierzchni kutikuli owadów. Kolejny dowód kluczowej roli Pr1 w patogenezie to fakt, iż wirulentne konidia wykazują bardzo wysoki poziom transkrypcji genu kodującego ten enzym [39,45]. Aktywność proteazy serynowej Pr1 jest 4 razy wyższa niż aktywność proteazy trypsynopodobnej Pr2 [43].

Innym enzymem, którego obecność stwierdzono w filtratach pohodowlanych *M. anisopliae* była proteinaza cysteinowa Pr4. Enzym ten posiada masę cząsteczkową równą 26,7 kDa i pI na 4,6. Niższa efektywność działania proteaz Pr2 i Pr4 w porównaniu z Pr1 (odpowiednio 21 i 51% aktywności Pr1), sugeruje, iż ich nadrzędną rolą jest regulacja aktywności proteazy Pr1 podczas mikozy. Wykazano, że grzyb *M. anisopliae* wytwarza również trzy izoformy metaloproteazy, które hydrolizują identyczne wiązania peptydowe jak Pr1; aktywność tych białek ulega zahamowaniu przez typowe dla metaloproteaz specyficzne inhibitory: 1,10-fenantrolinę lub fosforamidon [30]. Badania St Leger i wsp. [31,46,47] wykazały, iż wzrost grzyba *M. anisopliae* na kutikuli owadziej przyczynia się do syntezy przez patogen kilku egzopeptydaz (liczne izoenzymy aminopeptydazy, dipeptydyllopeptydaza o masie cząsteczkowej równej 74 kDa czy 30 kDa karboksypeptydaza), a środowisko kwaśne stymuluje entomopatogena do wytwarzania proteaz asparaginowych.

B. bassiana, również wytwarza proteazy serynowe zarówno nisko-, jak i wysokocząsteczkowe [48], których synteza zależna jest od źródła azotu. Obecność proteaz serynowych podobnych do Pr1 i Pr2 wytwarzanych przez *M. anisopliae* odnotowano także u takich entomopatogenów jak *Beauveria brongniartii* [49], *Verticillium lecanii*, *Nomuraea rileyi*, *Aschersonia aleyrodis* czy u grzybów należących do *Entomophthoraceae* [37].

Kolejną proteazą serynową, której przypisuje się znaczącą rolę w porażaniu owadów jest elastaza. Enzym ten należy do endoproteaz i katalizuje hydrolizę wiązań peptydowych tworzonych przez resztę alaniny (Ala). Stwierdzono, iż przeważającą pulę białek kutikuli owadów stanowią właśnie białka zawierające wiele reszt alaninowych [46], a Ala w niektórych białkach kutikularnych stanowić może nawet 44% wszystkich aminokwasów, tak jak u *Locusta migratoria*. Na poziom aktywności elastazy duży wpływ ma rodzaj zarodników, z których pochodzi hodowla. Jak pokazują badania Czygier i wsp. [50], kolonie grzyba *C. coronatus* o niskiej wirulencji produkują więcej chitynaz i lipaz, natomiast aktywność elastolityczna tych kolonii jest znacznie niższa niż aktywność kolonii o wysokiej wirulencji. Bania i wsp. [51] z medium poinkubacyjnego wspomnianego *C. coronatus* wyizolowali również proteazę serynową o masie 30-32 kDa. Enzym wykazywał aktywność podobną do subtylizyny i stabilność w szerokim zakresie pH. Z kolei Bidochka i Kchahatourians [48] otrzymali zewnątrzkomórkową proteazę z *B. bassiana*, która posiadała optymalne pH 8,5 i masę

cząsteczkową 35 kDa. Enzym hydrolizował elastynę, żelatynę, kazeinę i był inaktywowany w 50°C.

Obecnie uważa się, iż dominującą rolę we wczesnych etapach mikozy odgrywają proteazy trypsynopodobne i subtylizyny [38,42]. W przeciwieństwie do proteaz serynowych, proteazy asparaginowe nie aktywują układu oksydazy polifenolowej zaatakowanego osobnika [47].

Badania prowadzone przez St. Leger i wsp. [23] nad Pr1 z *M. anisopliae* wykazały, iż enzym ten ma wysoki ładunek dodatni. Uważa się, iż proteaza Pr1 z *M. anisopliae* adsorbuje się na kutikuli szarańczy tworząc niespecyficzne wiązania elektrostatyczne między dodatnimi grupami, a ujemnie naładowanymi grupami -COO kwasu glutaminowego i asparaginowego obecnymi w kutikuli szarańczy. Podobny mechanizm adsorpcji proteaz zasadowych na kutikuli szarańczy u innych entomopatogenów takich jak *V. lecanii* i *B. bassiana* odkryli Bidochka i Kchahatourians [52]. Jak twierdzą przytoczeni badacze, proteolizę zapoczątkowuje przyłączenie się centrum aktywnego enzymu do grup karboksylowych zlokalizowanych w ujemnie w naładowanych rejonach kutikuli.

Proteazy grzybów entomopatogennych hydrolizują nie tylko komponenty kutikuli owadów, ale mają również zdolność hydrolizy białek przeciwgrzybowych obecnych w epidermie owadów. Przemawia za tym fakt, iż wysokie stężenie lizozymu indukowało u *B. bassiana* i *M. anisopliae* syntezę proteaz trawiących to antymikrobowe białko [53].

ROLA CHITYNAZ

Badania nad mechanizmem porażania owadów przez grzyby owadobójcze, wskazywały, że o wirulencji *B. bassiana* czy *Nomuraea rileyi*, przynajmniej w części, decydują chitynazy grzybowe [54,55]. Świadczy o tym fakt, iż jak donoszą niektórzy badacze, mutanty entomopatogenne o zmniejszonej syntezie enzymów chitynolitycznych, cechowała zredukowana wirulencja [54]. Enzymy chitynolityczne, zwane powszechnie chitynazami to hydrolazy glikozydowe [EC 3.2.1.-], a więc katalizujące hydrolizę wiązania β -1,4 glikozydowego w chitynie [56]. Mimo, iż nomenklatura enzymów chitynolitycznych jest nadal pełna niejasności, to w ich obrębie wyróżnia się: endochitynazy i egzochitynazy [56]. Endochitynazy [EC 3.2.1.14] hydrolizują w sposób przypadkowy wiązania β -1,4 glikozydowe we wnętrzu cząsteczki chityny uwalniając rozpuszczalne oligomery N-acetyloglukozaminy, które z kolei są substratami dla egzochitynaz. Wśród egzochitynaz decydujące znaczenie w mikozie mają chitobiozydaza i N-acetyloglukozaminidaza. Chitobiozydaza [EC 3.2.1.29] hydrolizuje oligomery N-acetyloglukozaminy na dimery, które z kolei N-acetyloglukozaminidaza [EC 3.2.1.30] hydrolizuje do monomerów N-acetyloglukozaminy. Powstała N-acetyloglukozamina może być ostatecznie metabolizowana do CO₂, H₂O i NH₃. Chitynazy zalicza się do 18, 19 i 20 rodziny, przy czym większość chitynaz grzybowych należy do rodziny 18 [56]. Ostatnio chitynazy rodziny 18 podzielono na trzy podgrupy: A, B i C [57]. Z uwagi na fakt, iż chityna stanowi drugi co do wielkości składnik kutikuli owadów, to za kolejne enzymy, istotne w jej degradacji uznawane są chitynazy. Całkowita hydroliza chityny wymaga jednak działania licznych endo- i egzochitynaz [15]. Mimo prowadzonych badań, rola enzymów chitynolitycznych w pato-

genezie nadal nie jest w pełni poznana. Generalnie, masy cząsteczkowe poznanych chitynaz grzybowych mieszczą się w zakresie 27-190 kDa, a ich pI wynosi 3-8 [56]. Pomimo, iż obecność enzymów chitynolitycznych stwierdzono u większości przebadanych grzybów owadobójczych, to niestety niewiele ich scharakteryzowano. Spośród całej puli chitynaz najdokładniej przebadano enzymy pochodzące z grzyba owadobójczego *M. anisopliae*. Dotychczas udało się scharakteryzować zaledwie sześć chitynaz wytwarzanych przez tego entomopatogena: białko o masie 30 kDa, kilka endochitynaz: 33 kDa; dwie chitynazy 43,5 i 45 kDa o analogicznej sekwencji N-końca, enzym o masie cząsteczkowej 60 kDa, posiadający aktywność endo- i egzochitynazy (pH 5) oraz 110 kDa N-acetyloglukozaminidazę [22]. Scharakteryzowano trzy geny biorące udział w syntezie chitynaz: *chit1*, *chit2* i *chit3* [22].

Obecność dwóch N-acetyloglukozaminidaz stwierdzono w medium postinkubacyjnym *B. bassiana*: N-acetyloglukozaminidazę 1 o masie cząsteczkowej równej 97 kDa oraz N-acetyloglukozaminidazę 2, która jest bardziej termolabilna i jest heterodimerem zbudowanym z podjednostek o masie 64 i 66 kDa. Jak się okazało, oba enzymy wykazują maksymalną aktywność w pH 5 [58,59]. Również Havukkala i wsp. [60] z filtratów pochodzących z *B. bassiana* wyizolowali 45 kDa chitynazę. Przeważającą pulę spośród wyizolowanych i scharakteryzowanych grzybowych N-acetyloglukozaminidaz stanowią N-acetyloglukozaminidazy grzybów strzępkowych [61].

Stwierdzono, iż grzyby owadobójcze mogą wytwarzać różne chitynazy w zależności od rodzaju zastosowanego substratu, a więc gatunku owada, z którego pochodzi chityna czy kutikula [34]. Powszechnie wiadomo, iż u grzybów, chityna jest znaczącym ilościowo komponentem ściany komórkowej, dlatego też grzyby entomopatogenne wytwarzają także enzymy chitynolityczne, które nie biorą udziału w porażaniu owadów, a modelują i remodelują ścianę komórkową (kiełkowanie, wzrost strzępek, autoliza). Obecność takich chitynaz stwierdzono u grzybów z rodzajów, m.in.: *Mucor*, *Candida* czy *Fusarium* [62-66]. Brak jest jednoznacznych danych, które tłumaczyłyby jak grzyby rozpoznają różne źródła chityny i jak wpływa to na regulację chitynaz [57]. Większość badań nad regulacją i funkcją enzymów chitynolitycznych dotyczy niektórych gatunków grzybów strzępkowych [57]. Ostatnio zasugerowano, iż za remodelowanie ściany komórkowej u grzybów mogą być odpowiedzialne chitynazy należące do podgrupy B [57].

ROLA LIPAZ

Lipazy czyli acylohydrolazy triacyloglicerolowe [EC 3.1.1.3] to hydrolazy serynowe [21], których triadę katalityczną tworzą Ser-Asp-His, podobne do triady proteaz serynowych (<http://www.uwm.edu.pl/wnz/KBZ/Lipazy/triada.html>). Główną funkcją tych enzymów jest hydroliza wiązań estrowych triacylogliceroli (TAG) do wolnych kwasów tłuszczowych, diacylogliceroli (DAG), monoacylogliceroli (MAG) oraz glicerolu.

Enzymy lipolityczne stanowią jak do tej pory najmniej przebadaną grupę enzymów wytwarzanych przez grzyby owadobójcze, a ich rola w patogenezie owadów jest jak dotąd najmniej poznana [21,30]. Przypuszcza się, iż odpo-

wiedzialne są za rozpuszczanie wosków pokrywających kutikulę owadów oraz biorą udział w hydrolizie lipidów i lipoprotein. Najbardziej zewnętrzną warstwą w epikutikuli owadów i zarazem pierwszą linią obrony przeciwko grzybom owadobójczym jest warstwa lipidowa [19]. Obecnie uważa się, iż dzięki lipazom wzrasta adhezja struktur inwazyjnych grzyba owadobójczego do kutikuli. Uwalnianie na drodze lipolizy kwasy tłuszczowe obecne w kutikuli stawonogów potęgują oddziaływania hydrofobowe między grzybem owadobójczym a kutikulą, a to wzmacnia adhezję patogenu do kutikuli owada [43]. Niestety, nadal niewiele jest prac dotyczących enzymów lipolitycznych wyizolowanych z grzybów entomopatogennych. Znaczną pulę lipaz grzybowych stanowią enzymy z grzybów fitopatogennych z rodzajów *Botrytis*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus* i *Geotrichum* [67-69]. Wspomniani już Silva i wsp. [21] wyizolowali z *M. anisopliae* lipazę o masie cząsteczkowej 66 kDa i pI 5,6. Enzym wykazywał optymalną temperaturę działania 30°C i był stabilny w zakresie pH 3-6. U *Nomuraea rileyi* wyizolowano ostatnio lipazę o masie cząsteczkowej 81 kDa. Enzym ten nie wykazywał homologii do znanych obecnie enzymów lipolitycznych. Optymalne pH i temperatura aktywności wyizolowanej lipazy wynosiły odpowiednio 8 i 35°C [70].

Spośród innych enzymów grzybów owadobójczych Santi i wsp. [43] z konidiów *M. anisopliae* wyizolowali ostatnio fosfolipazę C. Jest to pierwsze doniesienie o występowaniu tego enzymu u *M. anisopliae*. Fosfolipazy niszczą fosfolipidy będące składnikami błon komórkowych owadów, co powoduje zaburzenie w funkcjonowaniu komórek stawonoga. Fosfolipaza u wielu mikrobiologicznych patogenów zaliczana jest do czynników wirulentnych. Kolejnymi enzymami zidentyfikowanymi u *M. anisopliae* była katalaza i peroksydaza. Są to enzymy chroniące przed reaktywnymi formami tlenu. Jak stwierdzono enzymy te wytwarzane są pod wpływem promieni UV-A i UV-B oraz ciepła, a więc chronią grzyba owadobójczego przed niekorzystnymi warunkami środowiska zewnętrznego [43].

PODSUMOWANIE

Uodparnianie się owadów na klasyczne insektycydy to poważny problem ekologiczny i ekonomiczny. Jednym z powodów dlaczego stawonogi uodparniają się na insektycydy jest ich zdolność do syntezy enzymów odpowiedzialnych za degradację i detoksykację ksenobiotyków pochodzących z różnych źródeł. Alternatywą dla chemicznych pestycydów mogą być biopreparaty wytworzone na bazie grzybów owadobójczych. Grzyby entomopatogenne jako naturalni wrogowie owadów, w toku ewolucji wytworzyły skuteczne mechanizmy penetracji kutikuli stawonogów oparte na mechanicznym nacisku strzępki inwazyjnej oraz wydzielaniu licznych enzymów proteo-, chityno- i lipolitycznych, które trawiąc poszczególne komponenty kutikuli owadów ułatwiają strzępce penetrującej osiągnięcie hemocelu ofiary. By jednak skutecznie wykorzystać ten unikalny mechanizm pokonywania kutikuli, należy w pełni poznać proces patogenezy. Wiadomo, iż o powodzeniu całego procesu infekcji decyduje pierwsze stadium, a więc penetracja przez kutikulę. Należy podkreślić, iż jako pierwsze w patogenezie kontakt z kutikulą mają enzymy wytwarzane przez grzyba owadobójczego. Tylko skoordynowane ich działanie jest w

stanie przełamać twardą i trudną do sforsowania barierę w postaci kutikuli, nawet niezależnie od jej składu. Dlatego też przyszłościowym wyzwaniem staje się poznanie roli jaką pełnią enzymy grzybów owadobójczych zwłaszcza w pierwszym etapie mikozy. Dopiero wówczas będzie możliwa aplikacja zdobytej wiedzy do produkcji bezpiecznych dla środowiska mikoinsektycydów i zmniejszenia w ten sposób liczebności populacji owadów szkodliwych.

PIŚMIENNICTWO

- Lacey LA, Frutos R, Kaya HK, Vail P (2001) Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biol Control* 21: 230-248
- Lord JC (2005) From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *J Invertebr Pathol* 89: 19-29
- St. Leger RJ, Wang Ch (2010) Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Appl Microbiol Biotech* 85: 901-907
- Shah PA, Pell JK (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotech* 61: 413-423
- Quesada-Moraga E, Santos-Quirós R, Valverde-García P, Santiago-Alaraz C (2004) Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *J Invertebr Pathol* 87: 51-58
- Scholtz EJ, Ng'habi K, Kihonda J, Takken W, Paaijman K, Abdulla S, Killeen GF, Knols BGJ (2005) An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science* 308: 1641-1642
- Milner RJ, Lim RP, Hunter DM (2002) Risk to the aquatic ecosystem from the *Metarhizium anisopliae* for locust control in Australia. *Pest Management Science* 58: 718-723
- Maniania NK, Sithanatham S, Ekesi S, Ampong-Nyarko K, Baumgärtner J, Löhr B, Matoka MC (2003) A field trial of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for control of onion thrips, *Thrips tabaci*. *Crop Protection* 22: 553-559
- Blanford S, Chan BHK, Jenkins N, Sim D, Turner RJ, Read AF, Thomas MB (2005) Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science* 308: 1638-1641
- Piątkowski J (2005) Grzyby owadobójcze, *Fahrenheit* nr 47
- Langewald J, Kooyman C (2007) Green muscle, a fungal biopesticide for control of grasshoppers and locusts in Africa. W: Vincent C, Goettel MS, Lazarovits G (red) *Biological control, a global perspective*. CABI, Oxfordshire, str. 311-327
- Bogus MI, Scheller K (2002) Extraction of an insecticidal protein fraction from the parasitic fungus *Conidiobolus coronatus* (Entomophthorales). *Acta Parasitol* 47: 66-72
- Bogus MI, Włóka E (2005) The effect of fungal infection on the hemolymph composition of *Neurotoma nemoralis* larvae. *Pesticides* 3: 177-181
- Bogus MI, Kędra E, Bania J, Szczepanik M, Czygier M, Jabłoński P, Pasztaleniec A, Samborski J, Mazgajska J, Polanowski A (2007) Different defense strategies of *Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella*, and *Calliphora vicina* against fungal infection. *J Insect Physiol* 53: 909-922
- Hegedus DD, Khachatourians GG (1995) The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotech Adv* 13: 445-490
- Chapman RF (1998) *The Insects – structure and function*, Cambridge University Press
- Samuels RI, Paterson IC (1995) Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. *Comp Biochem Physiol* 110B: 661-669
- Vega FE, Blackwell M (2005) *Insect-fungal associations; ecology and evolution*. Oxford University Press
- Pedrini N, Crespo R, Juárez MP (2007) Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp Biochem Physiol* 146: 124-137
- Deshpande MV (1999) Mycopenicillin Production by Fermentation: Potential and Challenges. *Crit Rev Microbiol* 25: 229-243
- Silva WOB, Santi L, Berger M, Pinto AFM, Guimarães JA, Schrank A, Vainstein MH (2009) Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochem* 44: 829-834
- Schrank A, Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56: 1267-1274
- St. Leger RJ, Staples RC, Roberts DW (1992) Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 120: 119-124
- Paananen A, Vuorimaa E, Torkkeli M, Penttilä M, Kauranen M, Ikkala O, Lemmetyinen H, Serimaa R, Linder MB (2003) Structural hierarchy in molecular films of two class II hydrophobins. *Biochemistry* 42: 5253-5258
- Vilcinskis A, Götz P (1999) Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. *Adv Parasitol* 43: 267-313
- Jarrold SL, Moore D, Potter U, Charnley AK (2007) The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycol Res* 111: 240-249
- Rangel DEN, Alston DG, Roberts DW (2008) Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycol Res* 112: 1355-1361
- Wekesa VW, Moraes GJ, Ortega EM, Delalibera I Jr (2010) Effect of temperature on sporulation of *Neozygites floridana* isolates from different climates and their virulence against the tomato red spider mite, *Tetranychus evansi*. *J Invertebr Pathol* 103: 36-42
- Clarkson JM, Charnley AK (1996) New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol* 4: 197-203
- Charnley AK (1994) Recent advantages in the study of entomopathogenic fungi. VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Montpellier 1: 292-297
- St Leger RJ, Bidochka MJ, Roberts DW (1994) Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. *Archiv Biochem Biophys* 313: 1-7
- Bogus MI, Szczepanik M (2000) Histopathology of *Conidiobolus coronatus* (Entomophthorales) infection in *Galleria mellonella* (Lepidoptera) larvae. *Acta Parasitol* 45: 48-54
- Wang C, Typas MA, Butt TM (2002) Detection and characterisation of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* 213: 251-255
- Krieger de Moraes C, Schrank A, Vainstein MH (2003) Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr Microbiol* 46: 205-210
- Pavlukova EB, Belozersky MA, Dunaevsky YE (1998) Extracellular proteolytic enzymes of filamentous fungi. *Biochemistry (Mosc)* 63: 899-928
- Bidochka MJ, Khachatourians GG (1990) Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *J Invertebr Pathol* 56: 362-370
- Charnley AK (1994) Recent advantages in the study of entomopathogenic fungi. VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Montpellier 2: 31-37
- Bagga S, Hu G, Screen SE, St. Leger RJ (2004) Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 324: 159-169
- Shah FA, Wang CS, Butt T M (2005) Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* 251: 259-266
- Zhang Y, Liu X, Wang M (2008) Cloning, expression and characterization of two novel cuticle-degrading serine proteases from the entomopathogenic fungus *Cordyceps sinensis*. *Res Microbiol* 159: 462-469
- Donatti AC, Furlaneto-Maia L, Fungaro MHP, Furlaneto MC (2008) Production and regulation of cuticle-degrading proteases from *Beauveria bassiana* in the presence of *Rhammatocerus schistocercoides* cuticle. *Curr Microbiol* 56: 256-260

42. Freimoser FM, Screen S, Hu G, St. Leger R (2003) EST analysis of genes expressed by the zygomycete pathogen *Conidiobolus coronatus* during growth on insect cuticle. *Microbiology* 149: 1893-1900
43. Santi L, Beys da Silva WO, Berger M, Guimarães JA, Schrank A, Vainstein MH (2010a) Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon* 55: 874-880
44. Segers R, Butt TM, Keen JN, Kerry BR, Peberdy J (1995) The subtilisins of the invertebrate mycopathogens *Verticillium chlamydosporium* and *Metarhizium anisopliae* are serologically and functionally related. *FEMS Microbiol Lett* 126: 227-232
45. Small CL, Bidochka MJ (2005) Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res* 109: 307-313
46. St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK (1993) Analysis of aminopeptidase and dipeptidylpeptidase IV from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Gen Microbiol* 139: 237-243
47. St Leger RJ, Joshi L, Roberts D (1998). Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Appl Environ Microbiol* 64: 709-713
48. Bidochka MJ, Khachatourians GG (1987) Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl Environ Microbiol* 53: 1679-1684
49. Sheng J, An K, Deng C, Li W, Bao X, Qiu D (2006) Cloning a cuticle-degrading serine protease gene with biologic control function from *Beauveria brongniartii* and its expression in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 53: 124-128
50. Czygier M, Dzik JM, Walajtyś-Rode E, Boguś MI (2000) Cuticle-degrading enzymes from pathogenic fungus *Conidiobolus coronatus*. *Acta Parasitol* 45: 247
51. Bania J, Samborski J, Boguś M, Polanowski A (2006) Specificity of an extracellular proteinase from *Conidiobolus coronatus* and its inhibition by an inhibitor from insect hemolymph. *Arch Insect Biochem Physiol* 62: 186-196
52. Bidochka MJ, Khachatourians GG (1994). Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. *J Invertebr Pathol* 64: 26-32
53. Vilcinskis A (1994) Biochemical and immunological study of the humoral immune defense of insects to fungal infection on the example of the great wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera). Ph. D. Thesis. University Berlin (after Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T (1997) Biological mediators of insects of insect immunity. *Ann Rev Entomol* 42: 611-643)
54. El-Sayed GN, Coudron TA, Ignoffo CM (1989) Chitinolytic activity and virulence associated with native mutant isolates of an entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J Invertebr Pathol* 54: 394-403
55. El-Sayed GN, Ignoffo CM, Leathers TD, Gupta SC (1993) Cuticular and non-cuticular substrate influence on expression of cuticle-degrading enzymes from conidia of an entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Mycopathologia* 122: 79-87
56. Duo-Chuan L (2006) Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161: 345-360
57. Seidl V (2008) Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol Rev* 22: 36-42
58. Bidochka MJ, Khachatourians GG (1993) Regulation of extracellular N-acetyl-D-glucosaminidase production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Can J Microbiol* 39: 6-12
59. Bidochka MJ, Tong KI, Khachatourians GG (1993) Partial purification and characterization of two extracellular N-acetyl-D-glucosaminidases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Can J Microbiol* 39: 40-45
60. Havukkala I, Mitamura C, Hara S, Hirayae K, Nishizawa Y, Hibi T (1993) Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes. *J Invertebr Pathol* 61: 97-102
61. Scigelova M, Crout DHG (1999) Microbial B-N-acetylhexosaminidases and their biotechnological applications. *Enzym Microb Tech* 25: 3-14
62. Balasubramanian R, Manocha MS (1992) Cytosolic and membrane-bound chitinases of two mucoraceous fungi: a comparative study. *Can J Microbiol* 132: 331-338
63. Binks PR, Robson GD, Goosey MW, Humphreys AM, Trinci APJ (1990) Chitin synthesis in *Fusarium graminearum* and its inhibition by edifenphos. *J Gen Microbiol* 137: 615-620
64. Jackson DJ, Saunders VA, Goday GW, Humphreys AM (1996) Chitinase activities from yeast and hyphal cells of *Candida albicans*. *Mycol Res* 100: 321-327
65. Ghormade VS, Lachke SA, Deshpande MV (2000) Dimorphism in *Benjaminiella poitrasii*: Involvement of intracellular endochitinase and N-Acetylglucosaminidase activities in the yeast-mycelium transformation. *Folia Microbiol* 45: 231-238
66. Adams DJ (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150: 2029-2035
67. Baillargeon MW, McCarthy SG (1991) *Geotrichum candidum* NRRL Y-553 lipase: purification, characterization and fatty acid specificity. *Lipids* 26: 831-836
68. Comménil P, Belinheri L, Sancholle M, Dehorter B (1995) Purification and properties of an extracellular lipase from the fungus *Botrytis cinerea*. *Lipids* 30: 351-353
69. Kawasaki L, Farres A, Aguirre J (1995) *Aspergillus nidulans* mutants affected in acetate metabolism isolated as lipid nonutilizers. *Exp Mycol* 19: 81-85
70. Supakdamrongkul P, Bhumiratana A, Wiwat C (2010) Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. *J Invertebr Pathol* 105: 228-235

Extracellular hydrolytic enzymes produced by entomopathogenic fungi – role in an infection process

Emilia Włóka✉

Institute of Parasitology Polish Academy of Science, 51/55 Twarda St., 00-818 Warsaw, Poland

✉e-mail: milka@twarda.pan.pl

Key words: *Conidiobolus coronatus*, entomopathogenic fungi, *Galleria mellonella*, proteases, chitinases, lipases

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi have a great potential in biological control of insect pest population. Fungal pathogens are promising source of insecticides and notable alternative to chemical pesticides. These fungi possess a unique mechanism of insects paralysis. As natural enemies of insects they attack direct host cuticle via a combination of mechanical pressure and cuticle-degrading enzymes. Entomopathogenic fungi produce several proteo-, chitino- and lipolytic enzymes, which are accepted as key factors in insect mycosis. The role of extracellular enzymes in pathogenesis is still not well understood. Profound understanding the mechanisms of insect paralysis by entomopathogenic fungi will help in the production of safer for environment and more efficiency mycoinsecticides.



52nd International Conference on the Bioscience of Lipids

Expanding the Horizons of Lipidomics

30th August - 3rd September 2011, Warsaw, Poland



Oral sessions:

Lipids in molecular medicine
Lipids in regulation of gene expression
Lipids in signaling and intracellular trafficking
Membrane microdomains, lipid binding proteins and membrane repair
Lipid modifications of macromolecules
Isoprenoid lipids
Lipid - protein interactions

Invited speakers:

Peter J. Quinn, London	Annette Draeger, Bern
James Ntambi, Madison	Li Peng, Beijing
Jean E. Vance, Edmonton	Jun-ichi Inokuchi, Sendai
Thomas W. Gettys, Baton Rouge	Kirill Alexandrov, Dortmund
Christian Wolfrum, Zürich	Lawrence Marnett, Nashville
Jan Kopecky, Prague	Michel Rohmer, Strasbourg
Frank J. Gonzalez FJ, Bethesda	Po Huang Liang, Taipei
Elina Ikonen, Helsinki	Gustav Dallner, Stockholm
Shun-ichi Nakamura, Kobe	Toon de Kroon, Utrecht
Laszlo Vigh, Szeged	Amitabha Chattopadhyay, Hyderabad
Volker Gerke, Muenster	Michel Lagarde, Lyon

Registration

Early registration till April 30, 2011

Late registration from May 01, 2011

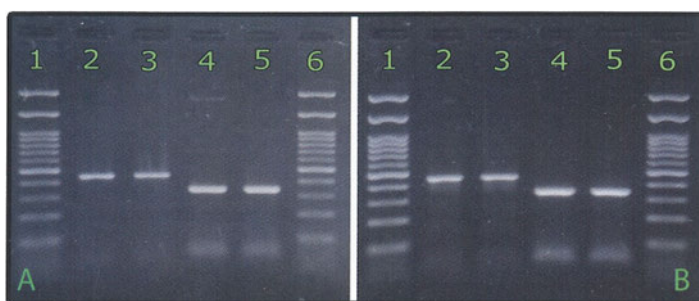
Abstracts:

Submission deadline May 01, 2011

Midori Green DNA Stain

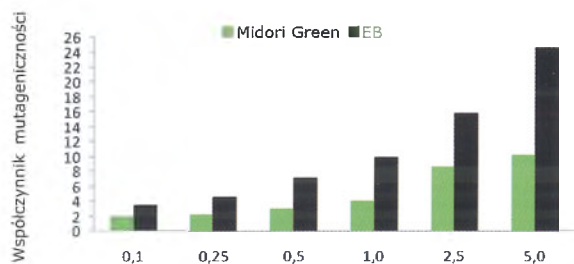
Bezpieczny barwnik do barwienia żeli agarozowych!

Midori Green DNA Stain jest bezpieczną alternatywą dla kancerogennego bromku etydy. Jest równie czuły, a procedura barwienia żeli agarozowych odbywa się w ten sam sposób. Midori Green DNA Stain emituje zielone światło po związaniu z DNA lub RNA. Posiada dwa drugorzędowe szczyty ekscytacji (~300 nm, 400 nm) oraz jeden silny ~500 nm. Emisja fluorescencji następuje w obrębie ~540 nm, dzięki temu Midori Green DNA Stain jest kompatybilny z wieloma urządzeniami wizualizującymi.



Rys.1 Żel agarozowy barwiony przy pomocy Midori Green DNA Stain (A) oraz bromku etydy (B).

Bezpieczeństwo: Aby ocenić potencjalną genotoksyczność, Midori Green DNA Stain został przetestowany w jąderkach szpiku kostnego myszy. Wynik był negatywny w przeciwieństwie do bromku etydy oraz innych barwników. Oprócz tego Midori Green został poddany testowi na aberracje chromosomowe. Midori Green jest niekancerogenny i na podstawie wyników testu Ames'a, można stwierdzić, że powoduje znacznie mniej mutacji niż bromek etydy Rys.2.



Współczynnik mutageniczny Midori Green oraz bromku etydy (µg/plytkę) z metaboliczną aktywacją.

Rys.2 Podsumowanie wyników testu Ames'a. Stopień mutageniczności Midori Green i bromku etydy z aktywacją metaboliczną (S9) w oznaczeniu mutageniczności TA98; dawka-odpowiedź. Na podstawie wyników testu Ames'a można stwierdzić, że Midori Green powoduje znacznie mniej mutacji niż bromek etydy.

Usuwanie: Midori Green nie jest sklasyfikowany jako substancja niebezpieczna, dlatego może być bezpiecznie usuwany do sieci kanalizacyjnej lub jako zwykły śmieć. Odpady muszą być usuwane zgodnie z obowiązującymi na danym terytorium przepisami środowiskowymi.

Informacje do zamówienia:

Nr kat.	Produkt	Wielkość
MG01	Midori Green	50 µl
MG02	Midori Green	1 ml



abo

abo Grażyna Tarnowska Boreysza
ul. Podlesna 6a, 80-255 Gdańsk
Biuro: ul. Wichrowe Wzgórze 123, 80-293 Gdańsk
tel.: (58) 341 21 43; fax: (58) 520 33 80
e-mail: abo@abo.com.pl; www.abo.com.pl

<http://rcin.org.pl>

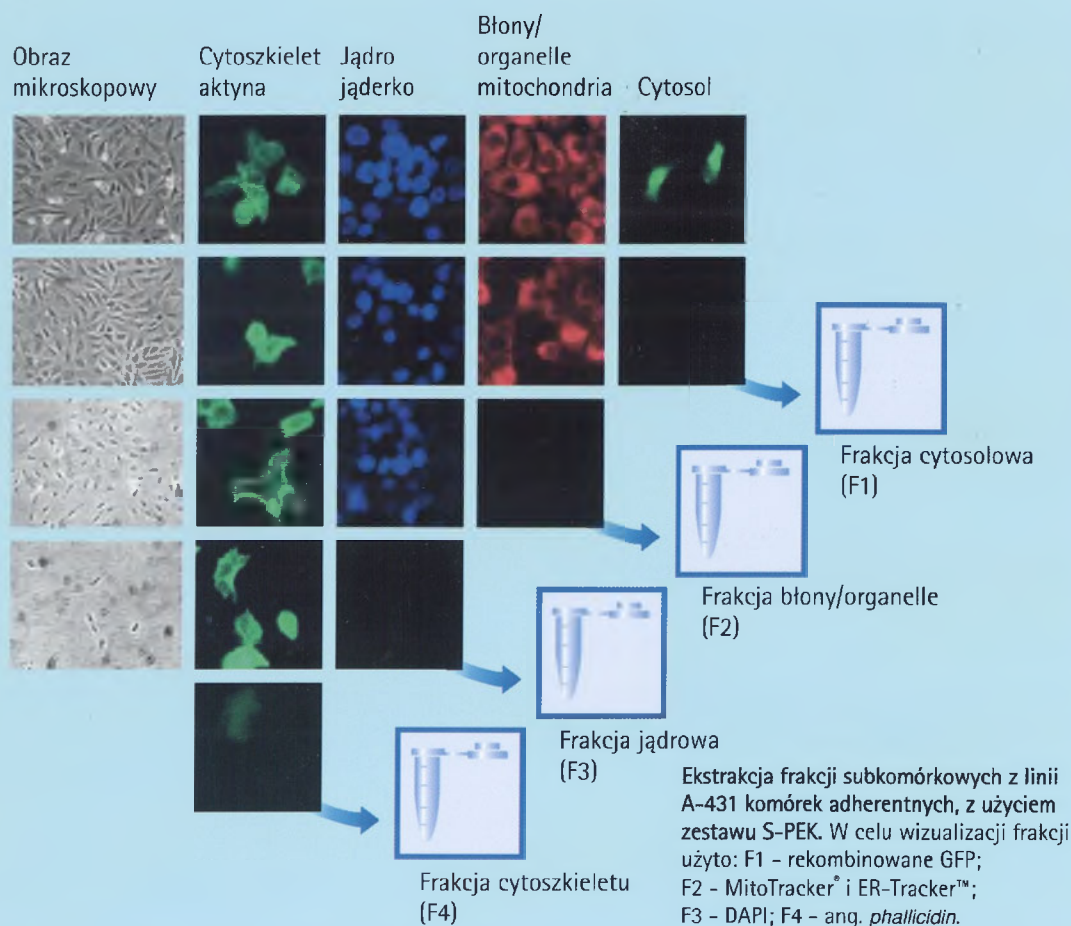
Genetics NIPPON Genetics
EUROPE GmbH

ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (S-PEK)

Calbiochem®
Novagen®

ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (S-PEK) przeznaczony jest do szybkiej i powtarzalnej ekstrakcji proteomów subkomórkowych z tkanek ssaków oraz adherentnych i zawiesinowych kultur komórkowych.

- Otrzymywane są cztery frakcje białek z jednej próbki: cytosol; błony/organelle; jądro; cytoszkielet.
- Szybka procedura – tylko 2 godz. (w tym 45 minut pracy manualnej).
- Wysoko powtarzalne wyniki.
- Nie jest wymagane ultrawirowanie próbek.
- Współdziała z następującymi dalszymi aplikacjami: 1 D i 2D PAGE, SELDI, ELISA, immunoblotting, badania aktywności oraz mikromacierze białkowe.



Merck Sp. z o.o.
Aleje Jerozolimskie 178
02-486 Warszawa
tel.: 022 53 59 770
fax: 022 53 59 945
dzial.handlowy@merck.pl
www.merck-chemicals.pl

