

B. Borkowski

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN  
0032-5422

## Advances in Biochemistry

TOM 47, NR 4, 2001 . . . . .

Tomasz Borkowski - wspomnienie . . . . .	
Oddziaływanie białko-RNA . . . . .	272
Rybozymy „hammerhead” . . . . .	282
Charakterystyka nukleaz 5' . . . . .	292
Kwercetyna . . . . .	299
Białko CD36 . . . . .	307
Regulacja aktywności AOX . . . . .	318
Działanie bisfosfonianów . . . . .	328

Z głębokim żalem zawiadamiamy,  
że w dniu 2 października 2001 roku zmarł w Lublinie

**Profesor dr hab. n. med. Tomasz Borkowski**

wybitny uczony, lekarz i biochemik,

wychowawca wielu pokoleń lekarzy medycyny, całe życie związany z ziemią lubelską, wieloletni Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Fizjologicznej oraz Prorektor do spraw studenckich Akademii Medycznej w Lublinie, członek wielu Towarzystw Naukowych. Szczególnie zasłużony działacz i Członek Honorowy Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Aktywny do końca swego życia, służył swym doświadczeniem i pomocą, był dobrym i życzliwym człowiekiem.

Pozostajemy zasmuceni

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Redakcja Kwartalnika „Postępy Biochemii”



Profesor Tomasz Ludwik Borkowski urodził się 1 marca 1925 roku w Łabuniach w powiecie zamojskim. Do szkoły podstawowej uczęszczał w Łabuniach, skąd jako aktywny harcerz został wydelegowany w roku 1935 na Światowy Zlot Harcerski do Spały i uczestniczył w defiladzie przed prezydentem Ignacym Mościckim. Do czasu wybuchu wojny uczęszczał do Gimnazjum w Zamościu. W roku 1938 stracił ojca. Wybuch wojny przerwał naukę, wojska niemieckie spaliły dom rodzinny, rozpoczęła się akcja wysiedleńcza Zamojszczyzny. Warunki okupacji zmusiły młodego chłopca do podjęcia pracy w gorzelnii, był tam praktykantem. Podczas okupacji angażował się czynnie w działalność konspiracyjną, uczestniczył w zorganizowanej przez dowództwo okręgu AK szkole podoficerskiej w obozie leśnym pod Zwierzyńcem, brał udział w kilku akcjach bojowych oddziału.

Po wyzwoleniu podjął przerwana naukę w Gimnazjum i Liceum Towarzystwa Szkoły Średniej w Lublinie, gdzie w roku 1946 uzyskał świadectwo dojrzałości i został przyjęty na Wydział Lekarski Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej. Pierwsze dwa lata studiów medycznych zakończył z wyróżnieniem. W roku 1948, jeszcze w trakcie studiów, rozpoczął pracę w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizjologicznej pod kierunkiem profesor Janiny Opieńskiej-Blauth. Miało to decydujący wpływ na Jego dalsze drogi życiowe. Prowadzony i

inspirowany przez Profesor Opieńską zespół młodych ludzi oprócz działalności dydaktycznej rozpoczął dynamiczne badania naukowe. W zespole tym pracowała również studentka Wydziału Weterynaryjnego UMCS, Irena Madecka, od roku 1949 żona Tomasza Borkowskiego. W roku 1951 uzyskał On tytuł lekarza medycyny oraz stopień doktora nauk medycznych. Zatrudniony nadal w Zakładzie zwyczajowo określanym jako medycyna teoretyczna współpracował z Zakładami tak zwanej medycyny praktycznej. Pod kierunkiem Profesora Alfreda Tuszkiewicza specjalizował się w zakresie chorób wewnętrznych i przeprowadzał badania o charakterze kliniczno-analitycznym. W roku 1956 przebywał na 3-miesięcznym stażu naukowym w pracowniach biochemicznych w Paryżu, Lille i Marsylii. W roku 1959, po przedłożeniu pracy pt. „Czynniki stymulujące oddychanie tkanki mózgowej *in vitro*”, uzyskał stopień kandydata nauk medycznych. Nawiązane kontakty naukowe z ośrodkami biochemicznymi we Francji zaowocowały przyznaniem przez Centre Nationale de Recherche Scientifique stypendium naukowego, które pozwoliło Tomaszowi Borkowskiemu przez rok pracować w Instytucie Chemii Biologicznej Wydziału Lekarskiego w Strasburgu pod kierunkiem Profesora P. Mandla. Prowadził tu badania nad kwasami nukleinowymi ośrodkowego układu nerwowego i wykazał po raz pierwszy obecność

DNA w mitochondriach komórek mózgowych. Po powrocie do kraju i przedłożeniu rozprawy habilitacyjnej na temat: „Kwasy nukleinowe w układzie nerwowym” uzyskał stopień doktora habilitowanego oraz tytuł i stanowisko docenta już w 1962 roku. Równoległe z pracą badawczą w Zakładzie Chemii Fizjologicznej, docent kierował od 1961 roku pracą Centralnego Laboratorium Klinicznego i prowadził badania w dziedzinie biochemii klinicznej.

W roku 1965, z chwilą odejścia na emeryturę Profesor Janiny Opieńskiej-Blauth, w wyniku postępowania konkursowego został powołany na stanowisko kierownika Katedry i Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie, które piastował do chwili przejścia na emeryturę w roku 1995. Tytuł i stanowisko profesora nadzwyczajnego, nadany przez Radę Państwa uzyskał w 1970 roku, a profesora zwyczajnego w 1975 roku. W latach 1972-1981 profesor dr hab. med. Tomasz Borkowski pełnił funkcję Prorektora ds. Nauki AM, w roku 1974 został powołany na członka Rady Głównej Szkolnictwa Wyższego i Techniki. Był długoletnim członkiem Rady Naukowej Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie oraz Instytutu Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie.

Pół wieku aktywnego uczestnictwa Profesora Borkowskiego w życiu naukowym, dydaktycznym i organizacyjnym Akademii Medycznej w Lublinie został uhonorowane przyznaniem Mu honorowego doktoratu macierzystej Uczelni.

Profesor Tomasz Borkowski był członkiem wielu towarzystw naukowych. W latach 1971 – 1974 był Prezesem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, uczestniczył w wielu komisjach naukowych, a od roku 1992 także Członkiem Honorowym Towarzystwa. Należał do Polskiego Towarzystwa Lekarskiego, Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej oraz Lubelskiego Towarzystwa Naukowego. Był też jednym z członków założycieli International Society of Neurochemistry.

Początkowe prace badawcze Tomasza Borkowskiego dotyczyły metabolizmu węglowodanowego u drobnoustrojów. Przy zastosowaniu różnych inhibitorów udało się między innymi wykazać, że bakterie *Escherichia coli* są zdolne metabolizować glukozę na drodze bezfosforylacyjnej poprzez działanie oksydazy glukozowej. Identyfikacja metabolitów pośrednich wymagała opracowania i wprowadzenia współczesnych metod analitycznych w tym głównie metody chromatografii bibułowej. W owym czasie prace te miały charakter

pionierski w skali krajowej, a Zakład Chemii Fizjologicznej był centrum szkolenia w dziedzinie chromatografii bibułowej pracowników naukowych z innych pracowni. Z tego okresu pochodzą prace Profesora z dziedziny chromatografii bibułowej o charakterze metodycznym. Opisane wówczas metody analityczne znalazły szerokie zastosowanie w licznych laboratoriach naukowych i weszły w skład opracowań monograficznych lub podręcznikowych. Podsumowaniem tej działalności było opracowanie rozdziału do pierwszej w Polsce monografii pt. „Chromatografia”.

Równocześnie z wyżej opisanymi badaniami Profesor podjął czynną współpracę naukową z Klinikami Akademii Medycznej w Lublinie. Na szczególną uwagę zasługuje szerokie wprowadzenie do badań klinicznych metod chromatografii bibułowej oraz wczesne spopularyzowanie w Polsce metody immunoelektroforezy. Szereg opracowanych wówczas metod znalazło zastosowanie w bieżącej pracy diagnostycznej. Publikacje z tego zakresu zaistniały dzięki współpracy Profesora z klinicystami, m. in. poprzez działania Centralnego Laboratorium Klinicznego, którym kierował On przez pełne 40 lat.

Z tej dziedziny badań na szczególne podkreślenie zasługują prace dotyczące właściwości fizykochemicznych kolagenu ściany aorty w różnych warunkach fizjologicznych i patologicznych.

Podstawowym kierunkiem osobistych zainteresowań Profesora Tomasza Borkowskiego są badania dotyczące najogólniej pojętej struktury molekularnej centralnego układu nerwowego. Od roku 1953 Profesor zajmował się problemem stymulacji procesów oddechowych w tkance mózgowej, metabolizmem kwasów nukleinowych w poszczególnych strukturach anatomicznych mózgu oraz w subfrakcjach komórki nerwowej, charakterystyką zasadowych białek jąder i rybosomów mózgowych oraz autonomią metabolizmu nukleinowo-białkowego w mitochondriach mózgowych.

Jakkolwiek Profesor Tomasz Borkowski związał całe swoje czynne życie naukowe i dydaktyczne z Akademią Medyczną w Lublinie, to jednak pracował okresowo w kilku laboratoriach francuskich i szwedzkich. Współpraca z ośrodkiem biochemicznym w Strasburgu zaowocowała publikacją w *Nature* w roku 1961, w której stwierdzono po raz pierwszy, że DNA w komórkach nerwowych występuje również w strukturach pozajądrowych, takich jak mitochondria. Bardzo istotne stało się ustalenie, że DNA mózgowia jest metabolicznie nieczynny. W „*Nature*” również opublikował jako

współautor artykuł na temat katabolizmu węglowodanów u bakterii. W trakcie badań nad kwasami nukleinowymi mózgu zostały opracowane nowe metody m.in. metoda jednoczesnej analizy składu nukleotydowego RNA i DNA, które wprowadzono do badań w laboratoriach krajowych i zagranicznych.

Mitochondralne kwasy nukleinowe były przedmiotem wielu jego publikacji. Jedną z nich pt. „*Characteristic of Mitochondrial Nucleic Acids Obtained from Calf Brain Gray and White Matter*” uzyskała I nagrodę Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej i była zamieszczona w Złotej Księdze z okazji Kongresu Nauki Polskiej.

W ostatnich latach na szczególną uwagę zasługują publikacje na temat wielocząsteczkowych kompleksów syntetaz aminoacylo-tRNA w tkance mózgowej i innych tkankach.

Na dorobek naukowy profesora Tomasza Borkowskiego składają się 102 oryginalne prace doświadczalne, wielokrotnie cytowane oraz 8 artykułów monograficznych i poglądowych. Uczestniczył aktywnie w licznych zjazdach i w 8 Kongresach Międzynarodowych.

Profesor Borkowski był zasłużonym pedagogiem, nauczycielem akademickim. Opracował dwa skrypty dla studentów. Wspólnie z innymi wykładowcami biochemii na Akademii Medycznych co roku uczestniczył w spotkaniach dydaktycznych i wytrwale zabiegał o poprawę i unowocześnienie dydaktyki.

Jako nauczyciel akademicki w ciągu prawie 50 lat pracy dydaktycznej przekazywał wiedzę biochemiczną adeptom wiedzy lekarskiej i studentom Wydziału Pielęgniarskiego. Prowadził prelekcje na Uniwersytecie Trzeciego Wieku. Cieszył się uznaniem młodzieży a Jego wykłady, zawsze ciekawe i nowoczesne, gromadziły rzesze studentów. Profesor szczególną troską otaczał działalność Studenckich Kół Naukowych.

Przejsie w 1995 roku na emeryturę nie zmniejszyło aktywności Profesora. Niemal do końca swoich dni uczestniczył w życiu Zakładu, aktywnie włączał się w dyskusje naukowe, chętnie służył radą i doświadczeniem. Profesor uprawiał sam i był wielkim propagatorem sportu. Jeździł na nartach, doskonale pływał, co najmniej raz w tygodniu rozgrywał mecz tenisowy, po przejściu na emeryturę

z zaprzyjaźnionymi seniorami tenisistami. Był zamiłowanym turystą, na swym rowerze górskim robił długie wycieczki wokół jezior Pojezierza Łęczyńskiego. Na Uczelni opiekował się Akademickim Zrzeszeniem Sportowym, pomagał w organizowaniu i patronował studenckim imprezom sportowym.

Profesor Tomasz Borkowski był zawsze życzliwym dyskutantem, opiekunem i doradcą młodych pracowników nauki. Cieszył się szacunkiem i sympatią swoich współpracowników. Był promotorem 26 prac doktorskich i opiekunem 5 habilitantów. O autorytecie Profesora świadczy powierzenie mu recenzji 68 doktoratów, 33 habilitacji i 25 wniosków o tytuły profesorskie. Z tytułu swojej dodatkowej specjalizacji w zakresie diagnostyki laboratoryjnej Profesor Borkowski uczestniczył w specjalizacji nowych kadr analityków, a przez okres 30 lat pełnił funkcje specjalisty wojewódzkiego z tej dziedziny.

Był odznaczony Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski, Medalem Zasłużonego dla Nauki, licznymi odznaczeniami resortowymi i wojewódzkimi.

Dzięki swojej wiedzy i życzliwości Profesor Borkowski cieszył się szacunkiem całego środowiska biochemicznego a jego działalność naukowa i społeczna była ogólnie znana i wysoko ceniona.

Był seniorem i jedną z czołowych postaci polskiej biochemii, znakomitym nauczycielem i badaczem. Zmarł dnia 2 października 2001 roku. Jego śmierć okryła żałobą środowisko biochemików polskich, społeczność Uczelni i Katedry.

Dnia 8 października w Lublinie, w Kaplicy przy Państwowym Szpitalu Klinicznym Profesora Tomasza Borkowskiego żegnał JM Rektor AM, Profesorowie, społeczność akademicka, przyjaciele, uczniowie, współpracownicy, studenci. Jego osobowość, urok osobisty, życzliwość pozostaną na zawsze w naszej wdzięcznej i pełnej szacunku pamięci.

Pogrzeb odbył się w Cieszynie, gdzie spoczął obok wcześniej zmarłej żony Ireny.

*Współpracownicy i uczniowie*

# **IV KONFERENCJA PARNASOWSKA**

## **„MOLECULAR MECHANISMS OF CELL ACTIVATION: BIOLOGICAL SIGNALS AND THEIR TARGET ENZYMES”**

**15-17 WRZESIEŃ 2002 WROCŁAW**

**Drogie Koleżanki**  
**Drodzy Koledzy,**

Uprzejmie informujemy, że w dniach od 15 do 17 września 2002 roku we Wrocławiu odbędzie się Konferencja Parnasowska organizowana w ramach obchodów 300-lecia Uniwersytetu Wrocławskiego. Będzie to czwarte spotkanie biochemików polskich i ukraińskich dla uczczenia pamięci Jakuba Karola Parnasa, znakomitego polskiego biochemika, profesora Uniwersytetu Jana Kazimierza we Lwowie tragicznie zmarłego w moskiewskim więzieniu.

W ramach konferencji przewidujemy referaty wykładowców polskich i ukraińskich jak również sesję plakatową.

Serdecznie zapraszamy do udziału w konferencji.

Za Komitet Organizacyjny

Jolanta Barańska  
Andrzej Dżugaj

Pierwszy komunikat podający szczegółowe informacje nt konferencji ukaże się w styczniu 2002.

Konferencja Parnasowska poprzedzi XXXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, który odbędzie się we Wrocławiu w dniach 18-21 września 2002 roku.

## WYDAWCA

Editor  
POLSKIE TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
Polish Biochemical Society  
ul. Pasteura 3,  
02-093 Warszawa, Poland  
tel/fax 658-20-99  
e-mail — ptbioch@nencki.gov.pl  
www.ptbioch.edu.pl

## REDAKTOR SENIOR

Senior Editor  
ZOFIA ZIELIŃSKA  
tel. 831-24-03

## REDAKTOR NACZELNY

Editor in chief  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
tel. 658-47-02

## REDAKTORZY

Editors  
KRYSTYNA GRZELAK  
DANUTA HULANICKA  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
ANDRZEJ KASPRZAK  
LILIANA KONARSKA  
ANNA SZAKIEL  
ADAM SZEWCZYK

## BIURO REDAKCJI

Editorial office  
SEKRETARZ  
Secretary  
HANNA LASKOWSKA  
poniedziałki, czwartki  
monday—thursday  
14—16  
tel. 659-85-71 w. 441  
SKŁAD I ŁAMANIE  
Typesetting  
MAŁGORZATA BASAJ

## RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue  
GRZEGORZ BARTOSZ (Łódź)  
ANNA BOGUSZEWSKA-  
CHACHULSKA (Warszawa)  
WITOLD JACHYMCZYK  
(Warszawa)  
MARCIN KRUSZEWSKI  
(Warszawa)  
ROMAN LORENC (Warszawa)  
BARBARA TOMASZEWSKA  
(Poznań)  
STANISŁAW SZALA (Gliwice)  
MACIEJ SIEWIŃSKI (Wrocław)

## ADRES REDAKCJI

Address  
REDAKCJA KWARTALNIKA  
„POSTĘPY BIOCHEMII”  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa  
e-mail: postepy@nencki.gov.pl

## SPIS TREŚCI

## CONTENTS

### Profesor Tomasz Borkowski – Wspomnienie

Professor Tomasz Borkowski - Obituary  
.....

### Rola oddziaływania białko-RNA podczas cyklu życiowego wirusa HIV

The role of protein-RNA interaction in the HIV virus life cycle  
JOANNA SZEPETA-WIŚNIEWSKA, ELIZA WYSZKO, MIROŚŁAWA  
BARCISZEWSKA. .... 272

### Zastosowanie rybozymów „hammerhead” jako czynników przeciwwirusowych

The application of the hammerhead ribozymes as antiviral tools  
MARZENA ROLA, JACEK KUŹMAK. .... 282

### Charakterystyka rodziny nukleaz 5'

The characteristics of 5' nucleases family  
KARINA SOLECKA, ANNA PRZYKORSKA. .... 292

### Kwercetyna: znaczenie w mutagenезie i karcynogenезie

Quercetin: the significance in mutagenesis and carcinogenesis  
ANDRZEJ TRZECIAK. .... 299

### Budowa i funkcje białka CD36

Structure and functions of CD36  
URSZULA KRALISZ. .... 307

### Regulacja aktywności oksydazy alternatywnej

Regulation of the alternative oxidase activity  
IZABELA M. JUSZCZUK, ANNA M. RYCHTER. .... 318

### Mechanizmy przeciwwresorpcyjnego działania bisfosfonianów w chorobach układu kostnego

Mechanisms of antiresorptive action of bisphosphonates in  
bone diseases  
EWA BAŁCZEWSKA, PIOTR BAŁCZEWSKI. .... 328

### Sprawozdanie Polskiego Związku Biochemicznego

..... 337

## Rola oddziaływania białko-RNA podczas cyklu życiowego wirusa HIV

### The role of protein-RNA interaction in the HIV virus life cycle

JOANNA SZEPETA-WIŚNIEWSKA<sup>1,2</sup>, ELIZA WYSZKO<sup>2</sup>,  
MIROŚŁAWA BARCISZEWSKA<sup>2</sup>

#### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Białko regulatorowe Tat
- III. TAR RNA
- IV. Mechanizm transkrypcji wirusa
- V. Inhibitory oddziaływań Tat-TAR RNA

#### Contents:

- I. Introduction
- II. Tat regulatory protein
- III. TAR RNA
- IV. Mechanism of HIV transcription
- V. Inhibitors of the Tat-TAR RNA interactions

**Wykaz stosowanych skrótów:** AIDS — ang. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*, zespół nabytego niedoboru odporności; CTD — ang. *carboxyl-terminal domain*, domena C-końcowa polimerazy II RNA; HAART — ang. *highly active antiretroviral therapy*, terapia z zastosowaniem kilku inhibitorów replikacji wirusa HIV; HIV — ang. *human immunodeficiency virus*, wirus niedoboru odporności; letter — ang. *long terminal repeats*, powtarzalne sekwencje znajdujące się przy obu końcach nici RNA; P-TEFb — ang. *positive-acting transcription elongation factor*, czynnik elongacyjny; TAR RNA — ang. *trans-activating responsive element*; Tat — ang. *transcription anti-termination protein*, aktywator transkrypcji wirusa HIV; TFIIF — ang. *transcription factor*, czynnik transkrypcyjny.

#### I. Wstęp

W 1981 roku po raz pierwszy opisano chorobę znaną obecnie pod nazwą zespołu nabytego niedoboru odporności— AIDS (ang. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*). Jest ona wywoływana obecnością retrowirusa HIV-1 (ang. *human immuno-*

*deficiency virus*) [1, 2]. Pięć lat później odkryto wirus HIV-2, który powodował AIDS u części chorych w Afryce [3]. Wirusy HIV-1 i HIV-2 zaliczane do podrodziny *Lentivirinae* są spokrewnione z ludzkim wirusem HTLV-1 (ang. *human T-lymphotropic virus 1*) wywołującym rzadki rodzaj białaczki. *Lentiwirusy* powodują przewlekłe, postępujące, najczęściej śmiertelne choroby u ssaków. Do tej podrodziny zaliczamy również: wirus niedoboru odporności małp SIV (ang. *simian immunodeficiency virus*), wirus niedoboru odporności kotów FIV (ang. *feline immunodeficiency virus*), wirus Visna owiec oraz opisany jako pierwszy wirus niedokrwiistości zakaźnej koni EIAV (ang. *equine infectious anemia virus*).

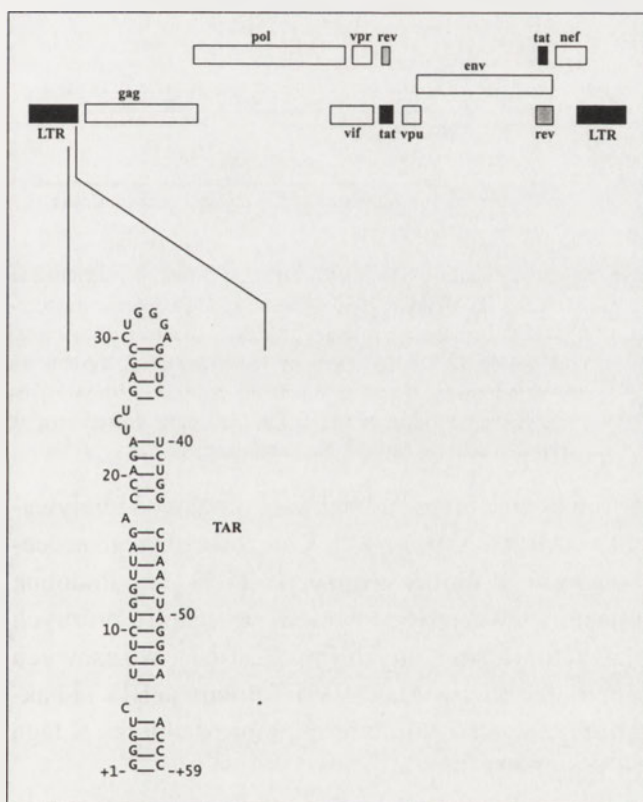
Genom HIV zbudowany jest z dwóch identycznych nici RNA o długości 9500 zasad. Zawiera on 9 genów. Trzy z nich *gag*, *env*, *pol* występują w cząsteczkach znanych retrowirusów. Kodują one białka kapsydu (*gag*) i otoczki (*env*) oraz odwrotną transkryptazę, integrazę i proteazę (*pol*); enzymy niezbędne w rozwoju wirusa. Pozostałe 6 genów: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu* koduje białka regulatorowe [4] (Ryc. 1).

<sup>1</sup>Mgr inż., <sup>2</sup>dr, <sup>2</sup>prof. dr hab.; <sup>1</sup>Akademia Rolnicza, ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań; <sup>2</sup>Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań; e-mail: mbarcisz@ibch.poznan.pl



Organizacja genomów HIV-1 i HIV-2 jest podobna, chociaż ich sekwencje nukleotydowe różnią się wyraźnie. Wykazano, że podobieństwo genów *gag* i *pol* wynosi 50-60%, natomiast pozostałych genów oraz powtarzających się elementów LTR (ang. *long terminal repeats*) 30-40% [4]. Ekspresja HIV zależy od sekwencji LTR znajdujących się przy końcach obu nici RNA. Są tam miejsca inicjacji transkrypcji, sekwencje TATA, oraz oligonukleotydy wiążące komórkowe czynniki transkrypcyjne, takie jak *NF-KB*, *NF-AT*, czy *AP-1* [5-7].

RNA wirusa upakowany jest w dwuwarstwowym kapsydie zbudowanym z białka p24 (CA ang. *capsid protein*), będącego produktem genu *gag*. Zew-



Ryc. 1. Schemat organizacji genomu wirusa HIV-1. LTR—powtarzalne sekwencje, znajdują się przy obu końcach nici RNA i regulują ekspresję genów wirusa. Geny strukturalne: *gag*—koduje białka kapsydu, *env*—białka otoczki, *pol*—odwrotną transkryptazę, integrazę, proteazę. Geny regulatorowe: *tat*—aktywuje transkrypcję genów wirusa poprzez oddziaływanie z elementem TAR RNA, *rev*—reguluje transkrypcję HIV w wyniku wiązania z elementem RRE, bierze udział w dojrzewaniu mRNA wirusa (ang. *splicing*), *nef*—obniża ekspresję receptorów CD4 na powierzchni zainfekowanych komórek, aktywuje kinazy komórkowe, *vif*—wpływa na internalizację i odplaszczanie wirusa, dojrzewanie wirionów, *vpr*—nieobecny w HIV-2, wpływa na uwalnianie wirionów z zainfekowanej komórki, redukuje ekspresję CD4, *vpr*—zawiera sygnał lokalizacji jądrowej oraz bierze udział w transporcie kompleksu preinicjacyjnego z cytoplazmy do jądra.

nętrzną otoczkę HIV stanowi błona białkowo-lipidowa zawierająca dwie glikoproteiny gp120 (SU ang. *surface glykoprotein*) i gp41 (TM ang. *transmembrane protein*). Ich prekursorem jest cząsteczka gp160 kodowana przez gen *env*. Gp41 jest białkiem transbłonowym związanym z peptydem gp120 zlokalizowanym na zewnętrznej stronie błony [8-10, 14]. Glikozylowane białko gp120 bierze udział w rozpoznawaniu komórek układu odpornościowego, głównie limfocytów T pomocniczych, ale również makrofagów i komórek dendrycznych [11]. Wnikając do komórki, HIV wykorzystuje znajdujące się na jej powierzchni dwa typy receptorów: CD4 oraz CCR5 lub CXCR4, blokując przyłączanie naturalnych ligandów komórkowych—cząsteczek MHC klasy II dla CD4 oraz chemokin dla CCR5 lub CXCR4. U poszczególnych izolatów wirusa w obrębie białka gp120 wyróżnić można pięć zachowawczych regionów (C1-C5), które przedzielone są zmiennymi sekwencjami aminokwasów (V1-V5). Trzy z nich przy końcu karboksylowym stanowią miejsce wiązania cząsteczek CD4 oraz białka gp41, natomiast CCR5 lub CXCR4 wykazują powinowactwo do trzeciego regionu zmiennego (V3). Podstawową funkcją glikoproteiny gp 41 jest zakotwiczenie wirusa w błonie i umożliwienie jego wniknięcia do komórki. Ważną rolę w tym procesie odgrywa region transbłonowy, bogaty w aminokwasy hydrofobowe oraz fragment przy końcu aminowym (domena fuzyjna) [12-15].

Odwrotna transkryptaza (RT ang. *reverse transcriptase*) inicjuje syntezę nici DNA (-) po uprzednim związaniu cząsteczki tRNA<sup>Lys</sup> z genomowym RNA w miejscu pbs (ang. *primer binding site*), znajdującym się 100-150 nukleotydów od końca 5' wirusowego RNA. Ponadto odwrotna transkryptaza wykazuje aktywność rybonukleazy H, która równocześnie z tworzeniem nici DNA (-) degraduje matrycowy RNA, pozostawiając jego krótki odcinek (bogaty w reszty purynowe) związany z nicią DNA (-) przy końcu 3'. Odcinek ten jest wykorzystywany jako starter w procesie syntezy nici DNA (+). Po syntezie 18 nukleotydów nici DNA (+) RNaza H degraduje starterowy tRNA, następuje hybrydyzacja komplementarnych odcinków pbs i elongacja nici DNA (+). Powstały dwuniciowy łańcuch DNA migruje do jądra komórki gospodarza gdzie przez integrazę (IN ang. *integration protein*) zostaje wbudowany do genomu. W transporcie wirusowego DNA do jądra uczestniczą białka p17 (MA ang. *matrix protein*) i Vpr, które zawierają sygnały lokalizacji jądrowej (NLS ang. *nuclear localization signal*) [9, 16, 17]. Zintegrowany genom wirusowy stanowi matrycę dla

transkrypcji genów kodujących białka strukturalne wirionów oraz białka odpowiedzialne za proliferację wirusa.

Wydaje się, że w krytycznych etapach cyklu życiowego retrowirusa HIV takich jak wniknięcie do komórki gospodarza, odwrotna transkrypcja oraz transkrypcja zintegrowanego prowirusa i transport wirusowego RNA, kluczową rolę pełnią oddziaływania białko-RNA.

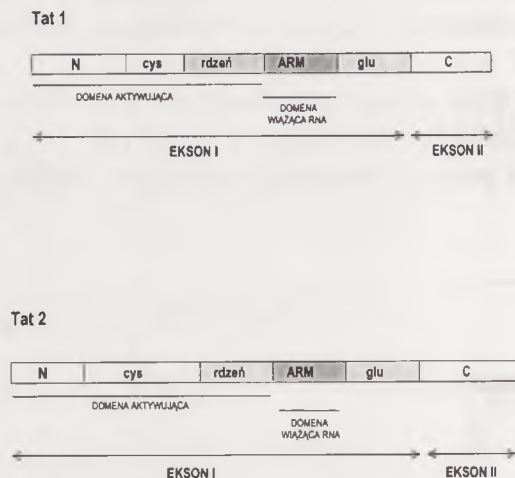
Szczególne znaczenie dla replikacji wirusa HIV ma tworzenie kompleksu białka Tat z TAR RNA. Decyduje on o wydajnej elongacji mRNA wirusa oraz zapobiega przedwczesnej terminacji transkrypcji. Poznanie mechanizmu tego oddziaływania może stanowić punkt wyjścia do opracowania specyficznych inhibitorów oraz w przyszłości potencjalnych leków dla zwalczania choroby AIDS.

## II. Białko regulatorowe Tat

Białko Tat (ang. *transcription anti-termination protein*) wirusów HIV-1 i HIV-2 bierze udział w aktywacji transkrypcji genomu poprzez specyficzne oddziaływanie z elementem TAR RNA (ang. *transactivating responsive element*) znajdującym się przy końcu 5' mRNA, kodowanym w obrębie końcowych powtarzających się elementów LTR [18-20]. Białko Tat jest aktywatorem wszystkich genów wirusa w tym również własnego genu [21] i znajduje się w jądrze lub jąderku. Tat-1 i Tat-2 są to białka zasadowe. Szczepki wirusa *in vivo* kodują białko Tat-1 o długości 101 aminokwasów. Skrócona forma Tat (86 aminokwasów) obecna jest w laboratoryjnych izolatach HIV (HXB2, LAI, NL4-3) i powstaje w wyniku pasażowania kultur tkankowych [22-26]. Długość Tat-2 wynosi 130 aminokwasów [24, 25]. Oba białka kodowane są przez dwa eksony. Jeden z nich znajduje się przed genem *env*, natomiast drugi zlokalizowany jest w obrębie *env* (Ryc. 1). Pierwszy ekson białka Tat-1 jest bardzo zachowawczy i koduje 72 reszty aminokwasowe, natomiast w białku Tat-2 sekwencja ta obejmuje 99 aminokwasów i jest znacznie mniej konserwatywna [24, 25]. Przypuszczano, że dla biologicznej aktywności Tat konieczne są tylko reszty aminokwasowe kodowane przez ekson pierwszy [6, 27]. Wykazano jednak, że aminokwasy 100-130 w drugim eksonie zwiększają trzykrotnie wydajność transkrypcji z HIV-2 LTR w komórkach HeLa [28].

W obrębie białka Tat wirusów HIV-1 i HIV-2 jak i innych lentiwirusów można wyróżnić 5 charakterystycznych domen: N-końcową, bogatą w cysteiny, rdzeń, zasadową (ARM ang. *arginine rich domain*) i bogatą w glutaminę (Ryc. 2). Koniec aminowy białka

Tat jest miejscem wiązania czynników komórkowych (np. TFIID, SP1), które są niezbędne dla tworzenia kompleksu Tat-TAR RNA [29]. Zawiera on reszty kwasowe, polarne i hydrofobowe, które tworzą helisę  $\alpha$ , występującą w wielu aktywatorach transkrypcji [30]. Region zasadowy o dużej zawartości lizyn i arginin (RKKRRQRRR w Tat1 i RKGRRRRTPK w Tat2) jest sygnałem lokalizacji



Ryc. 2. Schemat budowy białek HIV-Tat1 i HIV-Tat2. Wymienione są domeny strukturalne i funkcjonalne kodowane przez poszczególne eksony. Region zasadowy (ARM)—odpowiada za wiązanie Tat do TAR RNA. Domeny N-końcowa (N), cysteinowa (cys), rdzeniowa (rdzeń), glutaminowa (glu)—wpływają na specyficzność oddziaływania Tat-TAR oraz pośredniczą w wiązaniu białka z czynnikami komórkowymi.

jądrowej oraz bierze udział w swoistym oddziaływaniu z TAR RNA [9, 31-34]. Kluczowe dla tego procesu są reszty argininy w pozycji 52 i 53 [32]. Podobna domena występuje również w eukariotycznych białkach rybosomalnych (np. S2 i L7), wirusowych (np. białko Rev wirusa HIV i Tat wirusa BIV) i bakteriofagowych (np. antyterminatorowe białka N faga  $\lambda$  i faga P22) [35, 36].

Pozostałe regiony białka Tat nie są bezpośrednio zaangażowane w oddziaływanie z TAR RNA ale mają wpływ na jego specyficzność [37, 38]. Region cysteinowy (CTNCYCKKCCFHCQVC w Tat1 i CNNSCYCKRCCYHCQMC w Tat2) wraz z sąsiadującymi domenami rdzeniową i zasadową są najbardziej zachowawczymi regionami białek Tat. Ich homologia wynosi ponad 80% (Ryc. 3). Domena ta bogata w cysteiny wiąże jony cynku i bierze udział w dimeryzacji białka [39]. Cynk jest niezbędny dla wiązania cykliny T1 i tworzenia trójskładnikowego kompleksu Tat-T1-TAR [40]. Istnieją również dowody wskazujące, że białko Tat jest monomerem i nie wiąże jonów metali [41, 42]. Domeny cysteinowej nie znaleziono u wirusa niedokrwiistości zakaźnej koni. Rdzeń białka Tat (FITKALGISYG w Tat1 i

FLNKGLGICYE w Tat2) jest kluczowy dla tworzenia specyficznego kompleksu Tat-TAR. Analiza mutantów Tat-41(Lys→Thr), Tat-44(Gly→Ser), Tat-47H(Tyr→His), Tat-47A(Tyr→Ala) wskazuje, że mutacja lizyny 41 redukuje aktywność białka Tat o 60-70% [34, 37, 44].

Z powyższych rozważań wynika, że w białku Tat możemy wyróżnić dwa funkcjonalne regiony—wiązący (domena zasadowa) i aktywacyjny (domena N-końcowa, bogata w cysteiny, rdzeń) (Ryc. 2). Pierwszy z nich oddziałuje z TAR RNA [18, 31-34], natomiast drugi jest miejscem wiązania czynników

+59 u TAR1 oraz +1 do +124 u TAR2). Jest to motyw strukturalny swoście rozpoznawany przez białka uczestniczące w procesach regulacji ekspresji informacji genetycznej zarówno na poziomie transkrypcji jak i translacji [50].

W strukturze drugorzędowej TAR1 HIV mRNA wyróżnić można dwa fragmenty dwuniciowe rozdzielone 3 nukleotydowym wybrzuszeniem (pętla zewnętrzna) bogatym w pirymidyny, zakończone pętlą złożoną z 6 nukleotydów (Ryc. 4A). HIV-TAR2 RNA w odróżnieniu od HIV-TAR1 RNA składa się z trzech niezależnych elementów. Każdy z nich zawie-

Tat 1 <sup>1</sup>MEPVDPRLEPWKHPGSQPKA<sup>21</sup>

Tat 2 <sup>1</sup>METPLKAPESLKSCNPEFSRTSEQDVATQELARQGEEILSQLYRPLET<sup>49</sup>

Tat 1	<sup>22</sup> C-TNCYCKKCCFHCQVC	FITKALGISYG	RKKRRQRRR <sup>57</sup>
Tat 2	<sup>50</sup> CNNSCYCKRCCYHCQMC	FLNKGLGICYE	RKGRRRRTPK <sup>87</sup>

Tat 1 <sup>58</sup>PPQGSQTHQVSLSKQ<sup>72</sup>

Tat 2 <sup>86</sup>KTKTHPSPTPK<sup>99</sup>

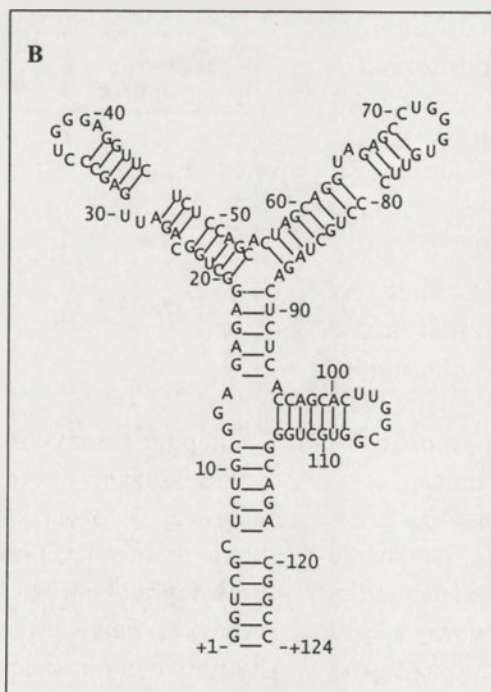
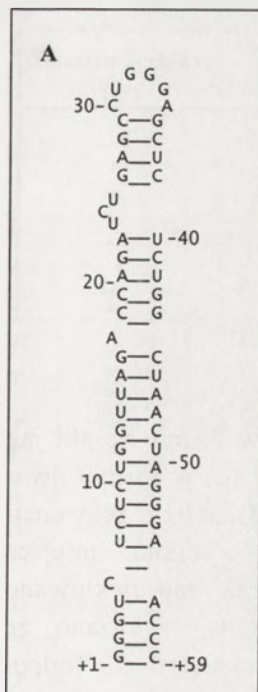
komórkowych np. TFIIH, TFIID, SP1, RNA pol II, P-TEFb oraz określa specyficzność kompleksu Tat-TAR [40, 45-49].

### III. TAR RNA

Sekwencja nukleotydowa przy końcu 5' HIV mRNA tworzy swoistą strukturę drugorzędową (spinka) zwaną TAR (ang. *trans-activating responsive element*). Fragment HIV-TAR RNA znajduje się w obrębie sekwencji LTR wirusa (nukleotydy +1 do

ra helikalny trzon i pętlę końcową złożoną z 5-7 nukleotydów, a struktura I i II fragmentu również dwunukleotydową pętlę zewnętrzną (Ryc. 4B). Białko Tat wiąże się głównie z elementem I (nukleotydy +20 do +54) obecnym przy 5' końcu wirusowego mRNA, słabiej z drugim (nukleotydy +55 do +88), natomiast trzeci (nukleotydy +95 do +114) nie ma zdolności wiązania białka [51]. Drugi element TAR2 RNA jest niezbędna dla pełnej aktywności transkrypcyjnej Tat-2. Jego brak obniża trzykrotnie poziom ekspresji genów wirusa HIV-2 [27, 51, 52].

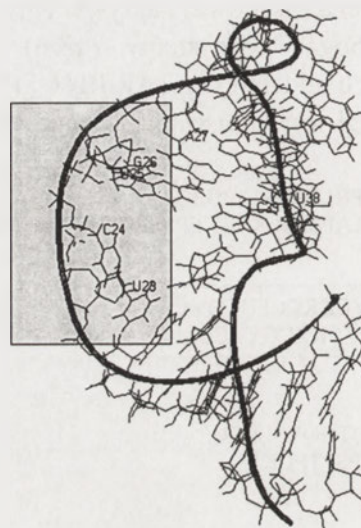
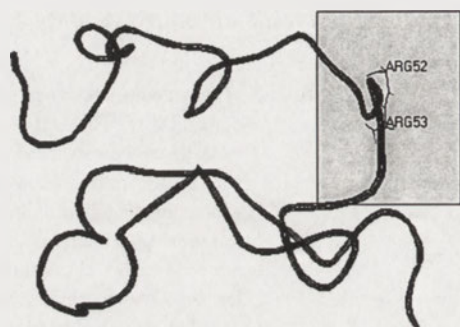
Ryc. 3. Porównanie sekwencji aminokwasowej białka Tat wirusów HIV-1 i HIV-2. Najbardziej zachowawcze domeny cysteino- wa i zasadowa (bogata w reszty argininy) wykazują 80% homologii. Ich obecność jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania białka Tat. Zakreskowanym polem zaznaczono aminokwasy wchodzące w skład domeny zasadowej, polem wykropkowanym oznaczono region cysteiny.



Ryc. 4. Struktura drugorzędowa HIV-TAR RNA. A, TAR1 RNA— tworzy fragment dwuniciowy, rozdzielony 3 nukleotydową pętlą zewnętrzną, zakończony pętlą złożoną z 6 nukleotydów. B, TAR2 RNA — składa się z trzech elementów. Każdy z nich zawiera helikalny trzon i pętlę końcową złożoną z 6 nukleotydów, a struktura I i II również dwunukleotydową pętlę zewnętrzną.

W rejonie HIV-TAR1 od +19 do +42 znajdują się nukleotydy niezbędne i wystarczające dla transkrypcji genomu wirusa HIV-1 [53, 74]. Do pętli zewnętrznej (miejsce gdzie jeden lub kilka nukleotydów w dwuniciowym odcinku RNA nie są sparowane) zawierającej reszty U23, C24, U25 wiąże się białko Tat [18, 19] (Ryc. 5). Wykazano, że U23 oraz pary zasad G26:C39 i A27:U38 znajdujące się bezpośrednio nad

nadto tworzy się triplet pomiędzy nukleotydem U23 (pętla zewnętrzna) a parą nukleotydów A27:U38 (helikalny trzon) [56-58, 60]. Analiza mutantów izomorficznych, w których nukleotydy U23-A27:U38 zastąpiono resztami C23-G27:C38 potwierdzają, że elementem krytycznym TAR RNA rozpoznawanym przez białko Tat jest budowa przestrzenna a nie jego sekwencja [57, 58].



**Ryc. 5.** Na rysunku oznaczono schematycznie regiony zaangażowane w oddziaływanie Tat-TAR. Region wiążący białka Tat i pętlę zewnętrzną TAR RNA. Wykazano, że reszty U23, C24, U25 (pętla zewnętrzna) jak również pary zasad G26:C39 i A27:U38 zlokalizowane w helikalnym trzonie zaangażowane są w oddziaływanie Tat-TAR. Konformacyjne zmiany wybrzuszenia TAR podczas oddziaływania z Tat indukuje głównie arginina 52 wchodząca w skład regionu wiążącego białka.

pętlą zewnętrzną w helikalnej części TAR są krytycznymi nukleotydami a ich mutacje obniżają w znacznym stopniu stałą wiązania Tat-TAR [37, 48] (Tabela 1). Reszty C24, U25 nie są bezpośrednio zaangażowane w oddziaływanie z białkiem Tat i mogą zostać podstawione dowolnym nukleotydem [37, 54].

Odpowiedzi na niektóre pytania o mechanizm oddziaływania białka Tat z TAR RNA udało się uzyskać z rozwiązanej struktury krystalograficznej 27-nukleotydowego fragmentu TAR1 RNA. Cząsteczka ta w kryształce posiada konformację A'-RNA, w której pełen skręt helisy przypada co 12 par zasad. Trójnukleotydowa pętla zewnętrzna (UCU) leży poza helisą w nieco poszerzonej dużej bruzdzie (TAR-12.7 Å w A-RNA-10 Å) i stabilizowana jest jonami wapnia [55]. Struktura TAR RNA w kryształce przypomina kompleks TAR z ligandem, gdzie nukleotydy pętli zewnętrznej ułożone są na zewnątrz helikalnego trzonu TAR, umożliwiając w ten sposób oddziaływanie warstwowe sąsiadujących domen.

Innych nieco informacji dostarcza analiza kompleksu TAR-arginina za pomocą NMR. Wskazuje ona na zmiany konformacyjne pętli zewnętrznej [56-59]. Guanidynowa grupa argininy tworzy wiązanie wodorowe z O6 i N7 guanozyny 26 oraz z parą zasad A22 (P22) i U23 (P23) w dużej bruzdzie. Po

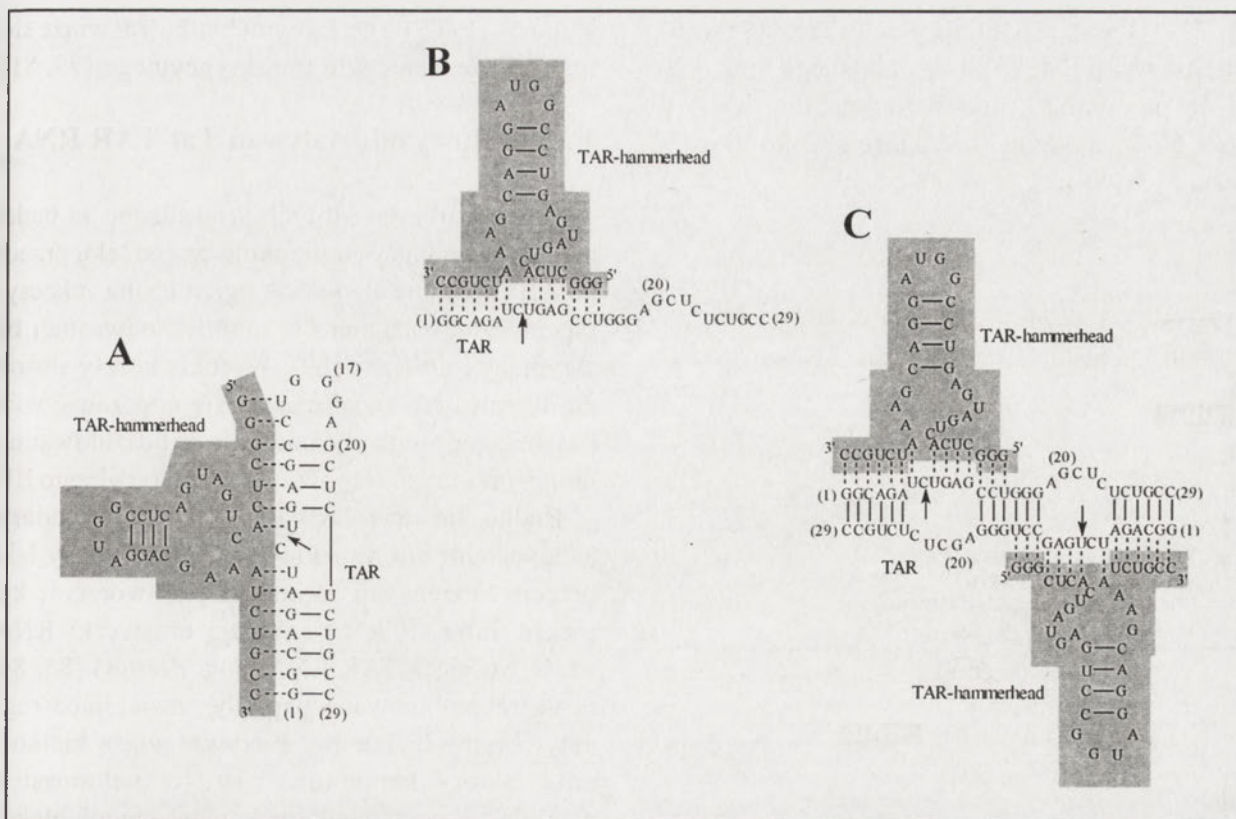
W naszym laboratorium do badania struktury TAR RNA po raz pierwszy wykorzystano rybozomy (Ryc. 6). Postawiono pytanie czy TAR RNA

**Tabela 1**

Wpływ mutacji punktowych w TAR RNA na wiązanie białka Tat i tworzenie kompleksu Tat-TAR.

nukleotydy w TAR RNA	mutacje	redukcja wiązania (%)
U23	C	20
G26:C39	U:A	12
	C:G	14
	G:U	19
	U:A	8
A27:U38	G:C	10

występuje rzeczywiście tylko w formie spinki jak przypuszczano dotychczas, czy też w formie dwuniciowej. W związku z tym po analizie sekwencji nukleotydowej TAR RNA wybrano miejsce prawdopodobnej hydrolizy oraz zaprojektowano rybozom *hammerhead* typu AUC. Wykazano, że hydrolizuje on specyficznie nukleotyd C8 (odpowiadający C24 w wirusowym TAR RNA)



Ryc. 6. Trzy prawdopodobne struktury kompleksu TAR RNA z rybozymem typu *hammerhead*. A, Struktura spinki TAR RNA. Parowanie rybozymu ze spinką wydaje się mało prawdopodobne. B, Jednoniciowy fragment TAR RNA łatwo oddziałuje z rybozymem. C, Dwuniciowa struktura TAR RNA bardzo łatwo tworzy kompleks z rybozymem. Zaciemnionym polem oznaczono rybozym. Strzałki wskazują miejsca hydrolizy TAR RNA przez rybozym.

wchodzący w skład trójnukleotydu pętli zewnętrznej, dając jeden produkt o długości 8 nukleotydów.

Hydroliza TAR RNA przy pomocy rybozymu typu *hammerhead* wskazuje na obecność struktury dwuniciowej TAR RNA *in vitro*, gdyż tylko ona zapewnia tworzenie kompleksu z rybozymem i hydrolizę substratu TAR RNA. Możliwość parowania rybozymu ze spinką wydaje się mało prawdopodobna [61]. Wyniki te prowadzą do wniosku, że w roztworze TAR występuje w dwóch formach: dwuniciowej i spinki.

Nadal brak jednoznacznych danych opisujących kompleks TAR RNA-Tat. Powstające modele oddziaływań są mało dokładne. Trudno wyobrazić sobie, że pojedyncza reszta aminokwasowa czy krótki peptyd może reprezentować wszystkie oddziaływania między TAR RNA i białkiem Tat. Wiadomo jednak, że w wiązaniu uczestniczy region zasadowy Tat, a pętla zewnętrzna w TAR RNA (Ryc. 5). Potwierdzają to wyniki badań analogicznego kompleksu BIVTat-TAR [62].

Ponadto znanych jest wiele innych białek komórkowych oddziałujących z HIV-TAR RNA. Z pętłą końcową wiąże się między innymi białko p68 (z komórek Hela), TRP-1 (ang. *TAR binding protein*),

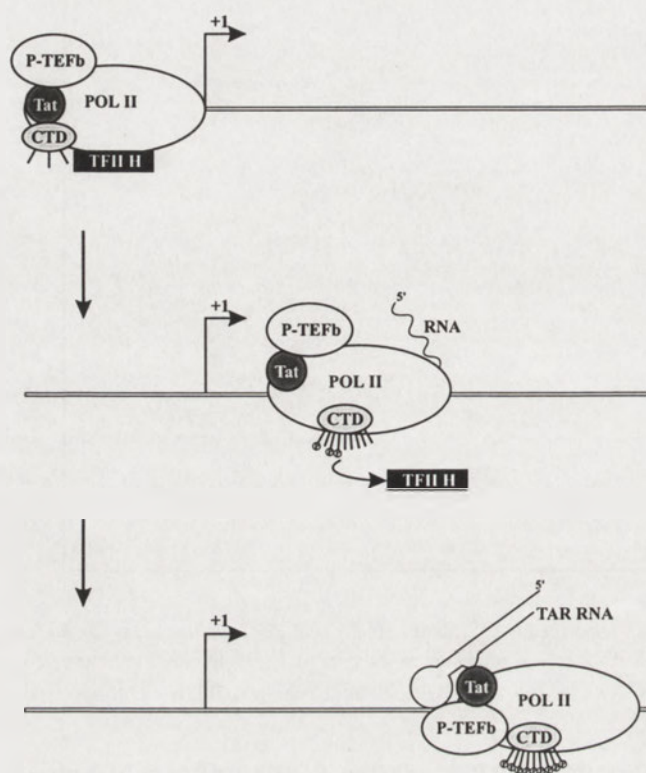
TRP-185, TRP-2, cyklina T1 [63-65] oraz być może białko Tat [66, 67].

#### IV. Mechanizm transkrypcji wirusa

Transkrypcja genomu wirusa HIV rozpoczyna się od utworzenia kompleksu transkrypcyjnego, w skład którego wchodzi matrycowy DNA, czynnik transkrypcyjny TFIIF, kinaza P-TEFb (ang. *positive-acting transcription elongation factor*), niesfosforylowana polimeraza II RNA oraz białko Tat (Ryc. 7). Białko TFIIF posiada aktywność kinazy (podjednostka CDK7 ang. *cyclic-dependent kinase*) [68] i fosforyluje domenę C-końcową dużej podjednostki polimerazy II RNA (CTD ang. *carboxyl-terminal domain*). Oddziaływanie białka Tat z czynnikiem transkrypcyjnym TFIIF i fosforylacja CTD są niezbędne dla inicjacji transkrypcji [69, 70]. Po syntezie pierwszych 30-50 nukleotydów, białko TFIIF dysocjuje z kompleksu i nie uczestniczy w elongacji transkrypcji [71]. Białko Tat pozostaje związane z kompleksem transkrypcyjnym i oddziałuje z kinazą P-TEFb, TAR RNA oraz częściowo fosforylowaną polimerazą II RNA.

Przyłączenie białka Tat do kompleksu transkrypcyjnego umożliwia wydajną elongację mRNA wiru-

sa [21, 72-74] oraz zapobiega przedwczesnej terminacji transkrypcji [74, 75]. Natomiast jego brak prowadzi do powstania krótkich fragmentów RNA o długości 60-80 nukleotydów, które szybko ulegają degradacji [74, 76].



Ryc. 7. Model kompleksu elongacyjnego z udziałem białka Tat. Białko Tat wiąże się do kompleksu preinicjacyjnego w skład którego wchodzi czynnik transkrypcyjny TFIIF, kinaza P-TEFb, niefosforylowana polimeraza II RNA. Oddziaływanie Tat z TFIIF odgrywa krytyczną rolę w inicjacji transkrypcji. TFIIF wraz z białkiem Tat fosforyluje dużą podjednostkę polimerazy II — CTD (ang. *carboxyl-terminal domain*). TFIIF dysocjuje z kompleksu natomiast Tat pozostaje z nim związany i oddziałuje z cykliną T1 (podjednostka P-TEFb). Po transkrypcji TAR RNA i związaniu z nim białka Tat następuje fosforylacja CTD przez kinazę P-TEFb. Powstaje aktywny kompleks elongacyjny.

Białko P-TEFb znane również jako TAK (ang. *Tat associated kinase*) zawiera dwie podjednostki niezbędne na etapie elongacji transkrypcji: regulatorową (cykliną T1) oraz kataliczną (kinaza CDK9 ang. *cyclic-dependent kinase*). Pierwsza z nich wiąże się z domeną aktywacyjną Tat i wpływa na specyficzność tworzenia kompleksu Tat-TAR RNA, druga natomiast fosforyluje dużą podjednostkę polimerazy II RNA (CTD) co prowadzi do powstania aktywnego kompleksu elongacyjnego [77, 78-80].

Kluczowym etapem transkrypcji genów wirusa HIV jest więc fosforylacja polimerazy II RNA przez kinazę CDK7 (podjednostka TFIIF) i CDK9 (pod-

jednostka P-TEFb), z którymi białko Tat wiąże się na różnych etapach cyklu transkrypcyjnego [79, 81].

## V. Inhibitory oddziaływań Tat-TAR RNA

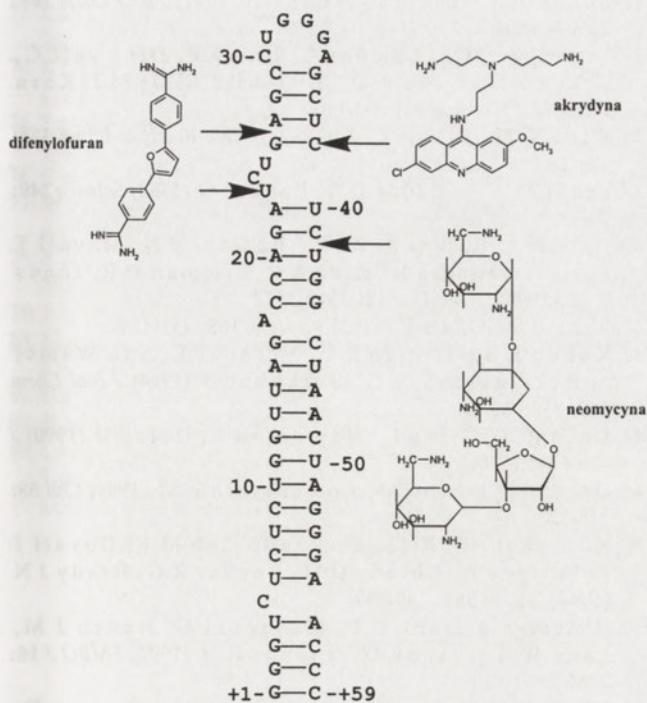
Od początku lat 90-tych prowadzone są badania mające na celu uzyskanie skutecznego leku przeciwko AIDS. Istotne ale jednak ograniczone sukcesy terapeutyczne osiągnięto w inhibicji odwrotnej transkryptazy i proteazy [82]. Wysokie koszty stosowanej terapii oraz zwiększająca się odporność wirusa na istniejące preparaty zmuszają do poszukiwania inhibitorów innych etapów cyklu replikacyjnego HIV.

Białko Tat oraz TAR RNA wydają się dobrymi kandydatami dla projektowania nowej klasy leków przeciwwirusowych. Wykazano, że tworzenie kompleksu Tat-TAR RNA inhibują cząsteczki RNA o właściwościach TAR RNA (ang. *decoys*) [83, 84] a także rekombinowane peptydy zawierające region aktywacyjny białka Tat. Pierwsze wiążą białko Tat oraz czynniki komórkowe. Drugie natomiast oddziałują tylko z czynnikami komórkowymi, blokując w ten sposób powstawanie aktywnego kompleksu Tat-TAR [85]. Znacznie silniejsze działanie wykazują chimery TAR-RRE RNA (ang. *rev responsive element*) [86]. Inhibują one nie tylko oddziaływanie Tat-TAR ale hamują również tworzenie kompleksu RRE-Rev. Uniemożliwiają w ten sposób powstawanie pełnej długości mRNA dla genów strukturalnych.

Potencjalnymi inhibitorami oddziaływań Tat-TAR są również związki małowcząsteczkowe — między innymi pochodne akrydyny, difenylofuranu, antybiotyki aminoglikozydowe (neomycyna) [87-89]. Wiążą się one do różnych miejsc w TAR RNA (akrydyna — do nukleotydów G26-C39, wchodzących w skład helikalnego trzonu, difenylofuran — do pętli zewnętrznej i trzonu, antybiotyki aminoglikozydowe — do trzonu poniżej pętli zewnętrznej) i hamują jego oddziaływanie z białkiem Tat (Ryc. 8).

Podejmowane są również próby wykorzystania oligonukleotydów antysensownych oraz rybozymów w terapii HIV [90-92]. Oligonukleotydy antysensowne są to krótkie łańcuchy DNA o sekwencji komplementarnej do wybranego fragmentu DNA lub mRNA. Mogą one hybrydyzować z sekwencją genu *tat* a także elementem TAR RNA. W pierwszym przypadku hamują ekspresję białka Tat, w drugim blokują tworzenie kompleksu Tat-TAR.

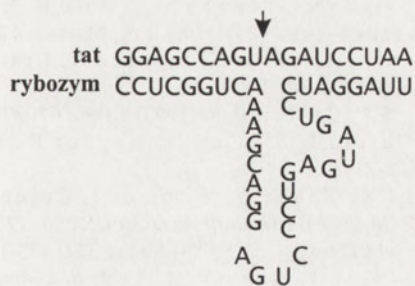
Rybozomy są w pewnym sensie podobne do oligonukleotydów antysensownych, ale dzięki właściwościom katalitycznym są dużo bardziej efektywne. Zaletą rybozymów jest ich działanie na szczepy HIV, odporne na konwencjonalną terapię przeciwwiru-



Ryc. 8. Miejsca wiązania małowcząstkowych inhibitorów do TAR RNA. Akrydyna wiąże się do nukleotydów G26-C39, będących częścią helikalnego trzonu, difenyllofuran — do pętli zewnętrznej i trzonu, neomycyna — do trzonu poniżej pętli zewnętrznej.

sową (inhibitory odwrotnej transkryptazy i proteazy).

Badania z wykorzystaniem dwóch rybozymów typu *hammerhead*, z których jeden wiązał się i hydrolizował kodon inicjacyjny genu *tat* (nukleotydy 5784-5801), drugi natomiast sekwencje zaangażowaną w *splicing* i poliadenylację RNA (nukleotydy 5840-5859) (Ryc. 9) wykazały inhibicję replikacji wirusa w 70-95% [91, 93]. Użycie kombinacji rybozymu z cząsteczkami RNA o właściwościach TAR RNA powodowało niemal całkowite (99%) zahamowanie namnażania HIV na okres 14 miesięcy w lini limfocytów T [83].



Ryc. 9. Drugorzędowa struktura rybozymu typu *hammerhead* i jego substratu (fragment sekwencji mRNA białka Tat obejmujący nukleotydy 5840-5859). Strzałką oznaczono miejsce hydrolizy.

W naszym laboratorium z powodzeniem wykorzystano rybozomy do degradacji TAR RNA [61] (Ryc. 6). Jak już wcześniej wspomniano zaprojektowano rybozym *hammerhead* typu AUC, który hydro-

lizował nukleotyd wchodzący w skład pętli zewnętrznej TAR. Degradacja TAR RNA może być potencjalną metodą inaktywacji wirusa HIV.

Inhibicja oddziaływań białka Tat z TAR RNA wydaje się mieć istotne znaczenie w walce z wirusem HIV. Może stanowić uzupełnienie konwencjonalnej terapii z wykorzystaniem inhibitorów odwrotnej transkryptazy i proteazy. Zastosowanie kilku leków jednocześnie stwarza największe nadzieje w walce z wirusem HIV (HAART, ang. *highly active antiretroviral therapy*). Jeśli jeden ze środków nie zahamuje replikacji wirusa, może to uczynić drugi. Jeżeli obydwa zawiodą, trzeci z nich będzie dodatkowym zabezpieczeniem. Preparaty stosowane pojedynczo ułatwiają powstawanie opornych szczepów co redukuje skuteczność leków.

Obecnie HAART jest trójlekową terapią z wykorzystaniem głównie dwóch inhibitorów odwrotnej transkryptazy i proteazy. Badana jest przydatność kombinacji kilku preparatów należących do różnych klas inhibitorów w odmienny sposób hamujących replikację HIV (np. inhibitory odwrotnej transkryptazy, proteazy, integrazy, inhibitory oddziaływania białko Tat-TAR RNA). Ma to duże znaczenie ze względu na pojawianie się u wirusa oporności krzyżowej. Jeżeli szczepy HIV rozwiną oporność na działanie jednego leku często są niewrażliwe na inne preparaty należące do tej samej grupy inhibitorów.

Prace koncentrują się również na połączeniu terapii HAART z jednoczesną aktywacją układu immunologicznego.

Pomimo postępu jaki dokonał się w walce z wirusem HIV nadal nie ma skutecznych metod terapeutycznych, które chroniłyby przed zakażeniem lub prowadziły do całkowitego wyleczenia. Jednak niewątpliwym sukcesem stosowanych terapii w tym HAART jest to, że pomagają w zachowaniu zdrowia i w znacznym stopniu wydłużają życie zakażonym.

## Podziękowanie

Praca finansowana częściowo z projektu badawczego Komitetu Badań Naukowych.

Artykuł otrzymano 2 kwietnia 2001 r.

Zaakceptowano do druku 11 października 2001 r.

## Piśmiennictwo

1. Barre-Sinoussi F, Chermann J C, Rey F, Nugeyre M T, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L (1983) *Science* **220**: 868-871

2. Popovic M, Sarngadharan M G, Read E, Gallo R C (1984) *Science* **224**: 497-500
3. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey M A, Santos-Ferreira M O, Laurent A G, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, Klatzman D, Champalimaud J L, Montagnier L (1986) *Science* **233**: 343-346
4. Guyader M, Emerman M, Sonigo P, Clavel F, Montagnier L, Alizon M (1987) *Nature* **326**: 662-669
5. Gaynor R (1992) *AIDS* **6**: 347-363
6. Sodorski J, Patarca R, Rosen C, Wong-Staal F, Haseltine W (1985) *Science* **229**: 74-77
7. Garcia J A, Harrich D, Soultanaki E, Wu F, Mitsuyasu R, Gaynor R B (1989) *EMBO J* **8**: 765-778
8. Leonard C K, Spellman M W, Riddle L, Harris R J, Thomas J N, Gregory T J (1990) *J Biol Chem* **265**: 10373-10382
9. Turner B G, Summers M F (1999) *J Mol Biol* **285**: 1-32
10. Chan D C, Fass D, Berger J M, Kim P S (1997) *Cell* **89**: 263-273
11. Ho D D, Neumann A U, Perelson A S, Chen W, Leonard J M, Markowitz M (1995) *Nature* **373**: 123-126
12. Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley J M, Olson W C, Allaway G P, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon P I, Moore I P (1996) *Nature* **384**: 184-187
13. Chapham P R, Weiss R A (1997) *Nature* **388**: 230-231
14. Thali M, Moore J P, Furman C, MacArthur C, Ho D D, Robinson J, Sodorski J (1993) *J Virol* **67**: 3978-3988
15. Wu L, Gerard N P, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso A A, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodorski J (1996) *Nature* **384**: 179-183
16. Heinzinger N K, Bukinsky M I, Haggerty S A, Ragland A M, Kewalramani V, Lee M A, Gendelman H E, Ratner L, Stevenson M, Emerman M (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7311-7315
17. Miller R H, Sarver N (1997) *Nature Med* **3**: 389-394
18. Dingwall C, Ernberg I, Gait M J, Green S M, Heaphy S, Karn J, Lowe A D, Singh M, Skinner M A (1990) *EMBO J* **9**: 4145-4153
19. Cordingley M G, LaFemina R L, Callahan P L, Condra J H, Sardana V V, Graham D J, Nguyen T M, LeGrow K, Gotlib L, Schlabach A J, Colonna R J (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 8985-8989
20. Jones K A (1989) *New Biol* **1**: 127-135
21. Marciniak R A, Calnan B J, Frankel A D, Sharp P A (1990) *Cell* **63**: 791-802
22. Meyers G, Henderson L E, Korber B, Jeang K-T, Wain-Hobson S (1996) *Los Alamos Natl Lab* **3**: 3-18
23. Jeang K-T, Xiao H, Rich E A (1999) *J Biol Chem* **274**: 28837-28840
24. Rhim H, Echetebe C O, Herrman Ch H, Rice P (1994) *J Acquir Immune Defic Syndr* **7**: 1116-1121
25. Rhim H, Chan F, Echetebe C O, Rice P (1993) *Protein Expression Purif* **4**: 24-31
26. Neuveut C, Jeang K-T (1996) *J Virol* **70**: 5572-5581
27. Emerman M, Guyader M, Montagnier L, Baltimore D, Muesing M A (1987) *EMBO J* **6**: 3755-3760
28. Rhim H, Rice A P (1994) *Nucl Acids Res* **22**: 4405-4413
29. Carrol R, Martarano L, Derse D (1991) *J Virol* **65**: 3460-3467
30. Rappaport J, Lee S J, Khalili K, Wong-Staal F (1989) *New Biol* **1**: 101-110
31. Hauber J, Malim M H, Cullen B R (1989) *J Virol* **63**: 1181-1187
32. Calnan B J, Biancalana S, Hudson D, Frankel A D (1991) *Genes Dev* **5**: 201-210
33. Weeks K M, Ampe C, Schultz S C, Steitz T A, Crothers D M (1990) *Science* **249**: 1281-1285
34. Kuppuswamy M, Subramanian T, Srinivasan A, Chinnadurai G (1989) *Nucl Acids Res* **17**: 3551-3561
35. Weiss M A, Narayana N (1998) *Biopoly* **48**: 167-180
36. Suzuki K, Olvera J, Wool I G (1991) *J Biol Chem* **266**: 20007-20010
37. Churcher M J, Lamont C, Hamy F, Dingwall C, Green S M, Lowe A D, Butler P J, Gait M J, Karn J (1993) *J Mol Biol* **230**: 90-110
38. Rana T M, Jeang K-T (1999) *Archiv Biochem Bioph* **365**: 175-185
39. Frankel A D, Bredt D S, Pabo C O (1988) *Science* **240**: 70-73
40. Garber M E, Wei P, KewalRamani V N, Mayall T P, Herrmann Ch H, Rice A P, Littman D R, Jones K A (1998) *Genes Dev* **12**: 3512-3527
41. Rice A P, Chan F (1991) *Virology* **185**: 451-454
42. Koken S E, Greijer A E, Verhoef K, van Wamel J, Bukrinskaya A G, Berkhout B (1994) *J Biol Chem* **269**: 8366-8375
43. Dorn P, DaSilva L, Martarano L, Derse D (1990) *J Virol* **64**: 1616-1624
44. Green M, Ishino M, Lowenstein P M (1989) *Cell* **58**: 215-223
45. Kashanchi F, Piras G, Randovich M F, Duvall J F, Fattaey A, Chiang C M, Roeder R G, Brady J N (1994) *Nature* **367**: 295-299
46. Garcia-Martinez L F, Mavankal G, Neveu J M, Lane W S, Ivanov D, Gaynor R B (1997) *EMBO J* **16**: 2836-2850
47. Mavankal G, Ignatius O S, Oliver H, Sigman D, Gaynor R B (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2089-2094
48. Weeks K M, Crothers D M (1991) *Cell* **66**: 577-588
49. Chun R F, Jeang K-T (1996) *J Biol Chem* **271**: 27888-27894
50. Wyatt J R, Tinoco I (1993) The RNA World Cold Spring Harbor Laboratory Press 465-496
51. Rhim H, Rice A P (1995) *Virology* **206**: 673-678
52. Berkhout B, Gatignol A, Silver J, Jeang K-T (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 1839-1846
53. Jakobovits A, Smith A D, Jakobovits E B, Capon D J (1988) *Mol Cell Biol* **8**: 2555-2561
54. Sumner-Smith M, Roy S, Barnett R, Reid S L, Kuperman R, Delling U, Sonenberg N (1991) *J Virol* **65**: 5196-5202
55. Ippolito J, Steitz T A (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9819-9824
56. Puglisi J D, Tan R, Calnan B J, Frankel A D, Williamson J R (1992) *Science* **257**: 76-80
57. Puglisi J D, Chen L, Frankel A D, Williamson J R (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3680-3684
58. Brodsky A S, Williamson J R (1997) *J Mol Biol* **267**: 624-639
59. Tan R, Frankel A D (1992) *Biochemistry* **31**: 10288-10294
60. Farrow M A, Aboul-ela F, Owen D, Karpeisky A, Biedelman L, Gait M J (1998) *Biochemistry* **37**: 3096-3108
61. Wyszko E, Barciszewska M Z, Bald R, Erdman V A, Barciszewski J (2001) *Int J Biol Macromol* **28**: 373-380
62. Puglisi J D, Chen L, Blanchard S, Frankel A D (1995) *Science* **270**: 1200-1203
63. Madore S J, Cullen B R (1993) *J Virol* **67**: 3703-3711
64. Wu F, Garcia J, Sigman D, Gaynor R (1991) *Genes Dev* **5**: 2128-2140
65. Fujinaga K, Taube R, Wimmer J, Cujec T P, Peterlin B M (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1285-1290
66. Feng S, Holland E C (1988) *Nature* **334**: 165-167
67. Wang Z, Huq I, Rana T M (1999) *Bioconjug Chem* **10**: 512-519
68. Swejstrup J Q, Vichi P, Egly J M (1996) *Trends Biochem Sci* **21**: 346-351
69. Goodrich J A, Tjian R (1994) *Cell* **77**: 145-156
70. Dvir A, Garrett K P, Chalut C, Egly J M, Conway J W, Conway R C (1996) *J Biol Chem* **271**: 7245-7248
71. Zawel L, Kumar K P, Reinberg D (1995) *Genes Dev* **9**: 1479-1490
72. Laspia M F, Rice A P, Mathews M B (1990) *Genes Dev* **4**: 2397-2408



73. Laspia M F, Rice A P, Mathews M B (1989) *Cell* **59**: 283-292
74. Kao S Y, Calman A F, Luciw P A, Peterlin B M (1987) *Nature* **330**: 489-493
75. Selby M J, Bain E S, Luciw P, Peterlin B M (1989) *Genes Dev* **3**: 547-558
76. Cullen B R (1990) *Cell* **63**: 655-657
77. Wei P, Garber M E, Fang S M, Fischer W H, Jones K A (1998) *Cell* **92**: 451-462
78. Yang X, Hermann C H, Rice A P (1996) *J Virol* **70**: 4576-4584
79. Ping Y-H, Rana T M (1999) *J Biol Chem* **274**: 7399-7404
80. Marshall N F, Peng J, Xie Z, Price D (1996) *J Biol Chem* **271**: 27176-27183
81. Dahmus M E (1996) *J Biol Chem* **271**: 19009-19012
82. Hammer S M (1996) *AIDS* **10**: 1-11
83. Liszewicz J, Sun D, Smythe J, Lusso P, Lori F, Louie A, Markham P, Rossi J, Reitz M, Gallo R C (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8000-8004
84. Sullenger B A, Gallardo H F, Ungers G E, Gilboa E (1991) *J Virol* **65**: 6811-6816
85. Carroll R, Petrlin B M, Derse D (1992) *J Virol* **66**: 2000-2007
86. Liszewicz J, Zeng G, Gratas C, Weinstein J N, Lori F (2000) *Hum Gene Ther* **11**: 807-815
87. Gelus N, Hamy F, Bailly Ch (1999) *Bioorg Med Chem* **7**: 1075-1079
88. Gelus N, Bailly Ch, Hamy F, Klimkait T, Wilson W D, Boykin D W (1999) *Bioorg Med Chem* **7**: 1089-1096
89. Mestre B, Arzumanov A, Singh M, Boulme F, Litvak S, Gait M J (1999) *Biochim Biophys Acta* **1445**: 86-98
90. Smythe J A, Symonds G (1995) *Inflamm Res* **44**: 11-15
91. Macpherson J L, Ely J A, Sun L-Q, Symonds G P (1999) *Front Biosci* **4**: 497-505
92. Lo K M, Biasolo M A, Dehni G, Palu G, Haseltine W A (1992) *Virology* **190**: 176-183
93. Sun L Q, Wang L, Gerlach W L, Symonds G (1995) *Nucl Acids Res* **23**: 2909-2913

# Zastosowanie rybozymów „hammerhead” jako czynników przeciwwirusowych

## The application of the hammerhead ribozymes as antiviral tools

MARZENA ROLA<sup>1</sup>, JACEK KUŹMAK<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Typy katalitycznych RNA
  - II-1. Rybozimy samotnące
  - II-2. Rybozimy zdolne do samodzielnego wycinania się
  - II-3. Rybonukleaza P
- III. Rybozimy „hammerhead”
  - III-1. Identyfikacja miejsca cięcia dla rybozymów
  - III-2. Wprowadzanie rybozymów do komórek
    - III-2.1. Egzogenna strategia wprowadzania rybozymów do komórek
    - III-2.2. Endogenna strategia wprowadzania rybozymów do komórek
- IV. Zastosowanie rybozymów „hammerhead” jako czynników przeciwwirusowych
- V. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** ASBV — wiroid skazy słonecznej awokado (ang. *Avocado Sunblotch Viroid*), BLV — wirus białaczki bydła (ang. *Bovine Leukemia Virus*), CAT — transacetylaza chloramfenikolowa (ang. *chloramphenicol acetyl transferase*), FMDV — wirus pryszczycy (ang. *Foot and Mouth Disease Virus*), HBV — wirus zapalenia wątroby typu B (ang. *Human Hepatitis B Virus*), HCV — wirus zapalenia wątroby typu C (ang. *Human Hepatitis C Virus*), HDV — wirus zapalenia wątroby typu D (ang. *Human Hepatitis Delta Virus*), HIV-1 — ludzki wirus niedoboru odporności typu 1 (ang. *Human Immunodeficiency Virus type 1*), hGH — ludzki hormon wzrostu (ang. *human growth hormone*), hnRNA — heterogenny jądrowy RNA (ang. *heterogenous nuclear RNA*), HTLV-1 — wirus białaczki limfocytarnej typu I (ang. *Human T-cell Leukemia Virus type 1*), HVJ — japoński wirus hemaglutynujący (ang. *Hemagglutinating Virus of Japan*), IRES — miejsce wewnętrznej inicjacji translacji (ang. *internal ribosome entry site*), LCMV — wirus zapalenia opon mózgowych i spłotów naczyńnkowych (ang. *Lymphocytic Choriomeningitis Virus*), LTR — długie powtórzenia końcowe (ang. *Long Terminal Repeats*), MHV

### Contents:

- I. Introduction
- II. Types of catalytic RNA
  - II-1. Self-cleaving ribozymes
  - II-2. Self-splicing ribozymes
  - II-3. Ribonuclease P
- III. The hammerhead ribozymes
  - III-1. Selection of ribozyme cleavage site
  - III-2. Delivery of ribozymes
    - III-2.1. Exogenous delivery of ribozymes
    - III-2.2. Endogenous delivery of ribozymes
- IV. The application of the hammerhead ribozymes as antiviral tools
- V. Final remarks

— wirus zapalenia wątroby myszy (ang. *Mouse Hepatitis Virus*), Mo-MLV — wirus białaczki mysiej Moloneya (ang. *Moloney Murine Leukemia Virus*), MoMSV — wirus mięsaka mysiego Moloneya (ang. *Moloney Murine Sarcoma Virus*), PPV — wirus ospowatości śliw (ang. *Plum Pox Virus*), PV — wirus polio (ang. *poliovirus*), PSTVd — wiroid wrzecionowatości bulw ziemniaka (ang. *Potato Spindle Tuber Viroid*), RNaza P — rybonukleaza P, RSV — wirus mięsaka Rousa (ang. *Rous Sarcoma Virus*), sBYDV — satelitarny RNA nici (+) i (-) wirusa żółtej karłowatości jęczmienia (ang. *satellite RNAs of Barley Yellow Dwarf Virus*), snRNA — małe jądrowe RNA (ang. *small nuclear RNA*), sTRSV — satelitarny RNA nici (+) wirusa plamistości tytoniu (ang. *satellite RNAs of Tobacco Ringspot Virus*), SV40 — wirus małpi 40 (ang. *Simian Virus 40*), UTR — region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*).

### I. Wstęp

Wyrażenie „świat RNA” zostało po raz pierwszy użyte, by opisać hipotetyczne stadium w procesie powstawania życia, w którym białka nie były jeszcze obecne, a cząsteczki RNA pełniły rolę enzymów i zdolnych do replikacji nośników informacji genetycznej. Biochemiczną skamieniałością pochodzącą z tamtego okresu są katalityczne kwasy

<sup>1</sup>Mgr, <sup>2</sup>doc. dr hab.; Zakład Biochemii, Państwowy Instytut Weterynaryjny, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; tel. (0-81) 886-3051 wew. 268; e-mail: mrolka@piwet.pulawy.pl, jkuzmak@piwet.pulawy.pl

rybonukleinowe, wciąż zazdrośnie strzegące swych tajemnic przed współczesnym światem. Przełomowym momentem w badaniach nad katalitycznymi właściwościami RNA było odkrycie C e c h a i wsp. dotyczące intronu zawartego w prekursorowym rRNA *Tetrahymena thermophila*, który ma zdolność samodzielnego wycinania się bez jakiegokolwiek udziału białek [1]. Od tego czasu terminem „rybozym” określamy krótkie cząsteczki RNA posiadające zdolność przeprowadzania reakcji autokatalizy bez udziału białek, a także ligacji zhydrolizowanych, międzynukleotydowych wiązań fosfodiesterowych. Wywołana przez nie reakcja jest specyficzna i przebiega zgodnie z założeniami teorii Michaelisa-Menten [2].

## II. Typy katalitycznych RNA

### II-1. Rybozomy samotnące

Wśród katalitycznych cząsteczek RNA wyróżniamy rybozomy samotnące (ang. *self-cleaving ribozymes*). Mają one zdolność do przeprowadzania autokatalitycznej reakcji bez jakiegokolwiek udziału białek. Cechą charakterystyczną produktów powstających na skutek ich aktywności jest obecność 2', 3' cyklicznego fosforanu na końcu jednego z nich, zaś 5' koniec drugiego tworzy grupa hydroksylowa. Rybozomy samotnące tworzą domeny katalityczne o różnym kształcie. Niektóre z nich mają kształt „główki młotka”, stąd nazwa rybozomy „hammerhead”. Są one reprezentatywne dla nici (+) i (-) wiroidu skazy słonecznej awokado (ASBV), satelitarnego RNA nici (+) wirusa pierścieniowatej plamistości tytoniu (sTRSV) i żółtej karłowatości jęczmienia (sBYDV), oraz niektórych wirusoidów [3].

Cechą charakterystyczną tej grupy rybozymów jest drugorzędowa struktura centrum katalitycznego utworzona przez nią (-) wspomnianego wirusoida (sTRSV) o kształcie szpilki (ang. *hairpin ribozyme*) [4].

Zupełnie innym typem rybozomu samotnącego jest wirus zapalenia wątroby typu D (HDV). Jego aktywna katalitycznie domena przyjmuje formy nigdzie wcześniej nie obserwowane — liścia koniczyny (ang. „cloverleaf”), pseudowęzła (ang. *pseudoknot-like structures*) czy główki strzałki (ang. *axehead*) [5-7]. Wirus HDV posiada wiele cech wiroidów, wirusoidów i satelitarnych RNA. Jego genom charakteryzuje się obecnością komplementarnych fragmentów, ważnych dla replikacji wirusa. Replikacja wirusa HDV, podobnie jak u przedstawicieli grupy rybozymów „hammerhead” i „hairpin”, zachodzi według

mechanizmu toczącego się koła, a jego obydwie nici, sensowna i antysensowna, wykazują aktywność autokatalityczną [8].

RNA o długości 881 nukleotydów, który jest transkryptem plazmidowego DNA, występującego w mitochondriach *Neurospora*, łączy w sobie cechy autokatalitycznego RNA wirusa HDV, satelitarnych RNA, jak również intronów grupy I. Produkty przeprowadzanych przez niego katalitycznych reakcji zachowują charakterystyczne dla rybozymów samotnących zakończenia, choć kształt aktywnej struktury drugorzędowej jest najbardziej zbliżony do intronów grupy I [9,10].

### II-2. Rybozomy zdolne do samodzielnego wycinania się

Inaczej niż w wypadku poprzedniej grupy, aktywność tej klasy rybozymów doprowadza do powstania produktów z końcami — 5'- fosforanowym i 3'- hydroksylowym. Wyróżnia się tu introny grupy I i II. W wypadku intronów grupy I do rozpoczęcia reakcji samowycinania potrzebna jest guanozyna lub jej inna ufosforylowana postać GMP, GDP bądź GTP. Grupa 3'-OH wspomnianej guanozyny, dokonuje „ataku nukleofilowego” na  $\alpha$ -fosfor wiązania fosfodiesterowego, znajdującego się pomiędzy egzonom I i intronem, a następnie łączy się z ostatnim nukleotydem egzonu 5'. Nowoutworzona w ten sposób grupa 3'-OH reaguje następnie z fosforem występującym w wiązaniu pomiędzy drugim końcem intronu a egzonom II. W wyniku dwuetapowej transestryfikacji uwalniany jest intron w formie liniowej [11]. Przedstawicielem tej grupy jest pierwszy poznany rybozym — intron genu 26S rRNA *Tetrahymena thermophila* [1].

Introny grupy II pochodzą z genów mitochondrialnych grzybów i roślin. W przeprowadzanych przez nie reakcjach nie jest konieczny udział wolnych nukleotydów. Inicjacja procesu samowycinania dokonuje się poprzez atak nukleofilowy grupy 2'-OH adenozy, umiejscowionej we wnętrzu intronu, na wiązanie fosfodiesterowe styku 5' egzono-intron. W końcowej fazie reakcji autokatalitycznej następuje połączenie egzonomów i uwolnienie intronu w kształcie lassa (ang. *ariat*) [11].

Innymi cząsteczkami o właściwościach katalitycznych są małe jądrowe RNA (sn RNA) i białka wchodzące w skład spliceosomu. Poprzez wycinanie intronów z heterogennego jądrowego RNA (hn RNA) zapewniają one powstanie funkcjonalnego produktu genu. Wobec tego, że mechanizm reakcji zbliżony jest do mechanizmu samowycinania intro-

nów grupy II, uważa się, iż składanie jądrowego pre-mRNA jest wynikiem ewolucji tego ostatniego procesu [11].

Redagowanie RNA (ang. *editing*) polegające na potraskrypcyjnej insercji, delecji bądź modyfikacji określonych nukleotydów, to kolejny poziom regulacji ekspresji genów u *Eucaryota*. Uczestniczy w nim RNA zwany przewodnim (ang. *guide RNA*). Są to krótkie cząsteczki RNA (ok. 40 nukleotydów) zawierające na 3' końcu fragment poli (U). Proponuje się wiele modeli redagowania transkryptów. Jeden z nich, zaproponowany przez Cecha, zbliżony jest do wycinania intronów grupy I [12].

### II-3. Rybonukleaza P

RNaza P, po raz pierwszy opisana w 1983 roku przez Altman i wsp., jest enzymem, który bierze udział w dojrzewaniu tRNA. Jest ona złożona z białka oraz cząsteczki RNA. Wyniki badań wskazują, że *in vitro*, podjednostka RNA w obecności wysokiego stężenia jonów Mg, może przeprowadzić reakcję katalityczną bez udziału kofaktora białkowego. Produktem reakcji jest ufosforylowany 5' koniec tRNA. Składnik białkowy jest wymagany do przeprowadzenia reakcji przez RNazę P *in vitro* i *in vivo* w fizjologicznym stężeniu jonów Mg [13].

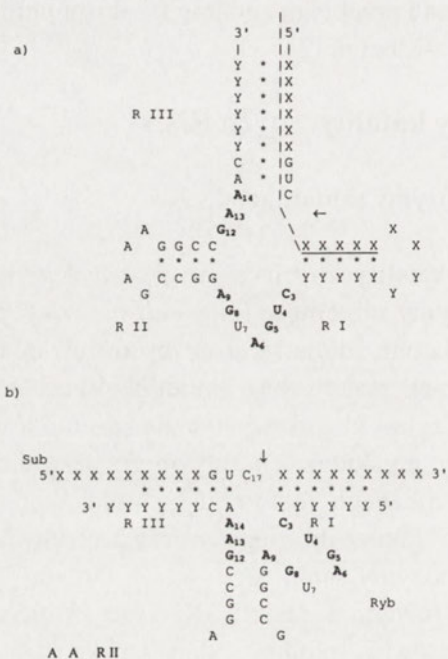
W pracy tej charakterystyka typów katalitycznych RNA została przedstawiona tylko w zarysie. Szerzej zagadnienia te w polskim piśmiennictwie zostały omówione w pracach przeglądowych innych autorów [14–16].

### III. Rybozomy „hammerhead”

Najwięcej uwagi poświęca się rybozynom „hammerhead”, najmniejszym wśród katalitycznych RNA. Naturalnie występują one wewnątrz wirusów RNA, gdzie działają w układzie *cis* podczas replikacji RNA, zachodzącej, jak już wspomniano, według mechanizmu toczącego się koła (Ryc. 1a) [2, 11]. Rybozym i substrat stanowią wtedy jedną całość. Zaobserwowano również, że proces rybonukleolitycznego trawienia może zachodzić także w układzie *trans*. Wtedy to, odmiennie niż w układzie *cis*, substrat i enzym są oddzielnymi cząsteczkami (Ryc. 1b) [18].

Zachowanie sekwencji nukleotydowych i homologia struktury drugorzędowej utworzonej przez nici (+) jak i (-) RNA wspomnianego już wiroida skazy słonecznej awokado (ASBV), pozwoliło na ustalenie charakterystycznej struktury dla rybozymów samotnych o centrum aktywnym, przypominającym

„głowę młotka” [19]. Jest ona utworzona przez trzy helikalne ramiona. Dwa z nich, I i III, których skład nukleotydowy nie jest ściśle zachowany, są odpowiedzialne za komplementarne wiązanie się rybozymu z substratem. Ramię II wraz z jednoniciowym fragmentem tworzącym rdzeń jest bezpośrednio zaangażowane w przeprowadzenie reakcji katalitycznej. Centrum aktywne składa się z konserwatywnych nukleotydów niezbędnych dla zachowania aktywności rybonukleolitycznej. Równie istotne jest występowanie co najmniej dwóch par zasad w helisie II, ze



Ryc. 1. Budowa rybozymów „hammerhead” aktywnych w pozycji „cis” (a) i „trans” (b) wg. pracy De-Min Zhou i wsp. [17]. Gwiazdki oznaczają komplementarne pary zasad, strzałki — miejsce, w którym zachodzi reakcja rozszczepiania wiązań fosfodiesterowych, R I, R II, R III — ramiona rybozimu, Sub — substrat, Ryb — rybozym. Wytłuszczonym drukiem zaznaczono pary zasad niezbędne do zachowania aktywności centrum katalitycznego rybozimu „hammerhead”.

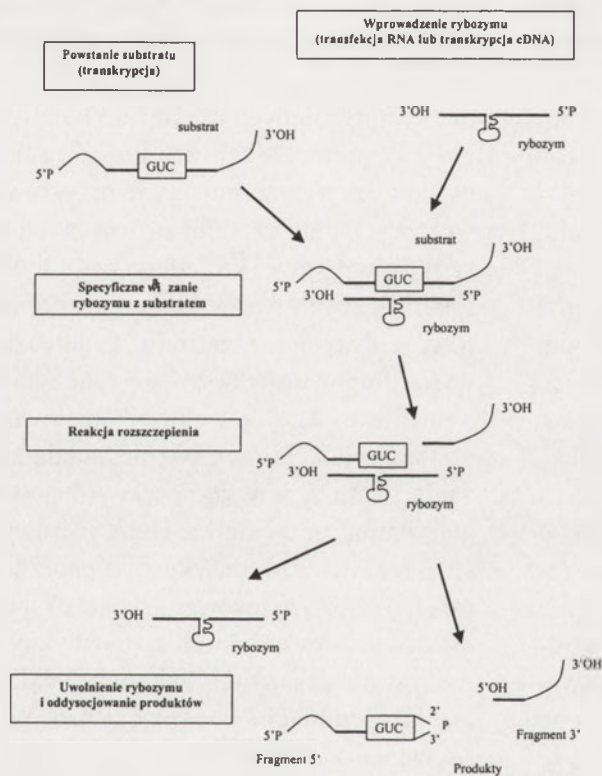
szczególnym uwzględnieniem pary G-C, zamykającej helisę w pozycji 10 i 11 [3, 20].

Dostępne dane wskazują, że cięcie zachodzi za specyficzną rozpoznawaną sekwencją trójnukleotydową substratu, którą najczęściej jest GUC [20]. W pierwszym etapie reakcji autokatalizy następuje asocjacja obu oligorybonuleotydów, a następnie hydroлиза wiązania fosfodiesterowego. Podkreśla się fakt, iż podczas katalitycznego cięcia tylko substrat ulega przekształceniu zaś sam rybozym, uwalniany po przeprowadzonej reakcji, jest stale aktywny (Ryc. 2.) [18].

Reakcja rybonukleolityczna zachodzi w drodze transestryfikacji. Rozszczepienie wiązania pomiędzy nukleotydami następuje poprzez atak nukleofilowy grupy 2'-OH na najbliższe wiązanie fosfodiesterowe. W efekcie powstają dwa produkty — jeden, zakończony 2', 3'cyklicznym fosforanem, drugi — grupą OH na 5' końcu. Hydroliza przeprowadzana przez rybozomy „hammerhead” związana jest z inwersją konfiguracji na atomie fosforu, a więc powstaniem pięciowartościowego stanu przejściowego [22, 23]. Ważną rolę w zachodzącej reakcji odgrywają jony metali. Zapewniają one utrzymanie aktywnej konformacji rdzenia katalitycznego, a poza tym

### III-1. Identyfikacja miejsca cięcia dla rybozymów

W doborze miejsca cięcia dla rybozymów zasadniczą rolę odgrywa sekwencja trójnukleotydu, za którą to cięcie zachodzi. Stosowana jest tu „reguła NUH” gdzie N — może być każdym z nukleotydów, U — to urydyna zaś H — to każdy z nukleotydów z wyjątkiem ganozyny [25]. Przyjmuje się, że skład sekwencji otaczających NUH nie wywiera wpływu na samą reakcję rozszczepienia. Zaobserwowano jednak, że występowanie dwukrotnie powtórzonej sekwencji UA od strony 3' zwiększa jej wydajność 10 krotnie [26].



Ryc. 2. Schemat wprowadzenia i katalitycznego działania rybozimu „hammerhead” wg. pracy Menke i Hobom [21]

są kofaktorami przeprowadzanej reakcji. Jony dwuwartościowe takie jak:  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , a także w mniejszym stopniu  $Sr^{2+}$  i  $Ba^{2+}$ , spełniają obydwie te funkcje w odróżnieniu od  $Cd^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ , uczestniczących w reakcji jedynie jako kofaktory [24].

Planując zastosowanie rybozymów jako czynników przeciwwirusowych niezbędne jest wybranie regionu genomu wirusa nie podlegającego mutacjom oraz odgrywającego zasadniczą rolę w replikacji lub samym procesie zakażenia komórki. Wybrany fragment wirusowego RNA musi poza tym zawierać określone trzy nukleotydy rozpoznawane przez rybozomy a także, co jest bardzo ważne dla zajścia reakcji rybonukleolitycznej, nie powinien zawierać struktur drugorzędowych. Na podstawie sekwencji takiego regionu ustala się skład nukleotydowy rybozimu, a następnie bada się jego aktywność w układzie komórkowym i pozakomórkowym.

Aktywność rybozimu oraz specyficzność przeprowadzanej reakcji uwarunkowana jest długością jego ramion. Zbyt krótkie ramiona I i III mogą być przyczyną utraty swoistości rybozimu, zaś ramiona zbyt długie zmniejszają szybkość oddysocjowywania produktów, co w konsekwencji prowadzi do zablokowania katalitycznych właściwości cząsteczek RNA. Wydaje się, że jeśli chodzi o specyficzność reakcji długość ramienia końca 3' rybozimu jest bardziej krytyczna niż końca 5' [23, 27]. Z analizy danych wynika, że optymalna długość helisy I i III to 7-8 nukleotydów [28].

### III-2. Wprowadzanie rybozymów do komórek

Wyróżnia się dwie strategie wprowadzania rybozymów do komórek eukariotycznych — egzo- i endogenna. Podstawą ich wyróżnienia jest rodzaj

wprowadzanego materiału. W przypadku strategii egzogennej jest to syntetyczny fragment RNA będący rybozymbem, zaś w przypadku endogennej — do komórki za pomocą wektora ekspresyjnego wprowadzany jest cDNA kodujący rybozym, który zostaje przepisany na RNA przy udziale polimeraz komórkowych.

### III-2.1. Egzogeniczna strategia wprowadzania rybozymów do komórek

RNA rybozymu jest syntetyzowane chemicznie (łańcuchy o długości około 30-40 nukleotydów) bądź enzymatycznie przy pomocy polimeraz RNA (SP6 czy T7) transkrybujących matrycowe DNA w układzie pozakomórkowym [29]. Może ono zostać wprowadzone do komórki za pomocą standardowych metod tj. poprzez elektroporację oraz za pośrednictwem liposomów czy też bezpośrednio przez iniekcję [21, 23]. Pierwszym krokiem, który należy podjąć w stosunku do wprowadzanego materiału, jest jego odpowiednia modyfikacja pozbawiająca RNA wolnych grup 2'-OH. Zapewnia ona uzyskanie oporności na komórkowe nukleazy, a co za tym idzie, wydłuża okres półtrwania w komórce danej cząsteczki rybozymu. Najczęściej stosowanymi podstawnikami są: 2'-deoksy, 2'-fluoro, 2'-O-metylo-, 2'-O-allilo- oraz 2'-amino pochodne [30]. Modyfikacje te obejmują również podstawienie przez 2'-fluorocytydynę nukleotydów znajdujących się poza regionem katalitycznym, a także wprowadzenie wiązań fosforotionowych na miejsce fosfodiesterowych [21]. Bardzo ważne jest jednak, żeby wprowadzane modyfikacje nie pozbawiły rybozymu jego własnej aktywności [31].

Wydaje się, że zastosowanie liposomów kationowych jako nośników jest najbardziej efektywnym sposobem wprowadzenia katalitycznych cząsteczek RNA do komórki. Jest to możliwe dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym pomiędzy dodatnio naładowanym nośnikiem materiału genetycznego, a ujemnie naładowaną błoną komórkową. Pobrany materiał na skutek destabilizacji i rozpadu endosomu jest uwalniany do cytoplazmy [32]. Warto też dodać, iż już sama asocjacja z liposomami zabezpiecza katalityczne RNA przed aktywnością zewnątrzkomórkowych rybonukleaz [31].

Głównym mankamentem tej metody jest brak stabilnej ekspresji wprowadzonego do komórki rybozymu. Stosując tę technikę nie uzyskuje się wystarczającego stężenia rybozymu w komórce. Jest to spowodowane zbyt niską efektywnością pobierania RNA a także jego degradacją w środowisku komórkowym [29]. Zastosowanie liposomów kationowych

w przypadku linii komórkowych THP-1, HeLa/LAV zakażonych wirusem HIV-1 nie pozwoliło na obniżenie syntezy wirusowego białka p24. Zaobserwowano ponadto niespecyficzne działanie rybozymów związanych z nośnikami kationowymi, a zwiększenie dawki tych ostatnich stało się cytotoksyczne dla badanych komórek [33].

### III-2.2. Endogeniczna strategia wprowadzania rybozymów do komórek

Strategia ta stwarza możliwość skutecznej transfekcji prawie wszystkich docelowych komórek. Zastosowanie różnego rodzaju promotorów umożliwi regulowanie poziomu ekspresji cDNA rybozymu, a użycie selekcyjnych genów markerowych pozwala na wyprowadzenie linii komórkowych, konstytutywnie syntetyzujących cząsteczki katalitycznego RNA [29]. W metodzie tej jako nośniki sekwencji nukleotydowych rybozymów wykorzystywane są różne wektory. Do najczęściej stosowanych należą wektory retrowirusowe, które stwarzają możliwość transfekcji licznych typów komórek i poprzez integrację wprowadzanego materiału genetycznego umożliwiają długotrwałą ekspresję rybozymu [34]. Kolejnym nośnikiem są wektory adenowirusowe, które podobnie jak retrowirusy, posiadają zdolność zakażenia wielu typów komórek. Adenowirusy nie ulegają jednak integracji z DNA jądrowym i indukują silną odpowiedź komórkową organizmu wobec wektora [31, 34]. Zastosowanie kaset ekspresyjnych daje możliwość uwzględnienia niezwykle ważnych warunków dla ekspresji rybozymów. Należą do nich inicjacja, terminacja i regulacja procesu transkrypcji sekwencji kodującej rybozym, a także stabilizacja i lokalizacja powstałego transkryptu [23,31]. Najczęściej stosowanymi promotorami są promotor genu polimerazy II, pozwalający na tkankowo specyficzną ekspresję rybozymu oraz promotor genu polimerazy III, który zapewnia wysoki poziom ekspresji wprowadzanego rybozymu [31].

## IV. Zastosowanie rybozymów „hammerhead” jako czynników przeciwwirusowych

Rybozimy „hammerhead” są najmniejszymi wśród katalitycznych RNA. Ze względu na swoją wielkość stanowią one odpowiedni materiał do syntezy chemicznej czy wprowadzania ich do poszczególnych wektorów [35]. Jakie pozostałe cechy przemawiają za wykorzystaniem ich jako czynników przeciwwirusowych? Z przedstawionych wcześniej danych wynika, że rybozimy „hammer-

*head*” są dobrze scharakteryzowane pod względem zasad doboru sekwencji i regionu wirusa, który stanowiłyby miejsce docelowe dla rybozomu, składu nukleotydowego aktywnego centrum katalitycznego czy parametrów kinetycznych przeprowadzanych reakcji [36]. Są one aktywne również w układzie *trans*, a ich wysoka specyficzność, minimalna cytotoxyczność niewątpliwie wskazują na skuteczną i przede wszystkim bezpieczną możliwość wykorzystania ich jako czynników przeciwwirusowych [18, 35].

Najwcześniej pojawiło się doniesienie dotyczące aktywności rybonukleolitycznych RNA w układzie pozakomórkowym, w którym opisano specyficzną reakcję przeprowadzaną przez 19 nukleotydowy rybozym, dla którego substratem był inny, 24 nukleotydowy fragment RNA [2].

Po raz pierwszy Cameron i Jennings [37] zaobserwowali, że rybozym dzięki swojej zdolności do rozszczepiania egzogennej RNA, może hamować ekspresję specyficznego genu również w układzie komórkowym. W przeprowadzonym przez nich doświadczeniu użyto sekwencję genu *cat* (transacetylazy chloramfenikolowej), którą wprowadzono do niekodującego regionu 3' genu lucyferazy, będącego pod kontrolą wczesnego promotora wirusa SV 40. Konstruktem takim transfekowano komórki linii COS1, a następnie kontrtransfekowano je plazmidem zawierającym DNA kodujący rybozym skierowany przeciwko mRNA CAT. W układzie takim ekspresja genu *cat* była zahamowana o 30%.

Wzrost zainteresowania wirusem HIV przyczynił się do rozwoju badań nad potencjalnym wykorzystaniem rybozymów jako czynników przeciwwirusowych. Dostarczyły one nowych informacji pozwalających na lepsze zrozumienie działania katalitycznych cząsteczek RNA i efektywniejsze ich zastosowanie. Sun i wsp. [38] planując strategię przeciwwirusowego użycia rybozymów wykorzystali funkcjonalne i strukturalne znaczenie sekwencji  $\Psi$  dla dojrzewania wirionów retrowirusów. Zastosowano ją w badaniach w układzie pozakomórkowym, a jako model posłużył wirus białaczki mysiej Moloneya (Mo-MLV). Do dalszych badań użyto komórki linii NIH 3T3 zakażone wirusem Mo-MLV, transfekowane wektorem pSV2neo, zawierającym rybozym przecinający RNA w obrębie sekwencji  $\Psi$ . Zaobserwowano zahamowanie replikacji wirusa o 80%. Zastosowanie podobnego konstruktu w komórkach zakażonych wirusem HIV-1 spowodowało obniżenie produkcji wirusowego białka p24

o 90%, a także opóźnienie tworzenia syncytiów. Bramlage i wsp. badali aktywność rybozymów „hammerhead”, rozpoznających specyficzną sekwencję w regionie LTR wirusa HIV-1 [39]. Kiedy badano ekspresję genu wskaźnikowego lucyferazy, znajdującego się pod kontrolą promotora LTR wirusa HIV-1, w linii komórkowej HeLa, została ona obniżona wskutek aktywności katalitycznych RNA od 61 do 87% w zależności od użytego rybozomu. Podobnie Dropulić i wsp. [40] wykorzystali rybozym tnący RNA wirusa HIV-1 w regionie LTR. Uszkodzenie sekwencji U5 LTR, a przez to pozabawienie mRNA zakończenia m<sup>7</sup>G, uniemożliwia prawidłowy i wydajny przebieg procesu translacji. Specyficzną aktywność rybozomu wykazano zarówno w układzie pozakomórkowym, jak i w komórkach linii HeLa, gdzie zaobserwowano zahamowanie procesu namnażania się wirusa HIV-1. Niestety rybozym był aktywny tylko przez okres 1 tygodnia, ponieważ później poziom wirusa w hodowli komórkowej znacząco wzrastał. Przypuszcza się, że przyczyną tego zjawiska była duża zmienność wirusa HIV. Rozwiązaniem tego problemu mogłoby być zastosowanie rybozymów rozpoznających różne docelowe sekwencje wirusa (ang. *multitarget ribozyme constructions*) [21]. Są to tak zwane rybozomy „drugiej generacji”. Udoskonalenie ich działania polega na zaprojektowaniu takiego zestawu rybozymów, które jednocześnie mogłyby rozpoznawać różne docelowe sekwencje wirusa. Wtedy, jeśli w jednym z regionów nastąpiłaby mutacja, nie pozwalająca na specyficzne rozpoznanie danej pozycji rozszczepienia, pozostałe rybozomy działałyby w innych, niezmiennych miejscach. Za przykład może posłużyć grupa kilku rybozymów, połączonych w tandem, skierowanych przeciwko poszczególnym sekwencjom zawierającym region GUC, zlokalizowanym w RNA genu *env* wirusa HIV [41]. Takie rybozomy połączone kowalencyjnie, z których każdy posiadał 8 nukleotydowe regiony flankujące, wykazywały aktywność rybonukleolityczną w układzie pozakomórkowym. Dzięki zastosowaniu tej strategii w odniesieniu do komórek linii HeLa uzyskano istotne zahamowanie tworzenia syncytiów oraz zmniejszoną ekspresję białka p24 wirusa HIV. Inny konstrukt tego rodzaju, zwany „shot-gun”, opisali Okhawa i wsp. [42]. Użyli oni kilku rybozymów „hammerhead” rozpoznających różne docelowe regiony wirusa HIV. Ich sekwencje zostały wbudowane w kasety ekspresyjne tRNA, połączone ze sobą w taki sposób, że pomiędzy nimi występowały jeszcze rybozomy działające w

układzie *cis*. Rolą tych ostatnich było przeprowadzenie autokatalitycznego rozszczepienia „złączy”. W ten sposób uzyskano 5 rybozymów „hammerhead” tnących niezależnie i jednocześnie w układzie *trans* docelowe RNA wirusa HIV-1. Rybozymy, jako czynniki przeciwwirusowe mogą być zastosowane również na zupełnie innym etapie procesu zakażenia komórki wirusem. Dzięki ich aktywności może dojść do hamowania wiązania i fuzji wirusa z komórką gospodarza. Miejscem zakotwiczenia się wirusa HIV-1, który charakteryzuje się tropizmem do makrofagów, jest receptor CCR5, znajdujący się na powierzchni komórek docelowych. Cagnon i Rossi [43] zaprojektowali rybozym specyficzny wobec mRNA tego receptora, który następnie został wprowadzony za pomocą kasety ekspresyjnej, zawierającej promotor genu polimerazy RNA III, do linii komórkowej HOS.CD4.CCR5. Zaobserwowano 70% ograniczenie ekspresji receptora CCR5, a przez to widoczne zahamowanie procesu namnażania się wirusa HIV, wykazującego tropizm do makrofagów. W kolejnych badaniach wykorzystano trimer rybozymów rozpoznający trzy różne miejsca w mRNA dla receptora CCR5. Jego aktywność wpłynęła zarówno na obniżenie poziomu mRNA, jak i infekcyjności wirusa. Gdy połączono działanie trimera z kolejnym rybozymem przecinającym mRNA genów regulatorowych *tat-rev* zaobserwowano obniżenie infekcyjności wirusa w linii komórkowej HOS.CD4/CCR5. Gdy konstrukt ten wprowadzono do macierzystych komórek krwiotwórczych CD34, komórki te różnicowały się do makrofagów, które z kolei wykazywały oporność na zakażenie wirusem HIV-1, charakteryzującym się tropizmem do tego typu komórek [44].

Strategię tandemowych rybozymów wykorzystano również w badaniach nad wirusem grypy, który podobnie jak wirus HIV charakteryzuje się dużym stopniem zmienności. Genom wirusa grypy typu A to 8 jednoniciowych segmentów RNA zakończonych wysoce konserwatywnymi regionami, które stanowią odpowiednie miejsce dla związania aktywnych rybonukleolitycznie cząsteczek RNA. Bliskie sąsiedztwo dwóch miejsc GUC na 5' końcu 5 segmentu pozwoliło na zaprojektowanie rybozymu-tandemu zawierającego dwa centra katalityczne. Skuteczność tego konstrukt i jego wyższość nad rybozymem hydrolizującym tylko jedno wiązanie fosfodiesterowe potwierdzono w układzie komórkowym, gdzie uzyskano 96-99% ograniczenie replikacji wirusa grypy typu A [45]. Układ podwójnego rybozymu zastosowano również w badaniach nad wirusem

pryszczycy (FMDV), który także charakteryzuje się dużą zmiennością genetyczną [46].

Wykorzystanie wektora retrowirusowego do wprowadzania sekwencji rybozymu opisali Lowenstein i Symonds [47]. Autorzy ci zastosowali wektor LNL6, skonstruowany na bazie wirusa białaczki mysiej Moloneya (Mo-MLV), w którym region 5'LTR i sekwencja  $\Psi$  pochodziła z wirusa mięsaka mysiego (MoMSV). Dzięki tej modyfikacji rybozym, dla którego substratem jest właśnie sekwencja  $\Psi$ , specyficznie rozpoznawał i rozszczepiał RNA wirusa Mo-MLV. Konstrukcja taka wykazała działanie przeciwwirusowe także po wprowadzeniu do zakażonych komórek linii NIH 3T3.

Innym wirusem, którego mRNA stało się substratem dla rybozymów, był wirus białaczki bydła (BLV). Transkrypcja prowirusowego DNA-BLV uzależniona jest od obecności dwóch białek Tax i Rex. Aby określić wpływ aktywnych katalitycznie cząsteczek RNA na proces replikacji wirusa BLV zsyntetyzowano dwa rybozymy, rozpoznające jako substrat mRNA *rex/tax*. W warunkach pozakomórkowych tylko jeden z nich rozszczepiał mRNA genu *tax*. Gdy sekwencję tego rybozymu wkłono do wektora eukariotycznego, w którym jego ekspresja była regulowana przez promotor wirusa mięsaka Rousa, a następnie taki konstrukt wprowadzono do komórek płuc nietoperza zakażonych BLV, zanotowano obniżenie aktywności odwrotnej transkryptazy o 90% i zmniejszenie o 61% produkcji wirusowego białka p24 [48].

Maeda i wsp. [49] zaprojektowali rybozymy rozpoznające jako substrat RNA kodujący polimerazę RNA zależną od RNA wirusa zapalenia wątroby myszy (MHV), pełniącej krytyczną rolę w jego replikacji. Aby zapewnić wysoki poziom ekspresji katalitycznego RNA sekwencja rybozymu została wkłono do wektora ekspresyjnego pEF321-T i umieszczona pod kontrolą promotora genu dla ludzkiego czynnika elongacyjnego I $\alpha$ . Wykazano, że w zakażonych komórkach, gdzie występowała aktywność odpowiedniego rybozymu, produkcja cząstek wirusa MHV, mierzona testem łyśinkowym, uległa znacznemu obniżeniu. Zahamowaniu podlegał również proces tworzenia syncytiów.

Wirus zapalenia wątroby typu B (HBV) należy do DNA-wirusów. Cechą charakterystyczną tej rodziny — *Hepadnaviridae* — jest to, że replikacja genomu zachodzi w procesie odwrotnej transkrypcji wirusowego mRNA, zwanego pregenomem. Właściwość tę wykorzystano w badaniach nad przeciwwirusową aktywnością rybozymów. Jednym z białek kodowanych przez DNA wirusa HBV jest



białko X, które pełni rolę czynnika transaktywującego. Sekwencja tego genu jest ściśle zachowana i znajduje się w każdym z transkryptów wirusa HBV. Kim i wsp. [50] badali dwa rybozomy, RzA i RzB, które w układzie komórkowym powodowały obniżenie aktywności transaktywującej białka HBx o 95 i 50%. Passman i wsp. [51], kontynuując badania nad rybozymami skierowanymi przeciwko mRNA-HBx, zaobserwowali, że w skutek ich aktywności nastąpiło zahamowanie ekspresji genów wirusa HBV, niezbędnych do jego replikacji.

Genom wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) stanowi jednoniciowe RNA (+). Aktywność rybozymów w odniesieniu do nici (+) i (-) RNA-HCV badano w komórkach CHO. Zsyntetyzowano 6 rybozymów, z których 4 specyficznie rozpoznawały nicę (+) a dwa nicę (-). Sekwencje poszczególnych rybozymów wklonowano do kasety ekspresyjnej pGval. Kaseta ta zawierała promotor polimerazy III oraz strukturę pętli pochodzącą z ludzkiego adenowirusa (ang. *stem-loop structure*), w obrębie której znajdował się rybozym. Otrzymany konstrukt umieszczono w wektorze adenowirusowym pod kontrolą promotora wirusa RSV, a następnie wprowadzono do komórek linii CHO zakażonych wirusem HCV. Spowodowało to znaczne obniżenie poziomu wirusowego RNA [52].

Region 5'UTR wirusa HCV charakteryzuje się wysokim stopniem konserwatywności. Zawiera on sekwencję IRES (ang. *internal ribosome entry site*), która zapewnia inicjację procesu translacji białek wirusa niezależnie od struktury czapeczki. Maciejak i wsp. [53] skonstruowali rybozomy rozpoznające 15 różnych miejsc w obrębie sekwencji 5'UTR HCV. Ich zdolność do przeprowadzania reakcji rybonukleolitycznej badano w komórkach linii OST7. Do komórek tych, przy pomocy liposomów kationowych, wprowadzano syntetyczny RNA poszczególnych rybozymów, a także plazmidy zawierające promotor polimerazy T7, region 5' UTR HCV połączony z genem wskaźnikowym — lucyferazą. Aktywność rybonukleolityczna rybozymów mierzona aktywnością lucyferazy wahała się od 40 do 70%. Ze względu na duże podobieństwo w replikacji wirusa HCV i wirusa polio (PV), wpływ katalitycznych RNA na proces namnażania się wirusa HCV badano w komórkach linii HeLa zakażonych wirusem PV, w którym sekwencję IRES zastąpiono odpowiadającą sekwencją wirusa HCV. W układzie takim, po wprowadzeniu rybozymów, nastąpiła 50% redukcja replikacji wirusa.

Okhawa i wsp. [54] zaprojektowali trzy rybozomy „hammerhead” tnące specyficznie RNA ko-

dujące białka wirusa HCV genotypu 1b, najbardziej opornego na działanie  $\alpha$ -interferonu. Zaobserwowano, że wydajność reakcji nukleolitycznej z udziałem rybozomu zależy od lokalizacji sekwencji docelowej oraz, że nie zawsze poziom aktywności rybozomu jest zgodny ze stopniem zahamowania procesu namnażania się wirusa. Widoczne było również, iż zastosowanie zbyt długiego substratu (1217 z) mogło spowodować wytworzenie struktury drugorzędowej, uniemożliwiającej związanie z rybozymem. Pociągnęło to za sobą konieczność użycia aż 1000-krotnego nadmiaru rybozomu wobec docelowego RNA.

Xing i Whitton [55, 56] badali aktywność rybozymów skierowanych przeciwko sekwencji S wirusa LCMV (wirus limfocytarnego zapalenia opon mózgowych i splotów naczyniówkowych myszy), należącego do arenawirusów. Segment S jest jednym z dwóch segmentów jednoniciowego RNA stanowiącego genom LCMV i koduje on, w kierunku sensownym, glikoproteinę C, zaś w antysensownym nukleoproteinę. Geny te są przedzielone krótkim fragmentem tworzącym prawdopodobnie strukturę drugorzędową, w obszarze której znajdują się specyficzne nukleotydy GUC, rozpoznawane przez rybozym (Rib1) [55]. Przypuszcza się, że to właśnie struktura szpilki była przyczyną braku jego aktywności, gdyż pozostałe rybozomy (Rib3, Rib4, Rib5), dla których miejsca cięcia znajdowały się poza regionem struktury drugorzędowej, przeprowadzały prawidłowo reakcję rozszczepienia wiązań fosfodiestrowych, a doświadczenia przeprowadzane na liniach komórkowych wykazały obniżenie poziomu RNA LCMV. Stwierdzono jednak, że występowały różnice w aktywności zastosowanych rybozymów. Należy to prawdopodobnie tłumaczyć różnym stopniem związania się poszczególnych rybozymów z miejscem docelowym, odmiennym składem regionów flankujących, a także zmiennością genetyczną samego wirusa. Ekspresja najbardziej aktywnego rybozomu (Rib 5) doprowadziła do blisko stukrotnego obniżenia produkcji cząstek wirusa LCMV [56].

Kitajima i wsp. [57] wykorzystali dla wprowadzenia rybozymów do komórek liposomy kationowe zintegrowane z cząsteczkami wirusa HVJ (japońskiego wirusa aglutynującego). Podyktowane to zostało wysoką zdolnością do opłaszczania cząstek RNA, efektywnym pobieraniem takich kompleksów przez komórkę oraz ich lokalizacją w pobliżu jądra. Układ taki zastosowano wobec mRNA genów *tax/rex* wirusa białaczki limfocytarnej typu I (HTLV-I). Ich skuteczność, jako inhibitorów ekspresji wirusa HTLV-I, badano w komórkach fibrobla-

stów płodowych szczura transfekowanych cDNA HTLV-I. Tylko rybozym skierowany przeciwko mRNA genu *tax* wykazywał swoją specyficzność w układzie komórkowym. Brak aktywności drugiego z rybozymów wynikał z użycia niepełnej sekwencji genu *rex* w cDNA użytym do transfekcji komórek.

Perspektywą dla dalszego rozwoju badań nad rybozymami są zwierzęta transgeniczne. Pierwsze próby nie dotyczyły wprawdzie przeciwwirusowego zastosowania rybozymów, ale wskazywały na możliwość uzyskania zwierząt transgenicznych, w komórkach których zachodziłaby ekspresja aktywnych katalitycznie cząsteczek RNA. L'Huillier i wsp. [58] skrzyżowali ze sobą transgeniczne myszy, u których obserwowano wysoką ekspresję genu  $\alpha$ -laktoalbuminy bydłęcej, z linią myszy transgenicznych z wbudowaną sekwencją rybozymu, specyficznego wobec genu  $\alpha$ -laktoalbuminy. Aktywność rybozymu u myszy z pokolenia F1, u których zachodziła ekspresja obydwu wbudowanych genów, doprowadziła do obniżenia poziomu docelowego mRNA nawet do 78%, w porównaniu do transgenicznych zwierząt nie zawierających sekwencji rybozymu.

Możliwość wprowadzenia za pomocą wektora adenowirusowego sekwencji rybozymu do komórek myszy transgenicznych z wbudowanym genem ludzkiego hormonu wzrostu (hGH) badali L e b e r i K a y [59]. Zastosowano różne promotory do regulacji ekspresji wprowadzanych rybozymów. Zaobserwowano zależność poziomu ekspresji rybozymu od zastosowanego promotora a także korelację pomiędzy ilością syntetyzowanego rybozymu, a poziomem mRNA hGH. Najbardziej aktywny z nich doprowadził do ponad 96% redukcji syntezy hormonu wzrostu.

Przeciwwirusowe działanie rybozymów u zwierząt transgenicznych badali również W a n g i wsp. [60]. Skonstruowany rybozym, którego substratem był RNA wirusa klasycznego pomoru świń, wklonowano do wektora ekspresyjnego pMHR32 pod kontrolę promotora genu owczej metalotioneiny. Konstrukt ten wprowadzono metodą mikroiniekcji do zygot. W hepatocytach uzyskanych od transgenicznych królików obecność RNA-rybozymu stwierdzono metodą RT-PCR, a wyniki badań wskazywały, że zwierzęta uzyskały oporność na zakażenie zjadliwym szczepem tego wirusa.

## V. Uwagi końcowe

Od początku lat osiemdziesiątych, kiedy to C e c h i wsp. [1] odkryli enzymatyczne cząsteczki RNA zdolne do przeprowadzenia reakcji katali-

tycznej bez udziału białek, z roku na rok coraz więcej wiemy o budowie i funkcjonowaniu rybozymów. Każde doświadczenie dostarcza nowych informacji o sposobie wprowadzania katalitycznych RNA, ich zachowaniu się w środowisku komórkowym oraz zdolności do regulacji ekspresji poszczególnych genów poprzez hydrolizę wiązań pomiędzy rybonukleotydami. Takie cechy jak zdolność do autokatalitycznego rozszczepiania nici RNA, przede wszystkim w układzie *trans*, specyficzność przeprowadzanych reakcji, a także możliwość wielokrotnego wykorzystania rybozymów, przyczyniły się do powstania koncepcji przeciwwirusowego zastosowania rybozymów. Najwięcej doświadczeń w tym kierunku wykonano z zastosowaniem rybozymów „hammerhead” i „hairpin” i były to w większości doświadczenia przeprowadzane w układach komórkowym i pozakomórkowym. Prawdopodobnie i próby z uwzględnieniem doświadczalnie zakażonych zwierząt będą dawały coraz więcej pozytywnych wyników. Ostatnio pojawiają się doniesienia o zastosowaniu rybozymów jednocześnie z terapią HAART (ang. *Highly Active Antiretroviral Therapy* — wysoce aktywna terapia antyretrowirusowa). Wskazują one na to, że aktywność przeciwwirusowa rybozymów pozwala na użycie niższych dawek leków hamujących proces namnażania się wirusa HIV [61].

Warto też wspomnieć, że przeciwwirusowe działanie rybozymów nie ogranicza się tylko do wirusów ludzkich i zwierzęcych. Wirusy roślinne, szczególnie wirusy roślin uprawnych, powodują rokrocznie poważne straty plonów. Prowadzone prace badawcze mają na celu uzyskanie jak najlepszych metod zwalczania chorób wirusowych. Po raz pierwszy Y a n g i wsp. [62] zaobserwowali, że w skutek aktywności wprowadzonego rybozymu nastąpiło obniżenie, do niewykrywalnego poziomu, RNA wiroida wrzecionowatości bulw ziemniaka (PSTVd) w komórkach transgenicznego ziemniaka (*Solanum tuberosum*). Zastosowanie rybozymów stwarza również możliwość ochrony przed zakażeniami, na które dotąd w ogóle nie ma skutecznej terapii. Wskazują na to pierwsze doniesienia o przeciwwirusowej aktywności rybozymów rozpoznających sekwencje wirusa ospowatości śliw (PPV)[63].

Wydaje się więc, że dzięki tak szeroko zakrojonym badaniom podstawowym i aplikacyjnym nad rybozymami, zastosowanie katalitycznych RNA, jako czynników przeciwwirusowych, rokuje duże nadzieje.

## Piśmiennictwo

1. Kruger K, Grabowski P J, Zaug A J, Sand J, Gottschling D E, Cech T R (1982) *Cell* 31: 147-157
2. Uhlenbeck O C (1987) *Nature* 328: 596-600
3. Symons R H (1992) *Annu Rev Biochem* 61: 641-671
4. Hampel A, Tritz R, Hick M, Cruz P (1990) *Nucleic Acids Res* 18: 299-304
5. Wu H N, Lin Y J, Lin F P, Makino S, Chang M F, Lai M M C (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1831-1835
6. Perrotta A T, Been M D (1990) *Nucleic Acids Res* 18: 6821-6827
7. Branch A D, Robertson H D (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10163-10167
8. Kuo M Y P, Sharmeen L, Dinter-Gottlieb G, Taylor J (1988) *J Virol* 62: 4439-4444
9. Saville B J, Collins R A (1990) *Cell* 61: 685-696
10. Guo H C T, Abreu D M D, Tillier E R M, Saville B J, Olive J E, Collins R A (1993) *J Mol Biol* 232: 351-361
11. von Ahsen U, Schroeder R (1993) *BioEssays* 15: 299-307
12. Cech T R (1991) *Cell* 64:667-669
13. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S (1983) *Cell* 35: 849-857
14. Chachulska A M (1992) *Postepy Biochemii* 38: 64-74
15. Jakubowicz M (1992) *Postepy Biochemii* 38: 164-171
16. Kierzek R (1996) W: Barciszewski J, Łastowski K, Twardowski T (red) *Nowe tendencje w biologii molekularnej inżynierii genetycznej oraz medycynie*, Wyd. Sorus, Poznań, str. 137-185
17. Zhou D M, Kohda T, Koseki S, Yamamoto R, Yasugi M, Tsugawa K, Okhawa J, Koguma T, Taira K (1996) *Biotechnologia* 4: 183-200
18. Rossi J J, Sarver N (1990) *TIBTECH* 8: 179-183
19. Hutchins C J, Rathgen P D, Forster A C, Symons R H (1986) *Nucleic Acids Res* 14: 3627-3640
20. Sigurdsson S T, Eckstein F (1995) *TIBTECH* 13: 286-289
21. Menke A, Hobom G (1997) *Molecular Biotechnology* 8: 17-33
22. Bratty J, Chartrand P, Ferbeyre G, Cedergren R (1993) *Biochim Biophys Acta* 1216: 345-359
23. Birikh K R, Heaton P A, Eckstein F (1997) *Eur J Biochem* 245: 1-16
24. Dahm S C, Derrick W B, Uhlenbeck O C (1993) *Biochemistry* 32: 13040-13045
25. Ruffner D E, Stormo G D, Uhlenbeck O C (1990) *Biochemistry* 29: 10695-10702
26. Clouet-d'Orwal B, Uhlenbeck O C (1997) *Biochemistry* 36: 9087-9092
27. Hertel K J, Herschlag D, Uhlenbeck O C (1996) *EMBO J* 15: 3751-3757
28. Lieber A, Rohde M, Strauss M (1997) W: Turner P C (red) *Methods in Molecular Biology*, Vol.74: Ribozyme Protocols, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, str. 45-50
29. Szczakiel G, Nedbal W (1995) *Trends Microbiol* 3: 213-217
30. Pieken W A, Olsen D B, Benseler F, Aurup H, Eckstein F (1991) *Science* 253: 314-317
31. Narendra K V, Anilkumar R K, Eckstein F (1998) *Nucleic Acids Res* 26: 5237-5242
32. Xu Y, Szoka, Jr. F C (1996) *Biochemistry* 35: 5616-5623
33. Konopka K, Rossi J J, Swiderski P, Slepishkin V A, Düzgüneş N (1998) *Biochim Biophys Acta* 1372: 55-68
34. Bramlage B, Luzi E, Eckstein F (1998) *TIBTECH* 16: 434-438
35. Phylactou L A, Kilpatrick M W, Wood M J A (1998) *Hum Mol Genetics* 7: 1649-1653
36. Sullivan S M (1994) *J Invest Dermatol* 103: 85-89
37. Cameron F H, Jennings P A (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9139-9143
38. Sun L Q, Warrilow D, Wang L, Witherington C, Macpherson J, Symonds G (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9715-9719
39. Bramlage B, Luzi E, Eckstein F (2000) *Nucleic Acids Res* 28: 4059-4067
40. Dropulić B, Lin N H, Martin M A, Jeang K T (1992) *J Virol* 66: 1432-1441
41. Chen C J, Banerjee A C, Harmison G G, Haglund K, Schubert M (1992) *Nucleic Acids Res* 20: 4581-4589
42. Okhawa K, Yuki N, Kanazawa Y, Ueda K, Mita E, Sasaki Y, Kasahara A, Hayashi N (1997) *J Hepatol* 27: 78-84
43. Cagnon L, Rossi J J (2000) *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 10: 251-261
44. Bai J, Rossi J, Akkina R (2001) *AIDS Res Hum Retroviruses* 20: 385-99
45. Hobom G, Menke A (1997) W: Scanlon K J (red) *Methods in Molecular Medicine*, Vol.11: Therapeutic Applications of Ribozymes, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, str. 97-110
46. Stram Y, Molad T (1994) *Virus Genes* 9: 155-159
47. Lowenstein P, Symonds G (1997) *J General Virol* 78: 2587-2590
48. Cantor G H, McElvain T F, Birkebak T A, Palmer G H (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10932-10936
49. Maeda A, Mizutani T, Hayashi M, Watanabe T, Namioka S (1994) *J Vet Med Sci* 56: 939-945
50. Kim Y K, Junn E, Park I, Lee Y, Kang C, Ahn J K (1999) *Biochem Biophys Res Comm* 257: 759-765
51. Passman M, Weinberg M, Kew M, Arbuthnot P (2000) *Biochem Biophys Res Comm* 268: 728-733
52. Lieber A, He C H Y I, Polyak S J, Gretch D R, Bar D, Kay M A (1996) *J Virol* 70: 8782-8791
53. Maciejak D G, Jensen K L, Jamison S F, Domenico K, Roberts E C, Chaudhary N, von Carlowitz I, Bellon L, Tong M J, Conrad A, Pavco P A, Blatt L M (2000) *Hepatology* 31: 769-776
54. Okhawa J, Yuyama N, Takebe Y, Nishikawa S, Taira K (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11302-11306
55. Xing Z, Whitton J L (1992) *J Virol* 66: 1361-1369
56. Xing Z, Whitton J L (1993) *J Virol* 67: 1840-1847
57. Kitajima I, Hanuy N, Soejima Y, Hirano R, Arahira S, Yamaoka S, Yamada R, Muruyama I, Kameda Y (1997) *J Biol Chem* 272: 27099-27106
58. L'Huillier P H, Soulier S, Stinnakre M G, Lepourry L, Davis S R, Mercier J C, Vilotte J L (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6698-6703
59. Lieber A, Kay M A (1996) *J Virol* 70: 3153-3158
60. Wang M H, Wang M H, Wang B, Jiang J Y, Fan B Q, Zhao Q Z, Xie Q G, Gong X M, Du N X (1996) *Acta Vet et Zootech Sinica* 27: 319-325
61. Maijgren-Steffensson C, Sonnerborg A, Vahlne A, Britton S, Larsson S, Ahrlund-Richter L (2001) *Mol Ther* 3: 531-5
62. Yang X, Yie Y, Zhu F, Liu Y, Kang L, Wang X, Tien P (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4861-4865
63. Liu B, Tabler M, Tsagris M (2000) *Virus Res* 68:15-23

# Charakterystyka rodziny nukleaz 5'

## The characteristic of 5' nucleases family

KARINA SOLECKA<sup>1</sup>, ANNA PRZYKORSKA<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Enzymy specyficzne wobec struktury 5' flap DNA
- III. Struktura krystaliczna nukleaz 5'
- IV. Rola nukleaz 5' w procesach metabolizmu DNA
- V. Mechanizm degradacji 5' flap DNA
  - V-1. Model pętli
  - V-2. Model przewlekania
- VI. Roślinne homologu nukleaz 5'
- VII. Podsumowanie

**Wykaz stosowanych skrótów:** BER — naprawa poprzez wycięcie zasady (ang. *base excision repair*); CDDP — diaminodichloroplatyna; FEN-1 — ssacza flap endonukleaza-1, inaczej zwana 5'-egzonukleazą-1; miejsca AP — miejsca apurynowe/apirymidynowe; NER — naprawa poprzez wycięcie nukleotydu (ang. *nucleotide excision repair*); PCNA — jądrowy antygen podziałów komórkowych (ang. *proliferating cell nuclear antigen*); TNR — powtarzające się sekwencje trójnukleotydowe.

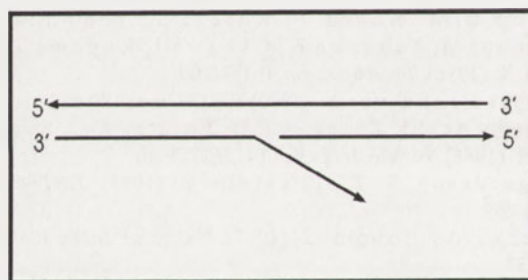
### I. Wstęp

W trakcie wielu ważnych procesów metabolizmu DNA, takich jak: replikacja [1, 2], rekombinacja [3–5], czy też naprawa [6, 7], może się formować rozgałęziona pośrednia struktura DNA, zwana 5' flap DNA (Ryc. 1), zawierająca wolny jednoniciowy koniec 5', wystający z dwuniciowego segmentu [8]. Taki substrat jest następnie rozpoznawany i degradowany przez specyficzne nukleazy [9], które potrafią odcinać endonukleolitycznie jego jednoniciowy fragment od reszty cząsteczki, bez względu na jego długość [10] i sekwencję [11]. Na przykład polimeraza DNA z *Thermus aquaticus* odcina nawet 268-nukleotydowe jednoniciowe ramię w miejscu jego połączenia z dwuniciowym odcinkiem DNA [12]. Enzymy o wspomnianej aktywności należą do grupy egzonukleaz 5'-3', zwanych również nukleazami 5' [13] i są funkcjo-

### Contents:

- I. Introduction
- II. 5' flap DNA structure-specific enzymes
- III. The crystal structure of 5' nucleases
- IV. The role of 5' nucleases in DNA metabolism processes
- V. Mechanism of 5' flap DNA cleavage
  - V-1. Looping model
  - V-2. Tracking model
- VI. Plant homologues of 5' nucleases
- VII Summary

nalnie konserwowane począwszy od wirusów, przez eubakteria, archebakteria, niższe eukariota aż do ssaków [9, 8, 14].



Ryc. 1. Struktura 5' flap DNA.

### II. Enzymy specyficzne wobec struktury 5' flap DNA

W komórkach eukariotycznych jeden enzym — FEN-1 (flap endonukleaza-1, inaczej 5'-egzonukleaza-1) wykazuje dwie różne aktywności: endonukleolityczną wobec struktury typu 5' flap i egzonukleolityczną wobec dwuniciowego DNA. Ssacza endo-/egzonukleaza FEN-1 o masie cząsteczkowej 42 kDa [15, 16] jest wysoce homologiczna do enzymów z *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, zwanych odpowiednio RAD27 (inaczej RTH1) i rad2 [17, 18]. Funkcjonalne homologii FEN-1 z eubakteria to polimeraza 1 DNA z *Escherichia coli* oraz polimeraza DNA z *Thermus aquaticus*. Powyższe bakteryjne enzymy wykazują podobieństwo w sekwencji aminokwasów do FEN-1, tylko w obrębie domeny N-terminalnej, z którą związana jest aktywność egzonukleazy 5'-3' [12,

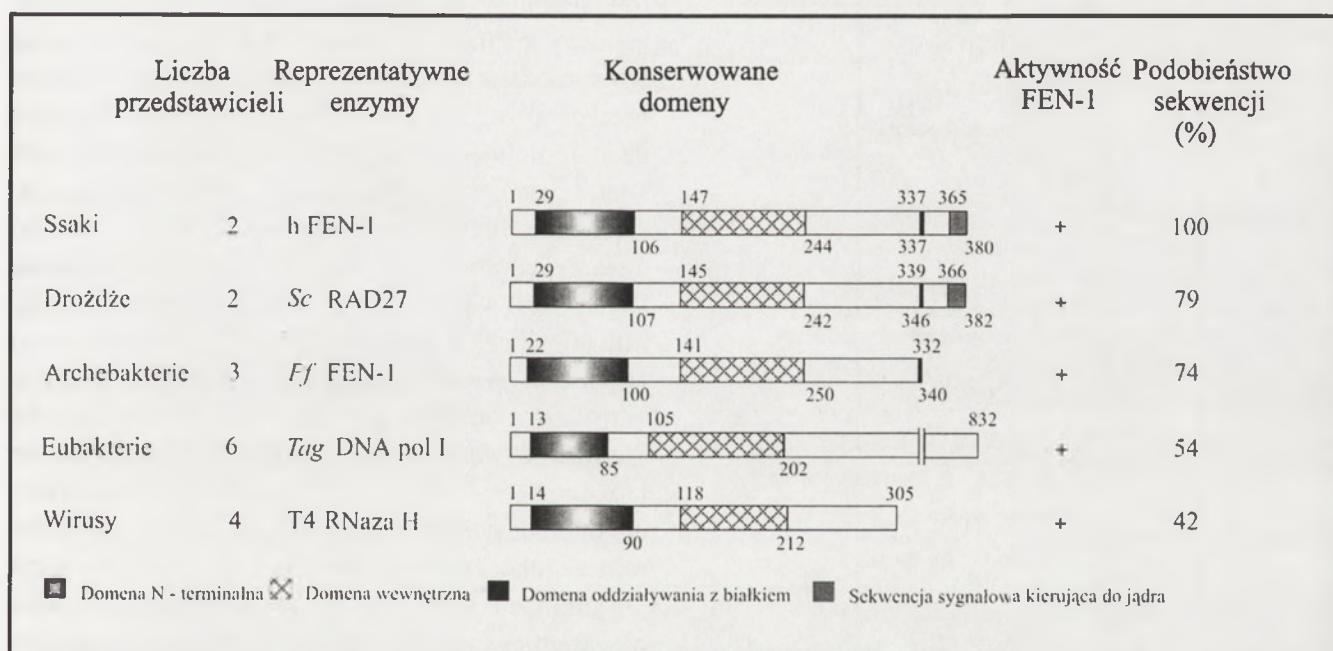
<sup>1</sup>Mgr, <sup>2</sup>dr hab.; Instytut Biochemii i Biofizyki, PAN, Zakład Biosyntezy Białka, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa.

19]. Natomiast do wirusowych funkcjonalnych homologów FEN-1, degradujących 5' flap DNA, zaliczane są: RNaza H z faga T4 i egzonukleaza 5'-3' z faga T5 [20, 21]. Enzymy z eubakteria i wirusów wykazują stosunkowo niskie podobieństwo w sekwencji aminokwasów do nukleazy FEN-1 [14]. Natomiast homologii FEN-1 znalezione u archebakteria: *Archaeoglobius fulgidus*, *Methanococcus jannaschii* [22] i *Pyrococcus furiosus* [23] wykazują około 74% podobieństwa w sekwencji aminokwasów do nukleazy FEN-1 (Ryc. 2).

Endonukleazy specyficzne wobec struktury 5' flap DNA mają konserwowane dwie domeny: N-terminalną i wewnętrzną (ang. *I* — *intermediate*) [28], zawierające konserwowane kwaśne amino-

### III. Struktura krystaliczna nukleaz 5'

Badania krystalograficzne homologów FEN-1 ujawniają ich bardzo interesującą strukturę przestrzenną. Egzonukleaza z faga T5 posiada w swojej strukturze helikalny łuk, który jest formowany przez dwie helisy, jedną zawierającą ładunek pozytywny i drugą zawierającą reszty hydrofobowe. Helikalny fragment tworzy otwór („ucho”) wystarczająco duży, żeby mógł się w nim ulokować jednoniciowy DNA. Centrum aktywne enzymu znajduje się u podstawy helikalnego łuku, gdzie mogą być związane dwa jony dwuwartościowe [25]. Badania struktury krystalicznej nukleaz 5' takich jak: polimeraza DNA z *Thermus aquaticus*, RNaza H



Ryc 2. Przedstawiciele nukleaz 5' [wg 14]. Do ssaczycy enzymów należą ludzka i mysia FEN-1. Drożdżowymi przedstawicielami są RAD27 z *Saccharomyces cerevisiae* i rad2 z *Schizosaccharomyces pombe*. Archebakterie zawierają FEN-1 z *Archaeoglobius fulgidus*, z *Methanococcus jannaschii* i z *Pyrococcus furiosus*. Polimeraza 1 DNA z *Escherichia coli* i polimeraza DNA z *Thermus aquaticus*, polimeraza DNA z *Thurmus flavus*, polimeraza DNA z *Bacillus caldotenax*, polimeraza DNA z *Deinococcus radiodurans* i polimeraza DNA z *Streptococcus pneumoniae* należą do eubakteria. Wirusowymi przedstawicielami są RNaza H z faga T4, egzonukleaza 5'-3' z faga T5, egzonukleazy z faga T7 i T3.

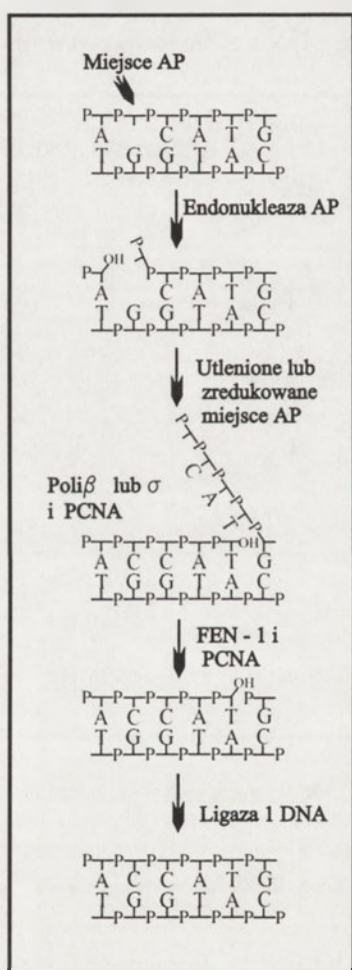
kwasy, odgrywające krytyczną rolę w katalizie (Ryc. 2). Większość z tych aminokwasów ma również znaczenie w wiązaniu jonów metali i hydrolizie substratu [13]. Natomiast domena C-terminalna, która jest nieobecna w białkach z eubakteria i wirusów, a jest konserwowana w systemie archebakteryjnym, pośredniczy w oddziaływaniu z białkiem PCNA (jądrowy antygen podziałów komórkowych) [16]. Ponadto C-terminalne reszty zasadowe, które są unikalne dla enzymów eukariotycznych, służą prawdopodobnie jako sekwencja sygnałowa, pozwalając białkom na migrację do jądra, gdzie wymagana jest ich aktywność [24].

z faga T4 [26], FEN-1 z *Pyrococcus furiosus* [27] oraz FEN-1 z *Methanococcus jannaschii* [28], również wykazują istnienie łuku lub pętli, potwierdzając, że ten element struktury jest ważny dla działania enzymu [29]. Ponadto analiza mutacyjna regionu pętli w FEN-1 z *Methanococcus jannaschii* sugeruje, że jest ona krytyczna zarówno w wiązaniu jak i degradacji struktury 5' flap DNA [30].

### IV. Rola nukleaz 5' w procesach metabolizmu DNA

Nukleazy 5' są enzymami szeroko rozpowszechnionymi, biorącymi udział w wielu reakcjach i

odgrywającymi istotną rolę w metabolizmie komórki. Na przykład, uszkodzone zasady DNA powstające w wyniku promieniowania jonizującego, lub prostych czynników alkilujących, mogą być naprawiane przy udziale ludzkiej egzonukleazy FEN-1 w procesie zwanym naprawą poprzez wycięcie zasady (ang. *base excision repair* — BER) [7]. Reakcja ta jest inicjowana przez glikozylazę DNA hydrolizującą wiązanie zasada-cukier i generującą w ten sposób miejsca apurynowe/apirymidynowe (miejsca AP). Są one przecinane po stronie 5' przez endonukleazę AP. W przypadku utlenionych lub zredukowanych miejsc AP, może



Ryc 3. Naprawa nieregularnych miejsc AP poprzez wycięcie zasady [wg 7]. Miejsce AP jest nacinane po stronie 5' przez endonukleazę AP. Polimeraza β lub δ syntezuje fragment DNA, w przypadku utlenionych i zredukowanych miejsc AP, generując strukturę 5' flap DNA. FEN — 1 (z pomocą PCNA) degradowuje endonukleolitycznie jednoniciowy segment. Ligaza I DNA łączy DNA.

być tworzona struktura 5' flap DNA. Polimeraza β lub δ poczynając od miejsca przecięcia DNA, syntetyzuje dwa do sześciu nukleotydów, wypychając jednocześnie nić istniejącą w dupleksie. Następnie ludzka FEN-1 może usunąć endonukleaolitycznie cały jednoniciowy uszkodzony fragment, wprowadzając cięcie w miejscu jego

połączenia z odcinkiem dwuniciowym. Naprawione DNA jest ligowane przez ligazę I DNA (Ryc. 3) [6].

Nukleazy aktywne wobec 5' flap DNA mogą także brać udział w naprawie poprzez wycięcie nukleotydu (NER). Proces ten jest odpowiedzialny za naprawę fotoproduktów powstałych pod wpływem promieniowania UV, jak i innych uszkodzeń DNA [31, 32]. Rozgałęzione struktury DNA podobne do tych postulowanych dla NER, są degradowane przez FEN-1 [9] oraz RAD2 z *Saccharomyces cerevisiae* [15].

Homologi ludzkiej FEN-1: RAD27 z *Saccharomyces cerevisiae* i rad2 z *Schizosaccharomyces pombe* mogą pełnić funkcje naprawcze zasad DNA, powstałych w wyniku promieniowania UV np. dimerów tyminowych, na drodze alternatywnej ścieżki naprawy poprzez wycięcie DNA (ang. *alternative DNA excision repair*). Wykazano, że wprowadzenie nacięcia przez nukleazę UVDE po stronie 5' uszkodzenia inicjuje naprawę. Na tak przygotowany substrat działa następnie nukleaza 5' wprowadzając nacięcie po stronie 3' uszkodzenia [33].

W drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* nukleaza RAD27 jest ważna dla wzrostu tego organizmu [18]. Mutacje w genie kodującym RAD27 powodują wrażliwość na czynniki alkilujące, promieniowanie UV oraz wzrost poziomu niestabilności prostych powtórzonych sekwencji DNA. Możliwe jest, że mutacje w ludzkim homologue — FEN-1, mogą zwiększać prawdopodobieństwo powstania raka jelita grubego i inne rodzaje raka, które są wynikiem duplikacji sekwencji [34]. Ponadto RAD27 prawdopodobnie bierze udział w zapobieganiu wydłużaniu i skracaniu powtarzających się sekwencji trójnukleotydowych (TNR). Delecyjne mutanty w genie kodującym to białko wykazują destabilizację obszaru z powtórzeniami CTG i jego wydłużanie. To sugeruje, że defekty w ludzkim odpowiedniku RAD27, mogą prowadzić do chorób genetycznych, które są powiązane z wydłużaniem TNR, jak: dystrofia mięśniowa, choroba Huntingtona, kilka rodzajów ataksji [35, 36].

Postuluje się, że przedstawiciele nukleaz 5' są enzymami wymaganymi w czasie replikacji DNA do usuwania primerów RNA z fragmentów Okazaki [37, 2]. Wycięcie primera RNA jest pierwszym i koniecznym krokiem potrzebnym do zakończenia replikacji na nici opóźnionej, zanim fragmenty Okazaki zostaną połączone przez ligazę DNA. W *Escherichia coli* usunięcie primera RNA wymaga aktywności egzonukleazy 5'-3' polimerazy I DNA, oraz RNazy H [38]. Ponieważ żadna ze znanych eukariotycznych polimeraz nie wykazuje aktywności egzonukleazy 5'-3', przypuszcza się, że w

komórkach tych organizmów, proces ten jest przeprowadzany dzięki współdziałaniu nukleaz: RNazy H1 i 5'-3' egzo/endonukleazy — FEN-1 [39,40]. RNaza H1 odcina prawie cały primer RNA pozostawiając jedynie monorybonukleotyd przyłączony do DNA. Jest on następnie usuwany przez FEN-1 egzonukleolitycznie lub endonukleolitycznie, razem z fragmentem DNA, zsyntezowanym przez polimerazę  $\alpha$ . Sugeruje się, że we fragmentach Okazaki może powstawać struktura typu 5' *flap*, dzięki syntezie DNA przez polimerazę DNA z wcześniejszego fragmentu Okazaki i rozwijaniu DNA przez helikazę. Ta struktura jest dopiero trawiona przez endonukleolityczną aktywność FEN-1 [37, 41, 5].

Wykazano, że podczas replikacji, ludzka FEN-1 może także brać udział w naprawie niewłaściwie wstawionych zasad DNA (ang. *mismatch repair*) przez polimerazę  $\alpha$ . Po zakończeniu syntezy primera RNA, polimeraza  $\alpha$  syntetyzuje fragment o długości 10-20 nukleotydów. Enzym ten nie posiada jednak żadnego mechanizmu pozwalającego usuwać niewłaściwie włączone deoksynukleotydy, które mogą destabilizować helikalną strukturę DNA w swoim sąsiedztwie. Struktura taka staje się substratem dla ludzkiej FEN-1, pozwalając na łatwiejszą endonukleolityczną degradację tych uszkodzeń [42].

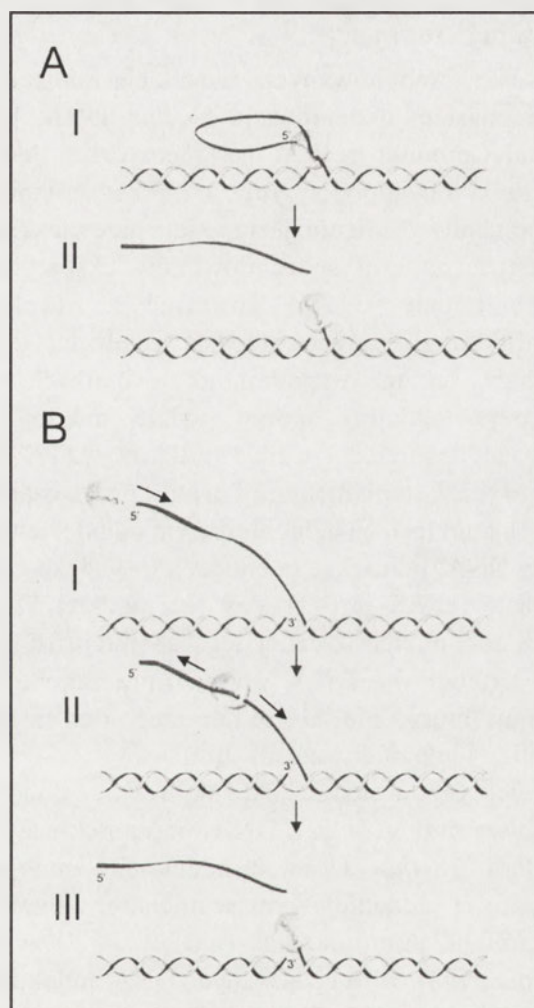
Mysia FEN-1 jest zdolna do degradacji 5' *flap* DNA, powstającego prawdopodobnie jako struktura pośrednia, w procesie łączenia dwuniciowych pęknięć DNA (ang. *double-strand break repair*), podczas rekombinacji niehomologicznej [15, 10]. W procesie tym zachodzi przerwanie ciągłości dwuniciowej struktury DNA i jego późniejsze łączenie. Nie jest tu wymagana wysoka homologia sekwencji. Najczęściej są to krótkie fragmenty od jednego do pięciu nukleotydów, mające nakierowywać reakcje łączenia pękniętych nici DNA (ang. *end joining*). Naprawa z wykorzystaniem krótkich odcinków homologii jest rzadziej występującym mechanizmem naprawy w procesie niehomologicznej rekombinacji [5]. Mogą się tutaj formować pośrednie struktury 5' *flap* DNA, które są substratem dla nukleaz 5' [16].

## V. Mechanizm degradacji struktury 5' *flap* DNA

### V-1. Mechanizm pętli

Zaproponowano dwa mechanizmy endonukleolitycznej degradacji 5' *flap* DNA przez nukleazy 5'. Pierwszym z nich jest model „pętli” (ang. *looping*

*model*), w którym enzym potrzebuje tylko związać się lub współdziałać z wolnym jednoniciowym końcem 5' w tej strukturze, żeby ulec aktywacji. Nukleaza w stanie aktywnym pozostając związana z końcem 5', wiąże się następnie z miejscem włączenia jednoniciowego fragmentu w dwuniciowy odcinek, wyginając ten niesparowany segment w pętlę (Ryc. 4). W tym miejscu enzym zaczyna



Ryc 4. Modele degradacji 5' *flap* DNA przez nukleazy 5' [wg 11]. A — model pętli. Enzym wiąże się w miejscu połączenia jednoniciowego segmentu w dwuniciowy odcinek, ale musi również oddziaływać z wolnym końcem 5', żeby wystąpiła degradacja. B — model „przewlekania”. I — enzym musi związać się z wolnym końcem 5'. II — ruch enzymu na nici. Enzym może przesuwając się po nici w dwóch kierunkach, przewlekając jednoniciowy segment przez otwór, w swojej strukturze wewnętrznej. III — odcięcie jednoniciowego segmentu przez enzym.

katalizę i odcina następnie jednoniciowy segment od reszty dwuniciowej struktury [41].

### V-2. Mechanizm przewlekania

Drugim zaproponowanym mechanizmem działania nukleaz 5', wobec 5' *flap* DNA, jest model „przewlekania” (ang. *threading model*). W tym

przypadku enzym „przewleka” wolny jednoniciowy fragment DNA, przez otwór („ucho”), w swej strukturze, począwszy od końca 5' do miejsca włączenia jednoniciowego odcinka w strukturę dwuniciową. Tutaj następuje degradacja substratu i zostaje uwolniony jednoniciowy DNA (Ryc. 4). Enzym może przesuwac się po nici DNA w dwóch kierunkach: nukleaza może wchodzić na wolny koniec 5' i ześlizgiwać się z niego, odstępując od reakcji [43, 29, 13, 11].

W obu proponowanych modelach miejsce, w którym następuje degradacja 5' *flap* DNA, jak i powstały produkt reakcji, są identyczne. Jednak bardziej prawdopodobnym z przedstawionych mechanizmów działania, jest model „przewlekania”. Przemawia za nim sporo dowodów eksperymentalnych i daje się go powiązać ze strukturą krystaliczną zbadanych przedstawicieli tej grupy enzymów. Jak już wspomniano, w białkach tych występuje helikalny motyw, gdzie mógłby się lokować jednoniciowy, a nie dwuniciowy DNA [25]. Dlatego też, komplementarny primer przyłączany w różnych punktach na jednoniciowym odgałęzieniu w 5' *flap* DNA, przeszkadza ciążącej 5'-3' egzo/endonukleazie (cFEN-1) [41], czy też ludzkiej FEN-1 [16], w endonukleolitycznej degradacji tej struktury. Taki dwuniciowy DNA stanowi przeszkodę dla enzymu, który nie może dotrzeć do miejsca hydrolizy i zdegradować substratu.

Model „przewlekania” daje się również połączyć z naprawą uszkodzonego DNA, przez nukleazy 5'. Struktura 5' *flap* DNA z adduktami umiejscowionymi na jednoniciowym segmencie, takimi jak *cis*-diaminodichloroplatyna (CDDP — czynnik antynowotworowy, wiążący się do DNA, indukujący jego uszkodzenie), czy też jej duże pochodne, jest endonukleolitycznie degradowana przez ludzką FEN-1 (hFEN-1). Enzym ten również hydrolizuje endonukleolitycznie strukturę 5' *flap* DNA, w której na jednoniciowym segmencie występują pojedyncze, lub podwójne dimery tymidynowe [29]. Natomiast CDDP zlokalizowane w sąsiedztwie miejsca włączenia jednoniciowego fragmentu, w strukturę dwuniciową, hamuje aktywność hFEN-1 [43]. Inny enzym — cFEN-1, toleruje biotynylowane nukleotydy na wolnym końcu 5', lub też wewnątrz jednoniciowego segmentu w 5' *flap* DNA. Enzym ten nie jest jednak zdolny do degradacji tej struktury, jeżeli biotyna jest połączona z białkiem — streptawidyną [11].

Związek nukleaz 5' z naprawą DNA zgodnie z mechanizmem „przewlekania” potwierdzają również badania genetyczne. Brak aktywnego

RAD27 w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*, powoduje defekty w procesie naprawy, oraz wrażliwość na czynniki alkilujące i promieniowanie UV [44]. Nukleazy 5' mogłyby więc „przewlekać” jednoniciowy segment w 5' *flap* DNA, zawierający uszkodzone zasady, począwszy od wolnego końca 5' tego substratu, do miejsca degradacji. Tutaj następowałoby usunięcie uszkodzenia, poprzez odcięcie całego jednoniciowego segmentu, razem ze zmodyfikowanymi nukleotydami [43]. Taki mechanizm działania enzymu pozwala także na naprawę różnego typu uszkodzeń, bez potrzeby specyficznego rozpoznawania struktury uszkodzonego nukleotydu [40]. Jest on tylko zależny od utworzenia odpowiedniej struktury DNA dla działania enzymu — 5' *flap* DNA. Może być jednak ograniczony wielkością modyfikacji, narzuconą przez rozmiar i giętkość „łuku” w enzymie, które nukleaza może tolerować. Ponadto mechanizm „przewlekania” jest w zgodzie z obserwowanym obniżeniem aktywności nukleaz 5' w przypadku gdy uszkodzenia są umiejscowione zbyt blisko punktu endonukleolitycznej degradacji struktury 5' *flap* DNA [43].

Istnieją jednak pewne dowody przeczące proponowanemu wyżej mechanizmowi „przewlekania”. Ludzka FEN-1 degraduje strukturę 5' *flap* DNA, w której jednoniciowy odcinek został zmodyfikowany, poprzez przyłączenie do niego 11-nukleotydowego fragmentu, co w efekcie dało strukturę widełek. Struktura ta jest na tyle duża, że powinna zahamować aktywność enzymu. Stwierdzono jednak, że obecność takiej struktury nie obniża aktywności hFEN-1. Dopiero dodatkowa modyfikacja tej struktury przez CDDP w obrębie powstałych widełek, czyni ją niedostępną dla enzymu [29].

Ponadto inne nukleazy 5' działają endonukleolitycznie nie tylko na 5' *flap* DNA, ale również na struktury dwuniciowe, mające w swoim obrębie jednoniciowy fragment. Enzymy te nie potrzebują więc jednoniciowego segmentu zawierającego wolny koniec 5'. Nukleaza z *Saccharomyces cerevisiae* — RAD2 działa endonukleolitycznie na dwuniciowy DNA, zawierający wewnątrz region 14 niesparowanych nukleotydów [45]. Enzym z kalafiora, przecina strukturę ramię — pętla, po stronie 3' pętli [46].

## VI. Roślinne homologi nukleaz 5'

Rośliny wyższe są interesującym systemem do badania mechanizmu koordynacji pomiędzy replikacją i naprawą DNA. Podlegają one wpływowi promie-



niowania UV przez dłuższy okres niż zwierzęta czy drożdże [47]. Nie mogą również uniknąć jego efektów. Z drugiej strony rozwój roślin wyższych jest zależny od ekspozycji na światło słoneczne, włączając promieniowanie UV, ponieważ energia dla tego procesu jest dostarczana dzięki fotosyntezie. Normalny rozwój roślin wyższych jest regulowany przez inicjację podziałów komórkowych tkanek merystematycznych i formowanie się organów. Procesy te zachodzą w obecności promieniowania UV, które jak wiadomo może powodować uszkodzenia DNA [47].

Jednakże w porównaniu ze zwierzętami, czy niższymi eukariontami mało jest wiadomo na temat białek, czy genów zaangażowanych w replikację i naprawę DNA w roślinach wyższych [48]. Są opisane w literaturze dwa enzymy roślinne, wyizolowane: z ryżu (*Oryza sativa*), określane jako OsFEN-1 i z kwiatostanów kalafiora (*Brassica oleracea*) [46]. Odgrywają one prawdopodobnie rolę we wspomnianych procesach. Wykazują one podobną aktywność endonukleolityczną, wobec struktury 5' flap DNA, jak nukleazy 5', które biorą udział w replikacji i naprawie DNA. Ponadto białko OsFEN-1 wykazuje 53,5 % podobieństwa w sekwencji aminokwasów z ludzkim FEN-1, 56,4% z FEN-1 z *Xenopus*, 50,3% z RAD 27 z *S. cerevisiae* i 52,3% z rad2 z *S. Pombe* [48].

Ponieważ badanie roślinnych odpowiedników nukleaz 5', może dostarczyć wiele informacji na temat mechanizmu współdziałania replikacji i naprawy DNA, zajęto się badaniem aktywności dwóch innych nukleaz roślinnych, dobrze scharakteryzowanych pod względem ich działania wobec RNA [49-61]. Są to nukleaza ChS — izolowana ze stromy chloroplastów pszenicy (*Triticum vulgare*) [54] oraz nukleaza Rn- izolowana z jąder komórkowych zarodków żyta (*Secale cereale*) [53]. Badając oba enzymy pod kątem ich aktywności wobec struktur typu flap, zaobserwowano, że nukleaza ChS wykazuje wysoką aktywność endonukleolityczną wobec 5' flap DNA, podczas gdy nukleaza Rn nie wykazuje takiej aktywności w stosowanych przez nas warunkach (Przykorska — dane niepublikowane). Nukleaza Rn wykazuje natomiast wyższą niż nukleaza ChS aktywność egzonukleazy 3'-5', wobec jednoniciowego segmentu w 3' flap DNA. Struktura ta proponowana jest jako forma pośrednia w naprawie przez rekombinację niehomologiczną (ang. *non-homologous end-joining*) [5].

Celem wyjaśnienia mechanizmu działania nukleazy ChS wobec 5' flap DNA, przygotowano substraty zawierające modyfikacje tej struktury.

Otrzymane rezultaty wykazują, że wprowadzone zmiany mogą obniżać badaną aktywność enzymu, co sugeruje, że mechanizm „przewlekania” jest możliwy. Przeciw takiej możliwości świadczy jednak fakt, że nukleazy ChS i Rn wykazują aktywność endonukleazową także wobec odcinka jednoniciowego, wypchniętego z dwuniciowej struktury DNA (ang. *bouge*), a więc wolny jednoniciowy koniec nie jest niezbędny dla działania enzymu.

Obie nukleazy: Rn i ChS są enzymami roślinnymi, specyficznymi wobec jednoniciowego RNA i DNA. Działają one jednak w różny sposób na badane struktury. Być może różnice w działaniu tych nukleaz wynikają z innej ich lokalizacji w komórce i związane są z innymi funkcjami obu enzymów. ChS izolowany jest bowiem z młodych chloroplastów liści pszenicy, a Rn z jąder komórkowych zarodków żyta.

## VII. Podsumowanie

Powyższa charakterystyka nukleaz 5' pozwala stwierdzić, że reakcję degradacji struktury 5' flap DNA, mogą przeprowadzać enzymy należące do różnych klas. Są to zwykle enzymy wielofunkcyjne, które oprócz zdolności do odcinania jednoniciowego odcinka w strukturze typu 5' flap DNA, pełnią też inne, niekiedy całkiem odmienne funkcje. Przykładem może tu być polimeraza I DNA z *Escherichia coli*, która w układach *in vitro* ma zdolność do rozpoczynania replikacji w miejscu pęknięcia, z dwuniciowych matryc zawierających koniec 3'-OH. *In vivo* enzym ten polimeryzuje krótkie fragmenty DNA np. w miejscach, gdzie zostały usunięte primery RNA lub odbudowuje fragmenty DNA, z których wcześniej zostały wycięte źle włączone zasady. Polimeraza ta posiada równocześnie aktywność egzonukleazy sprawdzającej 3'-5', korygując w ten sposób błędy powstające podczas polimeryzacji. Nukleaza 5' z faga T4 (T4 RNaza H) wykazuje dodatkowo aktywność egzonukleazy 5'-3' wobec hybrydowych cząsteczek RNA-DNA. Chloroplastowa nukleaza ChS jest enzymem specyficznym wobec jednoniciowych i wyeksponowanych na zewnątrz cząsteczek odcinków w RNA i DNA. Również w mitochondriach występują białka wykazujące homologię do FEN-1 np. DIN7 z *Saccharomyces cerevisiae*, który należy do rodziny białek XPG, biorących udział w naprawie i replikacji.

Dalsza dokładna analiza wyników badań z zastosowaniem mutacji oraz ko-krystalizacja enzymów z substratem DNA, powinna przybliżyć nam zrozu-

mienie mechanizmu działania tej fascynującej grupy enzymów.

Artykuł otrzymano 5 marca 2001 r.

Zaakceptowano do druku 8 listopada 2001 r.

## Piśmiennictwo

1. Murante RS, Henriksen LA, Bambara RA (1998) *Proc Natl Acad Sci* **95**: 2244-2249
2. Rumbaugh JA, Murante RS, Shi S, Bambara RA (1997) *J Biol Chem* **272**: 22591-22599
3. Wu X, Wilson TE, Lieber MR (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1303-1308
4. Pont-Kingdon G, Dawson RJ, Carroll D (1993) *EMBO J* **12**: 23-34
5. Roth BD, Wilson JH (1986) *Mol Cell Biol* **6**: 4295-4304
6. Kim K, Biade S, Matsumoto Y (1998) *J Biol Chem* **273**: 8842-8848
7. Klungland A, Lindahl T (1997) *The EMBO J* **16**: 3341-3348
8. Lee BI, Wilson DM 3rd (1999) *J Biol Chem* **274**: 37763-37769
9. Harrington JJ, Lieber MR (1994) *Genes Dev* **8**: 1344-1355
10. Harrington, JJ, Lieber MR (1994) *EMBO J* **13**: 1235-1246
11. Murante RS, Rust L, Bambara RA (1995) *J Biol Chem* **270**: 30377-30383
12. Lyamichev V, Brow MA, Dahlberg JE (1993) *Science* **260**: 778-783
13. Ceska TA, Sayers JR (1998) *Trends Biochem Sci* **23**: 331-336
14. Shen B, Qiu J, Hosfield D, Tainer JA (1998) *Trends Biochem Sci* **23**: 171-173
15. Harrington JJ, Lieber MR (1995) *J Biol Chem* **270**: 4503-4508
16. Wu X, Li J, Li X, Hsieh CL, Burgers PM, Lieber MR (1996) *Nucleic Acids Res* **24**: 2036-2043
17. Biswas EE, Zhu FX, Biswas SB (1997) *Biochemistry* **36**: 5955-5962
18. Fan XZ, Biswas EE, Biswas SB (1997) *Biochemistry* **36**: 5947-5954
19. Robins P, Pappin DJC, Wood RD, Lindahl T (1994) *J Biol Chem* **269**: 28535-28538
20. Garforth SJ, Sayers JR (1997) *Nucleic Acids Res* **25**: 3801-3807
21. Medha B, Hobss LJ, Nossal NG (1998) *J Biol Chem* **272**: 28523 — 28530
22. Rao HG, Rosenfeld A, Wetmur JG (1998) *J Bacteriol* **180**: 5406-5412
23. Hosfield DJ, Frank G, Weng Y, Tainer JA, Shen B (1998) *J Biol Chem* **273**: 27154-27161
24. Friedberg EC (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 347
25. Ceska TA, Sayers JR, Stier G, Suck D (1996) *Nature* **382**: 90-93
26. Mueser TC, Nossal NG, Hyde CC (1996) *Cell* **85**: 1101-1112
27. Hosfield DJ, Mol CD, Shen B, Tainer JA (1998) *Cell* **95**: 135-146
28. Sayers JR, Artymiuk PJ (1998) *Nature Struct Biol* **5**: 668-670
29. Bornarth CJ, Ranalli TA, Henriksen LA, Wahl AF, Bambara RA (1999) *Biochemistry* **38**: 13347-13354
30. Hwang KY, Baek K, Kim HY, Cho Y (1998) *Nat Struct Biol* **5**: 707-713
31. Hoeijmakers JHJ (1993) *Trends Genet* **9**: 173-177
32. Sancar A (1996) *Annu Rev Biochem* **65**: 43-81
33. Yoon JH, Swiderski PM, Kaplan BE, Takao M, Yasui A, Shen B, Pfeifer GP (1999) *Biochemistry* **33**: 4809-4817
34. Jonson RE, Gopala KK, Prakash L, Prakash S (1995) *Science* **269**: 238-240
35. Freudenreich CH, Kantrow SM, Zakinn V (1998) *Science* **279**: 853-856
36. Schweitzer JK, Livingston DM (1998) *Hum Mol Genet* **7**: 69-74
37. Huang L, Rumbaugh JA, Murante RS, Lin RJ, Rust L, Bambara RA (1996) *Biochemistry* **35**: 9266-9277
38. Funnell BE, Baker TA, Kornberg A (1986) *J Biol Chem* **261**: 5616-5624
39. Bambara RA, Huang L (1995) *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* **51**: 93-122
40. Bambara RA, Murante RS, Hendricksen LA (1997) *J Biol Chem* **272**: 4647-4650
41. Murante RS, Huang L, Turchi JJ, Bambara RA (1994) *J Biol Chem* **269**: 2 1191-1196
42. Rumbaugh, JA, Henriksen LA, DeMott MS, Bambara RA (1999) *J Biol Chem* **274**: 14602-14608
43. Barnes CJ, Wahl AF, Shen B, Park MS, Bambara RA (1996) *J Biol Chem* **271**: 29624-29631
44. Sommers CH, Miller EJ, Dujon B, Prakash S, Prakash L (1995) *J Biol Chem* **270**: 4193-4196
45. Habraken, Y, Sung, P, Prakash, L, Prakash S (1995) *J Biol Chem* **270**: 30194-30198
46. Kimura S, Kai M, Kobayashi H, Suzuki A, Morioka H, Otsuka E, Sakaguchi K (1997) *Nucleic Acids Res* **25**: 4970-4976
47. Stapleton AE, Thornber CS, Walbot V (1997) *Plant Cell Envir* **20**: 279-290
48. Kimura S, Ueda T, Hatanaka M, Tekenouchi M, Hashimoto J, Sakaguchi K (2000) *Plant Mol Biol* **42**: 415-427
49. Przykorska A (1995) *Biochimie* **77**: 109-112
50. Przykorska A, Adlouni CE, Keith G, Szarkowski JW, Dirheimer G (1992) *Nucleic Acids Res* **20**: 659-663
51. Przykorska A, Kuligowska E, Wagner E G H, Szarkowski JW, Nordström K (1989) *Phytochemistry* **28**: 1585-1588
52. Przykorska A, Nalaskowska M, Kuligowska E, Szarkowski JW, Barciszewski J (1991) *Phytochemistry* **30**: 1749-1752
53. Przykorska A, Szarkowski JW (1980) *Eur J Biochem* **108**: 285-293
54. Mońko M, Kuligowska E, Szarkowski JW (1994) *Phytochemistry* **37**: 301-305
55. El Adlouni C, Keith G, Dirheimer G, Szarkowski JW, Przykorska A (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 941-947
56. Gabryszuk J, Keith G, Mońko M, Kuligowska E, Dirheimer G, Szarkowski JW, Przykorska A (1995) *Nucleic Acids Symp Series* **33**: 115-119
57. Gabryszuk J, Przykorska A, Mońko M, Kuligowska E, Sturchler C, Krol A, Dirheimer G, Szarkowski JW, Keith G (1995) *Gene* **161**: 259-263
58. Maglott EJ, Deo SS, Przykorska A, Glick G (1998) *Biochemistry* **37**: 16349-16359
59. Perreau VM, Keith G, Holmes WM, Przykorska A, Santos MAS, Tuite M F (1999), *J Mol Biol* **293**: 1039-1053
60. Zehner ZE, Shepherd RK, Gabryszuk J, Fu TF, Al-Ali M, Holmes M (1997) *Nucleic Acids Res* **25**: 3362-3370
61. Gabryszuk J, Holmes MW (1997) *RNA* **3**: 1327-1336

# Kwercetyna: znaczenie w mutagenezie i karcynogenezie

## Quercetin: the significance in mutagenesis and carcinogenesis

ANDRZEJ TRZECIAK

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Wchłanianie i metabolizm kwercetyny
- III. Znaczenie kwercetyny w mutagenezie i karcynogenezie
  - III-1. Modulowanie metabolizmu ksenobiotyków
  - III-2. Właściwości antyoksydacyjne i prooksydacyjne kwercetyny
  - III-3. Oddziaływanie kwercetyny ze składnikami chromatyny i białkami naprawy DNA
  - III-4. Właściwości antyproliferacyjne i proapoptyczne kwercetyny
- IV. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** 2-AF — 2-aminofluoren; CDC2, kinaza — kinaza zależna od cyklin; *cis*-DDP — *cis*-diamminodichloroplatyna; CYP 1A1 — cytochrom P450 1A1; CYP 1A2 — cytochrom P450 1A2; CYP 2C8 — cytochrom P450 2C8; CYP 3A4 — cytochrom P450 3A4; DNA-PK — kinaza białkowa zależna od DNA, białko uczestniczące w naprawie DNA przez rekombinację niehomologiczną; DHPAA — kwas dihydroksyfenylooctowy; GST — S-transferaza glutationowa; LDL — frakcja lipoprotein o niskiej gęstości; MAP, kinazy — kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny; MeIQ — 2-amino-3,5-dimetylo[4,5-*f*]imidazolochinolina; MNNG — *N*-metylo-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidyna; p21<sup>CIP1/WAF1</sup> — białko kodowane przez gen *CIP1/WAF1*; PARP — polimeraza poliadenozynodifosforybozy; pHPAA — kwas *p*-hydroksyfenylooctowy; PKC — kinaza białkowa C; SGLT1 — białko transportujące glukozę napędzane gradientem stężeń Na<sup>+</sup>; Trp-P-2 — 3-amino-1-metylo-5H-pirydino[4,3-*b*]indol; XPA — białko związane z grupą komplementacyjną XPA syndromu *xeroderma pigmentosum*; UGT1A — transferaza urydynodifosfoglukuro-  
nowa.

### I. Wprowadzenie

Flawonoidy są związkami występującymi w dużych ilościach w roślinach i produktach roślinnych. W zależności od zwyczajów żywieniowych codziennie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Intake and metabolism of quercetin
- III. Significance of quercetin in mutagenesis and carcinogenesis
  - III-1. Modulation of xenobiotic metabolism
  - III-2. Antioxidative and pro-oxidative properties of quercetin
  - III-3. Interaction of quercetin with components of chromatin and DNA repair proteins
  - III-4. Antiproliferating and proapoptotic properties of quercetin
- IV. Concluding remarks

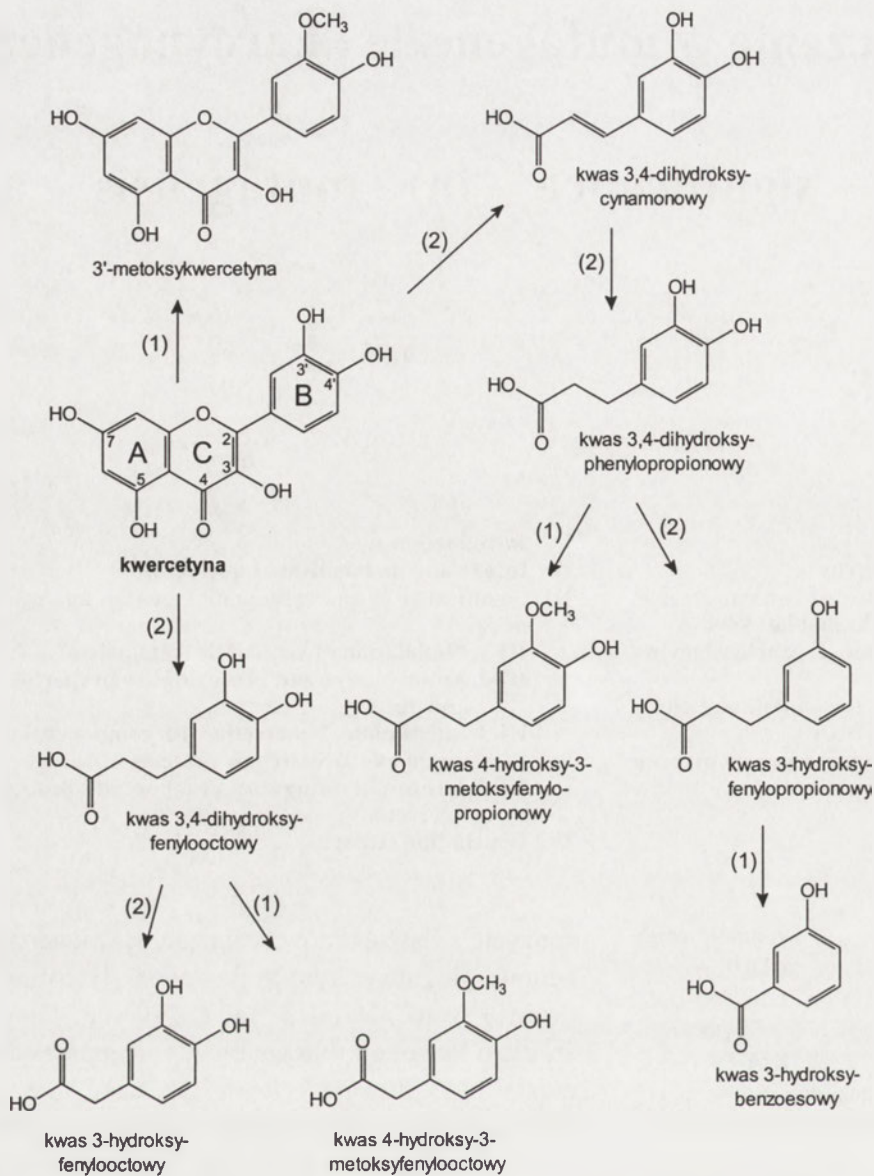
spożycie flawonoidów: flawonoli (kwercetyny, kempferolu, mirycetyny) i flawonów (luteoliny, apigeniny) waha się od 3 mg do 70 mg. Głównym źródłem flawonoli i flawonów w zależności od kraju może być herbata (Japonia), czerwone wino (Włochy) lub cebula i jabłka (Finlandia, Grecja, USA) [1, 2]. Kwercetyna (Ryc. 1) jest najbardziej rozpowszechnionym flawonoidem występującym w produktach spożywanych przez człowieka. Dzielne spożycie kwercetyny wynosi około 25 mg [3].

W pożywieniu kwercetyna występuje najczęściej w postaci  $\beta$ -glikozydów m.in. rutyny, kwercetryny i glukozydów kwercetyny, w których jest ona powiązana odpowiednio z rutynozą, ramnozą lub glukozą.

Dane epidemiologiczne wskazują, że kwercetyna i inne flawonoidy zmniejszają ryzyko wystąpienia choroby wieńcowej serca i udaru mózgu [2, 4-7]. Efekt ten może mieć związek z hamowaniem utleniania frakcji lipoprotein o niskiej gęstości, a w konsekwencji zmniejszaniem szybkości tworzenia płytek miażdżycowych. W szczególności kwercetyna jako silny antyoksydant może przeciwdziałać utlenianiu tej frakcji lipoprotein [8-10].

Kwercetyna może także wpływać na przebieg procesów nowotworzenia. W latach 70-tych wykazano, że związek ten działa mutagennie w układach bakteryjnych. Jednakże badania przeprowadzone na zwie-

<sup>1</sup>Dr; Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki; ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź; e-mail: antrzeciak@wp.pl



Ryc. 1. Przebieg metabolizmu kwercetyny w tkankach (1) i w świetle okężnicy (2). Nie uwzględniono reakcji sprzęgania z kwasami glukuronowym i siarkowym.

rzędach nie potwierdziły obaw, że może ona działać jako czynnik sprzyjający zmianom nowotworowym, co więcej badania te wskazują na właściwości anty-karcynogenne kwercetyny.

## II. Wchłanianie i metabolizm kwercetyny

Kwercetyna występująca w postaci aglikonu wchłaniana jest w całym jelicie, natomiast kwercetyna wchodząca w skład glikozydów — w jelicie cienkim [11, 12]. Glikozydy, które nie zostały przyswojone w jelicie cienkim dostają się do jelita grubego, gdzie są hydrolizowane przez  $\beta$ -glikozydazy wytwarzane przez florę bakteryjną; powstały w ten sposób aglikon ulega wchłonięciu przez śluzówkę jelita grubego.

Ilość przyswojonej kwercetyny oraz szybkość jej wchłaniania przez organizm człowieka może zależeć od postaci w jakiej występuje ona w pożywieniu. Stwierdzono, że po zjedzeniu porcji cebuli zawierającej 225  $\mu$ mol kwercetyny, głównie w postaci

glukozydów, maksymalne jej stężenie w osoczu (0,74  $\mu$ M) występowało już po godzinie od spożycia. W przypadku zjedzenia 331  $\mu$ mol kwercetyny wchodzącej w skład rutyny maksymalne stężenie kwercetyny (0,30  $\mu$ M) stwierdzono dopiero po blisko 10 godzinach [13]. Szybkość osiągnięcia maksymalnego stężenia kwercetyny w osoczu po spożyciu glukozydów kwercetyny wskazuje, że są one wchłanianie w jelicie cienkim, podczas gdy powolne wchłanianie rutyny wynika z jej znikomego przyswajania w tej części jelita.

Glikozydy kwercetyny są przyswajane w jelicie cienkim przez enterocyty za pośrednictwem białka SGLT1 — transportera glukozy zależnego od gradientu stężeń  $\text{Na}^+$  [11, 14]. Transporter ten nie transportuje jednak rutyny, chociaż jej obecność stwierdza się w osoczu [15]. Część glikozydów, które zostaną wchłonięte przez enterocyty ulega następnie hydrolizie. W cytosolu komórek błony śluzowej jelita stwierdzono występowanie  $\beta$ -glikozydazy, która hydrolizuje 4'-glukozyd kwercetyny [16].

Glikozydy kwercetyny mogą być także hydrolizowane w świetle jelita. W jelicie cienkim występuje  $\beta$ -glikozydaza: laktaza floryzynowa, która związana z błoną rąbka szczoteczki może hydrolizować m.in. 3-glukozyd kwercetyny oraz 4'-glukozyd kwercetyny z wytworzeniem aglikonu w pobliżu błony komórkowej enterocytów [17]. Dodatkowo w jelicie grubym kwercetyna powstaje w wyniku aktywności hydrolaz bakteryjnych. Kwercetyna może wnikać do komórek błony śluzowej na drodze dyfuzji biernej.

W komórkach nabłonka jelitowego kwercetyna jest sprzęgana z kwasem glukuronowym przez transferazę UDP-glukuronową; głównymi produktami tej reakcji są 3- i 7-glukuronid kwercetyny [14]. Z enterocytów do krwi transportowane są poza koniugatami kwercetyny również niewielkie ilości glikozydów kwercetyny oraz kwercetyny występującej w postaci wolnej [15, 18].

Metabolizm kwercetyny w wątrobie jest słabo poznany. Brak jest doniesień o przekształceniach tego związku katalizowanych przez enzymy I fazy metabolizmu ksenobiotyków. Białka II fazy metabolizmu ksenobiotyków przeprowadzają *O*-metylację kwercetyny oraz jej sprzęganie z kwasem glukuronowym i siarkowym. Produktami *O*-metylacji kwercetyny katalizowanej przez *O*-metylotransferazę katecholową są pochodne zawierające grupy metylowe w pozycjach 3' i 4' [19, 20]. Podczas sprzęgania kwercetyny z kwasem glukuronowym powstaje z kolei 3-, 7-, 4'- i 3'-glukuronian kwercetyny. Enzymy II fazy metabolizmu ksenobiotyków przekształcają zarówno aglikon, jak i glikozydy kwercetyny. Mogą one również przeprowadzać modyfikacje jednocześnie kilku różnych grup hydroksylowych kwercetyny [21, 22]. Metabolity kwercetyny powstające w wątrobie są wydalane z żółcią; część z nich jest z powrotem wchłaniana w jelicie.

W jelicie część kwercetyny ulega rozpadowi pod wpływem enzymów bakteryjnych i lekko alkalicznego środowiska. Enzymy bakteryjne powodują rozbięcie pierścienia pironowego kwercetyny (pierścienia C) z wytworzeniem kwasów fenyllooctowego i fenylpropionowego oraz innych pochodnych (Ryc. 1) [23]. W środowisku alkalicznym kwercetyna ulega chemicznej degradacji i utlenieniu [24]. Przy dużym spożyciu warzyw następuje wzrost pH treści pokarmowej w jelicie co może przyczyniać się do przyspieszonego rozpadu kwercetyny [25].

Przedstawione dane wskazują na to, że kwercetyna występuje w organizmie człowieka nie tylko w postaci aglikonu, ale również różnych glikozydów, koniugatów i produktów rozpadu. Każda z pochod-

nych kwercetyny może mieć odmienne działanie biologiczne. Produkty degradacji kwercetyny: kwas dihydroksyfenyllooctowy (DHPAA) i kwas *p*-hydroksyfenyllooctowy (pHPAA) hamują agregację płytek krwi w większym stopniu niż kwercetyna [26, 27]. W doświadczeniu mającym na celu porównanie aktywności biologicznej glikozydów: 3-glukozydu kwercetyny, 4'-glukozydu kwercetyny, 3,4'-diglukozydu kwercetyny i 3-rutynozydu kwercetyny oraz kwercetyny stwierdzono, że zablokowanie grupy 3-hydroksylowej kwercetyny powoduje utratę zdolności powstałej pochodnej tego związku do indukowania w mysich komórkach Hepalcl7 raka wątroby aktywności enzymu II fazy metabolizmu ksenobiotyków: reduktazy chinonowej, natomiast zablokowanie grupy 4'-hydroksylowej przyczynia się do zmniejszenia właściwości antyoksydacyjnych glikozydu w porównaniu z aglikonem [28]. Glukuroniany kwercetyny hamują aktywność oksydazy ksantynowej, przy czym stopień hamowania działania enzymu zależy od położenia grupy glukuronianowej w koniugacie kwercetyny [21]. Zatem przy badaniu aktywności biologicznej kwercetyny należy pod uwagę wziąć również jej metabolity.

### III. Znaczenie kwercetyny w mutageniezie i karcynogenezie

Zainteresowanie kwercetyną jako składnikiem występującym w żywności wzrosło po stwierdzeniu jej właściwości genotoksycznych i mutagennych w teście Ames oraz testach przeprowadzanych na komórkach ssaków [29-31]. Niektóre z długookresowych badań przeprowadzonych na gryzoniach dostarczyły również informacji o jej właściwościach karcynogennych; podawanie dużych ilości kwercetyny powodowało gruczolaki i gruczolakoraki kanałików nerkowych [32] oraz raki jelita i pęcherza moczowego szczurów [33]. Jednakże pomimo wyników doświadczeń wskazujących na zdolność kwercetyny do wywoływania mutacji i procesu nowotworzenia większość długookresowych badań przeprowadzonych na gryzoniach nie potwierdza tych właściwości [34].

Kwercetyna nie tylko charakteryzuje się brakiem właściwości mutagennych i karcynogennych, ale również może chronić przed skutkami działania pewnych mutagenów i karcynogenów. Zmniejsza ona mutagenny wpływ *N*-metylo-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidyny (MNNG) na DNA *Salmonella typhimurium* [35]. Podawanie zaś kwercetyny poprzedzające ekspozycję na takie karcynogeny jak 7,12-dimetylobenz[*a*]antracen i *N*-nitrozometylomocznik zmniejsza

sza częstość występowania nowotworów gruczołu piersiowego samic szczurów [36], a także występowania zmian nowotworowych w jelicie grubym myszy [37]. W pewnych przypadkach kwercetyna może wykazywać działanie kokarcynogenne; na przykład może ona potęgować działanie mutagenne amin heterocyklicznych w stosunku do wątroby myszy [38].

Modulowanie przez kwercetynę mutagennej i karcynogennej aktywności szeregu ksenobiotyków może być spowodowane przez zmiany aktywności enzymów I i II fazy metabolizmu ksenobiotyków, oddziaływanie z białkami naprawy DNA oraz z innymi białkami uczestniczącymi w metabolizmie DNA, a także właściwości antyproliferacyjne i proapoptyczne.

### III-1. Modulowanie metabolizmu ksenobiotyków

Kwercetyna zmniejsza aktywność cytochromu P450 1A1 (CYP 1A1) przekształcającego benz[*a*]piren do pochodnych diepoksydowych [39, 40], CYP 1A2 odpowiedzialnego za metabolizm leku przeciwnowotworowego dakarbozyny [41], CYP 2C8 przeprowadzającego konwersję leku przeciwnowotworowego paklitakselu do 6 $\alpha$ -hydroksypaklitakselu [42] oraz CYP 3A4 metabolizującego 17 $\beta$ -estradiol i metadon [43, 44]. Konsekwencją wpływu kwercetyny na aktywność cytochromów w przypadku benz[*a*]pirenu jest zmniejszona ilość adduktów DNA [39] oraz nowotworów skóry [45]. Mechanizm działania kwercetyny nie jest znany. W przypadku cytochromu P450 1A1 kwercetyna może zmniejszać ekspresję genu kodującego CYP 1A1 [39]. Może ona także oddziaływać z centrum aktywnym enzymu z uwagi na to, że kwercetyna jest produktem reakcji hydroksylacji flawonoidu kempferolu przeprowadzanej przez ten cytochrom [46].

Kwercetyna może również zwiększać tempo metabolizmu niektórych ksenobiotyków przez cytochromy. Dotyczy to ksenobiotyków takich jak aminy heterocykliczne: 2-amino-3,5-dimetylo[4,5-*f*]imidazolochinolina (MeIQ) i 3-amino-1-metylo-5H-pirydino[4,3-*b*]indol (Trp-P-2) [47] oraz trójcykliczne aminy aromatyczne: 2-aminofluoren (2-AF), aminoantracen i aminofenantren [48].

Kwercetyna wpływa także na aktywność enzymów II fazy metabolizmu ksenobiotyków. Kwercetyna powoduje wzrost aktywności transferazy UDP-glukuronowej UGT1A w ludzkich komórkach Caco-2 pochodzących z jelita grubego [49] i reduktazy chinonowej ludzkich komórek MCF-7 z raka piersi [50]. Kwercetyna jest inhibitorem niekompetycyjnym S-transferazy glutationowej (GST) wątroby

szczura [51, 52], której aktywność jest hamowana w mniejszym stopniu w porównaniu z aktywnością cytochromu P450 1A1 [39].

### III-2. Właściwości antyoksydacyjne i prooksydacyjne kwercetyny

Kwercetyna może wykazywać właściwości antyoksydacyjne i prooksydacyjne. Właściwości antyoksydacyjne kwercetyny związane są ze zdolnością do zmiatania wolnych rodników, hamowaniem aktywności oksydaz i działaniem przeciwzapalnym. Wykazano, że kwercetyna może oddziaływać z takimi rodnikami jak anionorodnik ponadtlenkowy (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), rodnik hydroksylowy (OH) [53], tlen singletowy (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) [54], rodnik nadtlenny (LOO<sup>•</sup>) [55], tlenek azotu (NO<sup>•</sup>) [56], czy też nadtlenoazotyn (ONOO<sup>-</sup>) [57]. Kwercetyna może również redukować rodnik  $\alpha$ -tokoferylowy do  $\alpha$ -tokoferolu w związku z tym, że ma niższy potencjał redoks niż  $\alpha$ -tokoferol [58]. Podczas reakcji z rodnikami kwercetyna jest dawcą atomu wodoru. Związek ten może być odtwarzany w wyniku redukcji rodnika kwercetyny przez witaminę C [59] i reduktazę semihydroaskorbinianową zależną od NAPH [60]. Właściwości antyoksydacyjne kwercetyny związane są z podstawieniem 3',4'-dihydroksylowym w pierścieniu B oraz kombinacji wiązania podwójnego C2-C3, grupy 3-hydroksylowej i 4-karbonylowej [28, 61].

Kwercetyna hamuje aktywność oksydaz, enzymów odpowiedzialnych za tworzenie i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kwercetyna jest inhibitorem kompetycyjnym oksydazy ksantynowej dzięki obecności grupy 7-hydroksylowej oraz inhibitorem niekompetycyjnym w związku z występowaniem podstawienia 3',4'-hydroksylowego w pierścieniu B [21, 61]. Może ona również wpływać na przekazywanie sygnału wewnątrzkomórkowego przez kinazy białkowe i w rezultacie hamować aktywność oksydazy NAPDH leukocytów [62].

Aktywność prooksydacyjną kwercetyny obserwuje się w obecności tlenu oraz jonów Fe<sup>3+</sup> i Cu<sup>2+</sup>. Kwercetyna może wiązać te metale przejściowe za pośrednictwem grup hydroksylowych pierścienia B, a także grup 3-hydroksylowej i 4-karbonylowej pierścienia C [63]. Kwercetyna charakteryzuje się także niskim potencjał oksydoredukcyjnym, który umożliwia jej redukcję Fe<sup>3+</sup> i Cu<sup>2+</sup>, a w konsekwencji tworzenie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH i <sup>1</sup>O<sub>2</sub> oraz uszkodzenia DNA i mutacje [64, 65]. Zastosowanie dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy zapobiega aktywności mutagennej kwercetyny w teście Ames [24].

Niewykluczone, że aktywność prooksydacyjna kwercetyny może odgrywać rolę w indukcji przez ten związek odpowiedzi adaptacyjnej limfocytów człowieka i komórek V79 chomika syryjskiego w stosunku do czynników generujących wolne rodniki takich jak mitomycyna C, bleomycyna i  $H_2O_2$  [66, 67].

### III-3. Oddziaływanie kwercetyny ze składnikami chromatyny i białkami naprawy DNA

Kwercetyna może oddziaływać z DNA i białkami uczestniczącymi w jego naprawie. Wykazano, że kwercetyna oddziałuje bezpośrednio z DNA i stabilizuje jego strukturę drugorzędową [68]. Wzrost oddziaływań pomiędzy kwercetyną i DNA obserwowany jest przy rosnącej sile jonowej środowiska [69]. Zdaniem niektórych autorów stabilizowanie struktury drugorzędowej DNA przez kwercetynę może być związane z jej zdolnością do interkalacji DNA [69, 70], jednakże wydaje się, że bardziej prawdopodobnym mechanizmem jest tworzenie kompleksów składających się z kwercetyny, kationów dwuwartościowych metali (wapnia, magnezu, żelaza, miedzi, manganu) i ujemnie naładowanego szkieletu fosfodiesterowego. Kompleksy takie utworzone w dużej ilości mogą utrudniać rozdzielenie się obu nici helisy DNA podczas jego denaturacji.

Kwercetyna może wpływać na szybkość naprawy uszkodzeń DNA. Może ona zmniejszać szybkość naprawy uszkodzeń DNA wywołanych przez promieniowanie jonizujące [71], MNNG [72] oraz *cis*-DDP [73]. Obserwowane zjawisko może być związane z hamowaniem polimeraz DNA [74], topoizomeraz DNA I i II typu [75, 76] oraz hamowaniem aktywności kinazowej jednostki katalitycznej kinazy białkowej zależnej od DNA (DNA-PK<sub>cs</sub>) [77]. W przypadku polimeraz DNA, DNA-PK i niektórych topoizomeraz wykazano, że kwercetyna jest inhibitorem kompetycyjnym współzawodniczącym z ATP o centrum aktywne enzymów.

Kwercetyna może hamować także białka naprawy DNA, aktywowane przez jony metali [72], takie jak  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$ . Jony te wchodziły w skład obszarów odpowiedzialnych w białkach za wiązanie się z DNA: domeny palca cynkowego białka XPA (uczestniczącego w naprawie DNA przez wycinanie nukleotydów) [78] oraz domeny zawierającej klaster  $[4Fe-4S]^{2+}$  białek NTHL1 (glikozylazy DNA usuwającej utlenione pirymidyny) i MYH (glikozylazy DNA usuwającej błędne parowania adeniny) [79]. Inne wiązane przez kwercetynę kationy metali:

$Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  [80] są aktywatorami niektórych białek naprawy DNA.

### III-4. Właściwości antyproliferacyjne i proapoptyczne kwercetyny

Kwercetyna hamuje podziały komórkowe różnych nowotworów człowieka: raka okrężnicy [81], raka piersi [82], białaczki [83]. Stwierdzono, że w komórkach eksponowanych na kwercetynę następuje zatrzymanie cyklu komórkowego w punktach kontrolnych G1/S [84, 85], G2/M [84, 86, 87]. Kwercetyna powoduje także apoptozę komórek, których cykl komórkowy został zatrzymany w punkcie kontrolnym G2/M [86, 87].

Antyproliferacyjne i proapoptyczne działanie kwercetyny może być związane z hamowaniem przez nią kinaz odgrywających rolę w przekazywaniu sygnału od błony komórkowej do cytoplazmy i do jądra oraz w regulacji cyklu komórkowego. Kwercetyna hamuje aktywność 4-kinazy fosfatydyloinozytolu i 5-kinazy fosfatydyloinozytolu [88], kinazy białkowej C (PKC), 3-kinazy fosfatydyloinozytolu [89, 90], kinaz białkowo-tyrozynowych receptorowych i niereceptorowych [91] oraz kinaz MAP [92, 93] i kinazy CDC2 [94]. Kwercetyna jest inhibitorem kompetycyjnym kinaz współzawodniczącym z ATP o ich centrum aktywne. Mechanizm hamowania przez kwercetynę aktywności kinaz oraz polimeraz DNA, topoizomeraz i integraz jest zatem podobny [90, 95]. Hamowanie wzrostu komórkowego spowodowane jest także zmniejszaniem przez kwercetynę aktywności polimeraz DNA i RNA [74, 96] oraz niektórych czynników elongacyjnych translacji [97]. Podczas ekspozycji komórek na kwercetynę następuje również podwyższenie komórkowego poziomu białka p53, ważnego białka biorącego udział w regulacji cyklu komórkowego, apoptozy i naprawy DNA [87].

W komórkach eksponowanych na kwercetynę zmniejszeniu ulega ekspresja szeregu genów kodujących białka niezbędne podczas proliferacji komórkowej takie jak: H-ras, K-ras, N-ras i c-myc [98-100], histon H4, cykliny A, B, D1 i kinazę CDC2 [83, 92, 94]. Zmniejszenie ekspresji białek związanych ze wzrostem i proliferacją komórek poddanych działaniu kwercetyny jest związane z hamowaniem aktywności kinaz fosfatydyloinozytolowych, kinazy białek C, kinaz białkowo-tyrozynowych i kinaz MAP oraz zwiększonym poziomem p53 w komórce. Podwyższony poziom białka p53 przyczynia się również do zwiększonej ekspresji takich czynników jak: p21<sup>CIP1/WAF1</sup> i 14-3-3 $\beta$ , odpowiedzialnych za zatrzy-

manie cyklu komórkowego w punktach kontrolnych G1/S i G2/M.

Poza hamowaniem proliferacji kwercetyna może powodować również apoptozę. W komórkach białaczkowych HL-60 obserwowano indukcję aktywności kaspazy 9 i stymulację trawienia proteolitycznego polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP). Ponadto kwercetyna może wywoływać utratę transbłonowego potencjału błony mitochondrialnej, zwiększenie produkcji reaktywnych form tlenu, uwolnienie cytochromu c z mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej do cytozolu i aktywację kaspazy 9 [101]. Proapoptyczny mechanizm działania kwercetyny może być zależny od p53; podwyższenie poziomu p53 w komórce przyczynia się do zwiększenia ekspresji genów kodujących białko Bax odpowiedzialne za uwalnianie cytochromu c do cytozolu oraz receptorów błonowych Fas i DR5 aktywujących kaspazy po związaniu się z nimi odpowiednich ligandów.

#### IV. Uwagi końcowe

Kwercetyna i inne flawonoidy występują w dużych ilościach w produktach pochodzenia roślinnego. Wyniki badań przeprowadzonych na zwierzętach oraz badań *in vitro* sugerują, że flawonoidy hamują rozwój nowotworów. Jednakże w badaniach epidemiologicznych przeprowadzonych na dużej grupie osób w 7 krajach nie stwierdzono korelacji pomiędzy spożyciem kwercetyny, kempferolu, mirycetyny, luteoliny, apigeniny a ogólną zapadalnością na nowotwory czy ryzykiem zachorowania na ich poszczególne rodzaje [1, 102, 103].

W badaniach epidemiologicznych oceniano spożycie flawonoidów na podstawie ich zawartości w produktach spożywczych. Stwierdzono m.in., że największe spożycie flawonoidów odnotowano w Japonii i głównym źródłem tych związków była tam herbata, natomiast najmniejsze spożycie było w Finlandii i ich najważniejszym źródłem była cebula i jabłka. Jednocześnie w przypadku kwercetyny wiadomo, że w różnych produktach występuje ona w postaci innych glikozydów różniących się między sobą szybkością absorpcji w jelitach: przykładowo rutynozyd kwercetyny występujący w herbacie jest wchłaniany 2,5 raza słabiej w porównaniu z glukozydami kwercetyny znajdującymi się w cebuli [7]. Zatem przy ocenie właściwości przeciwnowotworowych kwercetyny i innych flawonoidów powinno odnosić się zachorowalność na nowotwory nie w odniesieniu do spożycia tych związków, ale ilości, która jest absorbowana w jelitach.

#### Podziękowania

Praca wykonana przy wsparciu Komitetu Badań Naukowych grant nr 4 P05B 079 17.

Artykuł otrzymano 7maja 2001 r.

Zaakceptowano do druku 6 września 2001 r.

#### Piśmiennictwo

1. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen S, Simic BS, Toshima H, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB (1995) *Arch Intern Med* **155**: 381-386.
2. Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stamper MJ, Willet WC (1996) *Ann Intern Med* **125**: 384-389
3. US Department of Health and Human Service (US DHHS) (1992) *Toxicology and carcinogenesis studies of quercetin in F344 rats; National Toxicology Program Technical Report*. US DHHS, NIH publication No. 91-3140, Research Triangle Park, NC, USA.
4. Hertog MGL, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D (1997) *Am J Clin Nutr* **65**: 1489-1494
5. Hirvonen T, Pietinen P, Virtanen M, Ovaskainen ML, Hakkinen S, Albanes D, Virtamo J (2001) *Epidemiology* **12**: 62-67
6. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J (1996) *Br Med J* **312**: 478-481
7. Knekt P, Isotupa S, Rissanen H, Heliövaara M, Jarvinen R, Hakkinen S, Aromaa A, Reunanen A (2000) *Eur J Clin Nutr* **54**: 415-417
8. Doi K, Kojima T, Fujimoto Y (2000) *Biol Pharm Bull* **23**: 1066-1071
9. O'Reilly JD, Sanders TA, Wiseman H (2000) *Free Radic Res* **33**: 419-426
10. Zhang Z, Chang Q, Zhu M, Huang Y, Ho WK, Chen Z (2001) *J Nutr Biochem* **12**: 144-152.
11. Gee JM, Dupont MS, Rhodes MJC, Johnson IT (1998) *Free Radic Biol Med* **25**: 19-25
12. Walgren RA, Walle UK, Walle T (1998) *Biochem Pharmacol* **15**: 1721-1727
13. Hollman PCH, van Trijp JMP, Buysman MNCP, v.d. Gaag MS, Mengelers MJB, de Vries JHM, Katan MB (1997b) *FEBS Lett* **418**: 152-156
14. Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT (2000) *J Nutr* **130**: 2765-2771
15. Paganga G, Rice Evans CA (1997) *FEBS Lett* **401**: 78-82
16. Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJC, Morgan MRA, Williamson F (1998) *FEBS Lett* **436**: 71-75
17. Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MRA, Williamson G (2000) *FEBS Lett* **468**: 166-170
18. Ader P, Wessmann A, Wolfram S (2000) *Free Radic Biol Med* **28**: 1056-1067
19. Boulton DW, Walle K, Walle T (1998) *J Pharm Pharmacol* **50**: 243-249.
20. Manach C, Morand C, Demigne C, Texier O, Regeat F, Remesy C (1997) *FEBS Lett* **409**: 12-16
21. Day AJ, Bao Y, Morgan MR, Williamson G (2000) *Free Radic Biol Med* **29**: 1234-1243
22. Hollman PCH, Tijburg LBM, Yang CS (1997a) *Crit Rev Food Sci Nutr* **37**: 719-738
23. Hackett AM (1986) *Progr Clin Biol Res* **213**: 177-194
24. Hatcher JF, Bryan GT (1985) *Mutat Res* **148**: 13-23.
25. Graefe EU, Derendorf H, Veit M (1999) *Int J Clin Pharmacol Therapeutics* **37**: 219-233



26. Kim DH, Jung EA, Sohng IS, Han JA, Kim TH, Han MJ (1998) *Arch Pharmacol Res* **21**: 17-23
27. Kim DH, Kim SY, Park SY, Han MJ (1999) *Biol Pharm Bull* **22**: 749-751
28. Williamson G, Plumb GW, Uda Y, Price KR, Rhodes MJ (1996) *Carcinogenesis* **17**: 2385-2387.
29. Bjeldanes LF, Chang GW (1977) *Science* **197**: 577-578.
30. International Agency for Research on Cancer (IARC) (1983) Quercetin. W: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human*; Vol. 31: *Some food additives, feed additives and naturally occurring substances*. IARC, Lyon, Francja, str. 213-229
31. International Agency for Research on Cancer (IARC) (1999) Quercetin. W: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human*; Vol. 73: *Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances*. IARC, Lyon, Francja, str. 497-516
32. NIH (1992) *Toxicology and carcinogenesis studies of quercetin in F344 rats; National Toxicology Program Technical Report*, NTP TR 409. National Institutes of Health. NIH publication No. 93-147478, Research Triangle Park, NC, USA
33. Pamukcu AM, Yalciner S, Hatcher JF, Bryan GT (1980) *Cancer Res* **40**: 3468-3472.
34. Formica JV, Regelson W (1995) *Food Chem Toxicol* **33**: 1061-1080.
35. Francis AR, Shetty TK, Bhattacharya RK (1989) *Carcinogenesis* **10**: 1953-1955
36. Verma AK, Johnson JA, Gould MN, Tanner MA (1988) *Cancer Res* **48**: 5754-5758
37. Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark HL (1991) *Carcinogenesis* **12**: 1193-1196
38. Rowland I (1993) *Mutagenesis* **8**: 476
39. Kang ZC, Tsai SJ, Lee H (1999) *Nutr Cancer* **35**: 175-179
40. Machala M, Kubinova R, Horavova P, Suchy VV (2001) *Phytother Res* **15**: 114-118
41. Raid JM, Kuffel MJ, Miller JK, Rios R, Ames MM (1999) *Clin Cancer Res* **5**: 2192-2197
42. Desai PB, Duan JZ, Zhu YW, Kouzi S (1998) *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **23**: 417-424
43. Schubert W, Eriksson U, Edgar B, Cullberg G, Hedner T (1995) *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **20**: 219-224
44. Iribarne C, Berthou F, Baird S, Dreano Y, Picart D, Bail JP, Beaune P, Menez JF (1996) *Chem Res Toxicol* **9**: 365-373
45. Slaga TJ, Bracken WM, Viaje A, Berry DL, Fischer SM, Miller DR (1978) *J Natl Cancer Inst* **61**: 451-455
46. Silva ID, Rodrigues AS, Gaspar J, Maia R, Laires A, Rueff J (1997) *Mutagenesis* **12**: 383-390
47. Alldrick AJ, Lake BG, Rowland IR (1989) *Mutagenesis* **4**: 365-370
48. Ogawa S, Hirayama T, Fujioka Y, Ozasa S, Tokuda M, Hirai K, Fukui S (1987) *Mutat Res* **192**: 37-46
49. Galijatovic A, Walle UK, Walle T (2000) *Pharm Res* **17**: 21-26
50. Valerio LG, Kepa JK, Pickwell GV, Quattrochi LC (2001) *Toxicol Lett* **119**: 49-57
51. Merlos M, Sanchez RM, Camarasa J, Adzet T (1991) *Experientia* **47**: 616-619
52. Zhang K, Chew M, Yang EB, Wong KP, Mack P (2001) *Mol Pharmacol* **59**: 837-843
53. Suzuki Y, Ishihara M, Segami T, Ito M (1998) *Jpn J Pharmacol* **78**: 435-441
54. Marozienne A, Kliukiene R, Sarlauskas J, Cenas N (2000) *Cancer Lett* **157**: 39-44.
55. Dugas AJ Jr, Castaneda-Acosta J, Bonin GC, Price KL, Fischer NH, Winston GW (2000) *J Nat Prod* **63**: 327-331
56. Chan MM, Mattiacci JA, Hwang HS, Shah A, Fong D (2000) *Biochem Pharmacol* **60**: 1539-1548
57. Ketsawatsakul U, Whiteman M, Halliwell B (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **279**: 692-699
58. Rice-Evans C (1995) W: Rice-Evans C, Halliwell B, Lunt GG (red) *Free Radicals and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives*. Portland Press, London, Wielka Brytania, str. 103-116
59. Bors W, Michel C, Schikora S (1995) *Free Radic Biol Med* **19**: 45-52
60. Sakihama Y, Mano J, Sano S, Asada K, Yamasaki H (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **279**: 949-954
61. Cotelle N, Bernier J-L, Catteau J-P, Pommery J, Wallet J-C, Gaydou EM (1996) *Free Radic Biol Med* **20**: 35-43
62. Holland JA, O'Donnell RW, Chang MM, Johnson DK, Ziegler LM (2000) *Endothelium* **7**: 109-119
63. van Acker SABE, van den Berg D-J, Tromp MNJL, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJF, Bast A (1996) *Free Radic Biol Med* **20**: 331-342
64. Yamashita N, Tanemura H, Kawanishi S (1999) *Mutat Res* **425**: 107-115
65. Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Murakami K (1999) *Mol Genet Metab* **68**: 468-472
66. Oliveira NG, Rodrigues AS, Chaveca T, Rueff J (1997) *Mutagenesis* **12**: 457-462
67. Oliveira NG, Neves M, Rodrigues AS, Gil OM, Chaveca T, Rueff J (2000) *Mutagenesis* **15**: 77-83
68. Alvi NK, Rizvi RY, Hadi SM (1996) *Biosci Rep* **6**: 861-868
69. Ahmed MS, Ramesh V, Nagaraja V, Parish JH, Hadi SM (1994) *Mutagenesis* **9**: 193-197
70. Solimani R (1996) *Int J Biol Macromol* **18**: 287-295
71. van Rijn J, van den Berg J (1997) *Clin Cancer Res* **3**: 1775-1779
72. Błasiak J, Trzeciak A, Gąsiorowska A, Drzewoski J, Małeczka-Panas E (2001) *Plant Foods Human Nutr*, przyjęte do publikacji
73. Cross HJ, Tilby M, Chipman JK, Ferry DR, Gescher A (1996) *Int J Cancer* **66**: 404-408
74. Shinozuka K, Kikuchi Y, Nishino C, Mori A, Tawata S (1988) *Experientia* **44**: 882-885
75. Boege F, Straub T, Kehr A, Boesenberg C, Christiansen K, Andersen A, Jakob F, Kohrle J (1996) *J Biol Chem* **271**: 2262-2270
76. Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R (1995) *J Nat Prod* **58**: 217-225
77. Izzard RA, Jackson SP, Smith GC (1999) *Cancer Res* **59**: 2581-2586
78. Cleaver JE, States JC (1997) *Biochem J* **328**: 1-12.
79. Krokan HE, Standal R, Slupphaug G (1997) *Biochem J* **325**: 1-16
80. Kuo SM, Leavitt PS, Lin CP (1998) *Biol Trace Elem Res* **62**: 135-153
81. Ranelletti FO, Ricci R, Larocca LM, Maggiano N, Capelli A, Scambia G, Benedetti-Panici P, Mancuso S, Rumi C, Piantelli M (1992) *Int J Cancer* **50**: 486-492
82. Scambia G, Ranelletti FO, Benedetti Panici P, Piantelli M, Bonanno G, De Vincenzo R, Ferrandina G, Pierelli L, Capelli A, Mancuso S (1991) *Cancer Chemother Pharmacol* **28**: 255-258
83. Yoshida M, Yamamoto M, Nikaido T (1992) *Cancer Res* **52**, 6676-6681.
84. Rong Y, Yang EB, Zhang K, Mack P (2000) *Anticancer Res* **20**: 4339-4345.
85. Shen F, Herenyiova M, Weber G (1999) *Life Sci* **64**: 1869-1876.
86. De Vincenzo R, Ferlini C, Distefano M, Gaggini C, Riva A, Bombardelli E, Morazzoni P, Valenti P, Belluti F, Ranelletti FO, Mancuso S, Scambia G (2000) *Cancer Chemother Pharmacol* **46**: 305-312
87. Plaumann B, Fritsche M, Rimpler H, Brandner G, Hess RD (1996) *Oncogene* **13**: 1605-1614
88. Li W, Shen F, Weber G (1999) *Oncol Res* **11**: 243-247

89. Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, Baker J, Kerr DJ (1996) *Clin Cancer Res* **2**: 659-668
90. Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP, Williams RL (2000) *Mol Cell* **6**, 909-919
91. Casagrande F, Bacqueville D, Pillaire M-J, Malecaze F, Manenti S, Breton-Douillon M, Darbon J-M (1998) *FEBS Lett* **422**: 385-390
92. Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T (1998) *Hepatology* **27**: 1265-1274
93. Kimata M, Shichijo M, Miura T, Serizawa I, Inagaki N, Nagai H (2000) *Clin Exp Allergy* **30**: 501-508
94. Losiewicz MD, Carlson BA, Kaur G, Sausville EA, Worland PJ (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **201**: 589-595
95. Nakadate T, Jeng AY, Blumberg PM (1988) *Biochem Pharmacol* **37**: 1541-1545.
96. Nose K (1984) *Biochem Pharmacol* **33**: 3823-3827
97. Gałasiński W, Chlabicz J, Paszkiewicz-Gadek A, Marcinkiewicz C, Gindzieński A (1996) *Acta Pol Pharm* **53**: 311-318
98. Weber G, Shen F, Prajda N, Yang H, Li W, Yeh A, Csokay B, Olah E, Look KY (1997) *Adv Enzyme Regul* **37**: 35-55
99. Ranelletti FO, Maggiano N, Serra FG, Ricci R, Larocca LM, Lanza P, Scambia G, Fattorossi A, Capelli A, Piantelli M (2000) *Int J Cancer* **85**: 438-445
100. Segaert S, Courtois S, Garmyn M, Degreef H, Bouillon R (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **268**: 237-241
101. Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK (1999) *Eur J Cancer* **35**: 1517-1525
102. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout (1994) *Nutr Cancer* **22**: 175-184
103. Goldbohm RA, van den Brandt PA, Hertog MGL, Brants HAM, van Poppel G (1995) *Am J Epidemiol* **141**: S61

# Budowa i funkcje białka CD36

## Structure and functions of CD36

URSZULA KRALISZ

### Spis Treści

- I. Wstęp
- II. Występowanie CD36
- III. Zmiany ekspresji CD36
- IV. Porównanie CD36 pochodzących z różnych źródeł
- V. Budowa genu CD36
- VI. Budowa białka CD36
- VII. Rodzina białek CD36
- VIII. Funkcje CD36
  - VIII-1. Receptor trombospondyny
  - VIII-2. Receptor erytrocytów zakażonych pasożytem malarii *Plasmodium falciparum*
  - VIII-3. Udział CD36 w usuwaniu komórek apoptotycznych
  - VIII-4. Receptor utlenionych fosfolipidów o niskiej gęstości
  - VIII-5. Receptor długolącuchowych kwasów tłuszczowych
  - VIII-6. Receptor kolagenu
  - VIII-7. Udział CD36 w przewodzeniu sygnału
- IX. Znaczenie kliniczne CD36
- X. Podsumowanie

**Wykaz stosowanych skrótów:** GP — glikoproteina, CD — antygeny różnicowania leukocytów (ang. *cluster of differentiation*), TSP — trombospondyna, oxLDL — utlenione fosfolipidy o niskiej gęstości (ang. *oxidized low density lipoprotein*), HDL — lipoproteiny o wysokiej gęstości (ang. *high density lipoprotein*), FAT — transporter kwasów tłuszczowych (ang. *fatty acid transporter*), IRBC — zakażone erytrocyty (ang. *infected red blood cells*), SR-B1 — receptor zmiatający B1 (ang. *scavenger receptor B1*), HEL — komórki lini erytroleukemicznej (ang. *human erythroleukemic cell lines*), YAC — sztuczny chromosom drożdży (ang. *yeast artificial chromosome*), SNMP1 — białko błony neuronów czuciowych (ang. *sensory neuron membrane protein 1*), LIMPII — białko błony lizosomów (ang. *lysosomal integral membrane protein II*), emp — białko błony komórek nabłonkowych (ang. *epithelial membrane protein*), ICAM-1 — międzykomórkowe białko adhezyjne (ang. *intracellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 — białko adhezyjne komórek naczyńniowych-1 (ang. *vascular cell adhesion molecule-1*), ELAM-1 — białko adhezyjne komórek śródbłonna i leukocytów (ang. *endothelial-leukocyte adhesion molecule-1*), ARA — kwas arachidonowy, SLE — toczeń rumieniowaty

Dr nauk przyrodniczych; Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej Instytutu Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna w Łodzi. ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; E-mail: ulakr@yahoo.com

### Contents

- I. Introduction
- II. CD36 localization
- III. Changes in CD36 expression
- IV. Comparison of CD36 from different sources
- V. The structure of CD36 gene
- VI. The structure of CD36 protein
- VII. CD36 family of proteins
- VIII. Functions of CD36
  - VIII-1. Thrombospondin receptor
  - VIII-2. Receptor for malaria parasite, *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes
  - VIII-3. CD36 role in apoptotic cells clearance
  - VIII-4. Receptor for oxidized low density lipoproteins
  - VIII-5. Long chain fatty acids receptor
  - VIII-6. Collagen receptor
  - VIII-7. CD36 role in signal transduction
- IX. Clinical significance
- X. Concluding remarks

układowy (ang. *systemic lupus erythematosus*), ITP — plamica małopłytkowa idiopatyczna (ang. *idiopathic thrombocytopenic purpura*), HIT — małopłytkowość indukowana heparyną (ang. *heparin induced thrombocytopenia*), HITT — małopłytkowość indukowana heparyną z zakrzepami (ang. *heparin induced thrombocytopenia with thrombosis*), TTP — choroba Moschowitza, (ang. *thrombotic thrombocytopenic purpura*).

### I. Wstęp

Białko CD36 było początkowo opisane jako jedno z głównych białek błony plazmatycznej płytek krwi. Białko CD36 płytek krwi, znane też jako GPIV, GPIIb i GP88, charakteryzuje się dużą hydrofobowością, wysoką zawartością węglowodanów oraz wysoką opornością na działanie enzymów proteolitycznych min. trypsyny, chymotrypsyny i trombiny [1-4]. Badania późniejsze wykazały, że białko GPIV płytek krwi jest identyczne immunologicznie z antygenem CD36 leukocytów, który występuje w wielu komórkach i tkankach [5]. CD36 jest receptorem kolagenu, trombospondyny (TSP), fosfolipidów anionowych, utlenionych lipoprotein o niskiej gęstości (ang. *oxidised Low Density Lipoproteins*, oxLDL), erytrocytów zakażonych malarią (ang. *Infected Red*

*Blood Cells*, IRBC) i erytrocytów sierpowatych. CD36 bierze udział w rozpoznawaniu i fagocytozie apoptotycznych neutrofilii, fagocytozie zużytych części nabłonka siatkówki, „wybuchu” tlenowym monocytów i transportowaniu długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Jest białkiem przekaźnikowym i bierze udział w przesyłaniu informacji do wnętrza komórki. CD36 reaguje też z białkiem p37 aglutynującym płytki krwi wywołując agregację płytek. Długa lista ligandów wiążących się z CD36 spowodowała zaliczenie tego białka do grupy wielofunkcyjnych receptorów zmiatających klasy B1 (ang. *scavenger receptors-B1*, SR-B1). Ponadto, wskazuje ona na udział CD36 w adhezji i agregacji płytek krwi, oddziaływaniach płytek krwi z monocytami i płytek krwi z komórkami nowotworowymi, pochłanianiu apoptotycznych neutrofilii przez monocyty, adhezji komórek do macierzy, w tym adhezji erytrocytów sierpowatych i erytrocytów zakażonych pasożytem malarii do śródbłonka.

Celem tego artykułu jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy o białku CD36, a w szczególności o jego budowie, pełnionych funkcjach i znaczeniu klinicznym.

## II. Występowanie CD36

Badania immunologiczne wykazały obecność CD36 w błonach plazmatycznych wielu komórek hematopoetycznych, w tym płytek krwi, monocytów, makrofagów, granulocytów i erytrocytów. CD36 występuje również w komórkach śródbłonka naczyń włosowatych prawie wszystkich ludzkich tkanek (z wyjątkiem komórek śródbłonka błony podstawowej kłębków nerwowych), niektórych typach komórek nabłonka, komórkach tkanki tłuszczowej (adypocyty) i keratynocytach [1, 6, 7-12]. Na uwagę zasługuje fakt, że śródbłonek dużych naczyń krwionośnych nie zawiera CD36 [7, 13]. Obecność CD36 stwierdzono też w niektórych liniach komórek rakowych w tym min. w komórkach czerniaka, białaczki megakarioblastycznej (MEG-01) i komórkach erytroleukemicznych HEL (ang. *Human Erytroleukemic Cell Lines*) [14]. Wysoką zawartość CD36 stwierdzono w komórkach magazynujących triglicerydy min. w adypocytach oraz w komórkach nabłonka gruczołów mlecznych, komórkach śródbłonka naczyń kapilarnych tkanki tłuszczowej, mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego [15]. CD36 zostało wyizolowane z płytek krwi, komórek nabłonka gruczołu mlecznego, śródbłonka naczyń włosowatych mięśnia sercowego oraz komórek czerniaka C32. Najlepiej scharakteryzowane CD36 znajdują się w

płytkach krwi i komórkach nabłonka gruczołu mlecznego [1-4, 6, 9-10, 16-19, 20-24].

## III. Zmiany ekspresji CD36

Ekspresja CD36 na powierzchni błony plazmatycznej zwiększa się podczas różnicowania się promonocytów do monocytów oraz do makrofagów, promegakariocytów do płytek krwi i preadypocytów do adypocytów, ale zmniejsza się podczas powstawania erytrocytów [1, 25]. Ekspresja CD36 ulega zmianom w komórkach nabłonka gruczołu mlecznego. Mała zawartość CD36 znajduje się w gruczole nie wydzielającym mleka. W gruczole wydzielającym mleko syntezowane są duże ilości CD36, które znajdują się w rejonie apikalnym błony plazmatycznej komórek nabłonka, skąd CD36 dostaje się do błon otaczających krople triglicerydów w mleku [21]. Ekspresja CD36 jest specyficznie regulowana przez cytokiny i np. ekspresja CD36 monocytów zależy od czynnika stymulującego tworzenie koloni i od interleukiny 4, a ekspresja CD36 śródbłonka naczyń kapilarnych zależy od interferonu  $\gamma$  [1, 13, 25].

## IV. Porównanie CD36 pochodzących z różnych źródeł

Sekwencja aminokwasowa CD36 ludzi, wołu, myszy i szczura jest wysoce konserwatywna i podobieństwa wynoszą ok. 80-90 % [26]. W odróżnieniu od białka CD36 płytek ludzkich, które posiada 10 miejsc N-glikozylacji, CD36 nabłonka gruczołu mlecznego wołu posiada 8 miejsc N-glikozylacji [21]. CD36 komórek śródbłonka naczyń włosowatych serca wołu ma substytucję aminokwasu Asn $\rightarrow$ Asp w pozycji 3 w porównaniu z CD36 płytek krwi. CD36 śródbłonka serca wołu wykazuje również różnice funkcjonalne i immunologiczne w porównaniu z CD36 płytek ludzkich. CD36 serca i płytek krwi wołu nie wiążą erytrocytów zakażonych pasożytem malarii *Plasmodium falciparum*. Przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko CD36 płytek ludzkich rozpoznają CD36 serca wołu, ale przeciwciała monoklonalne 8A6, OKM5 i OKM8 nie reagują z CD36 serca wołu, wskazując na obecność epitopów specyficznych dla CD36 płytek ludzkich [24]. Na uwagę zasługuje fakt, że komórki śródbłonka naczyń włosowatych płuc i mózgu wołu nie posiadają CD36, podczas gdy występuje ono w ludzkim śródbłonku płuc i mózgu [21, 7].

CD36 komórek czerniaka i płytek krwi ludzkich ma masę cząsteczkową 88 kDa, erytroblastów i

nabłonka gruczołu mlecznego wołu 78 kDa, nabłonka gruczołu mlecznego ludzi 80 kDa, śródbłonka naczyń włosowatych mięśnia sercowego wołu 85 kDa, a monocytów ludzkich 94 kDa [6, 21, 23-24]. Różnice mas cząsteczkowych wynikają najprawdopodobniej z różnic w potranslacyjnych modyfikacjach CD36, w tym głównie z różnej zawartości cukrowców. Świadczy o tym fakt, że po deglikozylacji endoglikozydazą F CD36 nabłonka gruczołu mlecznego ludzi i wołu, śródbłonka wołu i płytek ludzkich otrzymano białko o tej samej masie cząsteczkowej wynoszącej 57 kDa [23].

## V. Budowa genu CD36

Gen dla CD36 zlokalizowano na chromosomie 7q11.2 [27]. Oquendo i wsp. [28] wyizolowali po

preparatów [29]. Sekwencja płytkowego cDNA była również niemal całkowicie zgodna z sekwencją podaną przez Oquendo i wsp. [30]. Całkowita organizacja genu ludzkiego dla CD36 została podana przez Armesilla i wsp. [31]. Do badań strukturalnej organizacji genu CD36 badacze ci stosowali cDNA otrzymane z mRNA komórek czerniaka. Gen CD36 izolowali też z biblioteki ludzkich genów sztucznego chromosomu drożdży YAC-37 (ang. *Yeast Artificial Chromosome*). Istnieje pojedyncza kopia genu CD36 w genomie ludzkim. Gen CD36 składa się z 15 eksonów, a jego wielkość wynosi 32 tysiące par zasad. Eksony kodują różną ilość aminokwasów, najwięcej aminokwasów (62) koduje ekson 10, a najmniej (15) ekson VIII. Charakterystyka eksonów oraz intronów genu CD36 podana jest w tabeli 1. Eksony I, II i XV

**Tabela 1**

Eksony ludzkiego genu CD36

Numer eksonu	Długość eksonu	Nukleotydy cDNA	Kodowane aminokwasy	Ilość aminokwasów
I	106	1-106		
II	94	107-200		
III	209	201-409	1-40	40
IV	161	410-570	41-94	54
V	148	571-718	95-143	49
VI	180	719-898	144-203	60
VII	92	899-990	204-234	32
VIII	47	991-1037	235-249	15
IX	70	1038-1107	250-273	24
X	188	1108-1295	274-335	62
XI	119	1296-1414	336-375	40
XII	74	1415-1488	376-400	25
XIII	55	1489-1543	401-418	18
XIV	434	1544-1977	419-472	54
XV	624	1709-2333		

raz pierwszy cDNA dla CD36 z biblioteki DNA człowieka otrzymanej z łożyska i zbadali jego sekwencję. Na podstawie uzyskanej sekwencji wyliczyli masę cząsteczkową polipeptydu, która wynosiła 53 kDa i zlokalizowali dwa transbłonowe obszary, znajdujące się blisko N- i C- końców cząsteczki. Wyler i wsp. porównali cDNA CD36 płytek krwi, monocytów, komórek śródbłonka i komórek HEL. Wykazali oni niemal prawie całkowitą zgodność sekwencji wyizolowanych

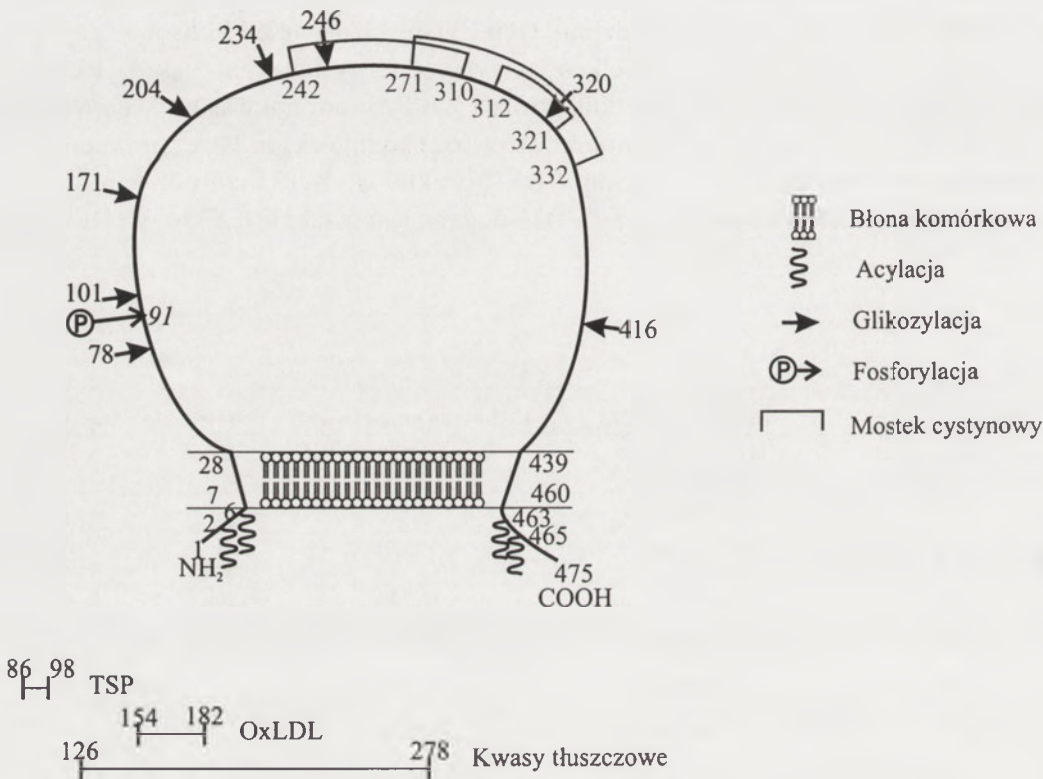
są niekodujące, ekson III koduje N-koniec oraz odcinek transbłonowy N-końca, eksony IV-XIII kodują domenę zewnątrzkomórkową, a ekson XIV koduje C- koniec cząsteczki, odcinek transbłonowy C-końca cząsteczki oraz niewielką część domeny zewnątrzkomórkowej od C-końca. Na uwagę zasługuje fakt, że aż jedenaście eksonów (eksony IV do XIII oraz część XIV) koduje domenę zewnątrzkomórkową, co może być konsekwencją wielorodności funkcji, w których ta domena bierze udział.

Armesilla i wsp.[31] zidentyfikowali też miejsce inicjacji transkrypcji genu CD36. Inicjacja transkrypcji rozpoczyna się od pojedynczego miejsca położonego 389 nukleotydów „w górę” od kodonu ATG rozpoczynającego translację, co jest zgodne z lokalizacją powszechnie występującego boksu TATA w pozycji 28 nukleotydów „w górę” od miejsca inicjacji transkrypcji. Gen CD36 zawiera 11 miejsc składowania (*splicing sites*) występujących po-

dyny, które również odgrywają funkcje regulatorowe.

## VI. Budowa białka CD36

Model budowy CD36 wydedukowano w oparciu o analizę sekwencji genu dla tego białka. Białko CD36 posiada dwie domeny transbłonowe (pozycje aminokwasowe 7–34 oraz 440–466), dwa krótkie



Ryc. 1. Schemat budowy białka CD36. Na schemacie zaznaczone są miejsca glikozylacji, fosforylacji, mostki cystynowe oraz regiony odpowiedzialne za wiązanie TSP, oxLDL oraz kwasów tłuszczowych (wg. [1, 35], zmodyfikowano).

między eksonami IX i XV. Wszystkie sekwencje akceptorowe i donorowe biorące udział w składaniu podlegają powszechnie występującym regułom składowania. Różnorodność faz intronów (46% znajduje się w fazie 0, 18% w fazie 1, 36% w fazie 2) ogranicza ilość cząsteczek mRNA, które mogą powstać w wyniku delekcji eksonu i pozwala na utrzymanie takiej samej ramki odczytu.

Regulacja transkrypcji genu CD36 jest słabo poznana. Analiza promotora genu dostarczyła informacji o szeregu elementach *cis*-regulatorowych. W różnicujących się komórkach B transkrypcja zależy m.in. od czynnika *Oct-2* [32]. Badając region bliski promotora, poza boksami TATA i CAAT, które występowały w odpowiednich pozycjach w odniesieniu do miejsca startu transkrypcji, znaleziono miejsca wiążące następujące czynniki regulujące: *NF-1*, *AP-2*, *AP-3*, *NF-kB/rel*, *PEA-3*, *CK-1*, *CK-2* oraz kilka obszarów bogatych w puryny i pirymi-

odcinki cytoplazmatyczne przy N- i C-końcach (pozycje 1-6 i 647-472) oraz dużą domenę zewnątrzkomórkową (pozycje 35-439) [28, 31, 33] (pozycje aminokwasowe są podane dla białka ludzkiego). N-terminalna metionina jest odczepiona potranslacyjnie pozostawiając dojrzałe białko z nieodczepionym peptydem sygnałowym. C-koniec cząsteczki CD36 zawiera krótki peptyd „*stop transfer*”. Palmitylacja cystein w pozycji 3, 7, 464 i 466 przyczynia się do hydrofobowego charakteru regionów transbłonowych i ich powiązania z błoną plazmatyczną [25, 34]. CD36 posiada 10 potencjalnych miejsc N-glikozylacji, z czego 8 znajduje się w N-terminalnej części cząsteczki [1, 25]. W zewnątrzkomórkowej części cząsteczki, od strony C-terminalnej, znajduje się region bogaty w reszty prolinowe i cysteinowe. W obrębie tego regionu znajduje się odcinek hydrofobowy (aminokwasy 184-204), który najprawdopodobniej tworzy kieszeń

hydrofobową [1, 2, 25]. Sześć reszt cysteinowych, obecnych w części zewnątrzkomórkowej, znajduje się w pozycjach 243, 272, 311, 313, 322 i 333. Udział zewnątrzkomórkowych cystein w tworzeniu mostków disiarczkowych został poznany dla CD36 komórek nabłonka gruczołu mlecznego wołu [35]. Mostki cystynowe występowały pomiędzy cysteinami 242-310, 271-332, 312-321, a więc w ułożeniach typu 1-3, 2-6 i 4-5. Rycina 1 przedstawia schemat budowy CD36 nabłonka gruczołów mlecznych wołu, które podobnie jak CD36 płytek krwi człowieka, zawiera dwa odcinki wewnątrzkomórkowe, ale znajdujące się w nieco innych pozycjach niż w CD36 ludzkim (aminokwasy 1-6 oraz 461-471), dwie domeny transbłonowe (7-28, 439-460) oraz duży odcinek zewnątrzkomórkowy (29-438) z ośmioma miejscami N-glikozylacji i trzema mostkami disiarczkowymi [21, 35].

## VII. Rodzina białek CD36

W ostatnich czterech latach wykryto kilka białek podobnych do CD36 i zaliczono je do rodziny CD36 [33, 36-38]. Do białek tych należą:

1. białko błony lizosomów LIMPII (ang. *lysosomal integral membrane protein II*)
2. Cla-1 (CD36/LIMPII *analogous-1*) znane też jako SR-B1 (ang. *scavenger receptor B1*)
3. białko błony neuronów czuciowych *Antheraca polyphemus* SNMP1 (ang. *sensory neuron membrane protein1*)
4. *croquemort* (białko muszki *Drosophila*)
5. białko błony komórek nabłonkowych muszki *Drosophila* emp (ang. *epithelial membrane protein*)
6. białko nicienia *Caenorhabditis elegans*.

Podobieństwa tych białek polegają min. na podobieństwie struktury I rzędowej, obecności N- i C-końca cząsteczki w części wewnątrzkomórkowej, występowaniu dużego obszaru zewnątrzkomórkowego o dużej homologii do CD36 i wysokiej konserwatywności dla miejsc cysteinowych. Trzy pary reszt cystynowych znajdujące się w wysoce konserwatywnej, zewnątrzkomórkowej części CD36, uczestniczą w tworzeniu multimerów. Multimeryzacja CD36 umożliwia magazynowanie tego białka w ściśle określonych obszarach wewnątrzkomórkowych lub mikrodomenach błony plazmatycznej [7-8, 18-19]. Podobieństwa polegają również na obecności reszt asparaginowych jako miejsc glikozylacji, występowaniu w N-terminalnej części peptydu sygnałowego, a w C-końcu peptydu „stop transfer” oraz dużej hydrofobowości cząsteczki [33]. Białka te pełnią również podobne

funkcje do CD36, w tym np. LIMPII jest receptorem trombospondyny, SR-B1 i *croquemort* są recepto-rami fosfolipidów anionowych, HDL, oraz biorą udział w usuwaniu komórek apoptotycznych [25, 39].

Białka rodziny CD36 występują w błonie plazmatycznej komórek. Wyjątkiem jest LIMPII, które występuje w błonie lizosomalnej [40]. W niektórych komórkach np. w płytkach krwi aktywowanych trombiną LIMPII ulega ekspresji na powierzchni błony plazmatycznej i wiąże się, tak jak CD36, z sekwencją CSVTCG występującą w TSP. W błonie plazmatycznej zaktywowanej płytki stwierdzono obecność ok. 20 000-60 000 miejsc wiążących TSP. Ponieważ ilość cząsteczek LIMPII obecnych w zaaktywowanych płytkach wynosi tylko 1 500, można przypuszczać, że cząsteczki LIMPII są odpowiedzialne za wiązanie niewielkiej frakcji TSP.

Porównanie sekwencji rejonu wiążącego TSP niektórych białek rodziny CD36 pozwoliło na znalezienie trzech wysoce konserwatywnych motywów sekwencyjnych. Jeden z tych motywów o sekwencji GPYTYR jest powszechnie występującym motywem fosforylowanym przez białkową kinazę C. Motyw ten nazwano CLESH (CD36, LIMPII, emp, SR-B1) motywem homologii I. Motyw ten ma funkcję regulacyjną w wiązaniu TSP i jest wskaźnikiem potencjalnej możliwości oddziaływania białka z TSP [39].

## VIII. Funkcje CD36

### VIII-1. Receptor trombospondyny

Białko CD36 zostało zidentyfikowane początkowo jako receptor TSP na podstawie doświadczeń, w których przeciwciała monoklonalne OKM5, skierowane przeciwko CD36, hamowały wiązanie TSP z płytkami krwi i niektórymi komórkami rakowymi [41]. Badania późniejsze, w których wykazano wiązanie TSP z komórkami posiadającymi CD36, liposomami z wbudowanym CD36 oraz izolowanym CD36, potwierdziły funkcje CD36 jako receptora TSP [1, 22, 42]. Leung i wsp. [43] opracowali dwuetapowy model oddziaływania CD36 z TSP. TSP początkowo wiąże się z CD36 w regionie 139-155, który jest regionem regulatorem. Związanie się TSP z tym regionem prowadzi do zmiany konformacyjnej w cząsteczce TSP, która eksponuje nowe miejsce wiązania w TSP, o wysokim powinowactwie do CD36, wiążące się z obszarem 93-110 w CD36. Frieda i wsp. [44], stosując białka fuzyjne o sekwencjach pokrywających się z

sekwencjami całej cząsteczki CD36, potwierdzili występowanie miejsca wiązania TSP w regionie 93-110. Motyw CSVTCG miejsca TSP o dużym powinowactwie do CD36 jest odpowiedzialny za wiązanie z regionem 93-110 [45].

Cechą charakterystyczną oddziaływań, w których bierze udział CD36, jest modulowanie specyficzności substratowej. Selektywność CD36 w kierunku TSP i kolagenu kontrolowana jest przez potranslacyjne reakcje fosforylacji i defosforylacji Thr w pozycji 92. W reakcjach tych bierze udział zależna od c-AMP ektokinaza A [46, 47].

### VIII-2. Receptor erytrocytów zakażonych pasożytem malarii *Plasmodium falciparum*

Infekcja pasożytem malarii charakteryzuje się adhezją erytrocytów zawierających dojrzałe formy pasożyta do komórek śródbłonka naczyń krwionośnych niektórych narządów, w tym płuc i mózgu [48]. Adhezja jest tak skuteczna, że uniemożliwia usuwanie IRBC w śledzionie, pozwala na dalszy rozwój pasożyta i przyczynia się do letalnej formy malarii, w której następuje zczopowanie naczyń krwionośnych mózgu [49]. Adhezja IRBC jest wywoływana przez charakterystyczne wypustki (ang. *knobs*), które ukazują się na powierzchni erytrocytów, gdy pasożyt osiąga etap późnego trofozoitu lub wczesnego schizonta i utrzymują się na powierzchni erytrocytów aż do uwolnienia z niego dojrzałego merozoitu [48]. Wiele niebezpośrednich dowodów wskazywało, iż CD36 jest receptorem IRBC, w tym hamowanie przez przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko CD36 (OKM5, NL07) adhezji IRBC do komórek śródbłonka, czerniaka C32 oraz monocytów [50, 51]. Sugerowano, że TSP pośredniczy w oddziaływaniu IRBC z CD36, ale liczne prace wykazały bezpośredni udział CD36 w tych oddziaływaniach, w tym m.in. wykazano, że IRBC wiążą się do izolowanego CD36 oraz do komórek COS-7 transfekowanych cDNA dla CD36 [52, 53]. Zastosowanie polipeptydów rekombinantowych oraz przeciwciał monoklonalnych, skierowanych przeciwko różnym regionom CD36, pozwoliło na znalezienie dwóch domen pomiędzy aminokwasami 97-110 oraz 155-183, wiążących IRBC [46, 54]. Analiza adhezji IRBC do komórek śródbłonka, badana podczas przepływu, wykazała, że ICAM-1 bierze udział w początkowym zwolnieniu przepływu erytrocytów, a CD36 jest odpowiedzialne za całkowite ich zatrzymanie i wytworzenie z nimi mocnych wiązań [55]. Sugeruje się, że sekwestryna występująca na powierzchni erytrocytów zakażonych doj-

rzałymi formami *Plasmodium falciparum* jest odpowiedzialna za łączenie się z CD36 [1]. Ponadto, sugeruje się, że białko PfEMP1, kodowane przez dużą rodzinę genów *var Plasmodium falciparum*, pełni funkcję receptora CD36 i ICAM-1 [1, 56-57]. Należy dodać, że w oddziaływaniu zakażonych erytrocytów ze śródbłonkiem biorą również udział białka ELAM-1, VCAM-1 oraz TSP [1, 2, 25, 55].

### VIII-3. Udział CD36 w usuwaniu komórek apoptotycznych

Badania z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych przeciwko CD36 dostarczyły pośrednich dowodów udziału CD36 makrofagów w fagocytozie apoptotycznych neutrofilii i limfocytów. Badania te wykazały również, że CD36 współdziała z receptorem witronektyny  $\alpha_v\beta_3$  makrofagów w wiązaniu TSP, która z kolei wiąże się z komórkami apoptotycznymi [58-60]. Bezpośrednich dowodów udziału CD36 w usuwaniu komórek apoptotycznych dostarczył Ren i wsp. [61], którzy transfekowali, stosując cDNA dla CD36, komórki czerniaka Bowesa i komórki COS-7, mające na swojej powierzchni receptor  $\alpha_v\beta_3$ . Transfekcja komórek czerniaka wywołała zwiększenie usuwania apoptotycznych neutrofilii, limfocytów i fibroblastów, a komórkom COS-7 nadała zdolność *de novo* usuwania apoptotycznych komórek. Stosując serię mutantów CD36 oraz różne przeciwciała przeciwko CD36 wykazano, że domena CD36 odpowiedzialna za rozpoznanie i usuwanie komórek apoptotycznych rozciąga się od aminokwasu 155 do 183 [62]. Makrofagi otrzewnowe nie posiadają na swojej powierzchni receptora  $\alpha_v\beta_3$ . Jednym z mechanizmów służącym makrofagom do rozpoznawania i usuwania komórek apoptotycznych jest wiązanie się z fosfolipidami anionowymi, głównie fosfatydyloseryną, występującą na powierzchni komórek apoptotycznych. CD36 oraz SR-B1 mogą również w tym uczestniczyć, gdyż są one receptorami fosfolipidów anionowych [63-65].

### VIII-4. Receptor utlenionych fosfolipidów o niskiej gęstości

LDL są utleniane przez reaktywne metabolity tlenu, wytwarzane przez monocyty i neutrofile, w odpowiedzi m.in. na uszkodzenia naczyń krwionośnych. CD36 makrofagów bierze udział w rozpoznawaniu i internalizacji ox-LDL. Stosując serię białek rekombinantowych o sekwencjach pokrywających prawie całą cząsteczkę CD36 Frieda i wsp. [66] wykazali, że domena wiążąca ox-LDL w CD36 rozciąga się od



aminokwasu 28 do 93. Z kolei P u e n t e N a v a z o i wsp. [67] stosując przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko CD36 oraz serię mutantów CD36 wykazali, że domena wiążąca ox-LDL znajduje się też pomiędzy aminokwasami 155-183, a więc jest identyczna z domeną wiążącą komórki apoptotyczne. Wiązanie i pobieranie ox-LDL było obniżone o 40% w makrofagach z brakiem CD36, w porównaniu z makrofagami wykazującymi normalny poziom CD36, wskazując, że CD36 jest ważnym, ale nie jedynym receptorem ox-LDL [68]. Innymi białkami biorącymi udział w pobieraniu i degradacji ox-LDL mogą być SR-B1 oraz białko o masie cząsteczkowej 94-97kDa [69].

Ox-LDL są źródłem lipidów kumulujących się w złogach miażdżycowych i wywierających patogenny wpływ na wiele komórek, w tym na monocyty, płytki krwi czy komórki śródbłonka [66]. Ox-LDL, w odróżnieniu od LDL, aktywują płytki krwi, powodując zwiększanie istniejących agregatów płytkowych, co może przyczyniać się do rozwoju miażdżycy i zakrzepów [66, 70].

Pobieranie oraz degradacja ox-LDL przez makrofagi jest jednym z kluczowych zjawisk przyczyniającym się do powstawania i rozwoju miażdżycy. CD36 bierze aktywny udział w internalizacji i degradacji ox-LDL oraz w tworzeniu komórek piankowych, tak więc wywiera efekt promiażdżycowy. Wykazano, że CD36 jest też receptorem HDL, co może oznaczać wywieranie efektu antymiażdżycowego. W chwili obecnej nie jest jasne, który z tych efektów przeważa. Przeprowadzenie badań nad podatnością myszy pozbawionych genu (ang. *knock-out*) CD36 na miażdżycę indukowaną dietą bogatą w cholesterol, może przyczynić się do rozwiązania tego problemu.

#### VIII-5. Receptor długołańcuchowych kwasów tłuszczowych

Wysoki poziom ekspresji CD36 w komórkach biorących udział w magazynowaniu i metabolizmie kwasów tłuszczowych (śródbłonki naczyń włosowatych tkanki tłuszczowej, mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego) wskazywał na udział CD36 w tych procesach [15]. Nie stwierdzono obecności CD36 w mózgu, co jest zgodne z niewykorzystywaniem przez komórki mózgowe kwasów tłuszczowych jako źródła energii. Ekspresja CD36 była też kilkukrotnie zwiększona w śródbłonku serca myszy NOD (ang. *nonbese diabetic*) mających zwiększoną zawartość triglicerydów w plazmie. Ponadto, ekspresja CD36 była również podwyższona w śródbłonku serca my-

szy żywionych dietą bogatą w tłuszcze, w porównaniu z myszami żywionymi dietą ubogą w tłuszcze [15]. Fakt, że pobieranie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych przez mięsień sercowy jest znacznie obniżone lub całkowicie nieobecne u osób z bardzo rzadko występującym niedoborem CD36 typu I (niedobór CD36 w płytkach krwi i monocytach), również świadczy o udziale CD36 w tym procesie [71]. Sugeruje się, że niedobór CD36 może być przyczyną dziedzicznej kardiomiopatii hipertroficzej, gdzie obserwuje się min. obniżone pobieranie i metabolizm kwasów tłuszczowych przez mięsień sercowy [72]. Ponadto, wykazano, że osoby z niedoborem CD36 typu I mają zwiększone pobieranie glukozy przez mięsień sercowy, co oznacza, że wyrównuje on straty energetyczne z powodu obniżenia transportu kwasów tłuszczowych przez zwiększone zużycie glukozy [73]. Miejsce wiązania kwasów tłuszczowych w CD36, które w adypocytach szczura nazywa się FAT (ang. *Fatty Acid Transporter*), zostało zlokalizowane w domenie od aminokwasu 126 do 278 [74]. Asocjacje oraz koekspresję CD36 z białkiem wiążącym kwasy tłuszczowe obserwowano w komórkach nabłonka gruczołu mlecznego, co może oznaczać, że CD36 wiąże kwasy tłuszczowe i transportuje je przez błonę, a białko wiążące kwasy tłuszczowe transportuje je dalej wewnątrz komórki [75].

Płytki krwi ludzkiej w obecności przeciwciał skierowanych przeciwko CD36 wykazywały obniżone wiązanie kwasu arachidonowego (ARA) oraz obniżoną agregację indukowaną ARA [76]. Ponieważ płytki osób z niedoborem CD36 nie wykazywały obniżonej agregacji indukowanej ARA, przypuszcza się, że w płytkach krwi, tak jak w innych komórkach, występują inne receptory odpowiedzialne za pobieranie kwasów tłuszczowych [77, 78].

#### VIII-6. Receptor kolagenu

Funkcja GPIV jako receptora kolagenu została omówiona uprzednio [79]. W artykule tym podam genetyczne podstawy niedoboru CD36, które zostały wyjaśnione w ciągu kilku ostatnich lat. Opisano dwie odmiany fenotypowe niedoboru CD36. Niedobór typu I (bardzo rzadko występujący) charakteryzuje się niedoborem CD36 w płytkach krwi i monocytach, a niedobór typu II (występujący częściej) charakteryzuje się niedoborem CD36 tylko w płytkach krwi [80]. K a s h i w a g i i wsp. [81-82] sekwencjonowali cDNA CD36 płytek krwi osób z niedoborem typu II i wykryli substytucję tylko jednego nukleotydu tj. cytozyny w pozycji 478 na tyminę (478C→T), co

powodowało zamianę proliny w pozycji 90 białka CD36 na serynę (90 Pro→Ser). Po transfekcji komórek 293T z pomocą cDNA mającego formę 478T i 478C uzyskano ekspresję prekursora CD36 o masie cząsteczkowej 81 kDa. Dojrzewanie tego prekursora do cząsteczki dojrzałej o masie 88 kDa było znacznie upośledzone w komórkach z transfekowaną formą 478T, a zmutowany prekursor ulegał degradacji w cytozolu [81]. W komórkach z transfekowaną formą 478C prawie całkowita ilość prekursora 81 kDa dojrzewała do cząsteczki 88 kDa w ciągu 6 godzin. Tak więc substytucja 478C→T wywołuje potranslacyjny defekt dojrzewania formy prekursorowej CD36 i jej degradację w cytoplazmie, co bezpośrednio prowadzi do niedoboru CD36 [81].

CDNA monocytów osób z niedoborem CD36 typu II jest heterozygotyczne dla formy 478C i 478T, natomiast płytki krwi mają tylko formę 478T. CDNA płytek i monocytów niedoboru typu I jest homozygotyczne i występuje tylko w formie 478T. Należy podkreślić, że niedobór typu I i II nie jest związany z całkowitym brakiem CD36 w płytkach i monocytach, lecz ze znacznym obniżeniem ilości tego białka [81].

Wykaz funkcji receptorowych białka CD36 znajduje się w tabeli 2.

**Tabela 2**

Wykaz funkcji receptorowych białka CD36

Funkcja	Rodzaj komórek
Receptor trombosponyny	monocyty, płytki krwi, niektóre komórki rakowe [1, 22, 41-42, 44, 46-47]
Receptor erytrocytów zakażonych <i>Plasmodium falciparum</i>	monocyty, komórki śródbłonka, niektóre komórki rakowe [1, 49, 50, 51-53]
Receptor kolagenu	płytki krwi [1, 79-82]
Receptor apoptotycznych neutrofilii i limfocytów	makrofagi [58, 60-61]
Receptor utlenionych fosfolipidów o niskiej gęstości	makrofagi, monocyty [66-68]
Receptor długołańcuchowych kwasów tłuszczowych	komórki śródbłonka, adypocyty, płytki krwi [15, 71, 74, 76-77]

W nawiasach podano L.p. odnośnych pozycji w wykazie piśmiennictwa.

### VIII-7. Udział CD36 w przewodzeniu sygnału

Funkcja CD36 jako białka przewodzącego informacji wynika z faktu, że niektóre jego ligandy, w tym kolagen i niektóre przeciwciała skierowane przeciwko CD36, aktywują płytki krwi oraz

wywołują wybuch tlenowy w monocytach i płytkach krwi [79, 83-84]. Ponadto, CD36 jest w płytkach krwi, komórkach czerniaka oraz komórkach HEL, jak wykazało zastosowanie technik immunoprecypitacyjnych, fizycznie połączona z kinazami tyrozynowymi rodziny *src*, w tym z *fyn*, *lyn* i *yes*, a w komórkach śródbłonka z kinazą *fyn* [85]. Może to oznaczać, że kinazy te biorą udział w przewodzeniu sygnału wewnątrz komórki, umożliwiając odpowiedź funkcjonalną na działanie ligandów oddziaływujących z CD36. Mechanizm przewodzenia sygnału przez CD36 jest bardzo słabo poznany. Aktywność receptorowych kinaz tyrozynowych jest modulowana przez ich di- lub oligomeryzację [86]. Sugeruje się, że aktywność kinaz niereceptorowych, do których należą kinazy połączone z CD36, może być zmieniana przez di-lub oligomeryzację CD36. Aktywacja płytek krwi przez przeciwciała dla CD36 dostarczyła dowodów przesyłania sygnału w sposób zależny i niezależny od receptora FcR2, który występuje w płytkach. Aktywacja płytek krwi przez anty-CD36 przeciwciała monoklonalne NL07, należące do klasy IgM, a więc niezależne od receptora FcR2a, oraz fragmenty (Fab)<sub>2</sub> tych przeciwciał potwierdza możliwość tworzenia di- lub oligomerów CD36 [87].

### IX. Znaczenie kliniczne CD36

Zwiększoną zawartość CD36 w płytkach krwi obserwowano u pacjentów z chorobami mieloproliferacyjnymi oraz u chorych na samoistną trombozę, co mogło być przyczyną komplikacji zakrzepowych [16, 88]. Obniżoną zawartość CD36 płytek krwi obserwowano w dystrofii mięśniowi Duchenne'a, co mogło być przyczyną obniżonej adhezji płytek [89]. Obniżoną glikozylację CD36 opisano u pacjentów dwóch rodzin chorych na rodzinną małopłytkowość (ang. *familial thrombocytopenia*). Płytki krwi chorych jednej rodziny, nie wykazujących objawów skazy krwotocznej, charakteryzowały się zwiększoną agregacją w odpowiedzi na kolagen, ADP i epinefrynę [90]. Płytki krwi chorych drugiej rodziny, z objawami skazy krwotocznej, wykazywały z kolei obniżoną zdolność do agregacji kolagenem, obniżoną adhezję do kolagenu i do białek macierzy [91]. Przyczyny różnic reaktywności płytek krwi tych dwóch rodzin nie są znane. Zwiększoną ekspresję CD36 na powierzchni płytek obserwowano podczas ich oddziaływania z uszkodzonymi naczyniami krwionośnymi. Przyczyną tego zjawiska jest ekspozycja CD36 obecnego w błonach ziarnistości na powierzchni błony plazmatycznej, co świadczy o aktywacji płytek krwi. Sugeruje się, że ekspresja CD36

na powierzchni płytek może być markerem aktywacji płytek krwi w różnych stanach patologicznych [92].

CD36 jest ważnym klinicznie antygenem, ponieważ osobnicy Nak<sup>a</sup> typu I ryzykują powstaniem izoprzeciwciał dla CD36 po transfuzji krwi Nak<sup>a+</sup> lub w czasie ciąży. Przeciwciała te mogą być przyczyną płamicy trombocytopenicznej [80]. Regionem wysoce immunogennym, odpowiedzialnym za wytwarzanie izoprzeciwciał oraz regionem, z którym reaguje szereg przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko CD36, jest region N-końca CD36 od aminokwasu 155 do 183 [93, 94]. CD36 może też odgrywać pewną rolę w złym potransfuzyjnym odzysku płytek krwi niedobrych pod względem antygenów układu grupowego krwi ABO, ponieważ ekspresja antygeny A występuje na CD36 [95].

W literaturze naukowej opisane są przypadki niedoboru CD36 w płytkach krwi i monocytach. Wszyscy opisani osobnicy są zupełnie zdrowi i nie wykazują zaburzeń hemostatycznych, pomimo wielu funkcji receptorowych pełnionych przez to białko. Wynika to z faktu, że CD36 nie jest jedynym receptorem dla wielu swoich ligandów [1, 25, 79-80, 96]. Dla oddziaływań wieloreceptorowych, tak jak to opisano dla CD36, najprawdopodobniej potrzebny jest synergizm defektów dwóch lub więcej receptorów, aby stało się to zauważalne klinicznie. Przykładami są chorzy na chorobę Moschowitza (ang. *thrombotic thrombocytopenic purpura*, TTP), z objawami skazy krwotocznej, gdzie poza niedoborem CD36 płytek krwi stwierdzono występowanie przeciwciał przeciwko CD36, GPIIb-IIIa i GPIa-IIa [97].

Występowanie przeciwciał skierowanych przeciwko CD36 obserwowano u wielu chorych na toczeń rumieniowaty układowy (ang. *systemic lupus erythematosus*, SLE) [98-100], czy chorych z małopłytkowością w tym indukowaną heparyną (ang. *heparin induced thrombocytopenia*, HIT), indukowaną heparyną z zakrzepami (ang. *heparin induced thrombocytopenia with thrombosis*, HITT), TTP oraz na płamicę małopłytkową idiopatyczną (ang. *idiopathic thrombocytopenic purpura*, ITP) [101-103]. U wszystkich chorych przeciwciała przeciwko CD36 występowały zawsze w połączeniu z innymi przeciwciałami, w tym głównie przeciwko GPIIb-IIIa, GPIb i GPIa-IIa, a w SLE dodatkowo przeciwko DNA, C1q, fosfolipidom, antygenom erytrocytów i komórek śródbłonka.

W płytkach trombocytopenicznych, poza typową formą CD36 o masie cząsteczkowej 88 kDa, obserwowano występowanie wysoce immunogennej formy o masie 85 kDa. Forma ta najprawdopodobniej

powstaje w wyniku usunięcia kwasu sialowego przez sialidazę, co zwiększa dostępność CD36 dla przeciwciał [102].

Mechanizm działania przeciwciał skierowanych przeciwko CD36 i ich udział w powstawaniu małopłytkowości i zakrzepów nie jest dokładnie poznany. Wiązanie się tych przeciwciał z CD36 w błonie płytkowej może powodować aktywację płytek z uruchamianiem szlaków przekazywania informacji za pośrednictwem kinaz tyrozynowych, uwalnianie tromboksanu A<sub>2</sub> oraz uwalnianie wielu substancji magazynowanych w ziarnistościach wewnątrzkomórkowych, które potęgują aktywację i doprowadzają do agregacji płytek. Aktywacja płytek krwi może przebiegać w sposób zależny i niezależny od receptora FcRIIA [51, 104]. Zaktywowane płytki mogą być usuwane z krążenia, co może być przyczyną małopłytkowości, lub mogą też wiązać się do śródbłonka, pojedynczo lub jako agregaty płytkowe, zwężając naczynia krwionośne i przyczyniając się do zakrzepic [105]. Fakt, że więcej przeciwciał dla CD36 występowało u chorych na TTP i HITT niż u chorych na ITP i HITT potwierdza udział tych przeciwciał w tworzeniu zakrzepów [100, 18]. Ponadto, w plazmie pacjentów chorych na TTP, często występuje białko o m.c. 37 kDa, nazywane aglutyniną płytkową, które łączy się z CD36 i powoduje dodatkowo aktywację płytek krwi.

Przeciwciała skierowane przeciwko CD36 mogą też wiązać się z komórkami śródbłonka powodując zaburzenia adhezji płytek krwi, transportu i pobierania lipidów oraz hamować apoptozę neutrofilów przez makrofagi [100, 104].

## X. Podsumowanie

CD36 jest przykładem białka wielofunkcyjnego, współdziałającego z innymi receptorami w wiązaniu ligandów. Występowanie „nadmiaru” receptorów wiążących takie same ligandy oraz obecność białek rodziny CD36, posiadających podobną strukturę i pełniących podobne funkcje, jest najprawdopodobniej przyczyną braku zmian fenotypowych u osób z niedoborem CD36. Białko CD36 dzięki oddziaływaniom z wieloma ligandami bierze udział w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Poznanie mechanizmów tych oddziaływań może znaleźć zastosowanie w leczeniu wielu chorób.

Artykuł otrzymano 5 marca 2001 r.

Zaakceptowano do druku 11 października 2001 r.

1. Greenwalt D E, Lipsky R H, Ockenhouse F, Ikeda H, Tandon N N, Jamieson G A (1992) *Blood* **80**: 1105-1115
2. Catimel B, Parmentier S, Leung L K K, McGregor J (1991) W: Kaplan-Covet C, Schlegel N, Salmon Ch, McGregor J (red) *Platelet immunology: fundamental and clinical aspects* t 206. INSERM, John Library Eurotext Ltd. str.41-53
3. Okumura T, Jamieson G A (1976) *J Biol Chem* **251**: 5944-5949
4. Podolsak B (1977) *Thromb Haemost* **37**: 396-406
5. Shaw S (1987) *Immunol Today* **8**: 1-3
6. Tandon N N, Lipski R H, Burges W H, Jamieson G A (1989) *J Biol Chem* **264**: 7570-7575
7. Knowless D M, Tolidijian B, Marboe C, Agati V D, Grimes M, Chass L J (1984) *J Immunol* **132**: 2170-2173
8. Greenwalt D E, Watt K W K, So O Y, Jiwani N (1990) *Biochemistry* **29**: 7054-7059
9. Clezardin P, Frappart L, Clerget M, Pechoux C, Delmas P D (1993) *Cancer Res* **53**: 1421-1430
10. Ryeom S W, Sparrow J R, Silverstein R L (1996) *J Cell Sci* **108**: 387-395
11. Abumrad N A, El-Maghrabi R, Ez-Zoubir A, Lopez E, Grimaldi P A (1993) *J Biol Chem* **268**: 17665-17668
12. Schravendijk M R, Handunnetti S M, Barnwell J W, Howard R J (1992) *Blood* **80**: 2105-2114
13. Swerlick R A, Lee K H, Wick T M, Lawley T J (1992) *J Immunol* **148**: 78-83
14. Imamura N, Mtasiwa D M, Inada T, Kuramoto A (1990) *Leukemia* **4**: 525-528
15. Greenwalt D E, Scheck SH, Rhinehart-Jones T (1995) *J Clin Invest* **96**: 1382-1388
16. Thibert V, Bellucci S, Edelman L, Tandon N N, Legrand C (1992) *Thromb Haemost* **168**: 600-605
17. Berger G, Caen J P, Berndt M C, Cramer E M (1993) *Blood* **82**: 3034-3044
18. Thorne R F, Meldrum C J, Harris J S, Dorahy D J, Shafren D R, Berndt M C, Burns G F, Gibson P G (1987) *Biochem Biophys Res Commun* **240**: 812-818
19. Rhinehart-Jones T, Greenwalt D E (1996) *Arch Biochem Biophys* **326**: 115-118
20. Kobylka D, Carraway K L (1973) *Biochim Biophys Acta* **307**: 133-140
21. Greenwalt D E, Mather I H (1985) *J Cell Biol* **100**: 397-408
22. McGregor J L, Catimel B, Parmentier S, Clezardin P, Dechavanne M, Leung L L K (1990) *J Biol Chem* **264**: 501-506
23. Tomiyama Y, Take H, Ikeda H, Mitani T, Furu-bayashi T, Mizutani H, Yamamoto N, Tandon N N, Sekiguchi S, Jamieson G A, Kurata Y, Yonezawa T, Tarui S (1990) *Blood* **75**: 499-502
24. Greenwalt D E, Watt K W K, Hasler T, Howard R J, Patel S (1990) *J Biol Chem* **265**: 16296-16299
25. Daviet L, McGregor J L (1997) *Thromb Haemost* **78**: 65-69
26. Berglund L, Petersen T E, Rasmussen J T (1996) *Biochim Biophys Acta* **1309**: 63-68
27. Fernandez-Ruiz E, Armesilla A, Sanchez-Madrid F, Vega M A (1993) *Genomics* **17**: 759-761
28. Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B (1989) *Cell* **58**: 95-101
29. Wyler B, Davie L, Bortkiewicz H, Bordet J-C, McGregor J L (1993) *Thromb Haemostas* **70**: 500-505
30. Lipsky R H, Sobieski D A, Tandon N N, Herman J, Ikeda H, Jamieson G A (1991) *Thromb Haemost* **65**: 456-457
31. Armesilla A L, Vega M A (1994) *J Biol Chem* **269**: 18985-18991
32. Konig H, Pfistere P, Corcoran L M, Wirth T (1995) *Genes Dev* **9**: 1598-1607
33. Vega M A, Segui Real B, Garcia J A, Cales C, Rodriguez F, Vanderkerckhove J, Sandoval I V (1991) *J Biol Chem* **266**: 16818-16824
34. Tao N, Wagner S J, Lublin D M (1996) *J Biol Chem* **271**: 22315-22320
35. Rasmussen J T, Bergkund L, Rasmussen M S, Petersen T E (1998) *Eur J Biochem* **257**: 488-494
36. Calvo D, Vega M A (1993) *J Biol Chem* **268**: 18929-18935
37. Hart K, Wilcox M (1993) *J Mol Biol* **234**: 249-253
38. Thiery-Mieg J, Sulston J (1992) *Nat Genet* **1**: 114-123
39. Crombie R, Silversein R (1998) *J Biol Chem* **273**: 4855-4863
40. Vega M A, Rodriguez F, Segui Real B, Cales C, Alcade J, Sandoval I V (1991) *J Biol Chem* **266**: 16269-16272
41. Asch A S, Barnwell J, Silverstein R L, Nachman R L (1987) *J Clin Invest* **79**: 1054-1061
42. Silverstein R L, Asch A S, Nachman R L (1989) *J Clin Invest* **84**: 546-552
43. Leung L L K, Li W-X, McGregor J L, Albrecht G, Howard R J (1992) *J Biol Chem* **267**: 18244-18250
44. Frieda S, Pearce A, Wu J, Silverstein R L (1995) *J Biol Chem* **270**: 2981-2986
45. Asch A S, Silbiger S, Heimer E, Nachman R L (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **182**: 1208-1217
46. Asch A S, Liu I, Briccetti F M, Barnwell J W, Kwakye-Berko F, Dokun A, Goldberg J, Per-nambuco M (1993) *Science* **262**: 1436-1439
47. Hatmi M, Gavaret J M, Elalamy I, Vargaftig B B, Jacquemin C (1996) *J Biol Chem* **271**: 24776-24780
48. Luse S A, Miller L H (1971) *Am J Trop Med Hyg* **20**: 655-660
49. Aikawa M, Suzuki M, Gutierrez Y (1980) W: Kreier J P (red) *Malaria: immunology, immunopathology, and immunization*. Academic Press, New York str. 47-102
50. Barnwell J, Ockenhouse C, Knowles D M (1985) *J Immunol* **135**: 3494-3497
51. Alessio M, Greco N J, Primo L, Ghigo D, Bosia A, Tandon N N, Ockenhouse C F, Jamieson G A, Malavasi F (1993) *Blood* **82**: 3637-3647
52. Barnwell J W, Asch A S, Nachman R L, Yamaya M, Aikawa M, Ingravallo P J (1989) *Clin Invest* **84**: 765-772
53. Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B (1989) *Cell* **58**: 95-101
54. Daviet L, Craig A G, McGregor J L, Pinches R, Wild T F, Berendt A R, Newbold C I, McGregor J L (1997) *Eur J Biochem* **243**: 344-349
55. Cooke B M, Berendt A R, Craig A G, McGregor J L, Newbold C I, Nash G B (1994) *Br J Haematol* **87**: 162-170
56. Baruch D I, Pasloske B L, Singh H B, Bi X, Ma X C, Feldman M, Taraschi T F, Howard R J (1995) *Cell* **82**: 77-87
57. Smith J D, Craig A G, Kriek N, Hudson-Taylor D, Kyes S, Fagen T, Baruch D I, Newbold C I, Miller L H (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 1766-1771
58. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C (1990) *Nature* **343**: 170-173
59. Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C (1989) *J Clin Invest* **90**: 1513-1522
60. Savill J, Hogg N (1992) *J Clin Invest* **90**: 1513-1522
61. Ren Y, Silverstein R L, Allen J, Savill J (1995) *J Exp Med* **181**: 1857-1862
62. Puente Navazo M D, Daviet L, Ren Y, Savill J, McGregor J L (1996) *J Biol Chem* **271**: 15581-15585
63. Rigotti A, Acton S L, Krieger M (1995) *J Biol Chem* **270**: 16221-16224
64. Franc N C, Dimarcq J L, Laeux M, Hoffman J, Ezekowitz R A B (1996) *Immunity* **4**: 431-443

65. Fukasawa M, Adachi H, Hirota K, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K (1996) *Exp Cell Res* **222**: 246-250
66. Frieda S, Pearce A, Roy P, Nicholson A C, Hajar D P, Febbraio M, Silverstein R L (1998) *J Biol Chem* **273**: 34875-34881
67. Puente Navazo M D, Daviet L, Ninio E, McGregor J L (1996) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**: 1033-1039
68. Nozaki S, Kashiwagi H, Yamashita S, Nakagawa T, Kostner B, Tomiyama Y, Nakata A, Ishigami M, Miyagawa J-i, Kameda-Takemura K, Kurata Y, Matsuzawa Y (1995) *J Clin Invest* **96**: 1859-1865
69. Ottnad E, Parthasarathy S, Sambrano G R, Ramprasad M P, Quehenberger O, Kondratenko N, Green S, Steinberg D (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1391-1395
70. Takahashi Y, Fuda H, Yanai H, Akita H, Shuping H, Chiba H, Matsuno K (1998) *Seminars Thromb Hemost* **24**: 251-253
71. Hwang E-H, Taki J, Yasue S, Fujimoto M, Taniguchi M, Matsunari I, Nakajima K, Shiobara S, Ikeda T, Tonami N (1998) *J Nucl Med* **39**: 1681-16883
72. Okamoto F, Tanaka K, Sohmiya K, Kawamura K (1998) *Jpn Circ J* **62**: 499-504
73. Fukuchi K, Nozaki S, Yoshizumi T, Hasegawa S, Uehara T, Nakagawa T, Kobayashi T, Tomiyama Y, Yamashita S, Matsuzawa Y, Nishimura T (1999) *J Nucl Med* **40**: 239-243
74. Baillie A G S, Coburn C T, Abumrad N A (1996) *J Membr Biol* **153**: 75-81
75. Spitsberg V L, Matitashvili E, Gorewit R C (1995) *Eur J Biochem* **230**: 872-878
76. Dutta-Roy A K, Gordon M J, Campbell F M, Crosbie L C (1996) *Platelets* **7**: 291-295
77. Yamamoto N, Akamatsu N, Yamazaki, H, Tanoue K (1992) *Br J Haematol* **81**: 86-89
78. Abumrad N A, El-Maghrabi M R, Amri E Z, Lopez E, Grimaldi P A (1993) *J Biol Chem* **268**: 17665-17668
79. Kralisz U (1995) *Post Biochem* **41**: 188-194
80. Yamamoto N, Akamatsu N, Sakuraba H, Yamazaki H, Tanoue K (1994) *Blood* **83**: 392-397
81. Kashiwagi H, Tomiyama Y, Honda S, Kosugi S, Shiraga M, Nagao N, Sekiguchi S, Kanayama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y (1995) *J Clin Invest* **95**: 1040-1046
82. Kashiwagi H, Tomiyama Y, Kosugi S, Shiraga M, Lipsky R H, Nagao N, Kanakura Y, Kurata Y, Matsuzawa Y (1995) *Thromb Haemost* **74**: 758-763
83. Schuepp B J, Pfister H, Clemetson K J, Silverstein R L, Jungi T W (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **175**: 263-270
84. Del Principe D, Menichelli A, De Matteis W, Di Giulo S, Giordani M, Savini I, Agro A F (1991) *Thromb Res* **62**: 365
85. Huang M-M, Bolen J B, Barnwell J W, Shattil S J, Brugge J S (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7844-7849
86. Ulrich A, Schlessinger J (1990) *Cell* **61**: 203-207.
87. Alessio M, Ghigo D, Garbaringo G, Geuna M, Malavasi F (1991) *Cell Immunol* **137**: 487-491
88. Bolin R B, Okumura T, Jamieson G A (1997) *Am J Hematol* **3**: 63-67
89. Maurin N, Forst J, Leithe H, Forst R (1998) *Thromb Haemost* **79**: 1067
90. Yufu Y, Ideguchi H, Narishige T, Suematsu E, Toyoda K, Nishimura J, Nawata H, Oda S (1990) *Am J Haematol* **33**: 271-273
91. Kirchmaier C M, Meyer M, Schimer A (1991) *Thromb Haemost* **65**: 1102
92. Escolar G, Lozano M, Diaz-Ricart M, Rao G H R, Ordinas A, White J G (1999) *Am J Hematol* **60**: 260-267
93. Daviet L, Buckland R, Puente Navazo M D, McGregor J L (1994) *Biochem J* **305**: 221-224
94. Daviet L, Morel-Kopp M-C, Kaplan C, McGregor J L (1995) *Thromb Haemost* **73**: 543-545
95. Stockelberg D, Hou M, Rydberg L, Kutti J, Wadenvik H (1996) *Trans Med* **6**: 243-248
96. Asch A (1996) *J Lab Clin Med* **127**: 321-325
97. Beer J H, Rabaglio M, Berchtold P, von Felten A, Clemetson K J, Tsakiris D A, Kehrel B, Brandenberger S (1993) *Blood* **82**: 820-829.
98. Macchi L, Rispal P, Clofent-Sanchez G, Pellegrin J-L, Nurden P, Leng B, Nurden A T (1997) *Br J Haematol* **98**: 336-341
99. Penzer S, Pabinger I, Gschwandtner M E, Mayr W R, Hutter D (1997) *Br J Haematol* **98**: 342-345
100. Al-Shashi R, Mason J C, Rao R, Hurd C, Thompson E M, Haskard D O, Davies K A (1997) *Br J Rheumatol* **36**: 794-798
101. Wadenvik H, Stockelberg D, Hou M (1998) *Acta Paediatr Suppl* **424**: 26-36
102. Schultz D R, Arnold P I, Jy W, Valant P A, Gruber J, Ahn Y S, Mao F W, Mao W W, Horstman L L (1998) *Br J Haematol* **103**: 849-857
103. Wright J F, Wang H, Hornstein A, Hogarth A, Hogarth M, Mody M, Garvey M B, Blanchette V, Rock G, Freedman J (1999) *Br J Haematol* **107**: 546-555
104. Vermylen J, Hoylaerts M F, Arnout J (1997) *Thromb Haemost* **78**: 420-426
105. Bombeli T, Schwartz, B R, Harlan J M (1998) *J Exp Med* **187**: 329-339

# Regulacja aktywności oksydazy alternatywnej

## Regulation of the alternative oxidase activity

IZABELA M. JUSZCZUK<sup>1</sup>, ANNA M. RYCHTER<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Lokalizacja oksydazy alternatywnej w roślinnym łańcuchu oddechowym
- III. Charakterystyka molekularna oksydazy alternatywnej
- IV. Regulacja aktywności oksydazy alternatywnej
  - IV-1. Regulacja aktywności oksydazy alternatywnej na poziomie genu
  - IV-2. Regulacja aktywności oksydazy alternatywnej na poziomie białka
    - IV-2.1. Stan redukcji białka oksydazy alternatywnej
    - IV-2.2. Stymulacja aktywności oksydazy alternatywnej przez pirogronian
    - IV-2.3. Poziom redukcji ubichinonu (Qr/Qt)
    - IV-2.4. Aktywność drogi cytochromowej
- V. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** AFT — aktywne formy tlenu; AOX — białko oksydazy alternatywnej; *aox1* — gen oksydazy alternatywnej; ATP — adenozyntrofosforan; BHAM — kwas benzohydroksamowy; DNA — kwas deoksyrybonukleinowy;  $K_m$  — stała Michaelisa, stała kinetyczna trwałości kompleksu enzym-substrat, której miarą jest stężenie substratu, przy jakim początkowa szybkość reakcji jest równa połowie szybkości maksymalnej; mRNA — informacyjny kwas rybonukleinowy; Qr — zredukowany ubichinon (ubichinol);  $NAD^+$  — dinukleotyd nikotynoamido-adeninowy (forma utleniona);  $NADH$  — dinukleotyd nikotynoamido-adeninowy (forma zredukowana);  $NAD-ME$  — dehydrogenaza jabłczanowa dekarboksylująca zależna od  $NAD^+$ ;  $NADP^+$  — fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego (forma utleniona);  $NADPH$  — fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego (forma zredukowana); Qt — ubichinon całkowity; Qr/Qt — stosunek stężenia zredukowanego ubichinonu do stężenia ubichinonu całkowitego; SHAM — kwas salicylohydroksamowy; SMP (ang. *submitochondrial particles*) — odwrócone pęcherzyki mitochondrialne,  $V_{max}$  — maksymalna szybkość reakcji enzymatycznej w warunkach wysycającego stężenia substratu.

### Contents:

- I. Introduction
- II. Localization of the alternative oxidase in plant mitochondrial respiratory chain
- III. Molecular characteristic of the alternative oxidase
- IV. Regulation of the alternative oxidase activity
  - IV-1. Regulation of the alternative oxidase gene expression
  - IV-2. Regulation of the alternative oxidase activity on the protein level
    - IV-2.1. The redox state of the alternative oxidase
    - IV-2.2. The stimulation of the alternative oxidase activity by pyruvate
    - IV-2.3. The reduction level of ubiquinone (Qr/Qt)
    - IV-2.4. The activity of the cytochrome pathway
- V. Final remarks

### I. Wstęp

Jedną z najdawniej poznanych charakterystycznych cech oddychania roślin jest tzw. oddychanie niewrażliwe na cyjanek. Oddychanie to związane jest z obecnością w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów dodatkowej oksydazy, alternatywnej w stosunku do oksydazy cytochromowej, nazwanej z tego powodu oksydazą alternatywną (AOX) [1-3]. Oddychanie cyjanoodporne (nie tylko ze względu na nazwę) uważane było za pewną osobliwość roślinnego metabolizmu oddechowego. Artykuły poświęcone charakterystyce roślinnego łańcucha oddechowego i przypuszczalnemu znaczeniu fizjologicznemu oksydazy alternatywnej opublikowane były w „Postęпах Biochemii” [3, 4]. Rola oddychania cyjanoodpornego jest stale dyskutowana, jedynie u tzw. roślin termogennych z rodziny *Araceae* jest niewątpliwie związana z wydzielaniem ciepła [5]. Oddychanie cyjanoodporne i oksydaza alternatywna występują jednak powszechnie w świecie roślinnym, nie tylko u roślin termogennych, a wytwarzanie ciepła w czasie oddychania innych roślin jest zbyt małe, aby miało znaczenie fizjologiczne.

Ostatnie dziesięć lat przyniosło dwa ważne odkrycia w badaniach oddychania cyjanoodpornego; pierwsze, że nie należy oznaczać aktywności i

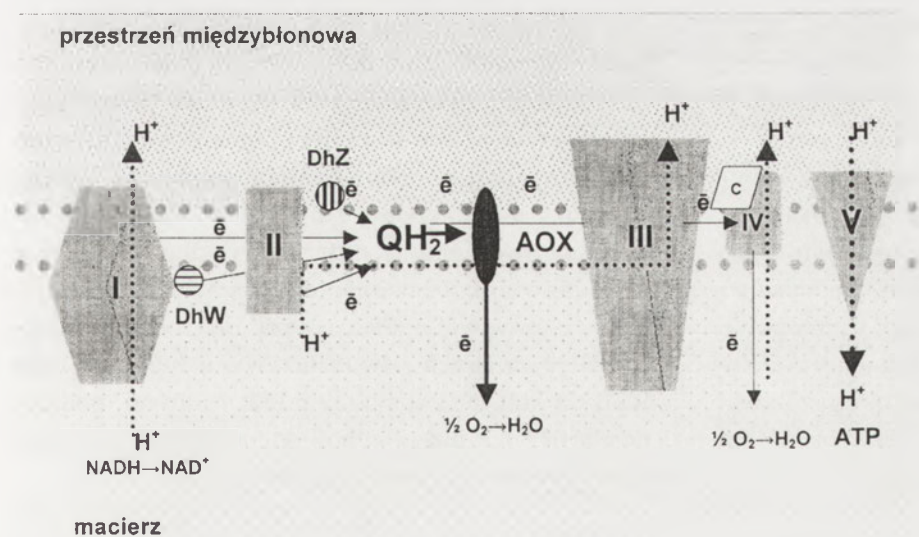
<sup>1</sup>Dr, <sup>2</sup>prof. dr hab.; Zakład Bioenergetyki Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: izabelaj@biol.uw.edu.pl, anna@rychter.com

udziału oksydazy alternatywnej w oddychaniu przy użyciu inhibitorów [6] i drugie, równie istotne, że aktywność AOX jest regulowana nie tylko na poziomie genu (stężenie białka AOX), ale przede wszystkim na poziomie białka, w sposób o wiele bardziej skomplikowany niż początkowo przypuszczano [2]. Droga cytochromowa i alternatywna, rozgałęziając się na poziomie ubichinonu, mogą współzawodniczyć o elektrony ze zredukowanego ubichinonu. Niefosforylujący charakter drogi alternatywnej powoduje obniżenie wydajności energetycznej procesu oddychania. Przepływ elektronów na oksydazę alternatywną musi być więc ściśle regulowany i uzależniony od metabolizmu komórki uwarunkowanego jej stanem fizjologicznym, rozwojowym i/lub przystosowaniami do zmiennych warunków środowiska [2]. Obecnie uważa się, że ta specyficzna cecha roślinnego łańcucha oddechowego jest związana ze zdolnością oddychania roślin do regulacji równowagi gospodarki energetyczno-węglowej w zmiennych warunkach środowiskowych.

Regulacja oddychania drogą alternatywną jest ostatnio przedmiotem intensywnych badań, między innymi w Zakładzie Bioenergetyki Roślin UW

zredukowanego ubichinonu (ubichinolu) na tlen [1-3] (Ryc. 1). Zaproponowany model regulacji przepływu elektronów z ubichinolu zakłada, że tlen reaguje z oksydazą alternatywną, gdy osiągnie ona stan cztero-elektronowej redukcji [11]. Reakcja ta nie prowadzi do przemieszczania protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondriów, przez co cała energia uwalniana podczas transportu elektronów z ubichinolu na tlen jest rozpraszana w postaci ciepła. Droga alternatywna jest drogą niefosforylującą, gdyż elektrony omijają dwa miejsca sprzężenia związane z tworzeniem siły protonomotorycznej (kompleksy III i IV łańcucha cytochromowego). Przepływ elektronów drogą alternatywną nie jest hamowany przez inhibitory drogi cytochromowej takie jak: cyjanek, azydek, antymycyna A czy myksotiazol, ale jest hamowany przez kwasy hydroksamowe, gallusan n-propylu i disulfiram [12-14].

Oksydaza alternatywna ma mniejsze powinowactwo do tlenu niż oksydaza cytochromowa. Stała Michaelisa ( $K_m$ ) dla oksydazy alternatywnej, w zależności od gatunku rośliny, wynosi 10-20  $\mu\text{M}$  i 1,7  $\mu\text{M}$ , a przy niskim stężeniu  $\text{O}_2$ , w granicach 0-6  $\mu\text{M}$ , podczas gdy dla oksydazy cytochromowej, odpo-



Ryc. 1. Transport elektronów w roślinnym łańcuchu oddechowym. I, oksydoreduktaza NADH — ubichinon; II, oksydoreduktaza bursztynian — ubichinon; III, oksydoreduktaza ubichinol — cytochrom c; IV, oksydaza cytochromu c; V, syntaza ATP; AOX, oksydaza alternatywna; c, cytochrom c;  $\text{QH}_2$ , zredukowany ubichinon; DhW, dehydrogenaza(y) wewnętrznej NAD(P)H; DhZ, dehydrogenaza(y) zewnętrznej NAD(P)H.

[7-10]. Obniżony poziom jonów fosforanowych w tkance korzeni fasoli powodujący wzrost odporności oddychania na cyjanek jest układem modelowym do badania regulacji oksydazy alternatywnej. Artykuł poświęcony jest regulacji ekspresji i aktywności oksydazy alternatywnej u roślin wyższych.

## II. Lokalizacja oksydazy alternatywnej w roślinnym łańcuchu oddechowym

Oksydaza alternatywna jest oksydazą ubichinolu, przenoszącą elektrony w łańcuchu oddechowym ze

wiednio, 0,1-0,6  $\mu\text{M}$  i 0,14  $\mu\text{M}$  [15,16]. Podczas pomiarów pobierania tlenu przez całe tkanki lub izolowane mitochondria, stężenie tlenu (100-200  $\mu\text{M}$ ) w stosowanych mieszaninach reakcyjnych nie ogranicza aktywności obydwu oksydaz [17]. W warunkach *in vivo* zdarza się jednak, że tlen może być czynnikiem ograniczającym oddychanie, np. w bulwach ziemniaka [18] lub przy bardzo intensywnym zużyciu energii podczas kwitnienia [19].

Przez wiele lat do oznaczania udziału drogi alternatywnej i cytochromowej w oddychaniu wykorzystywano metodę Bahra i Bonnora [20] pole-

gającą na miareczkowaniu aktywności obu dróg odpowiednimi inhibitorami (drogi cytochromowej — cyjankiem, antymycyną, a drogi alternatywnej — SHAM, BHAM), przy założeniu, że droga alternatywna działa przy wysyczonej drodze cytochromowej. Szereg doświadczeń wykazywało jednak, że droga alternatywna może działać przy niewysyczonej drodze cytochromowej, a ponadto może współzawodniczyć o elektrony z drogą cytochromową na poziomie ubiquinonu [21-23]. Obecnie jedyną wiarygodną i nieinwazyjną (bez zastosowania inhibitorów) metodą oznaczania udziału drogi alternatywnej w oddychaniu jest technika dyskryminacji pobierania ciężkiego izotopu tlenu,  $^{18}\text{O}_2$  w stosunku do  $^{16}\text{O}_2$  [24-26].

Pomimo wielu prób nie udało się dotychczas wyizolować z tkanek roślinnych oksydazy alternatywnej w postaci oczyszczonego, aktywnego biochemicznie preparatu białkowego. Otrzymanie homogennego enzymu nie udaje się z kilku przyczyn: trudności uwolnienia białka z błony mitochondrialnej, jego niestabilności poza strukturą błonową oraz braku odpowiedniego donora elektronów dla oksydazy alternatywnej *in vitro*, zastępującego ubiquinon. Częściowe oczyszczenie oksydazy alternatywnej z *Sauromatum guttatum* pozwoliło otrzymać przeciwciała monoklonalne dla oksydazy alternatywnej [27-29]. Zapoczątkowało to nowy etap badań regulacji aktywności oksydazy alternatywnej z wykorzystaniem technik biologii molekularnej. Analiza immunologiczna oksydazy alternatywnej w połączeniu ze znajomością struktury cząsteczkowej enzymu i precyzyjnym oznaczaniem aktywności techniką dyskryminacji izotopowej pozwala na badanie mechanizmów regulacji AOX w układach *in vitro* i *in vivo* w szerokim zakresie zmieniających się warunków życia roślin czy oddziaływania czynników stresowych.

### III. Charakterystyka molekularna oksydazy alternatywnej

Oksydaza alternatywna jest małym białkiem (o ciężarze cząsteczkowym od 32 do 39 kDa) występującym w formie dimeru i zlokalizowanym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Przypuszcza się, że monomeryczne białko AOX zawiera dwie hydrofobowe domeny o strukturze alfa-helisy zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [17, 30] i jedną helisę powierzchniową na zewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej [31]. Hydrofilowe końce C i N łańcucha polipeptydowego znajdują się po stronie macierzy mitochondrialnej

[32]. Miejsce wiązania substratu (ubichinolu) w białku znajduje się w rejonie hydrofilowej helisy od strony macierzy mitochondrialnej [33, 34] (Ryc. 2). Hipotetyczne centrum aktywne enzymu, przy C końcu alfa-helisy łańcucha polipeptydowego, tworzą dwa atomy metalu, prawdopodobnie żelaza [35-37]. Na N końcu białka znajdują się reszty cysteinowe, które uczestniczą w tworzeniu labilnych mostków dwusiarczkowych w dimerze oksydazy alternatywnej [1, 33]. Mutacja w genie oksydazy alternatywnej polegająca na zastąpieniu reszt cysteinowych resztami glutaminianowymi, alaninowymi bądź serynowymi powoduje tworzenie dimerycznego, zredukowanego białka, które nigdy nie przyjmuje formy utlenionej [38-40]. Dyskutowany od początku lat 90-tych model strukturalny oksydazy alternatywnej został ostatnio poddany weryfikacji [33]. Uważa się, że może to być białko zlokalizowane po stronie macierzy w wewnętrznej błonie mitochondrialnej lub połączone z tą błoną na zasadzie oddziaływań białko-białko (Ryc. 2).

Oksydaza alternatywna z mitochondriów roślinnych wykazuje wysoką homologię do sklonowanego niedawno chloroplastowego białka *Im* u *Arabidopsis thaliana*, które posiada aktywność oksydazy plasto-chinonu i podobnie jak AOX przenosi elektrony bezpośrednio na tlen [41, 42]. Zarówno białko *Im*, jak i oksydaza alternatywna kodowane są przez geny jądrowe o wysokim stopniu podobieństwa u różnych gatunków roślin [37]. Analiza sekwencji genów oksydazy alternatywnej i białka *Im*, odpowiedzialnych za tworzenie centrum aktywnego enzymów [37], potwierdziła wcześniejsze przypuszczenia [1, 36], że obydwa białka należą do rodziny metalo-białek zwanych „dwużelazowymi białkami typu R2”, do których zaliczamy między innymi: podjednostkę R2 reduktazy rybonukleotydowej,  $\Delta^9$ -desaturazę i monooksygenazę metanu.

### IV. Regulacja aktywności oksydazy alternatywnej

#### IV-1. Regulacja aktywności oksydazy alternatywnej na poziomie genu

Oksydaza alternatywna będąc białkiem mitochondrialnym kodowana jest przez gen zlokalizowany w DNA jądrowym [32]. Wykazano, że poziom mRNA, stężenie białka enzymatycznego oraz/lub aktywność oksydazy alternatywnej zależały od różnych czynników biotycznych lub abiotycznych [43-48]. Wzrost aktywności oksydazy alternatywnej związany ze zwiększoną ilością zsyntetyzowanego białka enzy-

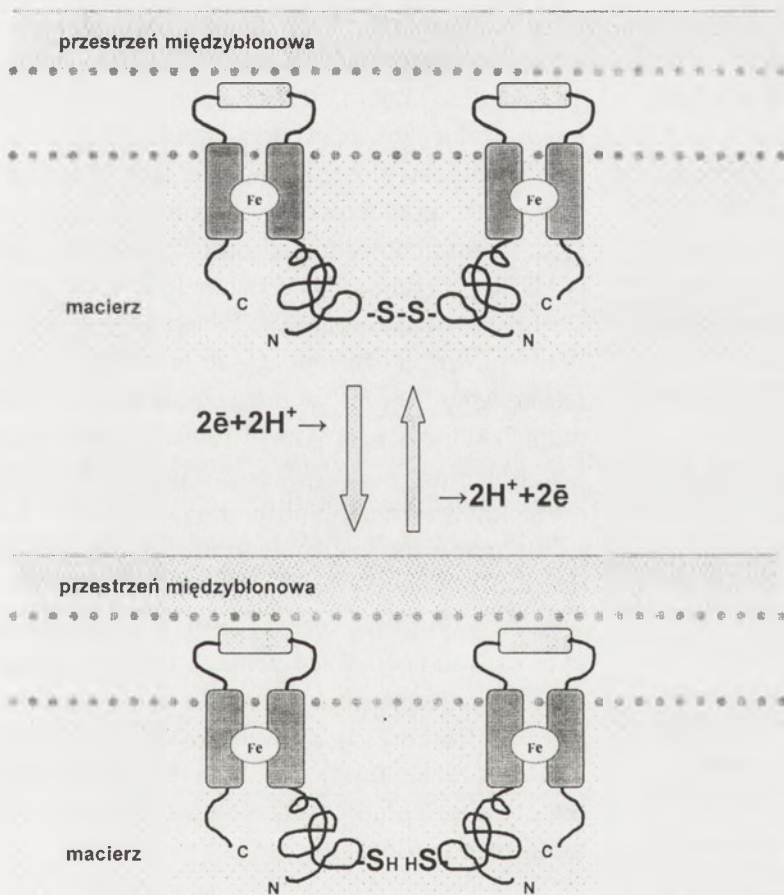


matycznego obserwowano w różnych warunkach wzrostu rośliny [9, 49-52], w określonym stanie rozwojowym [53-55] oraz w zależności od rodzaju tkanki [56]. System ekspresji genów oksydazy alternatywnej w jądrze komórkowym można zatem uważać za kluczowy i podstawowy poziom regulacji aktywności białka [2].

Badania ekspresji genów oksydazy alternatywnej rozpoczęły doświadczenia z genem *aox1* u *Sauromatum guttatum*, dla którego poziom mRNA wzrastał w trakcie termogenezy podczas kwitnienia oraz pod wpływem egzogenego kwasu salicylowego [45,

przy wzroście stężenia cytrynianu w mitochondriach. Wskazuje to na możliwość połączenia metabolizmu mitochondrialnego z ekspresją jądrowego genu oksydazy alternatywnej [47].

Poszukiwania cząsteczki sygnałowej, która byłaby przekaźnikiem informacji z mitochondrium do jądra komórkowego doprowadziły do hipotezy, że rolę taką mogłyby spełniać powstające w mitochondriach aktywne formy tlenu (AFT), a konkretnie nadtlenek wodoru, stosunkowo stabilny i łatwo przenikający przez błony. Badania metabolizmu oddechowego w mitochondriach *in vivo* i *in vitro* wykazały,



Ryc. 2. Struktura homodimeru oksydazy alternatywnej i położenie białka w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Oksydaza alternatywna w formie zredukowanej (-SH HS-) jest bardziej aktywna niż w formie utlenionej (-S-S-). Mostki dwusiarczkowe tworzą reszty cysteinowe N końca łańcucha polipeptydowego. AOX w formie zredukowanej podlega regulacji przez pirogronian. Aktywne centrum enzymu, które tworzą dwa atomy żelaza, zlokalizowane jest w obszarze domen hydrofilowych po stronie C końca łańcucha polipeptydowego.

46]. Wciąż bez odpowiedzi pozostaje pytanie: jaki sygnał i na jakiej drodze przenosi informację o stanie metabolicznym łańcucha oddechowego z mitochondrium do jądra komórkowego i powoduje indukcję syntezy białka oksydazy alternatywnej. U różnych organizmów (roślin, grzybów, pierwotniaków), u których badano oddychanie przy udziale drogi alternatywnej, wykazano, że zahamowanie aktywności drogi cytochromowej prowadziło do syntezy *de novo* białka oksydazy alternatywnej [57-60]. Wzrost redukcji ubichinonu na skutek napływu substratów oddechowych i ograniczenia transportu elektronów mógł również indukować ekspresję genu oksydazy alternatywnej [2, 10]. Wzrost poziomu mRNA dla oksydazy alternatywnej obserwowany był również

że reakcje redoks łańcucha oddechowego są ważnym źródłem aktywnych form tlenu [61-63]. Aktywne formy tlenu powstają również w cytosolu [61] w odpowiedzi na różnego typu czynniki stresowe, pod wpływem których obserwuje się wzrost aktywności oksydazy alternatywnej [32, 63, 64]. Dodanie  $H_2O_2$  do kultur zawiesinowych tytoniu i petunii powodowało indukcję syntezy oksydazy alternatywnej [23, 47]. Poza  $H_2O_2$ , możliwość indukcji ekspresji genu oksydazy alternatywnej u roślin termogennych przypisuje się również kwasowi salicylowemu [29, 43, 44, 46, 65, 66]. Mechanizm indukcji genu oksydazy alternatywnej nie jest jednak do tej pory wyjaśniony, nie ma bowiem dotychczas jednoznacznych dowodów na to, że AFT i/lub kwas salicylowy są rzeczy-

wiście czynnikami indukującymi ekspresję genu oksydazy alternatywnej w jądrze komórkowym.

#### IV-2. Regulacja aktywności oksydazy alternatywnej na poziomie białka

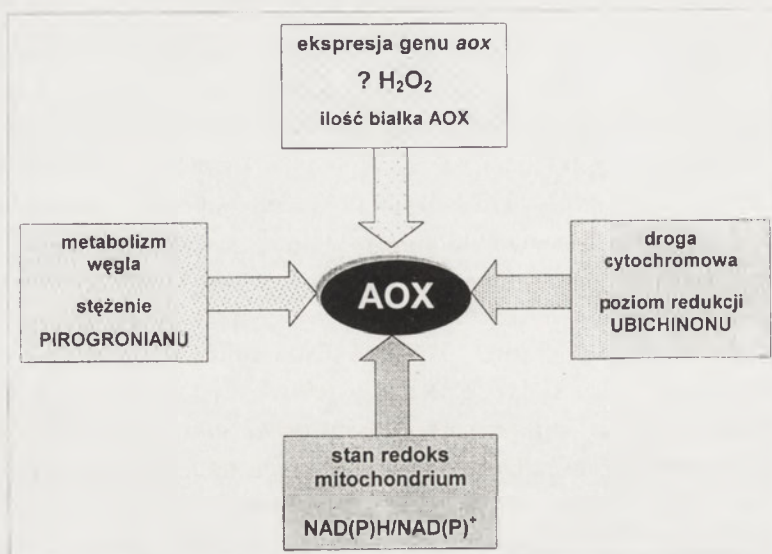
Oprócz ekspresji genów decydującej o ilości białka oksydazy alternatywnej, przepływ elektronów na drogę alternatywną zależy również od czynników związanych z metabolizmem oddechowym w mitochondriach. W ciągu ostatnich kilku lat intensywne badania prowadzone na izolowanych mitochondriach wykazały, że na poziomie białka, przepływ elektronów na drogę alternatywną jest regulowany przez: **stan redukcji enzymu** [67, 68], **stymulację aktywności oksydazy alternatywnej przez alfa-ketokwasy, w tym głównie pirogronian** [68-72], **poziom redukcji ubichinonu (Qr/Qt)** [23, 73-75] **oraz aktywność drogi cytochromowej** [6, 22, 76, 77]. Jednoczesne współdziałanie wymienionych powyżej czynników jest niezbędne w regulacji aktywności AOX w izolowanych mitochondriach (system *in vitro*), natomiast tylko niektóre z nich mają istotne znaczenie w regulacji aktywności AOX *in vivo* (Ryc. 3).

##### IV-2.1. Stan redukcji białka oksydazy alternatywnej

Oksydaza alternatywna może występować w wewnętrznej błonie mitochondriów jako homodimer w dwóch formach: związanej niekowalencyjnie (zredukowanej), bardziej aktywnej i związanej kowalencyjnie (utlenionej), mniej aktywnej [1, 67, 68]. Utleniona forma posiada masę cząsteczkową około 66 kDa, natomiast zredukowana, w zależności od gatunku rośliny od 32 do 39 kDa. Dodanie do izolowanych

mitochondriów czynników o właściwościach silnie redukujących (ditiotreitoliol) lub utleniających (diamid) powodowało swobodne przechodzenie oksydazy alternatywnej w formę zredukowaną lub utlenioną [67], co wskazywało na możliwość wzajemnej konwersji obu konformacyjnych form enzymu. Aktywna, zredukowana forma oksydazy alternatywnej posiada wyższe powinowactwo do zredukowanego ubichinonu [68] i może współzawodniczyć o elektrony z oksydazą cytochromową [71]. O stanie redukcji białka oksydazy alternatywnej może decydować stężenie zredukowanych nukleotydów pirydynowych (NAD(P)H) wewnątrz mitochondriów [2, 78]. Utlenianie cytrynianu, izocytrynianu lub jabłczanu prowadziło do wzrostu zawartości aktywnej oksydazy alternatywnej, natomiast metabolizm innych substratów oddechowych (bursztynianu, glicyny, 2-oksooglutaranu czy pirogronianu) nie powodował zmian zawartości zredukowanej oksydazy alternatywnej [79]. Zaproponowano, że oprócz NADH, również NADPH powstający w mitochondriach w wyniku aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej i/lub jabłczanowej może redukować białko oksydazy alternatywnej [78, 80] w powiązaniu z funkcjonowaniem układu tioredoksyna — reduktaza tioredoksyny [78, 81].

Techniką immunoblottingu wykazano, że oksydaza alternatywna występuje w mitochondriach izolowanych z korzeni fasoli. Zawartość białka AOX wzrasta w tkankach korzeni fasoli w warunkach deficytu fosforu [10]. W korzeniach fasoli oksydaza alternatywna występuje wyłącznie w aktywnej zredukowanej formie [10], a obserwowana w izolowanych mitochondriach forma utleniona [9] powstaje na skutek utlenienia białka AOX podczas procedury izolacji mitochondriów.



Ryc. 3. Czynniki regulujące aktywność oksydazy alternatywnej (AOX) w mitochondriach roślin wyższych. Przepływ elektronów drogą alternatywną zależy od ekspresji genu *aox* w jądrze komórkowym (regulacja na poziomie genu) oraz od wpływu czynników metabolicznych na aktywność zsyntetyzowanego białka (regulacja na poziomie białka). Zmodyfikowane według [2].

#### IV-2.2. Stymulacja aktywności oksydazy alternatywnej przez pirogronian

Oksydaza alternatywna w formie zredukowanej podlega aktywacji przez alfa-ketokwasy, głównie pirogronian [9, 68-71]. Stymulacja aktywności enzymu jest niezależna od metabolizmu oddechowego pirogronianu, co sugeruje bezpośrednie oddziaływanie allosteryczne pirogronianu z białkiem oksydazy alternatywnej. Analiza struktury białka oksydazy alternatywnej wskazuje, że miejsce wiązania pirogronianu do enzymu znajduje się po stronie macierzy mitochondrialnej, w obszarze reszt cysteinowych odpowiedzialnych za dimeryzację enzymu [38-40]. U roślin transgenicznych zmodyfikowanie białka oksydazy alternatywnej (brak odpowiednich reszt cysteinowych na N końcu polipeptydu) prowadziło do utraty zdolności oddziaływania enzymu z pirogronianem [40].

W izolowanych mitochondriach oksydaza alternatywna może być także aktywowana przez jabłczan i bursztynian [82-84]. W mitochondriach metabolizm jabłczanu przy udziale dehydrogenazy jabłczanowej dekarboksylującej zależnej od  $\text{NAD}^+$  (NAD-ME) prowadzi do powstawania pirogronianu. Bursztynian może być również przekształcany w pirogronian przy udziale kolejno: dehydrogenazy bursztynianowej, fumarazy i enzymu jabłczanowego (NAD-ME) [70]. W obecności pirogronianu oksydaza alternatywna staje się aktywna przy niższym stosunku stężenia zredukowanego ubichinonu (Qr) do stężenia całkowitego ubichinonu (Qt) [69, 70]. Zaproponowano, że pirogronian łącząc się z białkiem oksydazy alternatywnej obniża  $K_m$  reakcji enzymu ze zredukowanym ubichinonem (ubichinolem) [1, 68, 85]. Jednakże *in vitro* podanie sztucznych analogów ubichinonu do izolowanych mitochondriów oraz częściowo oczyszczonych preparatów białka AOX wykazało, że skutkiem oddziaływania pirogronianu był wzrost  $V_{\max}$  dla oksydazy alternatywnej, nie zaś podwyższenie powinowactwa enzymu do ubichinolu [86]. Wykorzystanie techniki otrzymywania odwróconych pęcherzyków mitochondrialnych (SMP) pozwoliło na precyzyjne określanie  $K_m$  dla pirogronianu w reakcji stymulacji aktywności oksydazy alternatywnej. Otrzymano wartości  $K_m$  dla pirogronianu (od około 4  $\mu\text{M}$  dla bulw batatów i 4,5  $\mu\text{M}$  dla liście soi do 50  $\mu\text{M}$  dla korzeni soi), przy których oksydaza alternatywna osiągała połowę swojej maksymalnej aktywności [70, 87]. Stężenia pirogronianu w ekstraktach z korzeni różnych gatunków roślin, w przeliczeniu na gram świeżej masy tkanki, wahały się w granicach 40-100 nmoli [88-90]. Pod wpływem

warunków stresowych, takich jak hipoksja, infekcja patogenna czy stosowanie antymycyny A, stężenie pirogronianu wzrastało do wartości 120-550 nmoli, w przeliczeniu na gram świeżej masy tkanki [48, 91, 92]. Szacunkowe stężenie pirogronianu w cytosolu może wynosić około 600  $\mu\text{M}$  [75], czyli blisko 12-150 razy więcej niż wynosi stała  $K_m$  dla pirogronianu w reakcji stymulacji aktywności AOX. Wobec tego przy założeniu, że stężenie pirogronianu w mitochondriach jest przynajmniej takie jak w cytosolu (a jest prawdopodobnie wyższe ze względu na aktywność enzymu jabłczanowego) oksydaza alternatywna w mitochondriach *in vivo* może być zawsze w pełni aktywowana [93].

Mitochondria izolowane z korzeni fasoli roślin kontrolnych bez dodanego pirogronianu charakteryzują się niską aktywnością AOX lub prawdopodobnie całkowitym brakiem aktywności AOX [10]. Wzrost aktywności AOX po dodaniu pirogronianu wskazuje, że potencjalna aktywność AOX w mitochondriach korzeni fasoli jest wysoka, gdy AOX jest w pełni zaktywowana. Mimo to udział oksydazy alternatywnej w oddychaniu jest prawdopodobnie niewielki [10]. Obniżone stężenie jonów fosforanowych w tkance korzeni fasoli powoduje znaczny wzrost odporności oddychania na cyjanek oraz wzrost aktywności oksydazy alternatywnej w izolowanych mitochondriach bez dodanego pirogronianu. Jednocześnie obserwowany jest wzrost aktywności enzymu jabłczanowego wytwarzającego wewnątrz mitochondriów pirogronian, który może aktywować oksydazę alternatywną [10].

#### IV-2.3. Poziom redukcji ubichinonu (Qr/Qt)

W łańcuchu oddechowym wspólnym substratem dla oksydazy cytochromowej i alternatywnej jest zredukowany ubichinon (ubichinol) [2]. Poziom redukcji ubichinonu, czyli stosunek stężenia zredukowanego ubichinonu (Qr) do całkowitego stężenia ubichinonu (Qt), (Qr/Qt), jest z jednej strony uwarunkowany aktywnością dehydrogenaz dostarczających elektrony z substratów oddechowych na ubichinon, a z drugiej strony aktywnością oksydaz, które przekazują elektrony z ubichinolu na tlen [73]. Opracowanie metody jednoczesnego pomiaru poziomu redukcji ubichinonu (Qr/Qt) i natężenia pobierania tlenu w izolowanych mitochondriach [94] zapoczątkowało badania regulacji przekazywania elektronów z ubichinolu na końcowe oksydazy łańcucha oddechowego. Pomiaru voltametryczne z wykorzystaniem tak zwanej „Q-elektrody” wykazały, że przepływ elektronów na oksydazę cytochromową w

izolowanych mitochondriach jest liniowo zależny od poziomu redukcji ubichinonu ( $Q_r/Q_t$ ), natomiast oksydaza alternatywna staje się aktywna dopiero, gdy ubichinon osiągnie wysoki poziom redukcji ( $Q_r/Q_t$ ) [94, 95]. Liniową zależność aktywności oksydazy alternatywnej od poziomu redukcji ubichinonu ( $Q_r/Q_t$ ) opisano jedynie dla roślin termogennych [95, 96]. U roślin nietermogennych, nieliniowa zależność aktywności oksydazy alternatywnej od poziomu redukcji ubichinonu ( $Q_r/Q_t$ ), zarówno w izolowanych mitochondriach jak i w całych tkankach, mogłaby wskazywać, że oksydaza alternatywna jest aktywna, gdy droga cytochromowa jest wysyciona elektronami na skutek dużego nagromadzenia substratów oddechowych [97-99].

Badania z zastosowaniem „Q-elektrody” [94] oraz ekstrakcja ubichinonu z całych tkanek lub izolowanych mitochondriów [23] pozwoliły opracować szereg modeli kinetycznych zależności aktywności dehydrogenaz i oksydaz łańcucha oddechowego od poziomu redukcji ubichinonu ( $Q_r/Q_t$ ) [11, 16, 77, 100]. Zasada tworzenia matematycznych modeli kinetycznych opiera się na założeniu, że nachylenie krzywej odpowiada zależności zmian aktywności oksydazy alternatywnej od zmian poziomu redukcji ubichinonu ( $Q_r/Q_t$ ). Szereg doświadczeń opisujących kinetykę dróg utleniających ubichinon wskazuje, że nachylenie krzywej dla zredukowanej oksydazy alternatywnej jest strome, a w pewnym obszarze (powyżej 10%  $Q_r/Q_t$ ) często zbliża się do zależności liniowej [68, 70, 71, 93, 101-103]. Interpretacje modeli kinetycznych dowodzą, że w obecności pirogronianu oraz przy występowaniu białka oksydazy alternatywnej w formie zredukowanej (aktywnej) nawet niewielkie zmiany  $Q_r/Q_t$  powodują duże zmiany aktywności oksydazy alternatywnej [93].

W mitochondriach izolowanych z korzeni fasoli poziom redukcji ubichinonu ( $Q_r/Q_t$ ) jest wysoki i wynosi około 40 % bez substratu oddechowego, natomiast w mitochondriach z korzeni fasoli roślin z obniżonym poziomem jonów fosforanowych wzrasta do wartości około 60 %. W mitochondriach izolowanych z korzeni fasoli oksydaza alternatywna jest aktywowana przez zredukowany ubichinon tylko w obecności pirogronianu, przy czym jest to zarówno pirogronian egzogeny, jak i endogeny, w przypadku roślin z obniżonym poziomem jonów fosforanowych [10].

#### IV-2.4. Aktywność drogi cytochromowej

Jeden z mechanizmów regulacji aktywności oksydazy alternatywnej zakłada, że zarówno stężenie jak

i aktywność enzymu zależą od zmian aktywności drogi cytochromowej [2]. Aktywność drogi cytochromowej jest uwarunkowana natężeniem procesów wytwarzania i zużywania ATP, przez co podlega regulacji metabolicznej przez adenylany [95]. Mechanizm ten, jak się wydaje, nie dotyczy oddychania przy udziale oksydazy alternatywnej [104]. Wobec tego, regulacja aktywności drogi alternatywnej przez zmiany aktywności drogi cytochromowej mogłaby być przykładem przystosowania metabolizmu oddechowego roślin do zmiennego zapotrzebowania na energię w różnych stanach rozwojowych i warunkach środowiskowych.

Wzrost oddychania przy udziale drogi alternatywnej w odpowiedzi na zahamowanie i/lub ograniczenie aktywności drogi cytochromowej obserwowano u roślin poddanych stresowi chłodu [52, 64, 105-107], w warunkach deficytu fosforu [7, 8, 104] oraz po zastosowaniu inhibitora kompleksu III łańcucha oddechowego [108]. Podczas rozwoju korzeni soi wraz ze spadkiem stężenia ADP i aktywności drogi cytochromowej obserwowano wzrost aktywności drogi alternatywnej w izolowanych mitochondriach i całych korzeniach [75]. W korzeniach trawy *Poa annula*, po przeniesieniu do warunków słabego oświetlenia, wzrost udziału drogi alternatywnej w oddychaniu również był związany ze spadkiem aktywności drogi cytochromowej [109].

Przepływ elektronów na drogę alternatywną zależy od aktywności drogi cytochromowej, ale tylko w warunkach, gdy oksydaza alternatywna jest aktywna (zredukowana) oraz związana allosterycznie z pirogronianem. Aktywność drogi cytochromowej oraz dostępność substratu AOX, zredukowanego ubichinonu, stanowią mechanizm regulujący aktywność oksydazy alternatywnej poprzez zmiany metaboliczne w łańcuchu oddechowym [22, 52, 71, 75, 109, 110]. Deficyt jonów fosforanowych wpływa na obniżenie oddychania i aktywności drogi cytochromowej [8, 10]. Obniżenie aktywności drogi cytochromowej powoduje wzrost poziomu redukcji ubichinonu i przepływ elektronów na zaktywowaną przez pirogronian drogę alternatywną [9, 10].

#### V. Uwagi końcowe

Oksydaza alternatywna obecna jest w każdej zbadanej dotąd roślinie i pojawia się niemal w każdym organie, zatem oprócz wytwarzania ciepła musi pełnić ważne funkcje metaboliczne. Hipoteza „przelewu” (*overflow*) [98] i nadmiaru siły redukcyjnej z powodzeniem funkcjonowała do roku 1995. Opisowała stany metaboliczne, w których droga alterna-

tywna może funkcjonować przy wysyczonej drodze cytochromowej (wzrost zawartości cukrów w komórce i ich intensywny metabolizm glikolityczny, wysoki ładunek energetyczny adenylanów) [97-99]. Obecnie wiadomo, że nawet przy niewysyczonej drodze cytochromowej, droga alternatywna może odbierać elektrony ze zredukowanego ubichinonu i uczestniczyć w oddychaniu [6, 76]. Warunki metaboliczne, w których spada stężenie ADP i aktywność oksydazy cytochromowej oraz wzrasta poziom redukcji ubichinonu (Qr/Qt), mogą prowadzić do stanu, w którym droga cytochromowa jest bliska wysycenia. Oksydaza alternatywna mogłaby w ten sposób nie tylko zapobiegać nadmiernej redukcji łańcucha oddechowego, ale również umożliwiać funkcjonowanie cyklu Krebsa [2, 109].

Według jednej z hipotez, fizjologiczną rolą oksydazy alternatywnej może być regulacja wytwarzania aktywnych form tlenu w komórkach [63, 64, 111]. Powstający w wyniku reakcji dysmutacji anionorodników ponadtlenkowych  $H_2O_2$  może odgrywać rolę czynnika indukującego syntezę AOX [32, 77, 111]. Podczas różnego rodzaju stresów biotycznych czy abiotycznych dochodzi do wzrostu zawartości AOX i oddychania z jej udziałem [59, 64, 99, 104]. Przy ograniczonej aktywności drogi cytochromowej i wzroście poziomu redukcji ubichinonu (Qr/Qt) dochodzi do zwiększonego wytwarzania aktywnych form tlenu [104, 112]. Oksydaza alternatywna, stabilizując poziom redukcji ubichinonu (Qr/Qt), może ograniczać powstawanie aktywnych form tlenu [63, 63, 104, 112-114].

Wzrost zawartości białka AOX i udziału AOX w oddychaniu jest wspólną odpowiedzią różnych gatunków roślin na działanie warunków stresowych. Stresy mogą być wywołane czynnikami biotycznymi i/lub abiotycznymi, takimi jak: zranienia, atak patogenów, cyjanek, tlenek azotu, wysokie stężenia  $CO_2$  i soli, niedobór składników mineralnych, anoksja, susza, niska/wysoka temperatura [2]. W ciągu ostatnich dziesięciu lat, badania regulacji aktywności oksydazy alternatywnej prowadzone *in vitro*, na izolowanych mitochondriach, wykazały, że jest to proces skomplikowany. Co więcej, nie wiadomo dokładnie, które z czynników regulujących aktywność AOX *in vitro* mają rzeczywiście znaczenie *in vivo*, w tkankach [109, 115]. Regulacja aktywności oksydazy alternatywnej *in vivo* zależy bowiem od współdziałania szeregu czynników metabolicznych. Izolowane mitochondria są łatwiejszym do badań układem *in vitro*, natomiast otrzymane wyniki należy zawsze odnosić do metabolizmu całej rośliny *in vivo* uwarunkowanego stanem rozwojowym i czynnikami

środowiskowymi. Badania regulacji aktywności AOX *in vivo* są nieliczne [10, 75, 93, 109, 115] i trudne do realizacji (ze względu na ograniczenia kontrolowanych modyfikacji reakcji zachodzących w łańcuchu oddechowym w nienaruszonej tkance). Perspektywa poznania mechanizmu regulacji AOX *in vivo* wiąże się obecnie z coraz częstszym otrzymywaniem roślin transgenicznych o zróżnicowanym stężeniu białka AOX w komórkach.

## Podziękowanie

Praca częściowo finansowana z projektu badawczego Nr 6 P04C 065 15 Komitetu Badań Naukowych.

Artykuł otrzymano 23 sierpnia 2001 r.

Zaakceptowano do druku 23 października 2001 r.

## Piśmiennictwo

1. Siedow JN, Umbach AL (1995) *Plant Cell* 7: 821-831
2. Vanlerberghe GC, McIntosh L (1997) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 703-734
3. Rychter AM (1996) *Post Biochem* 42: 268-276
4. Rychter AM (1982) *Post Biochem* 28: 89-111
5. Ordentlich A, Linzer RA, Raskin I (1991) *Plant Physiol* 97: 1545-1550
6. Day DA, Krab K, Lambers H, Moore AL, Siedow JN, Wagner AM, Wiskich JT (1996) *Plant Physiol* 110: 1-2
7. Rychter AM, Mikulska M (1990) *Physiol Plant* 79: 663-667
8. Rychter AM, Chauveau M, Bomsel JL, Lance C (1992) *Physiol Plant* 84: 80-86
9. Juszczyk IM, Malusa E, Rychter AM (1998) W: Møller IM, Gardeström P, Glimeilius K, Glaser E (red) *Plant Mitochondria: From Gene to Function*. Backhuys Publishers, Leiden, str. 481-485
10. Juszczyk IM, Wagner AM, Rychter AM (2001) *Physiol Plant* 113: 185-192
11. Siedow JN, Moore AL (1993) *Biochim Biophys Acta* 1142: 165-174
12. Schonbaum GR, Bonner W, Storey BT, Bahr JT (1971) *Plant Physiol* 47: 124-128
13. Grover SD, Laties GG (1978) W: Ducet G, Lance C (red) *Plant Mitochondria*. Elsevier Science BV, Amsterdam, str. 259-266
14. Siedow JN, Grivin ME (1980) *Plant Physiol* 65: 669-674
15. Millar AH, Bergersen FJ, Day DA (1994) *Plant Physiol Biochem* 32: 847-852
16. Ribas-Carbó M, Berry JA, Azcón-Bieto A, Siedow JN (1994) *Biochim Biophys Acta* 1188: 205-212
17. Moore AL, Siedow JN (1991) *Biochim Biophys Acta* 1059: 121-140
18. Laties GG (1982) *Annu Rev Plant Physiol* 33: 519-555
19. Wagner AM, Wagner MJ, Moore AL (1998) *Plant Physiol* 117: 1501-1506
20. Bahr JT, Bonner WD (1973) *J Biol Chem* 248: 3446-3450
21. Atkin OK, Villar R, Lambers H (1995) *Plant Physiol* 108: 1179-1183
22. Ribas-Carbó M, Berry JA, Yakir D, Gilles L, Robinson SA, Lennon AM, Siedow JN (1995a) *Plant Physiol* 109: 829-837
23. Wagner AM, Wagner MJ (1995) *Plant Physiol* 108: 277-283
24. Guy RD, Berry JA, Fogel ML, Hoering TC (1989) *Planta* 177: 483-491
25. Guy RD, Berry JA, Fogel ML, Turpin DH, Weger HG (1992) W: Lambers H, van der Plas LHW (red) *Molecular,*

- Biochemical and Physiological Aspects of Plant Respiration*. Academic, The Hague, str. 443-453
26. Robinson SA, Yakir D, Ribas-Carbó M, Giles L, Osmond CB, Siedow JN, Berry JA (1992) *Plant Physiol* **100**: 1087-1091
  27. Elthon TE, McIntosh L (1986) *Plant Physiol* **82**: 1-6
  28. Elthon TE, McIntosh L (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 8399-8403
  29. Elthon TE, Nickels RL, McIntosh L (1989) *Plant Physiol* **89**: 1311-1317
  30. Rhoads DM, McIntosh L (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2122-2126
  31. Siedow JN, Whelan J, Kearns A, Wiskich JT, Day DA (1992) W: Lambers H, van der Plas LHW (red) *Molecular, Biochemical and Physiological Aspects of Plant Respiration*. Academic, Amsterdam, str. 19-27
  32. McIntosh L (1994) *Plant Physiol* **105**: 781-786
  33. Andersson ME, Nordlund P (1999) *FEBS Lett* **449**: 17-22
  34. Siedow JN, Umbach AL (2000) *Biochim Biophys Acta* **1459**: 432-439
  35. Moore AL, Umbach AL, Siedow JN (1995) *J Bioenerg Biomembr* **27**: 367-377
  36. Siedow JN, Umbach AL, Moore AL (1995) *FEBS Lett* **362**: 10-14
  37. Berthold DA, Andersson ME, Nordlund P (2000) *Biochim Biophys Acta* **1460**: 241-254
  38. Rhoads DM, Umbach AL, Sweet CR, Lennon AM, Rauch GS, Siedow JN (1998) *J Biol Chem* **273**: 30750-30756
  39. Vanlerberghe GC, McIntosh L, Yip JYH (1998) *Plant Cell* **10**: 1551-1560
  40. Djajanegara I, Holtzapffel R, Finnegan PM, Hoefnagel MHN, Berthold DA, Wiskich JT, Day DA (1999) *FEBS Lett* **454**: 220-224
  41. Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, Coupland G, Kuntz M (1999) *Plant Cell* **11**: 57-68
  42. Wu D, Wright DA, Wetzels C, Voytas DF, Rodermel S (1999) *Plant Cell* **11**: 43-55
  43. Raskin I, Turner IM, Melander WR (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2214-2218
  44. Kapulnik Y, Yalpani L, Raskin I (1992) *Plant Physiol* **100**: 1921-1926
  45. Rhoads DM, McIntosh L (1992) *Plant Cell* **4**: 1131-1139
  46. Rhoads DM, McIntosh L (1993) *Plant Mol Biol* **21**: 615-624
  47. Vanlerberghe GC, McIntosh L (1996) *Plant Physiol* **111**: 589-595
  48. Simons BH, Millenaar FF, Mulder L, Van Loon LC, Lambers H (1999) *Plant Physiol* **120**: 529-538
  49. Obenland D, Diethelm R, Shibles R, Stewart CR (1990) *Plant Cell Physiol* **31**: 897-901
  50. Stewart CR, Martin BA, Reding L, Cerwick S (1990) *Plant Physiol* **92**: 761-766
  51. Moynihan MR, Ordentlich A, Raskin I (1995) *Plant Physiol* **108**: 995-999
  52. Ribas-Carbó M, Aroca R, González-Meler MA, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M (2000) *Plant Physiol* **122**: 194-204
  53. Hisher C, McIntosh L (1990) *Plant Physiol* **93**: 312-318
  54. Cruz-Hernandez A, Gomez-Lim MA (1995) *Planta* **197**: 569-576
  55. McCabe TC, Finnegan PM, Millar AH, Day DA, Whelan J (1998) *Plant Physiol* **118**: 675-68
  56. Kearns A, Whelan J, Young S, Elthon TE, Day DA (1992) *Plant Physiol* **99**: 712-717
  57. Benichou P, Calvayrac R, Claisse M (1988) *Planta* **175**: 23-32
  58. Sakajo S, Minagawa N, Komiyama T, Yoshimoto A (1991) *Biochim Biophys Acta* **1090**: 102-108
  59. Vanlerberghe GC, McIntosh L (1992) *Plant Physiol* **100**: 1846-1851
  60. Vanlerberghe GC, McIntosh L (1994) *Plant Physiol* **105**: 867-874
  61. Boveris A, Cadenas E (1982) W: Oberley LW (red) *Superoxide Dismutase*. CRC Press, Boca Raton, str. 15-30
  62. Longo VD, Gralla EB, Valentine JS (1996) *J Biol Chem* **271**: 12275-12780
  63. Møller IM (2001) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 561-591
  64. Purvis AC, Shewfelt RL (1993) *Physiol Plant* **88**: 712-718
  65. Raskin I, Ehmann A, Melander WR, Meeuse BJD (1987) *Science* **237**: 1601-1602
  66. Lennon AM, Neuenschwander UH, Ribas-Carbó M, Giles L, Ryals JA, Siedow JN (1997) *Plant Physiol* **115**: 783-791
  67. Umbach AL, Siedow JN (1993) *Plant Physiol* **103**: 845-854
  68. Umbach AL, Wiskich JT, Siedow JN (1994) *FEBS Lett* **348**: 181-184
  69. Millar AH, Wiskich JT, Whelan J, Day DA (1993) *FEBS Lett* **329**: 259-262
  70. Millar AH, Hoefnagel MHN, Day DA, Wiskich JT (1996) *Plant Physiol* **111**: 613-618
  71. Hoefnagel MHN, Millar AH, Wiskich JT, Day DA (1995) *Arch Biochem Biophys* **318**: 394-400
  72. Hoefnagel MHN, Wiskich JT (1998) *Arch Biochem Biophys* **355**: 262-270
  73. van den Bergen CWM, Wagner AM, Krab K, Moore AL (1994) *Eur J Biochem* **226**: 1071-1078
  74. Ribas-Carbó M, Wiskich JT, Berry JA, Siedow JN (1995b) *Arch Biochem Biophys* **317**: 156-160
  75. Millar AH, Atkin OK, Menz RI, Henry B, Farquhar G, Day DA (1998) *Plant Physiol* **117**: 1083-1093
  76. Millar AH, Atkin OK, Lambers H, Wiskich JT, Day DA (1995) *Physiol Plant* **95**: 523-532
  77. Wagner AM, Krab K (1995) *Plant Physiol* **95**: 318-325
  78. Møller IM, Rasmusson AG (1998) *Trends Plant Sci* **3**: 21-27
  79. Vanlerberghe GC, Day DA, Wiskich JT, Vanlerberghe AE, McIntosh L (1995) *Plant Physiol* **109**: 353-361
  80. Rasmusson AG, Møller IM (1990) *Plant Physiol* **94**: 1012-1018
  81. Konrad A, Banze M, Follmann H (1996) *J Plant Physiol* **149**: 317-321
  82. Wagner AM, Kraak MHS, van Emmerik WAM, van der Plas LHW (1989) *Plant Physiol Biochem* **27**: 837-845
  83. Linden AC, Arkelund HE (1993) *Physiol Plant* **87**: 134-141
  84. Wagner AM, van den Bergen CWM, Wincencjusz H (1995) *Plant Physiol* **108**: 1035-1042
  85. Day DA, Millar AH, Wiskich JT, Whelan J (1994) *Plant Physiol* **106**: 1421-1427
  86. Hoefnagel MHN, Rich PR, Zhang Q, Wiskich JT (1997) *Plant Physiol* **115**: 1145-1153
  87. Finnegan PM, Whelan J, Millar AH, Zhang Q, Smith MK, Wiskich JT, Day DA (1997) *Plant Physiol* **114**: 455-46
  88. Day DA, Lambers H (1983) *Physiol Plant* **58**: 155-160
  89. Kato-Noguchi H (1997) *Phytochemistry* **45**: 225-227
  90. Wagner AM, Wagner MJ (1997) *Plant Physiol* **115**: 617-622
  91. Good AG, Muench DG (1993) *Plant Physiol* **101**: 1163-1168
  92. Vanlerberghe GC, Vanlerberghe AE, McIntosh L (1997) *Plant Physiol* **113**: 657-66
  93. Millenaar FF, Benschop JJ, Wagner AM, Lambers H (1998) *Plant Physiol* **118**: 599-607
  94. Moore AL, Dry IB, Wiskich JT (1988) *FEBS Lett* **235**: 76-80
  95. Dry IB, Moore AL, Day DA, Wiskich JT (1989) *Arch Biochem Biophys* **273**: 148-157
  96. Day DA, Dry IB, Soole KL, Wiskich JT, Moore AL (1991) *Plant Physiol* **95**: 948-953
  97. Lambers H (1980) *Plant Cell Environ* **3**: 293-302
  98. Lambers H (1982) *Physiol Plant* **55**: 478-485
  99. Lambers H (1985) W: Douce CR, Day DA (red) *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer-Verlag, Berlin, str. 444-448
  100. James AT, Venables VN, Dry IB, Wiskich JT (1994) *Biometrica* **81**: 219-235
  101. Day DA, Whelan J, Millar AH, Siedow JN, Wiskich JT (1995) *Aust J Plant Physiol* **22**: 497-509

102. Hoefnagel MHN, Wiskich JT (1996) *Plant Physiol* **110**: 1329-1335
103. Millar AH, Finnegan PM, Whelan J, Drevon JJ, Day DA (1997) *Plant Cell Environ* **20**: 1273-1282
104. Parsons HL, Yip JYH, Vanlerberghe GC (1999) *Plant Physiol* **121**: 1309-1320
105. Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR (1994) *Plant Cell* **6**: 65-74
106. Wagner AM (1995) *FEBS Lett* **368**: 339-342
107. De Santis A, Landi P, Genchi G (1999) *Plant Physiol* **119**: 743-754
108. Mizutami A, Miki N, Nanba K (1994) *Pest Biochem Physiol* **60**: 187-194
109. Millenaar FF, Roelofs R, González-Meler MA, Siedow JN, Wagner AM, Lambers H (2000) *Plant J* **23**: 623-632
110. Ribas-Carbó M, Lennon AM, Robinson SA, Giles R, Berry JA, Siedow JN (1997) *Plant Physiol* **113**: 903-911
111. Wagner AM, Moore AL (1997) *Biosci Rep* **17**: 319-333
112. Purvis AC (1997) *Physiol Plant* **100**: 165-170
113. Purvis AC, Shewfelt RL, Gegogaine W (1995) *Physiol Plant* **94**: 743-749
114. Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8271-8276
115. Millenaar FF, González-Meler MA, Fiorani F, Welschen R, Ribas-Carbó M, Siedow JN, Wagner AM, Lambers H (2001) *Plant Physiol* **126**: 376-387

# Mechanizmy przeciwresorpcyjnego działania bisfosfonianów w chorobach układu kostnego

## Mechanisms of antiresorptive action of bisphosphonates in bone diseases

EWA BAŁCZEWSKA<sup>1</sup>, PIOTR BAŁCZEWSKI<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Proces przebudowy kości
- III. Mechanizm fizyko-chemicznego działania bisfosfonianów
- IV. Mechanizmy bezpośredniego działania bisfosfonianów
- V. Mechanizmy pośredniego działania bisfosfonianów
- VI. Podsumowanie

**Wykaz stosowanych skrótów:** BP — bisfosfonian; COX — 2-cyklooksygenaza 2; CMTC — chemicznie modyfikowana tetracyklina; CT — kalcytonina; FPP — farnazylo-difosforan; GGPP — geranylogeranylo-difosforan; GM — CFU — szereg granulocytarno — makrofagowy; hGH — ludzki hormon wzrostu; IFN $\gamma$  — interferon  $\gamma$ ; IGF<sub>1</sub> — insulinopodobny czynnik wzrostu 1; IL-1, IL-6, IL-11, IL-17 — interleukiny 1, 6, 11 i 17; IPP — izopentenylo-difosforan; LT — leukotrien; MMP-1, MMP-2 — metaloproteiny 1 i 2; MT — MMP — metaloproteinaza typu membranowego; OB — osteoblast; OC — osteoklast; ODF — osteoklastyczny czynnik różnicujący; 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> — 1,25-dihydroksywitamina D<sub>3</sub>; OPG — osteoprotegeryna; PGE<sub>2</sub> — prostaglandyna E<sub>2</sub>; PTH — parathormon; PTHrp — białko pokrewne parathormonowi; RANK — transmembranowy receptor na prekursorowych komórkach osteoklastycznych; RANKL — transmembranowy ligand na osteoklastycznych komórkach zrębu; T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> — hormony tarczycy; TC — tetracyklina; TGF $\alpha$  i TGF $\beta$  — transformujące czynniki wzrostu  $\alpha$  i  $\beta$ ; TIMP — tkankowy inhibitor metaloproteiny; TNF — czynnik martwicy nowotworów.

### I. Wprowadzenie

Bisfosfoniany (Ryc. 1, I) są syntetycznymi analogami fizjologicznie występujących pirofosforanów

### Contents:

- I. Introduction
- II. Bone turnover process
- III. Mechanism of physicochemical bisphosphonates action
- IV. Mechanisms of direct bisphosphonates action
- V. Mechanisms of indirect bisphosphonates action
- VI. Summary

(Ryc. 1, II). Struktura chemiczna bisfosfonianów znana jest od roku 1865 [1], ale pierwsza koncepcja użycia ich jako inhibitorów resorpcji kości powstała w laboratorium Herberta Fleischera w 1968 roku [2].

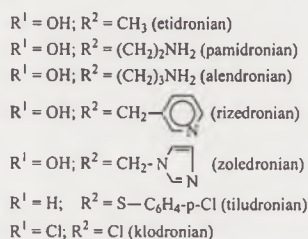
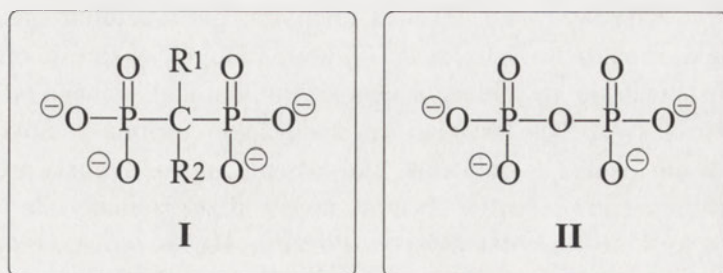
Bisfosfoniany (BP) zawierają dwa ugrupowania fosfonianowe połączone z tym samym, centralnym atomem węgla, tworząc strukturę P-C-P. Dla podkreślenia tego faktu stosuje się też nazwę geminalne bisfosfoniany lub metylenobisfosfoniany. Każde z ugrupowań fosfonianowych zawiera tetrakoordynacyjny atom fosforu oraz jedno pojedyncze wiązanie fosfor-węgiel, dwa pojedyncze wiązania fosfor-tlen oraz jedno podwójne wiązanie fosfor-tlen. Zgodnie z obowiązującą nomenklaturą chemiczną należy zaniechać stosowania nieprawidłowego nazewnictwa: bifosfoniany, difosfoniany oraz dwufosfoniany. Bisfosfoniany są pochodnymi dość mocnego kwasu metylenobisfosfonowego. Kliniczne zastosowanie mają jego sole disodowe. Ich struktura, właściwości i działanie zostały opisane szerzej w innej pracy przeglądowej [3]. Obecnie znanych jest około 2500 struktur bisfosfonianowych (baza związków i reakcji chemicznych Beilstein Cross Fire do 11,2000), z których klodronian, etidronian, pamidronian, alendronian, tiludronian oraz najnowszej generacji rizedronian i ibandronian (sole disodowe) znalazły zastosowanie jako leki. Co najmniej jeden z siedmiu wymienionych leków bisfosfonianowych jest dopuszczony do sprzedaży przynajmniej w jednym z 80 państw

<sup>1</sup>Dr n. med., Zakład Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej i Przyzębia, Instytut Stomatologii Akademii Medycznej w Łodzi, 92-213 Łódź, ul. Pomorska 251; <sup>2</sup>doc. dr hab., Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Polska Akademia Nauk, 90-363 Łódź, ul. Sienkiewicza 112; E-mail: pbalczew@bilbo.cbmm.lodz.pl



świata [2]. Natomiast neridronian, olpadronian, inkadronian i zoledronian są na etapie zaawansowanych badań klinicznych [2, 4].

przez fosfatazy w przewodzie pokarmowym i uniemożliwiało podawanie ich drogą dojelitową. Podobnie jak pirofosforany, bisfosfoniany zapobiegały do-



Ryc. 1. Bisfosfoniany (I) jako węglowe analogi naturalnych pirofosforanów (II).

W strukturze bisfosfonianów można wyróżnić charakterystyczne fragmenty odpowiedzialne za swoistą aktywność biologiczną. Dwa ugrupowania oksyanionowe są odpowiedzialne za silne wiązania bisfosfonianów z kationami metali, w tym głównie wapnia, co powoduje, że miejscem selektywnej kumulacji bisfosfonianów są hydroksyapatyty tkanki kostnej. Grupa hydroksylowa  $R^1 = \text{OH}$  przy atomie węgla C1 wzmacnia wiązanie bisfosfonianów z jonami wapnia poprzez wiązania trójzębne. Drugi z podstawników  $R^2$  stanowi łańcuch węglowy (1-3 atomów węgla) zakończony atomem azotu grupy aminowej lub pierścienia heterocyklicznego (jak pirydyna w rizedronianie lub imidazol w zoledronianie) [3]. Podstawnik  $R^2$  jest w decydującym stopniu odpowiedzialny za właściwości i aktywność biologiczną. Na przykład, antyresorpcyjna aktywność zoledronianu jest 10000 razy większa, alendronianu 1000 razy, pamidronianu 100 razy, a klodronianu 10 razy większa *in vivo* i *in vitro*, niż historycznie pierwszego zsyntezowanego etidronianu [2, 4]. Jedynie klodronian i tiludronian nie mają ani grupy hydroksylowej ani łańcucha węglowego przy centralnym atomie węgla C1, a etidronian zamiast dłuższego łańcucha węglowego  $R^2$  ma grupę metylową [3]. Klodronian, tiludronian i etidronian zaliczane są do grupy fosfonianów o słabszej aktywności przeciwresorpcyjnej.

Wiązanie P-C-P jest odporne na chemiczną i enzymatyczną hydrolizę oraz na działanie bardzo wielu reagentów chemicznych. Fakt ten legł u podstaw koncepcji zastosowania bisfosfonianów, początkowo jako leków zapobiegających procesom wapnienia tkanek miękkich, zamiast pirofosforanów, których labilne wiązanie P-O-P było łatwo hydrolizowane

świadczalnie wywołanym zwapnieniom naczyń krwionośnych, nerek i serca, zmniejszały akumulację cholesterolu, elastyny i kolagenu, a także, w większym stężeniu, hamowały proces mineralizacji kości, chrząstki i zębiny, co niekiedy mogło być efektem niekorzystnym [2, 5, 6]. Głównym ich działaniem jest jednak hamowanie resorpcji kości i dlatego bisfosfoniany znalazły zastosowanie w leczeniu choroby Pageta, osteoporozy (głównie post i perimenopauzalnej), szpiczaka, osteolitycznej hiperkalcemii w przebiegu chorób nowotworowych, nowotworowych przerzutów do kości, pierwotnej nadczynności przytarczyc, a także reumatoidalnego zapalenia stawów, w którym stosowane są jako środki przeciwzapalne [2, 4-18]. Uważa się, że bisfosfoniany należą do grupy leków bezpiecznych, gdyż nie wykryto dotychczas ich interakcji z innymi lekami, a wszystkie testy na ich działanie teratogenne, mitogenne i kancerogenne wypadły ujemnie [6]. Mechanizm działania stosowanych dotychczas leków bisfosfonianowych jest złożony i nie do końca poznany, zwłaszcza na poziomie molekularnym. Niniejszy artykuł przedstawia najnowsze poglądy na ten temat w oparciu o piśmiennictwo z lat 1966-2000.

## II. Proces przebudowy kości

Przedstawienie mechanizmów działania bisfosfonianów [19-57] wymaga krótkiego omówienia procesów przebudowy kości, czynników oddziałujących na osteoklasty i osteoblasty, czyli komórki, które odgrywają w tej przebudowie zasadniczą rolę oraz sposobu komunikowania się osteoblastów z osteoklastami.

Szkielet ludzki obok funkcji podporowej stanowi rezerwuuar wapnia i dostarcza go w takiej ilości do krwi, aby jego stężenie w osoczu utrzymywało się w prawidłowych granicach 90-106 mg/L [6]. Utrzymanie wartości tego stężenia umożliwia stała, regulowana potrzebami przebudowa kości, która składa się z dwóch przeciwstawnych procesów: osteoklastycznej resorpcji kości — procesu, w którym wapń uwalniany jest do krwioobiegu i osteoblastycznego tworzenia kości — procesu wiążącego wapń w kości [6]. W homeostazie wapniowej, oprócz kości istotną rolę odgrywają jelita i nerki, gdzie odbywa się wchłanianie i wydalanie wapnia. Cykl przebudowy kości zbitnej (korowej) u zdrowego człowieka wynosi 100 dni. Cykl przebudowy kości beleczkowej (gąbczastej), stanowiącej 20% masy kości, wynosi 200 dni. W skład kości wchodzi składniki nieorganiczne, które stanowią 65% [w tym 95% to hydroksyapatyty —  $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$ ] oraz składniki organiczne stanowiące 35% masy kości (w tym 93% to macierz kostna poprzeplatana włóknami kolagenu typu I, 5% stanowią białka niekolagenowe i proteoglikany, a 2% składniki komórkowe — osteoblasty, osteoklasty i osteocyty [6]).

Osteoblasty są małymi (20-30 mikrometrów), jednojądrowymi komórkami, odpowiedzialnymi za proces osteogenezy kości. Czynniki stymulującymi wywodzące się z komórek zrębu preosteoblasty, wczesne osteoblasty jak i ich dojrzałe formy są  $\text{TGF}\beta$ ; PTH;  $\text{T}_3$ ,  $\text{T}_4$ ;  $\text{PGE}_2$  (w stężeniach rzędu  $10^{-9}$ - $10^{-7}$  mol/L), aktywne metabolity 1,25-dihydroksy-witamina  $\text{D}_3$ , hGH, IGF-1, estrogeny (Ryc. 2). Pobudzone osteoblasty wydzielają składniki niezmineralizowanej macierzy kostnej (osteoid), takie jak tropokolagen, proteoglikany, białka niekolagenowe (osteonektynę, osteokalcynę, osteopontynę), morfogenetyczne białka kości oraz enzymy (np. fosfatazę zasadową, kolagenazę, aktywator plazminogenu). Na skutek odkładania się fosforanu wapnia, osteoid ulega w ciągu 5-10 dni mineralizacji, a osteoblasty ulegają zatopieniu w wyprodukowanym przez siebie osteoidzie i przekształcają się w osteocyt.

Osteoklasty są dużymi wielojądrowymi komórkami wywodzącymi się z hematopoetycznych, prekursorowych komórek szeregu granulocytarno-makrofażowego GM-CFU, odpowiedzialnymi za resorpcję kości. Mają pomarszczoną, grzebieniową powierzchnię tworzącą liczne wypustki, które ściśle przylegają do powierzchni resorbowanej kości. Rola integryn w procesie adhezji i migracji tych komórek została omówiona w innym artykule przeglądowym [58]. Pojedynczy osteoklast niszczy kość tworząc pod sobą wyżłobienie (zatoka Howshipa), do odbu-

dowy którego wymagana jest obecność około 150 aktywnych osteoblastów. Osteoklasty są pobudzane przez interleukiny: IL-1, IL-6 i IL-11;  $\text{TGF}\alpha$ , TNF, LT, PTH i PTHrp oraz przez ostatnio odkrytą interleukinę IL-17, która indukuje ekspresję mRNA osteoklastycznego czynnika różnicującego (ODF). ODF jest białkiem związanym z błoną komórkową osteoblastów. Białko to przekazuje sygnały prekursorom osteoklastów, aby te przekształcały się w dojrzałe osteoklasty. Ponadto IL-17 zwiększa zależną od COX-2 syntezę  $\text{PGE}_2$  [60]. Osteoklasty są hamowane przez kalcytoninę (CT), estrogeny,  $\text{TGF}\beta$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{IFN}\gamma$ . Innym ważnym supresorem tworzenia i aktywności dojrzałych osteoklastów, a także inhibitorem proliferacji osteoblastów jest tlenek azotu (NO) w wysokich stężeniach, indukowanych przez prozapalne cytokiny  $\text{IFN}\gamma$ , TNF i IL-1. Natomiast w niskich stężeniach tlenek azotu stymuluje namnażanie osteoblastów. Ważnym czynnikiem skomplikowanego procesu komunikowania się osteoblastu z osteoklastem jest IL-6, która wydzielona przez pobudzone osteoblasty daje sygnał osteoklastom do rozpoczęcia procesu resorpcji. Pobudzone osteoklasty uruchamiają pompę protonową, która wydziela jony wodorowe silnie zakwaszające mikrośrodowisko pod komórką i tym samym inicjuje rozpuszczanie się hydroksyapatytu. Wzrost stężenia jonów wapnia i dalszy spadek pH powodują, że osteoklast odrywa się od zresorbowanej kości, migruje do czystej strefy i będąc częściowo tylko przytwierdzonym do powierzchni kości zostawia za sobą, w drodze do nowego miejsca, powierzchniowo wytrawioną tzw. ślimaczą ścieżkę („snail track”) [4]. Część organiczna macierzy kostnej pod osteoklastem jest trawiona przez zaktywowane proteazy, fosfatazę kwaśną i inne enzymy lizosomalne. Dokładniejsze informacje dotyczące fizjologicznej i patologicznej przebudowy kości i jej regulatorów można znaleźć w literaturze monograficznej, np. [6, 7].

Ostatnie znaczące osiągnięcia w zrozumieniu molekularnego mechanizmu wzajemnego oddziaływania pomiędzy osteoblastycznymi komórkami zrębu i hematopoetycznymi prekursorami komórek osteoklastycznych to: 1) odkrycie osteoprotegeryny (OPG), naturalnie występującego białka o silnej aktywności pobudzającej osteoklastogenezę, 2) wyizolowanie transmembranowego ligandu RANKL znajdującego się na osteoblastycznych komórkach zrębu, który wiąże się z transmembranowym receptorem RANK na prekursorowych komórkach osteoklastycznych [13]. Oddziaływanie RANK/RANKL inicjuje proces sygnalizacji i kaskadę ekspresji genowej, która kończy się zróżnicowaniem i dojrzewaniem

niem prekursorowych komórek osteoklastycznych do aktywnych osteoklastów, zdolnych do resorpcji kości. OPG działa jako receptor pułapkowy. Łącząc się z ligandem RANKL, OPG blokuje możliwość oddziaływania z receptorem RANK, hamując w ten sposób rozwój osteoklastów. Hormony kalcytropowe (PTH, witamina D<sub>3</sub>), PGE<sub>2</sub> i cytokiny (IL-11), pobudzają osteoklastogenezę poprzez dwójstronne oddziaływanie hamujące produkcję OPG i pobudzając produkcję RANKL. Estrogeny hamują produkcję RANKL, a tym samym stymulowaną przez RANKL osteoklastogenezę. Nie jest do końca jasna różnica pomiędzy białkami ODF i RANKL. Odkrycie OPG oraz oddziaływań RANK/RANKL/OPG doprowadziło do pierwszych badań klinicznych OPG jako leku przeciw osteoporozie. Brak jest na razie badań dotyczących roli, jaką bisfosfoniany mogą odgrywać w opisanym mechanizmie.

### III. Mechanizmy fizykochemicznego działania bisfosfonianów

Podstawą uznania fizykochemicznych mechanizmów działania bisfosfonianów [4, 18, 38, 51, 56] była obserwacja, że podobnie jak pirofosforany (Ryc. 1, II), bisfosfoniany (Ryc. 1, I) cechuje *in vitro* wysokie powinowactwo do jonów wapnia. Powoduje to, że bisfosfoniany silnie wiążą się z powierzchnią kryształów fosforanu wapnia, stanowiących główny składnik naturalnych hydroksyapatytów, hamując dalsze tworzenie tych kryształów poprzez zablokowanie aktywnych centrów krystalizacji. W wyniku tego procesu bisfosfoniany hamują agregację i przekształcanie się bezpostaciowego fosforanu wapnia w krystaliczny, a także hamują rozpuszczanie się już utworzonych kryształów. Na tej podstawie przyjęto, że bisfosfoniany mogą zaporowo chronić kość przed "rozpuszczaniem". Omówione procesy fizykochemiczne zachodzą w przypadku stosowania dużych stężeń bisfosfonianów pierwszej generacji, np. etidronianu. Odkrycie silniej działających od niego bisfosfonianów (alendronianu, pamidronianu i zolendronianu), stosowanych w wielokrotnie mniejszych dawkach, musiało nasuwać przypuszczenia, że właściwości leczniczych tych związków nie należy tłumaczyć jedynie poprzez procesy fizykochemiczne, w których one uczestniczą [38].

### IV. Mechanizmy bezpośredniego działania bisfosfonianów

Zakłada się, że w mechanizmach bezpośredniego działania bisfosfonianów wchłonięcie bisfosfonianu

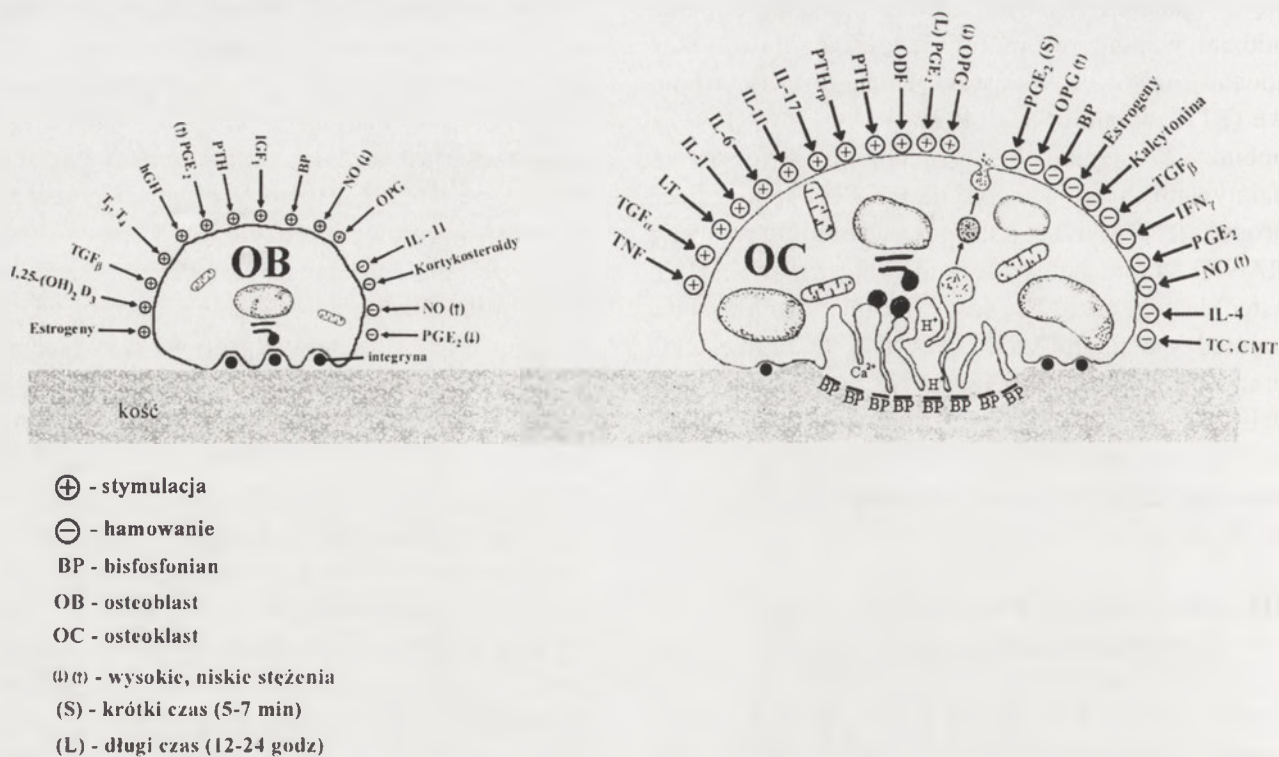
przez osteoklast następuje na drodze endocytozy, co doprowadza do zakłócenia metabolizmu komórkowego i apoptozy osteoklastu.

Bisfosfoniany po podaniu doustnym są u człowieka wchłaniane w jelicie cienkim zaledwie w kilku procentach (etidronian 1-9%, kłodronian 2%). Z tego 20-50% (etidronian) jest odkładane w kości, a pozostała część jest wydalana z moczem w postaci niezmienionej [6,28]. Można je również podawać we wlewach kroplowych dożylnych. Okres półtrwania krążących bisfosfonianów jest bardzo krótki, rzędu kilku minut. Badania izotopowe wykazały, że bisfosfoniany lokują się selektywnie pod osteoklastem [21, 43] i łączą się z jonami wapnia hydroksyapatytu. Oddziaływanie bisfosfonianów i jonów wapnia były przedmiotem obliczeń *ab initio* (na przykładzie kłodronianu), które posłużyły dalej do opracowania map potencjału elektrostatycznego tych oddziaływań, pomocnych przy konstruowaniu nowych, efektywnie działających bisfosfonianów [47].

W czasie procesu przebudowy kości bisfosfonian zostaje zatopiony w osteoidzie, poprawiając po mineralizacji biomechaniczne właściwości szkieletu [61]. Stwierdzono, że niskie dawki aminopodstawionych preparatów bisfosfonianowych mogą specyficznie hamować dostęp komórek prekursorowych osteoklastów do zmineralizowanej wcześniej macierzy kostnej [24]. W badaniach onkologicznych zaobserwowano, że bisfosfoniany hamują adhezję przerzutowych komórek nowotworowych raka piersi i prostaty, zarówno do zmineralizowanej jak i niezmineralizowanej macierzy kostnej [14]. W procesie resorpcji kości, po zakwaszeniu mikrośrodowiska pod osteoklastem przez pompy protonowe, stężenie bisfosfonianów w tym miejscu wzrasta, w wyniku częściowego ich uwalniania wraz ze zresorbowaną tkanką kostną. Z przestrzeni pod osteoklastem bisfosfoniany są dalej wchłaniane w procesie endocytozy do osteoklastu, którego aktywność resorpcyjna spada lub wręcz zanika (Ryc. 2). Obliczono, że w warunkach *in vitro* stężenie alendronianu w przestrzeni resorpcyjnej pod osteoklastem myszy i kurczaka, wynosi 0.1-1 mM przy pH=3.5 i uwolnieniu z kości około 50% ilości tego bisfosfonianu [21]. Bisfosfoniany wchłonięte przez osteoklasty wywołują zmiany metaboliczne oraz zmiany kształtu osteoklastu, które najprawdopodobniej mogą się również dokonywać wskutek zewnątrzkomórkowego oddziaływania bisfosfonianu z osteoklastem. Pomarszczona, grzebieniowa struktura osteoklastu, zwłaszcza w części kontaktowej z powierzchnią kości (Ryc. 2) jest niezwykle ważna dla zachowania pełnej aktywności osteoklastu i utrata tej struktury wskutek

działania bisfosfonianów uniemożliwia adhezję osteoklastu do macierzy kostnej oraz wytworzenie szczelnych przestrzeni resorpcyjnych, w których

Istotne znaczenie w postępie badań mechanizmów działania bisfosfonianów miało stwierdzenie, że te bisfosfoniany, które zawierają atom azotu są inhibi-



Ryc. 2. Modulatory funkcji i komunikacji osteoblastu (OB) i osteoklastu (OC).

działają jony wodorowe i enzymy. Najprawdopodobniej, przyczyną utraty pomarszczonej struktury komórkowej jest dysfunkcja małych sygnalizacyjnych białek Rac i Rho z rodziny GTP-az, które są odpowiedzialne m.in. za adhezję, ruchy, zmiany morfologiczne komórek i ich apoptozę [26,62]. W szczególności stwierdzono, że białko Rac wywiera działanie regulujące na czynnik wzrostu, który jest bezpośrednio odpowiedzialny za kształt błony cytoplazmatycznej osteoklastu [63]. W badaniach zresorbowanej powierzchni kości przez izolowane mysie osteoklasty z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego wykazano znaczenie subtelnego oddziaływania bisfosfonianów na zmianę kształtu błony cytoplazmatycznej osteoklastu [49]. Inne badania podkreślają istotny udział bisfosfonianów w więcej niż jednym etapie procesu dojrzewania osteoklastów [48]. Dotyczy to aktywnych bisfosfonianów zawierających w łańcuchu bocznym atom azotu (np. alendronian, ibandronian, rizedronian), które nie są metabolizowane przez osteoklasty. W odróżnieniu od nich grupa mniej aktywnych bisfosfonianów (klodronian, etidronian) — nie zawierających atomu azotu w łańcuchu bocznym i przez to najbardziej przypominających fizjologiczne pirofosforany — ulega metabolizowaniu przez osteoklasty (*patrz niżej*).

torami enzymów szlaku miewalonowego odpowiedzialnego m.in. za produkcję izopentenylodifosforanu (IPP), farnesylo-difosforanu (FPP), geranylogeranylo-difosforanu (GGPP), a także skwalenu i steroli (cholesterolu) [4, 20, 26, 27, 32, 34, 35]. Zarówno FPP jak i GGPP są konieczne dla prenylowania białek Rac, Rho, a także Ras, co warunkuje ich prawidłową funkcję. Bisfosfoniany zawierające atom azotu hamują syntezę FPP i GGPP — najprawdopodobniej poprzez hamowanie enzymów wymaganych w syntezie obu tych metabolitów szlaku miewalonowego i osłabiają przez to mechanizm prenylowania wymienionych białek. Utrata funkcji przez geranylogeranylowane białka w osteoklastach ma poważniejsze konsekwencje niż utrata funkcji przez farnesylo-wane białka, gdyż wiadomo, że geranylogeranylowane Rac, Rho jak i Rab są w większym stopniu odpowiedzialne za tworzenie, funkcje i kształt błony komórkowej osteoklastów. Bisfosfoniany oddziałują na enzymy szlaku miewalonowego, takie jak izomerazy IPP, syntazy FPP, GGPP i skwalenu, w różnym stopniu. Na przykład, ibandronian jest silniejszym inhibitorem syntazy skwalenu niż alendronian i pamidronian, ale pomimo to, te dwa ostatnie bisfosfoniany zachowują zdolność do blokowania syntezy steroli poprzez blokowanie innych enzymów szlaku niż syntaza skwalenu. Może to świadczyć o

tym, że te bisfosfoniany są substratowymi analogami izoprenoidowych difosforanów [64]. Ostatnie doniesienia wskazują, że bisfosfoniany słabiej oddziałują na prenylowane transferazy niż izomeryzy i syntazy [65]. Mogą również, poprzez hamowanie prenylowania białek indukować apoptozę zarówno osteoklastów jak i makrofagów (np. J774), powiązanych wspólnymi prekursorami komórkowymi. Stąd często efekt wywierany przez bisfosfoniany na makrofagi jest porównywany z efektem wywieranym na osteoklasty [52]. Indukcja apoptozy makrofagów przez bisfosfoniany jest przynajmniej w części odpowiedzialna za ich właściwości przeciwzapalne [41]. Bisfosfoniany redukują również aktywność innych enzymów np. fosfatazy kwaśnej [54], enzymów lizosomalnych [66, 67],  $\beta$ -glukuronidazy [22], wakuolarnych  $H^+$  ATP-az w osteoklastach [68, 69].

W odróżnieniu od bisfosfonianów zawierających atom azotu, klodronian, etidronian i tiludronian są metabolizowane do 5'-( $\beta,\gamma$ -dichlorometyleno, hydroksyetylideno i *p*-chlorofenylo-tiometyleno) trifosforanów adenozy (Ryc. 3, III-V), które są nie ulegającymi hydrolizie analogami trifosforanu adenozy [27, 32].

Akumulacja w osteoklastach wyżej wymienionych toksycznych metabolitów bisfosfonianów ogranicza żywotność komórek i powoduje w konsekwencji ich apoptozę.

Jednym z pierwszych obiektów modelowych użytych do badań metabolizmu bisfosfonianów była ameba *Dictyostelium discoideum* [45, 46, 70, 71]. Organizm ten oraz inne komórki jak np. makrofagi J774 i komórki kostniakomięsaka MG63, metabolizowały klodronian do tego samego nie ulegającego hydrolizie metabolitu (Ryc.3, III) [71]. Potwierdzenie działania metabolitu III uzyskano, zamykając go w liposomach i wprowadzając drogą fagocytozy do makrofaga J774. Metabolit III powodował te same biochemiczne zmiany w tej komórce, co wolny metabolit wprowadzony na tej samej drodze. Stwierdzono, że wbudowywanie bisfosfonianów w struktury 5'-trifosforanów adenozy zachodzi przy udziale rodziny syntetaz aminoacylo-t-RNA, które mogą wykorzystywać bisfosfoniany w miejsce pirofosforanów dzięki analogiom strukturalnym [72].

## V. Mechanizm pośredniego działania bisfosfonianów

Stwierdzono, że w odróżnieniu od bezpośredniego działania na osteoklasty, bisfosfoniany oddziałują również na te komórki w sposób pośred-

ni, poprzez stymulację osteoblastów (w stężeniach rzędu  $10^{-9}$  mol/L, *in vitro*) do produkcji czynnika białkowego o niskiej masie cząsteczkowej (<10kDa), który jest inhibitorem resorpcyjnej aktywności osteoklastu [73-76]. Mechanizm ten jest mało poznany.

Inny mechanizm pośredni jest związany z wpływem bisfosfonianów na hamowanie przez osteoblasty produkcji IL-6, która przekazuje osteoklastom sygnał do rozpoczęcia resorpcji. Stwierdzono, że w obecności etidronianu w stężeniu rzędu  $10^{-4}$  mol/L, produkcja IL-6 przez komórki osteoblastopodobne stanowiła 58% produkcji IL-6 przez nowotworowe komórki kostniakomięsaka MG63 uznanej za poziom odniesienia. Dla porównania 17  $\beta$ -estradiol nie miał wpływu na intensywność wydzielania IL-6 przez komórki osteoblastopodobne [77]. Również pamidronian (w 40%) i zoledronian (w 60%) powodowały zahamowanie produkcji IL-6 stymulowanej przez IL-1 $\beta$  i metaloproteinazy MMP-1, uczestniczącej w mechanizmie inicjowania resorpcji kości [78]. Aktywności ludzkiej kolagenazy MMP-1 typu fibroblastycznego ( $IC_{50}=150 \mu M$ ), a także kolagenazy zrębu z ekstraktu torbieli ludzkiej szczęki były też hamowane, *in vitro*, przez klodronian [79]. Oba bisfosfoniany (pamidronian i zoledronian) użyte w większym stężeniu powodowały apoptozę komórek szpiku oraz komórek nowotworowych szpiczaka mnogiego. Niekorzystnym efektem działania tych bisfosfonianów, a zwłaszcza zoledronianu była podwyższona produkcja przez komórki podścieliska, metaloproteinazy MMP-2, odpowiedzialnej nie tylko za procesy resorpcyjne kości, ale także za procesy przerzutowe komórek nowotworowych. Zatem bisfosfoniany zwłaszcza w przypadku toczących się procesów nowotworowych musiały być łączone z inhibitorami tych metaloproteinaz np. z przeciwbakteryjnymi tetracyklinami (TC) lub modyfikowanymi chemicznie tetracyklinami (CMTC), które nie mają właściwości przeciwbakteryjnych [80-82]. W przebiegu chorób nowotworowych, równowaga pomiędzy MMP produkowanymi przez osteoklasty i osteoblasty może być naruszona przez TGF $\beta$ , który indukuje zmienną ekspresję nie tylko MMP macierzy, ale także ich inhibitorów tkankowych TIMP, produkowanych przez komórki nowotworowe [83]. Przy okazji warto odnotować fakt, że w komórkach osteoklastów odkryto MMP typu membranowego (MT-MMP), będące podklasą rodziny MMP i odgrywające znaczną rolę w mechanizmie adhezji osteoklastów do powierzchni kości i ich aktywności migracyjnej [84, 85]. Z uwagi na powyższe funkcje metaloproteinaz, należy domyślać się znacznego na nie

wpływu bisfosfonianów, choć brak jest jeszcze doniesień na ten temat.

## VI. Podsumowanie

Bisfosfoniany są syntetycznymi i enzymatycznie trwałymi analogami naturalnych pirofosforanów. Obie grupy połączeń charakteryzują się wspólnymi cechami, takimi jak niska wchłanianie jelitowa, wysoka akumulacja w tkance kostnej, aktywność przeciwersorpcyjna. Każdy z bisfosfonianów ma indywidualną charakterystykę i prawdopodobnie swoisty mechanizm działania. Dotychczas największe różnice ujawniły się pomiędzy bisfosfonianami nie zawierającymi w bocznym łańcuchu węglowym, R<sup>2</sup>, atomu azotu i jednocześnie najbardziej przypominającymi pirofosforany (etidronian, klodronian, tilu-

4. Hamowanie adhezji prekursorów osteoklastów i komórek nowotworowych do tkanki kostnej.

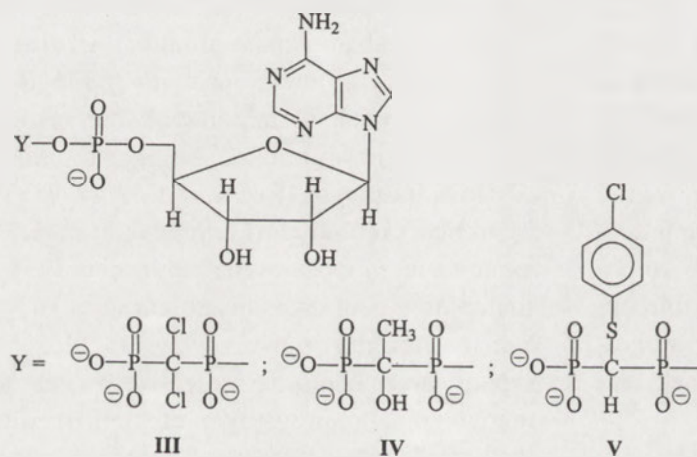
5. Osłabienie aktywności biochemicznej osteoklastu poprzez akumulację w cytosolu bisfosfonianów i ich toksycznych, nie ulegających hydrolizie metabolitów ATP-(Ryc. 3, III-V).

6. Ograniczenie liczby osteoklastów w wyniku apoptozy.

7. Niekorzystne zmiany morfologiczne osteoklastu, a w szczególności utrata jego pomarszczonej, grzebieniowej struktury, która umożliwia aktywność resorpcyjną tej komórki.

8. Hamowanie aktywności enzymów szlaku miewalonowego, proteaz, fosfatazy kwaśnej i innych enzymów lizosomalnych degradujących kość.

9. Stymulowanie osteoblastu do produkcji inhibitorów osteoklastu.



Ryc. 3. Toksyczne dla osteoklastu metabolity klodronianu (III), etidronianu (IV) i tiludronianu (V).

dronian) a bisfosfonianami zawierającymi atom azotu (pamidronian, alendronian, rizedronian i inne) o wyższej aktywności biologicznej. Z uwagi na różne oddziaływania modulatorów resorpcji kości na osteoklasty, działanie bisfosfonianów można klasyfikować jako bezpośrednie i, dotychczas mniej rozpoznane, pośrednie z udziałem osteoblastów. Mechanizm działania fizykochemicznego ogranicza się do nieorganicznego (mineralnego) składnika tkanki kostnej. Reasumując, obecnie poznane mechanizmy przeciwersorpcyjnego (a także przeciwzapalnego i przeciwnowotworowego) działania bisfosfonianów, obejmują następujące procesy:

1. Hamowanie rozpuszczania kryształów fosforanu wapnia w hydroksyapatytach. Obniżenie stężenia jonów wapnia pod osteoklastem i hamowanie szybkości jego migracji do kolejnych miejsc resorpcji.

2. Hamowanie tworzenia i dojrzewania osteoklastu.

3. Hamowanie dostępu prekursorów osteoklastu do tkanki kostnej.

Omawiając aktualne poglądy na temat mechanizmów działania bisfosfonianów, trudno nie wspomnieć o skuteczności działania leków bisfosfonianowych różnej generacji, w leczeniu osteoporozy, która w 1997 roku została uznana przez WHO za chorobę cywilizacyjną. Otóż, 2-letnie doustne stosowanie najstarszego bisfosfonianu — etidronianu disodowego, w relatywnie dużych dawkach, tj. 400 mg dziennie przez 2 tygodnie z 12 tygodniową przerwą (duże dawki ujemnie wpływają na proces mineralizacji tkanki kostnej i w związku z tym konieczna jest suplementacja wapnia), przynosi efekt leczniczy w postaci 2.5% zwiększenia gęstości masy kostnej kręgosłupa w odcinku lędźwiowym. Po wprowadzeniu do leczenia preparatów aminobisfosfonianowych (pamidronian, alendronian, rizedronian), które nie upośledzają mineralizacji tkanki kostnej, osiąga się lepsze efekty w odbudowie kości przy mniejszych dawkach dobowych. Na przykład, w ciągu 2 lat stosowania pamidronianu w dawce 150 mg dziennie, gęstość masy kostnej lędźwiowego odcinka kręgosłupa u osób badanych wzrosła aż o 6.5% [7]. Uzy-

skano w ten sposób lepsze właściwości biomechaniczne kości przy jej prawidłowym obrazie w badaniach histologicznych i zmniejszenie liczby mikrozłamań, co ma ogromne znaczenie w aspekcie stale zwiększającej się liczby chorych na osteoporozę (w USA, Europie i Japonii ocenia się ich liczbę na ok. 80 mln.).

Warto podkreślić, że stały postęp w odkrywaniu nowych mechanizmów działania bisfosfonianów daje szansę wielu pacjentom i lekarzom na skuteczniejszą walkę nie tylko z osteoporozą, ale i innymi chorobami układu kostnego.

## Podziękowanie

Praca finansowana przez A.M. w Łodzi w ramach badań własnych (E.B.) nr 502-12448 (161) oraz badań statutowych (P.B.).

Artykuł otrzymano 13 lipca 2000 r.  
Zaakceptowano do druku 23 sierpnia 2001 r.

## Piśmiennictwo

1. Menshutkin N (1865) *Liebigs Ann Chem* **133**: 317-320.
2. Fleisch H (1995) *H Bisphosphonates in bone disease. From the laboratory to the patient*. The Parthenon Publishing Group New York London.
3. Bałczewska E, Bałczewski P (2000) *Wiad Chem* **54**: 1075-1088.
4. Proceedings of the XIVth International Conference of Phosphorus Chemistry, Cincinnati Ohio (USA). Part 1 Phosphorus Sulfur Silicon (1999) 144-146: Widler L, Jaeggi K A, Green J R str. 5-8; Ebetino F str. 9-12; Esswein A, Bauss F, Muehlbauer R, Guenther H, Bosies E, str. 13-20; McKenna Ch, Kashemirov BA, Li Z-M, str. 313-316, Francis MD, str. 317-318, Mönkkönen J, Makkonen N, Rogers M J, Frith J C, Aurida S, str. 321-324; Russell R G G, str. 793-820.
5. Johansen A, Stone M, Rawlison F (1996) *Drugs-Aging* **8**: 113-126.
6. Badurski J, Sawicki A, Boczoń S (1994) W: Badurski J (red.) *Osteoporoza*. Osteoprint Białystok.
7. Galus K (1994) Choroby metaboliczne kości. *Med Tour Press International* Wyd. Medyczne Warszawa.
8. Licata A A (1997) *Am J Med Sci* **313**: 17-22.
9. Hodzman A, Adachi J, Olszyński W (1996) *CMAJ* **155**: 945-948.
10. Raviolo P, Galvango G, Biarese V, Lovisetto P (1989) *Clin-Ther* **129**, 31-41.
11. Chisholm MA, Mulloy AL, Taylor AT (1996) *Ann-Pharmacother* **30**: 507-13.
12. Harvey H A (1995) *Support-Care-Cancer* **3**: 123-129.
13. Aubin JE, Bounelye E (2000) *Medscape Womens Health* **5**: 5.
14. Boissier S, Magnetto S, Frappart L, Cuzin B, Ebetino FH, Delmas PD, Clezardin P (1997) *Cancer Res* **57**: 3890-4.
15. Singer FR (1990) *Semin Oncol* **17**: 34-9.
16. Courvoisier B (1990) *Schwiz Med Wochenschr* **111**: 1876-8.
17. Freeman D A (1998) *Am J Med Sci* **295**: 144-158.
18. Fleisch H (1987) *Clin Orthop*: 72-78.
19. Russell R G, Rogers M J (1999) *Bone* **25**: 97-106.

20. van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Lowik C, Pappoulos S (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **255**: 491-4.
21. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, Golub E, Rodan GA (1991) *J Clin Invest* **88**: 2095.
22. Rodan GA (1998) *Annu Rev Pharmacolog Toxicol* **38**: 375-88.
23. Amin D, Cornell SA, Gustafson SK, Needle SJ, Ullrich JW, Bilder GE, Perrone MH (1992) *J Lipid Res* **33**: 1657-63.
24. Boonekamp P M, van der Wee Pals L J, van Wijk van Lennep M M, Thesing C W, Bijvoet O L (1986) *Bone Miner* **1**: 27-39
25. Hughes D E, Mac Donald B R, Russell R G, Gowen M (1989) *J Clin Invest* **83**: 1930-1935.
26. Luckman S P, Hughes D E, Coxon F P, Graham R, Russell G, Rogers M J (1998) *J Bone Miner Res* **13**: 581-589.
27. Frith J C, Monkkonen J, Blackburn G M, Russell R G, Rogers M J (1997) *J Bone Miner Res* **12**: 1358-67.
28. Adami S, Zamberlan N (1996) *Drug Staf* **14**: 158-170.
29. Adami S, Bhalla A K, Dorizzi R, Montesanti F, Rossini S, Salvagno G, Lo-Cascio V (1987) *Calcif Tissue Int* **41**: 326.
30. Russell R G, Roger M J, Fritz J C, Luckman S P, Coxon F P, Benford H L, Croucher P J, Shipman C, Fleisch H A (1999) *J Bone Miner Res* **2**: 53-65.
31. Russell R G, Croucher P J, Rogers M J (1999) *Osteoporoz Int* **2**: S66-80.
32. Breuil V (1999) *Rev Rheum Engl Ed* **66**: 339-343.
33. Rogers M J, Frith J C, Luckman S P, Coxon F P, Benford H L, Monkkonen J, Auriola S, Chilton K M, Russell A G (1999) *Bone* **24**: 735-795.
34. van Beek E, Lowik C, van der Phijm G, Pappoulos S (1999) *J Bone Miner Res* **14**: 722-729.
35. Coxon F P, Benford H L, Russell R G, Rogers M J (1998) *Mol Pharmacol* **54**: 631-638.
36. Fleisch H (1998) *Endocr Rev* **19**: 80-100.
37. Fojtik Z, Kandusova M (1997) *Vnitř Lek* **43**: 234-237.
38. Fleisch H (1997) *Medicina B Aires* **57**: 65-75.
39. Fleisch H (1997) *Horm Metab Res* **29**: 145-150.
40. Igarashi K, Hirafuji M, Adachi H, Shinoda H, Mitani H (1997) *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **56**: 121-125.
41. Rogers M J, Chilton K M, Coxon F P, Lawry J, Smith M O, Suri S, Russell R G (1996) *J Bone Miner Res* **11**: 1482.
42. Azuma Y, Chokki M, Ohta T, Kiyoki M (1996) *Endocrinology* **137**: 2586-2592.
43. Azuma Y, Sato H, One Y, Okabe K, Ohta T, Tsuchimoto M, Kiyoki M (1995) *Bone* **16**: 235-245.
44. Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S, Nakamura I, Zhang D, Barbier A, Suda T (1995) *Bone* **17**: 137-144.
45. Rogers M J, Ji X, Russell R G, Blackburn G M, Williamson M P, Bayless A V, Ebetino F H, Watts D J (1994) *Biochem J* **303**: 303-311.
46. Rogers M J, Watts D J, Russell R G, Ji X, Xiong X, Blackburn G M, Bayless A V, Ebetino F H (1994) *J Bone Miner Res* **9**: 1029-39.
47. Bjorkroth J P, Perakyla M, Pakkanen T A, Pohjola E (1992) *J Comput Aided Mol Des* **6**: 303-314.
48. Hughes D E, Mian M, Guillard-Cumming D F, Russell R G (1991) *Drugs Exp Clin Res* **17**: 109-114.
49. Sato M, Grasser W (1990) *J Bone Miner Res* **5**: 31-40.
50. Schaff R A, Hall T G, Bar R S (1989) *Clin Pharm* **8**: 108-121.
51. Blumenthal N C (1989) *Clin Orthop* 279-289.
52. Cecchini M G, Felix R, Fleisch H (1987) *J Bone Miner Res* **2**: 135-142.
53. Eisenhut M, Fritz P, Kimmig B, Wingen F, Krempien B (1986) *Int J Rad Appl Instrum A* **37**: 741-747.
54. Maire P J, Hoff M, Garba M T (1985) *Bone* **6**: 193-200.

55. Lerner V, Larsson A (1984) *Experientia* **40**: 965-967.
56. Fleisch H (1981) *Metab Bone Dis Relat Res* **3**: 279-287.
57. Fogelman I (1980) *Eur J Nucl Med* **5**: 473-476.
58. Błasiak J, Niewiarowska J, Cieślak M, Cier-niewski Cz S (1999) *Postępy biochemii* **45**: 239-248.
59. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamata-ni N, Gillespie M T, Martin T J, Suda T (1999) *J Clin Invest* **103**: 1345-1352.
60. Jimi E, Nakamura I, Buong L T, Ikebe T, Taka-nashi N, Rodan G A, Suda T (1999) *Exp Cell Res* **247**: 84-93.
61. Ferretti J L, Cointry G R, Capozza R F, Mondelo N, Peluffo V, Chiappe A, Meta M, Alippi R M (1997) *Medicina B Aires* **1**: 83-92.
62. Machesky L M, Hall A (1997) *J Cell Biol* **138**: 913-926.
63. Ridley A J, Paterson H F, Johnston C L, Diek-mann D, Hall A (1992) *Cell* **70**: 401-410.
64. Amin D, Cornell S A, Perrone M H, Bilder G E (1996) *Drug Res* **46**: 759-762.
65. van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Löwik C, Pa-papoulos S (1999) *Biochem Biophys Res Comm* **255**: 491-494.
66. Felix R, Russell R G, Fleisch H (1976) *Biochim Biophys Acta* **429**: 429-438.
67. Lerner U H, Larsson A (1987) *Bone* **8**: 179-189.
68. David P, Nguen H, Barbier A, Baron R (1996) *J Bone Miner Res* **11**: 1498-1507.
69. Zimolo Z, Wesołowski G, Rodan G A (1995) *J Clin Invest* **96**: 2277-2283.
70. Pelorgeas S, Martin J-P, Satre M (1992) *Biochem Pharmacol* **44**: 2157-2163.
71. Fritz J C, Mönkkönen J, Blackburn G M, Russell R G, Roger M J (1996) *J Bone Miner Res* **12**: 1358-1367.
72. Roger M J, Brown R J, Hodkin V, Russell R G, Wats D J (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **224**: 863-869.
73. Yu X, Scholler J, Foged N T (1996) *Bone* **19**: 339-345.
74. Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo Y, Kado S, Kugai N, Yamamoto M, Nagata N (1996) *Bone* **18**: 9-14.
75. Sahni M, Guenther H, Fleisch H, Collin P, Mar-tin T J (1993) *J Clin Invest* **91**: 2004-2011.
76. Vitte C, Fleisch H, Guenther H L (1996) *Endocrino-logy* **137**: 2324.
77. Olmos J M, DeVega T, Perera L, Riancho J A, Amado J A, Gonzalez-Macias J (1999) *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **21**: 519-522.
78. Derenue S, Amiot M, Barille S, Collette M, Ro-billard N, Berthand P, Harrousseau J L, Bataille R (1999) *J Bone Miner Res* **14**: 2048-2056.
79. Teronen O, Koutinen Y T, Lindqvist C, Salo T, Ingman T, Lauhio A, Ding Y, Sautavirta S, Valle-ala H, Sorsa T (1997) *Calcif Tissue Int* **61**: 59-61.
80. Golub L M, Ramamurthy N S, Llawaneras A, Ryan M E, Lee H M, Lin Y, Bain S, Sorsa T (2000) *Ann New York Acad Sci* **878**: 290-310.
81. Bettany J T, Peet N M, Wolowacz R G, Skerry T M, Grabowski P S (2000) *Bone* **27**: 75-80.
82. Sasaki T, Ramamurthy N S, Golub L M (1994) *Bone* **15**: 373-375.
83. Duivenvoorden W C, Hirte H W, Singh G (1999) *Clin Exp Metastasis* **17**: 27-34.
84. Sato T, del Carmen Ovejero M, Hon P, Heegaard A M, Kumegawa M, Foged N T, Delaisse J M (1997) *J Cell Sci* **110**: 589-596.
85. Takino T, Sato T, Shinagawa A, Seiki M (1995) *J Biol Chem* **270**: 23013-23020.



# Sprawozdanie z XVII zwyczajnego Walnego Zebrania członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

XVII Walne Zebranie członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbyło się w trakcie trwania XXXVII Zjazdu Towarzystwa w dniu 12 września 2001 r. w Auli Wydz. Nauk Ekonomicznych Uniwersytetu M. Kopernika w Toruniu. O terminie i programie zebrania Zarząd Główny poinformował członków PTBioch na łamach swojej strony internetowej oraz za pomocą e-mailowej listy adresowej. Ponadto karty wstępu zawierające porządek obrad oraz będące jednocześnie mandatami wyborczymi rozdawano uczestnikom Zjazdu będącymi członkami Towarzystwa w recepcji od dnia 10 września br.

W pierwszym z wyznaczonych terminów rozpoczęcia Zebrania nie osiągnięto quorum, dlatego też Zebranie rozpoczęło się w drugim terminie o godz. 19:30. W zebraniu uczestniczyło 71 zwyczajnych członków Towarzystwa.

Zebranych powitał kol. M. Komoszyński, Przewodniczący Oddziału Toruńskiego PTBioch. Na wstępie zaapelował do uczestników Zebrania o zaopiniowanie stanowiska środowiska biochemików wobec „Ustawy o genetycznie modyfikowanych organizmach” uchwalonej w czerwcu br. O przedstawienie zastrzeżeń dotyczących Ustawy poproszono kol. T. Twardowskiego.

W krótkim wystąpieniu kol. Twardowski omówił zagrożenia dla prowadzenia badań nad genetycznie modyfikowanymi organizmami (GMO), które pojawią się w momencie wejścia w życie Ustawy. Przedstawił też dwie, różniące się ostrością sformułowań, wersje rezolucji w tej sprawie. Powielone kopie obu rezolucji rozdano uczestnikom Zebrania, zaś dyskusję nad nimi przełożono na czas przerwy w obradach.

Kol. Komoszyński zaproponował wybór kol. S. Angielskiego na Przewodniczącego Zebrania. W jawnym głosowaniu jednogłośnie zaaprobowano tę kandydaturę. Na wniosek kol. J. Barańskiej w podobnym głosowaniu wybrano kol. Annę Goc na Sekretarza Walnego Zebrania.

W imieniu Zarządu Głównego kol. Angielski zaproponował kandydatury kol. J. Kwiatkowskiej-Korczak oraz T. Wesołowskiej do Komisji Matki, oraz A. Jarmołowskiego i B. Grzelakowskiej-Sztabert do Komisji Wniosków. Wobec braku innych kandydatur w głosowaniach jawnych, odpowiednio przy jednym głosie wstrzymującym się i jednogłośnie, uchwalono proponowane składy obu Komisji. Do Komisji Skrutacyjnej kol. Barańska zaproponowała kol. R. Zamorskiego, B. Wojczuk i B. Wieczorek, propozycję tę przyjęto jednogłośnie.

Również jednogłośnie przyjęto protokół poprzedniego XVI Walnego Zebrania, które odbyło się 16 września 1998 r.

Prezes ustępującego Zarządu Głównego kol. J. Barańska przedstawiła sprawozdanie z jego działalności w XVI kadencji obejmującej lata 1998-2001. Na wstępie poprosiła zebranych o uczczenie minutą ciszy pamięci kolegów, którzy nas w tym czasie opuścili, a zwłaszcza prof. Zakrzewskiego. Przypomniała jego zasługi dla Towarzystwa: wieloletnie prezesowanie, zwłaszcza w trudnych latach 80-tych, udział w tworzeniu statutu i organizowaniu zjazdu FEBS. Pełny tekst sprawozdania z pracy Zarządu zostanie opublikowany na łamach „Postępów Biochemii”, poniżej zamieszczono jedynie skrót.

Ze sprawozdania można się było dowiedzieć m. in., że Towarzystwo w dniu 30 czerwca 2001 r. liczyło 1947 członków, w tym 836 zawieszonych w prawach z powodu niepłacenia składek członkowskich. Najwyższą ściągalskością składek odnotowano w Oddziale Szczecińskim, a najgorszą w Oddz. Warszawskim. Co roku do Towarzystwa wstępuje podobna liczba osób, ogółem od roku 1999 do dnia Zebrania przyjęto 220 nowych członków, w tym 89 studentów. Na ostatnim zebraniu Zarządu XVI kadencji w dniu 10 września 2001 r. ustalono wysokość składki wraz z prenumeratą Postępów Biochemii na następny rok na 70 zł dla członków zwyczajnych i 35 zł dla członków studentów oraz cenę prenumeraty dla osób niestowarzyszonych na 60 zł, a dla członków honorowych i emerytowanych na 25 zł.

Sprawozdanie obejmowało działalność wydawniczą Towarzystwa, premiowanie osiągnięć naukowych poprzez konkursy i nagrody, popularyzację staży naukowych fundowanych przez FEBS i dorocznych zjazdów tej organizacji, współorganizację dorocznych zjazdów Towarzystwa, współpracę z innymi towarzystwami naukowymi w kraju i europejskimi towarzystwami biochemicznymi.

Słowa uznania skierowano pod adresem zespołu redakcyjnego „Postępów Biochemii” oraz kol. L. Konarskiej, redaktor naczelnej „Acta Biochimica Polonica”, która przyczyniła się do podniesienia wartości „impact factor” tego czasopisma do 0,75. Podziękowania za wkład pracy otrzymali członkowie komisji konkursowych, a zwłaszcza konkursu im. J. K. Parnasa z przewodniczącym kol. G. Bartoszem na czele.

W czasie trwania XVI kadencji odnotowano systematyczny wzrost liczby polskich uczestników zjazdów FEBS i w porównaniu do innych krajów członkowskich dużą liczbę polskich stypendystów FEBS. Kol. Barańska poinformowała zebranych o nowej możliwości uzyskania grantu FEBS na wyposażenie laboratorium, z której mogą skorzystać stypendyści zakończonych długoterminowych stypendiów tej organizacji po powrocie do macierzystego kraju. Wielkim sukcesem delegacji Towarzystwa na zjazd FEBS w Lizbonie w czerwcu br. jest wybór kol. M. J. Nałęcza na przewodniczącego Fellowship Committee. Polskę we władzach FEBS reprezentują też: kol. J. Barciszewski jako członek Advanced Courses Committee oraz kol. J. Barańska — członek Working Group to Explore Ways of Improving Assistance to Central and Eastern European Countries, a we władzach European Federation of Biotechnology w Executive Committee kol. S. Bielecki. Dzięki staraniom Zarządu Wyższa Szkoła Pedagogiczna w Rzeszowie otrzymała z FEBS 3-letnią subskrypcję „FEBS Letters” oraz „Journal of Biochemistry”.

W mijającej kadencji odbyły się doroczne krajowe zjazdy w Olsztynie, Poznaniu i Toruniu. Towarzystwo posiada też stronę internetową oraz e-mailową listę adresową — zapisanie się do niej gwarantuje otrzymywanie bieżących ogłoszeń PTBioch.

Odbywające się co dwa lata Konferencje im. Parnasa są okazją do wspólnych spotkań nie tylko biochemików polskich i ukraińskich, ale także członków Towarzystw Lekarskiego i Badań Układu Nerwowego. Ostatnie odbyło się w październiku 2000 r. we Lwowie, następne wraz z dorocznym zjazdem Towarzystwa odbędzie się za rok we Wrocławiu w ramach obchodów 300-lecia tamtejszego Uniwersytetu.

Kol. Barańska odczytała list członków Białoruskiego Towarzystwa Biochemicznego i pracowników Instytutu Biochemii Narodowej Akademii Nauk Białorusi z życzeniami dla uczestników XXXVII Zjazdu. Białoruscy biochemicy przekazali też polskim kolegom w darze statuetkę.

Na zakończenie ustępująca pani Prezes dziękowała za współpracę członkom Zarządu, przewodniczącym Oddziałów i wszystkim wolontariuszom, którzy pomagali jej w minionej kadencji.

Kol. M. Stryjecka-Zimmer przedstawiła sprawozdanie Komisji Rewizyjnej. Komisja Rewizyjna zwróciła uwagę na fakt, iż z powodu nieuiszczenia składek przez dużą liczbę członków wpływające kwoty nie pokrywają wydatków związanych z działalnością biura Zarządu. Jednocześnie podkreślono dużą aktywność ustępującego Zarządu w zdobywaniu dodatkowych funduszy od firm produkujących odczynniki chemiczne oraz poprzez prowadzenie działalności wydawniczej. Zjazdy Towarzystwa są też dofinansowywane przez KBN. Komisja Rewizyjna wysoko oceniła działalność Zarządu Głównego XVI kadencji od strony merytorycznej i finansowej.

W dyskusji nad sprawozdaniem skierowano szczególne słowa uznania i podziękowania dla kol. Teresy Wesołowskiej za wkład pracy nad redagowaniem i wydawaniem „Listów do Biochemików”. Zebrani w jawnym głosowaniu udzielili Zarządowi XVI kadencji absolutorium przy jednym głosie wstrzymującym się.

Kol. J. Kwiatkowska-Korczyk, przewodnicząca Komisji Matki, przedstawiła zgłoszone przez poprzedni Zarząd Główny kandydatury kol. J. Barańskiej na prezesa i kol. L. Konarskiej na wiceprezesa Towarzystwa. Głosami z sali zaproponowano na stanowisko prezesa kandydatury kol. L. Konarskiej (propozycja kol. Z. Żaka) i kol. B. Grzelakowskiej-Sztabert (propozycja kol. W. H. Trzeciaka), jednakże obie odmówiły zgody na kandydowanie do tej funkcji.

Również od poprzedniego Zarządu wyszły: sugestia, żeby każdy z Oddziałów był reprezentowany we władzach Towarzystwa i następujące kandydatury na członków nowego Zarządu Głównego: z Warszawy Adama Szewczyka, Anny Dygas i Jerzego Duszyńskiego, Teresy Wesołowskiej ze Szczecina, Jana Glogowskiego z Olsztyna, z Wrocławia Marii Malickiej-Błaszczewicz i Andrzeja Dżugaja, Edwarda Bańkowskiego z Białegostoku, z Poznania Artura Jarmołowskiego, Witolda Walerycha i Tomasza Twardowskiego, Marka Gniazdowskiego z Łodzi, Teresy Jakubowicz z Lublina, Iwony Żak z Katowic, z Krakowa Jerzego J. Silberringa, Piotra Laidlera i Zdzisława Żaka, Michała Komoszyńskiego z Torunia i Michała Woźniaka z Gdańska. Z sali zgłoszono kandydatury J. Popinigisa (Gdańsk) i D. Chlubka (Szczecin), zgodę wyraził tylko ten ostatni.

Komisja Matka zaproponowała do Komisji Rewizyjnej kol.: M. Stryjecką-Zimmer, B. Grzelakowską-Sztabert i J. Popinigisa, który odmówił zgody na kandydowanie. Propozycję kandydowania przyjęła kol. Z. Szweykowska.

W tajnych głosowaniach wzięło udział 70 osób, oddano 65-69 głosów ważnych. Zgodnie ze statutem Towarzystwa do Zarządu Głównego weszło 14 osób z najwyższą liczbą głosów. Na poszczególnych kandydatów oddano następujące ilości głosów:

Prezes:	Jolanta Barańska	— 57
Wiceprezes:	Liliana Konarska	— 66
Członkowie Zarządu Głównego:	Adam Szewczyk	— 63
	Teresa Wesołowska	— 57
	Marek Gniazdowski	— 56
	Edward Bańkowski	— 55
	Michał Komoszyński	— 54
	Anna Dygas	— 53
	Maria Malicka-Błaszkiwicz	— 50
	Michał Woźniak	— 49
	Jerzy Duszyński	— 47
	Artur Jarmołowski	— 46
	Iwona Żak	— 44
	Teresa Jakubowicz	— 43
	Tomasz Twardowski	— 43
	Dariusz Chlubek	— 40
	Komisja Rewizyjna:	Maria Stryjecka-Zimmer
Barbara Grzelakowska-Sztabert		— 67
Zofia Szweykowska		— 67

Kol. Angielski pogratulował nowowybranym, życzył im owocnej pracy w nowej kadencji i podziękował za pracę członkom komisji wyborczych.

W dyskusji na temat działalności Towarzystwa podniesiono problem ściągalności składek. Wydaje się jednak, że przy obecnym systemie indywidualnego wnoszenia opłat Zarząd może jedynie apelować poprzez pocztę elektroniczną bezpośrednio do dłużników oraz do Przewodniczących Oddziałów, z których pochodzą.

W wolnych wnioskach powrócono do przedstawionych na wstępie projektów rezolucji odnośnie ustawy o GMO. Zebrani jednogłośnie opowiedzieli się za uchwaleniem rezolucji. Niemal wszyscy optowali za rezolucją zawierającą ostrzejsze sformułowania, jednakże po dyskusji powierzono kol. T. Twardowskiemu i J. Płucienniczakowi opracowanie ostatecznej wersji, która zachowując zdecydowany ton protestu przeciwko aktualnemu brzmieniu Ustawy zawierałaby też apel o dokonanie w niej zmian na korzyść placówek naukowych (zastąpienie obowiązku rejestracji zawiadomieniem o badaniach prowadzonych na GMO, zniesienie opłat za zezwolenia na używanie GMO, zmiana restrykcyjnego charakteru Ustawy). Uczestnicy Zjazdu będą mieli możliwość złożenia podpisów pod końcowym tekstem rezolucji, zostanie on też opublikowany w „Postęпах Biochemii” i „Biotechnologii”. Jednocześnie kol. Twardowski mocno akcentował, iż szerokie środowisko naukowe zachowało dużą inercję w czasie prac nad Ustawą, natomiast eksperci zgłosili zastrzeżenia odnośnie jej projektu, jednakże zostały one odrzucone przez Sejm i Senat RP. Zwrócił też uwagę na zbyt niską aktywność naukowców w dziele popularyzowania osiągnięć inżynierii genetycznej, w tym wyników wskazujących na brak potwierdzonych zagrożeń dla ludzkości. Kol. Płucienniczak apelował o nadanie rezolucji możliwie szerokiego rozgłosu, od naszej postawy zależeć będzie czy zostanie wniesiona inicjatywa zmiany Ustawy i jak potoczy się Sejmowa dyskusja nad nią.

W wolnych wnioskach kol. A. Jarmołowski zaproponował umożliwienie wnoszenia składek członkowskich za pomocą kart płatniczych poprzez Internet, i poprzez odpowiednie terminale bankowe w trakcie dorocznych zjazdów. Natomiast kol. Z. Szweykowska apelowała o ograniczenie zjazdowych sesji „Różne” poprzez wprowadzenie sesji o ogólnych tematach np. zgodnych z działami akademickich podręczników biochemii.

Sekretarz Walnego Zebrania  
dr Anna Goc

Przewodniczący Walnego Zebrania  
prof. dr hab. Stefan Angielski

Toruń, 12.09.2001

# Sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego XVI Kadencji (1998 — 2001)

**Zarząd Główny XVI kadencji** działał w składzie:

**Prezydium:** prezes — prof. dr hab. Jolanta Barańska  
wiceprezes — prof. dr hab. Liliana Konarska  
sekretarz — doc. dr hab. Dariusz Stępkowski  
skarbnik — dr Ewa Turska

**Członkowie Prezydium Zarządu:** prof. dr hab. Edward Bańkowski  
prof. dr hab. Lech Wojtczak

**Komisja Rewizyjna:** prof. dr hab. Marta Stryjecka-Zimmer  
prof. dr hab. Barbara Grzelakowska-Sztabert  
prof. dr hab. Jerzy Popinigis

**Członkowie Zarządu:**

Prof. Stanisław Bielecki  
Dr hab. Jan Glogowski  
Prof. Teresa Jakubowicz  
Dr Artur Jarmołowski  
Prof. Aleksandra Kubicz  
Dr hab. Piotr Laidler  
Prof. Julian Świerczyński  
Prof. Roman Tarnawski  
Dr Teresa Wesołowska  
Dr hab. Michał Woźniak,

**Zarząd Towarzystwa działał przez swoje Oddziały terenowe znajdujące się w:**

Białymstoku — przewodniczący doc. dr hab. Jerzy Pałka  
Gdańsku — przewodniczący doc. dr hab. Michał Woźniak  
Katowicach — przewodnicząca doc. dr hab. Iwona Żak  
Krakowie — przewodniczący prof. dr hab. Zdzisław Żak  
Lublinie — przewodnicząca prof. dr hab. Teresa Jakubowicz  
Łodzi — przewodniczący doc. dr hab. Alojzy Zgierski  
Olsztynie — przewodniczący prof. dr hab. Jan Glogowski  
Poznaniu — przewodniczący prof. dr hab. Witold Walerych  
Szczecinie — przewodniczący doc. dr hab. Dariusz Chlubek  
Toruniu — przewodniczący doc. dr hab. Michał Komoszyński  
Warszawie — przewodniczący prof. dr hab. Jerzy Duszyński  
Wrocławiu — przewodnicząca prof. dr hab. Maria Malicka-Błaszkiwicz

Nowa kadencja związana z wyborem nowych władz Zarządu Głównego Towarzystwa rozpoczęła swoją pracę 16 września 1998r. W czasie obecnej kadencji, pomimo energicznej akcji porządkowania i usuwania z Towarzystwa osób zalegających z opłatami (przenoszonych w poczet tzw. członków biernych) ilość członków Towarzystwa (honorowych, aktywnych, oraz członków emerytów) jest wysoka i wynosi 1111 osób (Tabela 1). Jest to zatem jedno z największych Towarzystw Naukowych w Polsce.

Do Towarzystwa stale przyjmowani są nowi członkowie (Tabela 2). W latach 1999-2001 przyjęto 223 osoby, w tym 89 studentów (na dzień 10.09.2001r.).

Obowiązująca składka członkowska wynosiła w 1999r. i 2000r. 30 zł (10 zł dla studenta), a z dniem 1 stycznia 2001r. 60 zł (dla członków studentów — 30 zł). Na zebraniu Zarządu Głównego, które odbyło się w dniu 10 września 2001r. ustalono nieznaczne podniesienie składek członkowskich (od dnia 1 stycznia 2002r.) I tak, roczna składka dla członków pełnoprawnych będzie 70 zł, a dla członków studentów 35 zł.

<http://rcin.org.pl>

Tabela 1

**POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE**

Stan osobowy w dniu 30 czerwca 2001 r.

Oddział	Liczba członków ogółem (3+4+5+7)	W tym członkowie				zawieszeni
		honorowi	emeryci	płacący składki		
				ogółem	w tym studenci	
1	2	3	4	5	6	7
Białystok	63	-	5	30	2	28
Gdańsk	120	1	3	54	10	62
Katowice	139	2	4	104	29	29
Kraków	128	1	8	81	11	38
Lublin	127	1	15	77	7	34
Łódź	180	-	11	110	14	59
Olsztyn	55	-	3	25	2	27
Poznań	202	-	13	87	5	102
Szczecin	63	1	7	55	9	-
Toruń	43	-	1	20	3	22
Warszawa	675	6	44	267	59	358
Wrocław	152	2	6	67	16	77
<b>RAZEM</b>	<b>1.947</b>	<b>14</b>	<b>120</b>	<b>977</b>	<b>167</b>	<b>836</b>

W ramach składki, tak jak to ustalono w 2001r., członkowie otrzymywać będą roczną prenumeratę „*Postępów Biochemii*”, 4 wydania „*Listów do członków PTBioch*”, członkostwo w FEBS i EMBO, dostęp do *Acta Biochimica Polonica* w internecie, korzystanie z poczty dostępnej w ramach Listy elektronicznej PTBioch, oraz prawo do obniżonych płatności za uczestnictwo w Zjazdach i Konferencjach organizowanych przez

Tabela 2

**Nowi członkowie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przyjęci w latach 1999-2001.**

Stan na dzień 10 września 2001 r.

PTB oddział	1999		2000		2001		Razem	
	ogółem	w tym studenci	ogółem	w tym studenci	ogółem	w tym studenci	ogółem	w tym studenci
Białystok	7	1	-	-	-	-	7	1
Gdańsk	5	3	2	-	6	2	13	5
Katowice	19	11	15	7	4	4	38	22
Kraków	9	3	7	5	9	-	25	8
Lublin	7	3	2	-	6	2	15	5
Łódź	6	1	6	3	6	2	18	8
Olsztyn	-	-	-	-	1	-	1	-
Poznań	3	1	9	1	2	-	14	2
Szczecin	1	-	6	-	3	1	10	1
Toruń	1	-	1	-	4	2	6	2
Warszawa	18	11	15	8	23	10	56	29
Wrocław	2	1	1	-	17	7	20	8
<b>Razem</b>	<b>78</b>	<b>35</b>	<b>64</b>	<b>24</b>	<b>81</b>	<b>30</b>	<b>223</b>	<b>89</b>

PTBioch, FEBS i EMBO. Członkowie honorowi i emeryci są zwolnieni z opłat. Emeryci będą mogli opłacić prenumeratę „*Postępów Biochemii*” w kwocie 25 zł, członkowie honorowi są zwolnieni od takiej opłaty. Niezrzeszeni mogą opłacić prenumeratę „*Postępów Biochemii*” w wysokości 60 zł.

Sprawy finansowe Towarzystwa układały się zadawalająco. Dzięki dofinansowaniu ze strony Komitetu Badań Naukowych było możliwe regularne i na wysokim poziomie wydawanie czasopism oraz organizacja Zjazdów. Ważną pozycję w budżecie Towarzystwa stanowi dotacja Molecular Research Center z Cincinnati, USA, prowadzonego przez dr Piotra Chomczyńskiego. Dotacja ta jest składana Towarzystwu dzięki staraniom prof. L. Konarskiej. Jest ona przeznaczona na najważniejszą nagrodę Towarzystwa, nagrodę im. J.K. Parnasa. Z kolei dotacja firmy Aldrich-Sigma przeznaczona jest na nagrodę za najlepszą pracę z polskiego laboratorium z dziedziny chemii i biochemii kwasów nukleinowych. Budżet Towarzystwa jest także wspierany przez Instytuty: Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN, Biochemii i Biofizyki PAN, Chemii Bioorganicznej PAN, a także przez Sieć Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN.

Zarząd Główny przy współpracy z Zarządami Oddziałów prowadzi działalność Statutową przez Sekcje, Komisje i Zespoły. Zgodnie ze Statutem Towarzystwa, każdego roku, zależnie od potrzeby, odbywają się posiedzenia Prezydium Zarządu Głównego, a także co najmniej dwa posiedzenia rozszerzonego Zarządu Głównego z udziałem przedstawicieli wszystkich Oddziałów, organizatorów Zjazdów naukowych i innych zapraszanych gości.

Dyżury członków Prezydium odbywają się we wtorki w siedzibie Zarządu Głównego, która od 1993 roku mieści się w murach Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN przy ulicy Pasteura 3 w Warszawie. Biuro Zarządu Głównego oraz redakcja „*Acta Biochimica Polonica*” i „*Postępów Biochemii*” są zlokalizowane w jednym budynku.

**Głównym statutowym celem Towarzystwa jest popieranie rozwoju biochemii, popularyzacja jej osiągnięć oraz integracja środowiska biochemicznego.**

**Zarząd Główny XVI kadencji realizował te cele przez:**

- **działalność wydawniczą,**
- **premiowanie osiągnięć naukowych przez konkursy i nagrody,**
- **popularyzację staży naukowych krajowych i zagranicznych fundowanych przez FEBS,**
- **współorganizację dorocznych Zjazdów Towarzystwa,**
- **integrację polskiego Środowiska biochemicznego,**
- **popularyzację dorocznych Zjazdów FEBSu i aktywną pracę we władzach FEBS,**
- **współpracę z innymi Towarzystwami Naukowymi w Polsce oraz innymi Towarzystwami Biochemicznymi w Europie.**

## **I. Działalność wydawnicza:**

Polskie Towarzystwo Biochemiczne wydaje:

- kwartalnik „*Postępy Biochemii*”

kwartalnik indeksowany jest w Medline i Agrolibex. Redaktorem Naczelnym pisma do dnia 1 stycznia 2001 roku była p. prof. Zofia Zielińska. Od tej daty obowiązki te przejęła p. prof. Grażyna Palamarczyk. Pani prof. Z. Zielińska pełni funkcję Redaktora Seniora. Prace opublikowane w kwartalniku zawierają informacje z zakresu współczesnych kierunków badań w naukach biologicznych, przybliżając najnowsze osiągnięcia z wielu dziedzin. Kwartalnik wydawany w języku polskim jest cennym uzupełnieniem podręczników akademickich i uczy mówić o biochemii poprawną polszczyzną.

- kwartalnik „*Acta Biochimica Polonica*”

jest wydawany wspólnie z Komitetem Biochemii i Biofizyki PAN. Kwartalnik jest indeksowany przez Current Contents, BIOSIS, Chemical Abstracts, Excerpta Medica, Medline. Naczelnym redaktorem pisma do roku 1999 była pani prof. Konstancja Raczyńska-Bojanowska, a od roku 1999 funkcję tę pełni prof. Liliana Konarska. Przewodniczącym Rady Redakcyjnej jest prof. Lech Wojtczak. Kwartalnik publikuje oryginalne prace doświadczalne w języku angielskim. Redakcji pisma należą się słowa najwyższego uznania, bowiem dzięki jej staraniom „*impact factor*” pisma stale rośnie. Wynosił on w 1998r. — 0.522, w 1999r. — 0.477, w 2000r. — 0.569, a w 2001 — 0.749. Należy ponadto dodać, że utrzymywana jest odrębna strona *Acta Biochimica Polonica* „on line”.

Obydwa kwartalniki są wydawane z pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych, co zapewnia ich regularne ukazywanie się w prawidłowych terminach i nowoczesną szatę graficzną.

- biuletyn Towarzystwa: „*Listy do członków PTBioch*”

Biuletyn jest redagowany przez dr Teresę Wesołowską i wydawany w Szczecinie. W ciągu XVI Kadencji do chwili obecnej ukazało się 10 numerów Listów (Nr. 52-55 w roku 1999, 56-59 w roku 2000 i 60-61 do połowy roku 2001). Biuletyn przekazuje aktualne wiadomości dotyczące pracy Zarządu Głównego, pracy Oddziałów oraz informuje o naukowych imprezach w kraju i zagranicą. Biuletyn jest współfinansowany przez Towarzystwo Biochemiczne, oraz dzięki wysiłkom i zapobiegliwości p. dr Teresy Wesołowskiej przez firmy prezentujące oferty towarowe z zakresu technik laboratoryjnych. Rzetelna informacja oraz serdeczny stosunek dr Teresy Wesołowskiej do czytelników powodują, że biuletyn ten jest ważnym ogniwem integrującym środowisko biochemiczne.

## II. Konkursy i nagrody:

Towarzystwo powołuje Komisje, w skład których wchodzi wybitni naukowcy z Polski i spoza niej. Komisje decydują o przyznaniu nagrody.

Każdego roku Towarzystwo ogłasza konkurs na:

— najlepszą pracę doświadczalną z zakresu biochemii wykonaną w pracowni na terenie Polski. Konkurs ten jest uhonorowany nagrodą **im. prof. Jakuba Karola Parnasa**. Nagroda ta jest najpoważniejszą i najważniejszą nagrodą Towarzystwa i jest wręczana dorocznie podczas uroczystości otwarcia dorocznego Zjazdu PTBioch.

— najlepszą pracę przeglądową opublikowaną w czasopiśmie Towarzystwa „Postępy Biochemii”. Zwycięzca konkursu otrzymuje nagrodę **im. prof. Bolesława Skarżyńskiego**.

— innym rodzajem konkursów są konkursy, które rozgrywają się w czasie trwania Zjazdów PTBioch. I tak, w konkursie **im. prof. Włodzimierza Mozołowskiego** biorą udział młodzi naukowcy, biochemicy do lat 30-tu, przedstawiający swoje dokonania w postaci posteru lub krótkiego komunikatu. Z kolei konkurs **im. prof. Janiny Opieńskiej-Blauth** jest konkursem, w którym biorą udział studenci z Kół Naukowych, przedstawiający swoje szczególnie wartościowe prace badawcze na Zjazdach PTBioch. Konkurs ten jest ustanowiony z inicjatywy Lubelskiego Oddziału PTBioch.

— Nagroda **im. prof. Antoniego Dmochowskiego** jest przyznawana co dwa lata za wybitne osiągnięcia dydaktyczne w dziedzinie biochemii. Jest ona ustanowiona z inicjatywy Łódzkiego Oddziału PTBioch.

— Nagroda **im. prof. Bronisława Filipowicza** za specjalne zasługi w dziedzinie popularyzacji nauki, ustanowiona z inicjatywy Łódzkiego Oddziału PTBioch, została przyznana po raz pierwszy w roku 2001.

— Nagroda za najlepszą pracę z dziedziny **Chemii i Biochemii Kwasów Nukleinowych**. Inicjatorem tej nagrody jest Sekcja Kwasów Nukleinowych PTBioch, kierowana przez prof. J. Barciszewskiego, a sponsorem nagrody i dyplomu jest firma Sigma-Aldrich Polska.

Rozstrzygnięcie wszystkich konkursów następuje na jesieni danego roku. Nagrody imienia prof. prof.: Parnasa, Skarżyńskiego, Dmochowskiego i Filipowicza wręczane są w dniu rozpoczęcia obrad w czasie Uroczystego Otwarcia Zjazdu PTBioch. Nagrody imienia prof. prof. Mozołowskiego i Opieńskiej-Blauth są wręczane w czasie uroczystości zakończenia Zjazdu.

W czasie trwania omawianej XVI kadencji Zarządu nagrody otrzymali:

### NAGRODA im. J.K. PARNASA:

w roku 1999:

**A. Szalewska-Pałasz, A. Węgrzyn, A. Błaszczyk, K. Taylor, G. Węgrzyn** za pracę pt.

„DNA-stimulated transcriptional activation of orilambda: Escherichia coli RNA polymerase beta subunit as a transcriptional activator contact site” opublikowaną w *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 4241-4246.

w roku 2000:

**M. Prymakowska-Bossak, M.R. Przewłoka, J. Ślusarczyk, M. Kuraś, J. Lichota, B. Kiljańczyk, A. Jerzmanowski** za pracę pt. „Linker histones play a role in male leiosis and the development of pollen grains in tobacco” opublikowaną w *Plant Cell*, 1999, 11, 2317-2329.

w roku 2001:

nagrodę otrzymał Zespół **prof. Jacka Otlewskiego** za cykl trzech prac:

**T. Cierpicki, J. Otlewski** „Determination of a high precision structure of a novel protein, Linum usitatissimum trypsin inhibitor (LUTI), using computer-aided assignment of NOESY cross-peaks” opublikowaną w *J. Mol. Biol.*, 2000, 302, 1179-1192;

**T. Cierpicki, J. Bania, J. Otlewski** „NMR solution structure of *Apis mellifera* chymotrypsin/cathepsin C inhibitor-1 (AMC1-1): structural similarity with *Ascaris* protease inhibitors” opublikowaną w *Protein Sci*, 2000, 9, 976-984.

**A. Grzesiak, I. Krokoszyńska, D. Krowarsch, O. Buczek, M. Dadlez, J. Otlewski** „Inhibition of six serine proteinases of the human coagulation system by mutants of bovine pancreatic trypsin inhibitor” opublikowaną w *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 33346-33352.

\* W skład Komisji Konkursowej, w czasie trzech lat kadencji Zarządu (1999-2000-2001) wchodziły następujące osoby:

Przewodniczący: Prof. Grzegorz Bartosz (Uniwersytet Łódzki, Łódź)

Członkowie: Prof. Jan Barciszewski (Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań)

Prof. Jerzy Duszyński (Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, Warszawa)

Prof. Janusz Gębicki (School of Biol. Sci., Sydney, Australia)

Prof. Arkadiusz Kozubek (Uniwersytet Wrocławski, Wrocław)

Prof. Ryszard Oliński (Akademia Medyczna, Bydgoszcz)

Prof. Marta Pasenkiewicz-Gierula (Uniwersytet Jagielloński, Kraków)

Prof. Zofia Szweykowska (Uniwersytet A. Mickiewicza, Poznań)

Prof. Grzegorz Węgrzyn (Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański)

Prof. Krystyna Wolska (Uniwersytet Warszawski, Warszawa)

Dr hab. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław)

#### **NAGRODA im. B. SKARŻYŃSKIEGO:**

Nagrodę otrzymali:

w roku 1999:

**A. Krakowiak, M. Koziolkiewicz** za pracę pt. „Oligonukleotydy o właściwościach aptamerycznych” opublikowaną w „*Postęпах Biochemii*”, 1998, 44, 306-317.

w roku 2000:

**A. Węgrzyn, G. Węgrzyn** za pracę „Regulacja replikacji DNA bakteriofaga lambda i plazmidów lambda” opublikowaną w „*Postęпах Biochemii*”, 1999, 45, 5-11.

w roku 2001;

**I. Grądzka** za pracę „Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium” opublikowaną w „*Postęпах Biochemii*”, 2000, 46, 2-17.

W skład komisji konkursowych wchodziło:

Przewodniczący: Dr hab. Iwona Fijałkowska (1999) (Warszawa)

prof. Grażyna Palamarczyk (2000) (Warszawa)

prof. Krystyna Grzelak (2001) (Warszawa)

Członkowie: dr hab. Adam Dubin (1999) (Kraków)

prof. Włodzimierz Krzyżosiak (1999) (Poznań)

prof. Marek Naruszewicz (1999) (Szczecin)

doc. Jerzy Pałka (1999) (Białystok)

prof. Ryszard Słomski (1999) (Poznań)

prof. Zofia Zielińska (1999) (Warszawa)

doc. Krystyna Grzelak (2000) (Warszawa)

prof. Stanisław Lewak (2000) (Warszawa)

prof. Bogdan Liberek (2000) (Warszawa)

prof. Mirosława Naskręt-Barciszewska (2000) (Poznań)

prof. Magdalena Rakowska-Boguta (2000) (Warszawa)

dr hab. Ewa Sikora (2000) (Warszawa)

prof. Stanisław Szala (2000) (Warszawa)

prof. Zofia Zielińska (2000) (Warszawa)

dr hab. Iwona Fijałkowska (2001) (Warszawa)

prof. Teresa Jakubowicz (2001) (Lublin)



dr hab. Piotr Laidler (2001) (Kraków)  
prof. Andrzej Ożyhar (2001) (Wrocław)  
prof. Zofia Zielińska (2001) (Warszawa)  
prof. Mariusz Żydowo (2001) (Gdańsk)

#### **NAGRODA im. W. MOZOŁOWSKIEGO (dla młodych biochemików, do lat 30-u):**

Nagrody uzyskali:

w roku 1999:

Główna nagroda: **A. Kobiela**k za pracę pt. „Utrata stabilności transkryptu genu MSX 1, wywołana mutacją w regionie kodującym 3'-UTR, może powodować zaburzenia tworzenia zawiązków zębów”

**I. Biedrzycka** (wyróżnienie)

w roku 2000:

Główna nagroda: **K. Kobiela**k za pracę pt. „Rola czynników transkrypcji LEF-1 i beta kateniny w różnicowaniu się przydatków skóry. Udział ścieżki sygnałowej WNT”.

**M. Bobeszko** (wyróżnienie)

**H. Czapińska** (wyróżnienie)

**M. Golczak** (wyróżnienie)

**A. Masny** (wyróżnienie)

**M. Nawrot** (wyróżnienie)

**M. Palczewska** (wyróżnienie)

**M. Schmidt** (wyróżnienie)

w roku 2001:

Główna nagroda: **J. Wiejak** za pracę autorstwa J. Wiejak, E. Wyroba pt „Homolog ssaczej dynaminy 2 u *Paramecium*: klonowanie i sekwencjonowanie katalitycznej domeny GTP-azowej”

**A. Kirilenko** (wyróżnienie)

**F. Kukulski** (wyróżnienie)

**M. Mucha** (wyróżnienie)

**D. Piękna** (wyróżnienie)

**M. Sakowicz** (wyróżnienie)

**S. Wiśniewski** (wyróżnienie)

W skład komisji konkursowych wchodził:

Przewodniczący: Prof. Jerzy Duszyński (1999) (Warszawa)

Prof. Witold Walerych (2000) (Poznań)

Prof. Michał Woźniak (2001) (Gdańsk)

Członkowie: prof. Zofia Szwejkowska-Kulińska (1999) Poznań

dr hab. Dariusz Stępkowski (1999) Warszawa

prof. Przemysław Wojtaszek (1999) (Poznań)

prof. Janina Kwiatkowska-Korczak (2000) (Wrocław)

dr hab. Cezary Mądrzak (2000) (Poznań)

prof. Ryszard Słomski (2000) (Poznań)

Prof. Liliana Konarska (2001) (Warszawa)

Prof. Jadwiga Gniot-Szulżycka (2001) (Toruń)

Prof. Zdzisław Zwierz (2001) (Kraków)

#### **NAGRODA im. J. OPIEŃSKIEJ-BLAUTH (przyznawana studentom)**

W roku 1999:

I Nagroda: **J. Krajewski** i **T. Stefaniak** za pracę pt. „Rola reaktywnych form tlenu w eksperymentalnej nefrokarcinogenezie”

II Nagroda: **M. Ociepa** za pracę pt. „Estrogeny Środowiskowe indukują ekspresję genów dla dytochromów CYP1A1 i CYP1A2 uczestniczących we wzmacnianiu działania estrogenów naturalnych w komórkach linii ustalonej raka sutka MCF-7”.

**U. Wilczyńska** (wyróżnienie)

W roku 2000:

Nagroda: **M. Kaszuba** za pracę pt. „Próba przeniesienia genu syntazy resweratrolowej z winorośli (*Vitis inifera*) do pomidora (*Lycopersicon esculentum*)”

**J. Gołębiewska** (wyróżnienie)

**A. Waclawik** (wyróżnienie)

**B. Skoblińska** (wyróżnienie)

W roku 2001:

Nagroda (dwie równorzędne nagrody za wspólną pracę): **J. Kobiela** i **J. Krajewski** za pracę pt. „Mikrosomalna 4-hydroksylaza estradiolu jako enzym odpowiedzialny za powstawanie stresu oksydacyjnego w eksperymentalnym nowotworze nerki”.

**J. Gołębiewska** (wyróżnienie)

**P. Rozwadowski** (wyróżnienie)

**R. Dutkiewicz** (wyróżnienie)

**A. Czyż** (wyróżnienie)

W skład Komisji Konkursowych wchodził:

Przewodniczący: dr. Artur Jarmołowski (1999) (Poznań)

prof. Tomasz Borkowski (2000) (Lublin)

prof. Marta Stryjecka-Zimmer (2001) (Lublin)

Członkowie: prof. Marta Stryjecka-Zimmer (1999) (Lublin)

dr Maria Sanecka-Obacz (1999) (Lublin)

dr Teresa Wesołowska (1999) (Szczecin)

prof. Henryk Berbeć (2000) (Lublin)

prof. Michał Woźniak (2000) (Gdańsk)

dr Teresa Wesołowska (2000) (Szczecin)

prof. Janina Kwiatkowska-Korczak (2001) (Wrocław)

dr Teresa Wesołowska (2001) (Szczecin)

## **NAGRODA im. A. DMOCHOWSKIEGO**

Nagroda ta jest przyznawana co dwa lata. W czasie omawianej XVI kadencji Zarządu PTBioch była przyznana tylko raz, w roku 2000, będąc III edycją Konkursu.

Główna nagroda:

**E. Bartnik, M. Chorąży, M. Fikus, W. Gajewski, W. Jachymczyk, A. Jerzmanowski, H. Krzanowska, B. Lipińska, W. Ostoja-Zagórski, K. Staroń, P. Stępień, S. Szala, A. Taylor, K. Taylor** za podręcznik pt. „Genetyka Molekularna” pod red **P. Węgleńskiego**, PWN, 1998

Wyróżnienie:

Wyróżnienie przyznano za pracę „Na pograniczu chemii i biologii” pod red. **J. Barciszewskiego, H. Koronaka, W.T. Makarewicza, K. Ziernickiego**, tomy 1,2,3, Wydawnictwo Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, Poznań, 1998-1999

W pracach Komisji uczestniczyły następujące osoby:

Przewodnicząca: prof. Zofia Walter (Łódź)

Członkowie: prof. Edward Bańkowski (Białystok)

prof. Tomasz Borkowski (Lublin)

prof. Leokadia Kłyszajko-Stefanowicz (Łódź)

prof. Maria Malicka-Błaszkiwicz (Wrocław)

prof. Zdzisław Żak (Kraków)

## **NAGRODA im. B. FILIPOWICZA**

Nagroda przyznana po raz pierwszy w roku 2001 — I edycja Konkursu.

Główna nagroda:

**prof. M. Fikus** w uznaniu dorobku naukowego, organizacji „Festiwalu Nauki” w Warszawie, a także prezentację osiągnięć nauk biologicznych w środkach powszechnego przekazu

Wyróżnienie:

**prof. A. Kubicz** w uznaniu dorobku naukowego, publikację książki pt. „Tajemnice ewolucji molekularnej”, PWN 1999, oraz organizację „Festiwalu Nauki” na Dolnym Śląsku.

W pracach Komisji uczestniczyli:

Przewodniczący: prof. Marek Gniazdowski (Łódź)

Członkowie: prof. Stanisław Bielecki (Łódź)

prof. Tomasz Borkowski (Lublin)

prof. Jerzy Duszyński (Warszawa)

prof. Leokadia Kłyszajko-Stefanowicz (Łódź)

dr hab. Leszek Szmigiero (Łódź)

prof. Grzegorz Węgrzyn (Łódź)

## NAGRODA ZA NAJLEPSZĄ PRACĘ Z CHEMII I BIOCHEMII KWASÓW NUKLEINOWYCH

Nagrodę uzyskali:

w roku 1999:

**R. Tomaszewski, E. Mogielnicka, A. Jerzmanowski** za pracę „Both the 5S rRNA gene and the AT-rich flanks of *Xenopus laevis* oocyte-type 5S rDNA repeat are required for histone H1-dependent repression of transcription of pol III-type genes *in vitro* reconstituted chromatin” opublikowaną w *Nucleic Acid Res.* 1998, 26, 5596-5601.

w roku 2000:

**Specjalna Nagroda Milenijna 2000** Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i firmy Sigma-Aldrich Polska, za wybitny wkład w rozwój badań nad kwasami nukleinowymi w Polsce dla:

**prof. Davida Shugara i prof. Macieja Wiewiórowskiego.**

w roku 2001:

**J. Bujnicki** za pracę „Phylogenomic analysis of 16S rRNA:(guanine-N2) methyltransferases suggests new family members and reveals highly conserved motifs and a domain structure similar to other nucleic acid aminomethyltransferases” opublikowaną w *FASEB J.*, 2000, 14, 2365-2368.

Nagroda jest przyznawana w wyniku pracy Kapituły powołanej przy Sekcji Kwasów Nukleinowych PT-Bioch. Jest ona kierowana przez prof. Jana Barciszewskiego (Poznań), a w skład jej wchodzi następujący profesorowie: Edward Darżynkiewicz (Warszawa), Witold Filipowicz (Bazylea), Ryszard Kole (Chapel Hill NC, USA), Maria M. Konarska (New York NY, USA), Jarosław Kuśmierk (Warszawa), Wojciech T. Markiewicz (Poznań), Antoni J. Rafalski (Wilmington DE, USA), Jacek Stawiński (Sztokholm), Wojciech J. Stec (Łódź), Zygmunt Wasylewski (Kraków), Joanna Zakrzewska-Czerwińska (Wrocław), Maciej Żylicz (Gdańsk, Warszawa).

W skład nagród PTBioch wchodzi dyplomy, a także znaczne kwoty pieniędzy. Nagrodę im. A. Dmochowskiego i B. Filipowicza stanowi dyplom i medal z brązu. Na nagrodę za najlepszą pracę z biochemii i chemii kwasów nukleinowych, sponsorowaną przez firmę Sigma-Aldrich Polska, składa się nagroda pieniężna i okazały dyplom z brązu. Nagroda sponsorowana przez tę firmę jest wręczana na kolejnym Zjeździe PTBioch przez Prezesa Towarzystwa i przedstawicieli firmy. W roku 1999 był nim p. dr Aleksander Jankowski, a w latach 2000, 2001 p. dr Maciej Marlewski. Nagrody PTBioch stanowią prestiżowe wyróżnienie i mają szeroki oddźwięk w społeczności biochemicznej.

### III. Staże Naukowe

Uczestnictwo w stażach naukowych jest gorąco popierane przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne. Zarząd Towarzystwa prowadzi nieustanną akcję propagującą wyjazdy młodych naukowców na stypendia fundowane przez FEBS. Członkowie Towarzystwa każdego roku występują za naszym poparciem do władz FEBSu ubiegając się o stypendia: długoterminowe, krótkoterminowe i dwumiesięczne w okresie letnim (*summer fellowship*), a także o stypendia umożliwiające udział w specjalnych tygodniowych lub dwutygodniowych kursach naukowych, czy corocznych Zjazdach FEBSu. W roku 1999 przyznano 2 stypendia długoterminowe, 4

krótkoterminowe i 1 w okresie letnim. Ponadto 20 osób uzyskało stypendia na wyjazdy na kursy i zjazdy, co w sumie pokazuje, że ze stypendiów FEBSu korzystało 27 osób. W roku 2000 przyznano 4 stypendia długoterminowe, 4 krótkoterminowe i 2 w okresie letnim. Ponadto 15 młodych naukowców z Polski uzyskało stypendia na organizowane przez FEBS i IUMB Sympozjum poprzedzające Zjazd, co również pokazuje, że ze stypendiów tych korzystało 25 osób. Obecna liczba wydaje się być podwojeniem wartości z lat poprzednich, wskazując na coraz większe zaangażowanie i aktywność młodych ludzi. Nie ma jeszcze danych opracowanych przez FEBS i informujących o stypendiach w roku 2001, jednak wstępne nasze szacunki wskazują na podobną ilość osób jak w roku 1999. Na Zjazd FEBS-u w Lizbonie w 2001r zakwalifikowało się 10 osób z Polski (na 90 wszystkich) uzyskując stypendia na wyjazd. Natomiast na specjalnie zorganizowane tzw. „Forum Młodych Naukowców”, poprzedzające Zjazd, zakwalifikowało się na 65 uczestniczących w Forum 7 osób.

#### IV. Zjazdy Towarzystwa

W okresie Sprawozdawczym odbyły się następujące Zjazdy Towarzystwa Biochemicznego:

- **XXXV Zjazd Towarzystwa w Olsztynie-Krotowie**, w dniach 13-16 września 1999r.,
- **XXXVI Zjazd Towarzystwa w Poznaniu**, w dniach 11-14 września 2000r.
- **XXXVII Zjazd Towarzystwa w Toruniu**, w dniach 10-14 września 2001r.

Dokładne informacje dotyczące Zjazdów można znaleźć w dodatkowych Materiałach stanowiących Sprawozdania z tych Zjazdów opublikowanych w „Postęпах Biochemii” (Zjazd w Olsztynie — „Postępy Biochemii” 45 (4) 1999, 344-346; Zjazd w Poznaniu — „Postępy Biochemii” 46 (4) 2000, 355-357).

W Zjeździe w Krotowie-Olsztynie uczestniczyło 419 osób, w Poznaniu 900 osób, a w Toruniu 700 osób. We wszystkich Zjazdach brali udział koledzy biochemicy pochodzenia polskiego z Białorusi (Grodno) i Ukrainy (Lwów). Przyjazdy ich są współfinansowane przez Towarzystwo i „Wspólnotę Polską” i koordynowane z ogromnym zaangażowaniem przez prof. Marka Gniazdowskiego (Łódź).

Towarzystwo Biochemiczne patronuje także i współorganizuje Sesje, czy Sympozja monotematyczne. Takim Sympozjum było Sympozjum zorganizowane w Gdańsku dotyczące metabolizmu puryn i pirymidyn, które odbywało się w okresie 14-18 września 1999r. (7th Symposium of the European Society for the Study of Purine & Pyrimidine Metabolism in Man). Na czele komitetu organizacyjnego stał prof. Wiesław Makarewicz.

#### V. Integracja polskiego środowiska biochemicznego

Integracja polskiego środowiska biochemicznego odbywa się dzięki corocznym Zjazdom, a także dzięki wydawanym „Listom do członków PTBioch”, czy poprzez komunikaty publikowane przez redakcję „Postępów Biochemii”. Towarzystwo ma także swoją stronę internetową powstałą w poprzedniej kadencji w wyniku starań prof. L. Konarskiej: [www.ptbioch.edu.pl](http://www.ptbioch.edu.pl). Ponadto w czasie obecnej kadencji utworzono w 2000r. listę e-mailową członków PTBioch ([infoptbioch@nencki.gov.pl](mailto:infoptbioch@nencki.gov.pl)). Lista ta powstała i była pod bezpośrednim nadzorem Sekretarza Zarządu, dr hab. D. Stępkowskiego, prowadzona przy pomocy dr hab. A. Szewczyka (Warszawa). Obecnie na liście tej znajduje się już wiele osób. Zwiększa to doskonale przepływ informacji między członkami Towarzystwa, pozwala na szybkie przekazywanie danych, a także na przekazywanie informacji dochodzących do Zarządu Towarzystwa od władz FEBSu.

Z okazji czterdziestolecia powstania Towarzystwa, Zarząd Główny zorganizował 16 grudnia 1998r uroczystą Sesję, na której prócz wykładu naukowego prof. Lecha Wojtczaka, kolejni Prezesi Towarzystwa snuli wspomnienia opowiadając o swojej pracy. Sesja zakończyła się szampanem.

#### VI. Zjazdy FEBSu i aktywna praca we władzach FEBSu

Polskie Towarzystwo Biochemiczne od roku 1963 jest członkiem Europejskiej Federacji Towarzystw Biochemicznych (FEBS). Zarząd Główny usilnie stara się, aby jak najwięcej członków Towarzystwa uczestniczyło w dorocznych Zjazdach FEBSu. Zachęca też młodych ludzi, aby aplikowali do władz FEBSu o stypendia, które pozwalają na częściową lub całkowitą odpłatność udziału w Zjazdach.

W roku 1999, Zjazd FEBSu miał miejsce w Nicei, we Francji. W Zjeździe tym, na ogólną liczbę 813 uczestniczyły 64 osoby z Polski. Polska, po Francji, Niemczech i Szwecji była najliczniej reprezentowanym krajem

na tym Zjeździe. Wśród osób z Polski, 15 reprezentowało młodych ludzi (do 31 roku życia), którzy dostali pełne stypendia.

Zjazd FEBSu w 2000 roku odbywał się wspólnie z Kongresem IUBMBu w Birmingham, Anglia. Na tym Zjeździe (liczba wszystkich uczestników — 1019), Polska reprezentowana była także przez bardzo liczną grupę 114 osób, z czego aż 42, a więc blisko połowę, stanowili młodzi ludzie do 31 roku życia. Wśród tych osób, 15 (na 120 wszystkich) wygrało konkurs i wzięło udział w dwudniowym, poprzedzającym Kongres Sympozjum (Young Scientist Travel Fellowships Symposium). Podczas Sympozjum miały one możliwość prezentowania wyników uzyskanych w laboratoriach w Polsce. Udział w Sympozjum, wpisowe na Kongres i wszelkie pozostałe opłaty związane z uczestnictwem w Kongresie były opłacone przez organizatorów. Zjazd FEBS-u w Lizbonie w 2001 roku zgromadził około 1889 osób (liczba tak duża ze względu na uczestników z Płd. Ameryki), w tym z Polski było osób 76.

Ponieważ w roku 1996 na Zjazd w Bazylei przybyło 16 osób z Polski, a w latach 1997 i 1998 na Zjazdy w Barcelonie i Kopenhadze 25 i odpowiednio 23 osoby, zwiększenie uczestnictwa osób z Polski w Zjazdach FEBSu w latach 1999 i 2000 jest 3-krotne. Sądzymy, że jest to wynik starań i pracy propagandowej Zarządu Głównego, którego komunikaty dzięki uzupełnianej na bieżąco stronie internetowej, liście e-mailowej oraz „Listom do członków PTBioch” docierają obecnie do większej ilości kolegów i stymulują do wyjazdów i starań o stypendia.

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego usilnie stara się, aby jak najwięcej przedstawicieli PTBioch zasiadało we władzach FEBSu. W roku 1995, w poprzedniej Kadencji Zarządu, po wielu latach przerwy do władz FEBSu został wybrany prof. Maciej J. Nałęcz (Warszawa) jako członek Advanced Courses Committee. Kadencja prof. Nałęcza skończyła się w roku 1999. W tym samym roku i do tego samego Komitetu został jednak wybrany prof. Jan Barciszewski (Poznań). W październiku 1998r. odbył się FEBS Advanced Course w Poznaniu pt. „RNA Biochemistry and Biotechnology” organizowany przez prof. Barciszewskiego. W październiku 2000r., na zebraniu Komitetu zapadła pozytywna decyzja odnośnie organizacji w Polsce następnego Kursu FEBS-u (przyjęta aplikacja). Tym razem będzie to Kurs praktyczny na temat: „Estimation of DNA damage induced by genotoxic agents”. Kurs odbywać się będzie w Gliwicach w roku 2002, a głównym organizatorem jest prof. Joanna Rzeszowska-Wolny. Pan prof. Barciszewski i Zarząd Główny Towarzystwa gorąco zachęcają kolegów do jak największego udziału przy organizacji takich Kursów.

W roku 1999, na Zjeździe w Nicei, powstała w ramach FEBSu nowa Grupa Robocza, której zadaniem jest podniesienie na wyższy poziom biochemii i biologii molekularnej w krajach Europy Wschodniej (FEBS Working Group to Explore Ways to Improve Assistance to Eastern European Countries). W skład tej grupy wchodzi prof. Jolanta Barańska (Warszawa). Jednym z efektów działań tej grupy była możliwość wystąpienia do władz FEBSu Towarzystw Biochemicznych państw Wschodniej i Centralnej Europy z prośbą o bezpłatną subskrypcję czasopism publikowanych przez Federację, tj. FEBS Letters i European Journal of Biochemistry. W wyniku starań Zarządu Głównego, Polska, poczynając od roku 2001 uzyskała 3-letnią subskrypcję tych pism dla grupy naukowców pracujących na Wydziale Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego w Rzeszowie pod kierunkiem prof. Tomasza Bilińskiego.

Największym jednak, bezspornym osiągnięciem Zarządu Głównego i społeczności biochemicznej był wybór w roku 2001, na Zjeździe FEBS-u w Lizbonie, prof. Macieja J. Nałęcza (Warszawa) jako Przewodniczącego Komitetu Stypendialnego FEBS-u (President of the FEBS Fellowship Committee). Nominacja ta powoduje jednocześnie wejście prof. Nałęcza do ścisłej, kierowniczej egzekutywy FEBS-u. Także w 2001 r. prof. Stanisław Bielecki (Łódź) wszedł do Executive Committee Europejskiej Federacji Biotechnologii. Prof. Bielecki jest założycielem i aktywnym działaczem Sekcji Biotechnologicznej przy Polskim Towarzystwie Biochemicznym. Obydwu profesorom serdecznie gratulujemy wyboru!

## **VII. Współpraca z innymi Towarzystwami Naukowymi w Polsce oraz z innymi Towarzystwami Biochemicznymi w Europie**

Polskie Towarzystwo Biochemiczne jest otwarte i współpracuje z wieloma Towarzystwami Naukowymi w Polsce. Szczególnie dobrze rozwija się współpraca z Polskim Towarzystwem Chemicznym. Te dwa towarzystwa a ponadto jeszcze Towarzystwo Fizyczne, Geograficzne i Przyrodników im. M. Kopernika utworzyło Zespół do spraw Edukacji Przyrodniczej współpracujący z Ministerstwem Edukacji w sprawie nauczania na poziomie gimnazjów i liceów. W wyniku działań tego Zespołu odbyło się w Lublinie, w dniach 11-13 lutego

2000r. Symposium Naukowo-Dydaktyczne „Społeczne znaczenie wiedzy przyrodniczej”. Polskie Towarzystwo Biochemiczne reprezentował w tych działaniach prof. Jerzy Duszyński (Warszawa).

Współpraca z innymi, sąsiadującymi z nami Towarzystwami Biochemicznymi, także rozwija się dobrze. Jako wzorcową podajemy współpracę Polskiego i Ukraińskiego Towarzystwa Biochemicznego. Obydwa te Towarzystwa patronują Polsko-Ukraińskim Konferencjom Biochemicznym im. Jakuba Karola Parnasa. Konferencje te odbywają się co 2 lata naprzemiennie, raz w Polsce, raz na Ukrainie. Pierwsza, zorganizowana przez Zarząd Główny poprzedniej Kadencji, odbyła się we Lwowie we wrześniu 1996r., druga w Gdańsku w 1998r. Zarząd obecnej Kadencji współorganizował z kolegami ukraińskimi Konferencję w październiku 2000r. we Lwowie. Na Konferencję tę ze strony polskiej przyjechało 85 naukowców, reprezentujących ośrodki z różnych miast Polski i różne dziedziny biochemii i biologii molekularnej. Sprawozdanie z tej Konferencji było publikowane w „Postęпах Biochemii”, 2000, 46, 357-358. Następną Konferencją Parnasa odbędzie się w roku 2002 we Wrocławiu.

Jednym z osiągnięć Polskiego Towarzystwa Biochemicznego jest zawarcie z Ukraińskim Towarzystwem Biochemicznym porozumienia o współpracy. W porozumieniu tym postanowiono prowadzić szereg akcji promujących biochemików obu Krajów, organizować Kursy, Zjazdy i wspólne Konferencje ze specjalnym uwzględnieniem Konferencji Parnasa. Porozumienie zostało podpisane w Kijowie 16 czerwca 2001 roku przez Prezesów obu Towarzystw, prof. Siergieja Komisarenkę i prof. Jolantę Barańską. Przy podpisywaniu umowy uczestniczyli również dr Ludmiła Drobot (reprezentująca grupę naukowców lwowskich) i prof. Andrzej Dżugaj (główny organizator Konferencji Parnasa we Wrocławiu w roku 2002).

Należy także dodać, że PTBioch aktywnie uczestniczy w dyskusji Forum Europejskiego na temat rozwoju nauki w Europie. Zaproszeni do dyskusji nad dokumentem „Towards a European Research Area” przez p. Philippe Busquin, opracowaliśmy nasze stanowisko punktując i zwracając uwagę na szereg istotnych problemów. Dokument ten był tworzony w porozumieniu z kolegami wszystkich Oddziałów, choć szczególne podziękowania należą się Oddziałowi w Białymstoku, Krakowie i Warszawie.

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego składa serdeczne podziękowanie Przewodniczącym i Kolegom pracującym w Oddziałach i Sekcjach, Redaktorom Czasopism, Organizatorom kolejnych Zjazdów PTBioch, Kolegom pracującym w poszczególnych Komisjach Konkursowych i Komitetach FEBS-u oraz wszystkim innym, których praca przyczyniła się do rozwoju Towarzystwa i integracji środowiska biochemicznego.

Prof. Jolanta Barańska  
Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Warszawa 26 wrzesień 2001r.

# Roczny spis treści tom 47, nr 1, 2, 3, 4, 2001

## ARTYKUŁY

- Małgorzata Sidorkiewicz** — CCC DNA — pośrednia forma replikacyjna genomu HBV . . . . . 2
- Małgorzata Czyż** — Czynniki transkrypcyjne Sp1 . . . . . 10
- Beata Dudzińska, Tomasz Twardowski** — Struktura rybosomu prokariotycznego. 19
- Beata Nowicka-Sans, Krystyna I. Wolska** — Rola białek GreA i GreB w elongacji transkrypcji bakteryjnej . . . . . 30
- Andrzej Trzeciak, Janusz Błasiak** — Naprawa DNA w komórkach ssaków: mechanizm rekombinacji homologicznej . . . . . 38
- Ryszard Oliński, Marek Jurgowiak** — Czy w mitochondriach działają skuteczne mechanizmy naprawy DNA? . . . . . 52
- Teresa Żołądek, Joanna Kamińska** — Rola ligazy ubikwitynowo-białkowej Rsp5p w endocytozie białek błony komórkowej u drożdży. . . . . 63
- Marta Tkaczyk, Katarzyna Kalita** — Receptor estrogenowy — budowa, regulacja i funkcja . . . . . 72
- Paweł P. Jagodziński** — Rola receptorów chemokin w procesie infekcji HIV oraz leczeniu AIDS . . . . . 80
- Agnieszka Szpecht-Potocka** — Rodzicielskie piętno genomowe w zespole Pradera-Williego . . . . . 87
- Katarzyna Borg, Agnieszka Szpecht-Potocka** — Przyczyna zespołu Angelmana — nowe spojrzenie na mechanizm rodzicielskiego piętna genomowego . . . . . 98
- Marlena Szalata** — Dinukleozydopolifosforany: występowanie, metabolizm i funkcje 105
- Ewa Bartnik** — Genom ludzki 2001 . . . . . 114
- Maja Hemmings-Mieszczak** — Rola struktury mRNA w inicjacji translacji u eukariontów . . . . . 118
- Tomasz T. Calikowski** — Przebudowa struktur chromatynowych przez kompleksy wielobiałkowe. . . . . 129
- Dariusz Bartosik** — Stabilność plazmidów bakteryjnych . . . . . 138
- Anna Jasińska, Włodzimierz Krzyżosiak** — Funkcje genów BRCA1 i BRCA2 związanych z dziedziczną predyspozycją do raka sutka . . . . . 146
- Anna Nogalska, Julian Świerczyński** — Malonylo-koenzym A jako cząsteczka sygnałowa czynna w regulacji łaknienia . . . 160
- Anna Jakubowska, Elżbieta Zielińska, Stanisław Kowalczyk** — Metabolizm i transport auksyn w roślinach . . . . . 169
- Kamil Frankowski, Jacek Kęsy, Jan Kopicewicz** — Fitochrom i transdukcja sygnału świetlnego . . . . . 184
- Anna Maassen, Jacek Hennig** — Udział tlenu azotu w odpowiedzi roślin na infekcje 192
- Anna Nogalska, Julian Świerczyński** — Leptyna — hormon o wielu funkcjach . . . 200
- Karolina Przybyłowska, Janusz Błasiak** — Metaloproteazy macierzowe i ich rola w progresji nowotworów . . . . . 212
- Marek Cybulski, Henryk Berbeć** — Rola katepsyny D w progresji nowotworów . . . 224
- Joanna Pieńkowska, Zofia Szwejkowska-Kulińska** — Syntazy pseudourydynowe — enzymy wprowadzające najczęstszy w kwasach nukleinowych modyfikowany nukleozyd — pseudourydynę . . . . . 232

- Rafał Derlacz** — Informacja genetyczna pod kontrolą — rola eukariotycznej topoizomerazy I . . . . . 243
- Anna Linkiewicz, Marcin Filipecki** — Od zróżnicowanej ekspresji genu do klonu cDNA — przegląd metod identyfikacji genów o zmiennym poziomie transkrypcji . 253
- Agata Czyż, Grzegorz Węgrzyn** — Mechanizm, regulacja i rola bioluminescencji bakterii . . . . . 263
- Joanna Szepeta-Wiśniewska, Eliza Wyższko, Mirosława Barciszewska** — Rola oddziaływania białko-RNA podczas cyklu życiowego wirusa HIV. . . . . 272
- Marzena Rola, Jacek Kuźmak** — Zastosowanie rybozymów "hammerhead" jako czynników przeciwwirusowych. . . . . 283
- Karina Solecka, Anna Przykorska** — Charakterystyka rodziny nukleaz 5' . . . . 293
- Andrzej Trzeciak** — Kwercecytyna: znaczenie w mutagenezie i karcynogenezie . . . 301
- Urszula Kralisz** — Budowa i funkcja białka CD36. . . . . 309
- Izabela M. Juszczyk, Anna M. Rychter** — Regulacja aktywności oksydazy alternatywnej . . . . . 321
- Ewa Bałczewska, Piotr Bałczewski** — Mechanizmy przeciwersorpcyjnego działania bisfosfonianów w chorobach układu kostnego . . . . . 331

## Indeks autorów prac przeglądowych, tom 47, 2001

### B

**Bałczewska E** — Zakład Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej i Przyzębia, Instytut Stomatologii, Akademia Medyczna w Łodzi, ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź

**Bałczewski P** — Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź, pbalczew@bilbo.cbmm.lodz.pl

**Barciszewska M** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań, mbarcisz@ibch.poznan.pl

**Bartnik E** — Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Genetyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

**Bartosik D** — Uniwersytet Warszawski, Instytut Mikrobiologii, Zakład Genetyki Bakterii, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa,

**Berbec H** — Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Akademii Medycznej w Lublinie, ul. Lubartowska 85, 20-123 Lublin

**Błasiak J** — Uniwersytet Łódzki, Katedra Genetyki Molekularnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, januszb@biol.uni.lodz.pl

**Borg K** — Instytut Matki i Dziecka, Zakład Genetyki Medycznej, ul. Kasprzaka 17a, 01-529 Warszawa

### C

**Calikowski TT** — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pracownia Biologii Molekularnej Roślin, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, tomekc@ibb.waw.pl

**Cybulski M** — Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Akademii Medycznej w Lublinie, ul. Lubartowska 85, 20-123 Lublin, marekc@hipokrates.am.lublin.pl

**Czyż M** — Akademia Medyczna w Łodzi, Instytut Fizjologii i Biochemii, Zakład Chemii Ogólnej, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź, mczyk@psk2.am.lodz.pl

**Czyż A** — Pracownia Biologii Molekularnej afiliowana przy Uniwersytecie Gdańskim, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk, czyz@biotech.univ.gda.pl

### D

**Derlacz R** — Instytut Biochemii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, ul. Mieczniko-



wa 1, 02-096 Warszawa,  
rderlacz@biol.uw.edu.pl

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

## F

**Filipecki M** — Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

**Frankowski K** — Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

## H

**Hemmings-Mieszczak M** — Novartis Pharma AG, 4002 Basel, Szwajcaria, maria.hemmings@pharma.novartis.com

**Hennig J** — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Zakład Biochemii Roślin, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa, jacek@ibb.waw.pl

## J

**Jagodziński PP** — Akademia Medyczna, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań, pjagodzi@eucalyptus.usoms.poznan.pl

**Jakubowska A** — Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Biochemii, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń, anjakubo@cc.uni.torun.pl

**Jasińska A** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Pracownia Genetyki Nowotworów, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

**Jurgowiak M** — Akademia Medyczna im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz, marekj@aci.amb.bydgoszcz.pl

**Juszczuk IM** — Zakład Bioenergetyki Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, izabelaj@biol.uw.edu.pl

## K

**Kalita K** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Pracownia Neurobiologii Molekularnej, Zakład Neurobiologii Molekularnej i Ko-

mórkowej, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, kalitak@nencki.gov.pl

**Kamińska J** — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Zakład Genetyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, kaminska@ibb.waw.pl

**Kęsy J** — Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń kesy@biol.uni.torun.pl

**Kopcewicz J** — Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

**Kowalczyk S** — Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Biochemii, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

**Kralisz U** — Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź, ulakr@yahoo.com

**Krzyżosiak WJ** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Pracownia Genetyki Nowotworów, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, wlokrzy@man.poznan.pl

**Kuźmak J** — Zakład Biochemii, Państwowy Instytut Weterynaryjny, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, jkuzmak@piwet.pulawy.pl

## L

**Linkiewicz A** — Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa, linkiewicz@alpha.sggw.waw.pl

## M

**Maasen A** — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Zakład Biochemii Roślin, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

## N

**Nogalska A** — Akademia Medyczna w Gdańsku, Katedra i Zakład Biochemii, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

**Nowicka-Sans B** — Department of Microbiology, Health Center, University of Connecticut, Farmington, CT 06032, USA, b.nowicka@neuron.uchc.edu

## O

**Oliński R** — Akademia Medyczna im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz, [ryszardo@aci.amb.bydgoszcz.pl](mailto:ryszardo@aci.amb.bydgoszcz.pl)

## P

**Przybyłowska K** — Uniwersytet Łódzki, Katedra Genetyki Molekularnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

**Pieńkowska J** — Zakład Ekspresji Genów, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań, [pienkowj@main.amu.edu.pl](mailto:pienkowj@main.amu.edu.pl)

**Przykorska A** — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Zakład Biosyntezy Białka, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

## R

**Rola M** — Zakład Biochemii, Państwowy Instytut Weterynaryjny, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, [mrolka@piwet.pulawy.pl](mailto:mrolka@piwet.pulawy.pl)

**Rychter AM** — Zakład Bioenergetyki Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, [anna@rychter.com](mailto:anna@rychter.com)

## S

**Sidorkiewicz M** — Akademia Medyczna w Łodzi, Instytut Fizjologii i Biochemii, Zakład Biochemii, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź, [msidor@psk2.am.lodz.pl](mailto:msidor@psk2.am.lodz.pl)

**Solecka K** — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Zakład Biosyntezy Białka, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

**Szalała M** — Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań

**Szepeta-Wiśniewska J** — Akademia Rolnicza, ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań, [szepelia@ibch.poznan.pl](mailto:szepelia@ibch.poznan.pl)

**Szpecht-Potocka A** — Instytut Matki i Dziecka, Zakład Genetyki Medycznej, ul. Kasprzaka 17a, 01-529 Warszawa, [aspotocka@hotmail.com](mailto:aspotocka@hotmail.com)

**Szweykowska-Kulińska Z** — Zakład Ekspresji Genów, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań, [zofszwey@main.amu.edu.pl](mailto:zofszwey@main.amu.edu.pl)

**Świerczyński J** — Akademia Medyczna w Gdańsku, Katedra i Zakład Biochemii, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, [juls@amedec.amg.gda.pl](mailto:juls@amedec.amg.gda.pl)

## T

**Tkaczyk M** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Pracownia Neurobiologii Molekularnej, Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, [martat@nencki.gov.pl](mailto:martat@nencki.gov.pl)

**Trzeciak A** — Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, ul. Rzgowska 281, 93-338 Łódź, [antrzeciak@wp.pl](mailto:antrzeciak@wp.pl)

**Trzeciak J** — Uniwersytet Łódzki, Katedra Genetyki Molekularnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

**Twardowski T** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, [twardows@ibch.poznan.pl](mailto:twardows@ibch.poznan.pl)

## W

**Wolska KI** — Uniwersytet Warszawski, Instytut Mikrobiologii, Zakład Genetyki Bakterii, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, [izabelaw@biol.uw.edu.pl](mailto:izabelaw@biol.uw.edu.pl)

**Węgrzyn G** — Pracownia Biologii Molekularnej afiliowana przy Uniwersytecie Gdańskim, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

**Wyszko E** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań, [wyszko@ibch.poznan.pl](mailto:wyszko@ibch.poznan.pl)

## Z

**Zielińska E** — Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytutu Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Biochemii, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

## Ż

**Żołądek T** — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Zakład Genetyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, [teresa@ibb.waw.pl](mailto:teresa@ibb.waw.pl)

# Wskazówki dla Autorów

Wydawany przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje prace przeglądowe omawiające nowe osiągnięcia, koncepcje i kierunki badawcze w dziedzinie biochemii i nauk pokrewnych; publikuje też noty z historii biochemii, zasady polskiego słownictwa biochemicznego, recenzje nadesłanych książek oraz sprawozdania ze zjazdów, konferencji i szkół, w których biorą udział członkowie Towarzystwa.

Prace przeznaczone do publikacji w „Postępkach Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych (do 20 stron tekstu licząc piśmiennictwo i tabele), minireviews (do 10 stron tekstu), oraz krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach (do 5 stron tekstu).

Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel, rycin: wykresy, schematy, reakcje, wzory i fotografie.

Wskazany jest podział artykułów monograficznych na rozdziały i podrozdziały, których rzeczowe tytuły tworzą spis treści. Zgodnie z przyjętą konwencją rozdziały noszą cyfry rzymskie, podrozdziały odpowiednio rzymskie i arabskie, np. I-1, I-2. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy przeto winni unikać składni obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie doraźnie tworzonych skrótów, nawet jeśli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z nadesłanych do Redakcji prac podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzenia zmian nie wpływających na treść pracy, deklaruje też gotowość konsultowania tekstu z Autorami.

Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. W przypadku, gdy Autor(zy) zamierza(ją) włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów prac cytowanych, należy uzyskać i przekazać nam odpowiednią zgodę na przedruk.

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

**TEKST:** prosimy o nadsyłanie dwóch egzemplarzy wydruku oraz dyskietki z tekstem zapisanym jako \*.doc w formacie IBM PC. Wydruk powinien być jednostronny z lewym marginesem około 4 cm, z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami, z użyciem czcionki Arial CE 11 lub 12. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego prosimy o wpisanie ółwkiem na marginesie ich fonetycznego brzmienia.

**Strona informacyjna** jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) Autora (ów), nazwy, adresy, telefony, adresy e-mail

zakładów, w których pracują Autorzy, adres do korespondencji, tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz – w prawym dolnym rogu: liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrócony tytuł pracy, zamieszczany na okładce czasopisma (do 25 znaków).

**Strona 1 (tytułowa)** zawiera imiona i nazwiska Autorów, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści też w obu językach, tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym i adresem e-mail oraz wykaz stosowanych skrótów w porządku alfabetycznym.

Kolejno numerowane dalsze strony obejmują tekst pracy, piśmiennictwo, tabele, podpisy i objaśnienia rycin, wzorów i fotografii.

**PIŚMIENNICTWO:** Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3, 7, 9-26]. Odnośniki bibliograficzne powinny mieć nową, uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady.

1. Hildebrandt GR, Aronson NN (1980) *Biochim Biophys Acta* 631: 499-502
2. Bostock CJ, Summer AT (1978) *The Eucaryotic Chromosome*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg GF Von VB (red) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 541-553
4. Deleij J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stotz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* t. 29B. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 1-7
5. Franks NP, Lieb WR (1981) W: Knight C G (red) *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t. 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 243-272

**ILUSTRACJE:** ryciny powinny być zapisane na dyskietce jako: \*.tif, lub \*.cdr, lub \*.psd, lub \*.eps. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Istnieje możliwość wykonania reprodukcji barwnych, ale ich koszty ponoszą Autorzy. Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów powinny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: ryciny noszą cyfry arabskiej, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ółwkiem preferowane miejsce umieszczenia ryciny czy wzoru. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Wydruki ilustracji należy na odwrocie podpisać imieniem i nazwiskiem pierwszego z Autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „górną-dół” (ółwkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

Wydruk i załączniki (w dwu egzemplarzach) oraz dyskietkę, właściwie zabezpieczone przed uszkodzeniem w czasie transportu, prosimy przesyłać na adres:

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”  
Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
ul. Pasteura 3  
02-093 Warszawa

## KOMUNIKAT ZARZĄDU GŁÓWNEGO

### POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Prosimy o wnoszenie opłat za składki członkowskie na nasze konto w PBK XIII Oddz. Warszawa nr 11101053-411050000371.

Jednocześnie uprzejmie informujemy, że decyzją Zarządu Głównego PTBioch. została zmieniona wysokość składki członkowskiej. W roku 2002 wynosi ona:

dla Członków rzeczywistych	70.- zł.
dla Członków studentów	35.- zł

**Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską za rok 2002, otrzymają bezpłatną prenumeratę kwartalnika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego „Postępy Biochemii”. Małżeństwa mogą opłacać: 70.- + 45.- = 115.-zł, otrzymają wówczas jeden egzemplarz „Postępów Biochemii”.**

Powyższe zmiany nie dotyczą Członków Honorowych Towarzystwa. Natomiast Członkowie-Emeryci – nadal zwolnieni z opłacania składki członkowskiej – płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” 25.- zł.

Biblioteki płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” w roku 2001 100.- zł.

## POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

### ZAPROSZENIE

Jeżeli chciałabyś/chciałbyś zapisać się na listę e-mailową Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wyślij e-mail na adres: [infoptbioch@nencki.gov.pl](mailto:infoptbioch@nencki.gov.pl). W polu „subject „ umieść swoje nazwisko i imię (w takiej kolejności i bez polskich znaków diakrytycznych) oraz adres e-mailu. Wysyłając taki mail zgadzasz się na to, aby na Twój adres e-mailowy przychodziły informacje ZG, listy pojedynczych lub grup członków do ogółu członków, informacje z FEBS o zjazdach i kursach oraz materiały reklamowe. Lista będzie rozsyłać materiały kontrolowane przez moderatora, którym będzie Dariusz Stępkowski, sekretarz Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, tak więc nie będzie Ci grozić zalew śmieciowej poczty i zawirusowanych „attachmentów”. Mam nadzieję, że tą drogą poprawi się stan poinformowania naszych członków o różnych wydarzeniach naukowych, stypendiach, kursach i wreszcie o aktywności poszczególnych oddziałów naszego Towarzystwa. Być może również „Listy do biochemików” redagowane przez p. Teresę Wesołowską będą obok wersji drukowanej kolportowane przez naszą listę. Zapraszam także do odwiedzenia strony [www naszego Towarzystwa](http://www.rcin.org.pl)

Dariusz Stępkowski

Sekretarz Zarządu Głównego  
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego