

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2009
TOM 55
NUMER 3

140-te urodziny DNA
Cytochromy P-450
Kwas jasmonowy



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

www.postepybiochemii.pl

<http://rcin.org.pl>

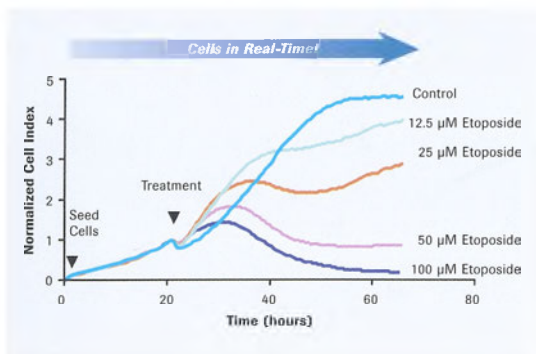


www.roche-applied-science.com

xCELLigence
Aparat RTCA SP

xCELLigence system analizy komórek w czasie rzeczywistym

Głębsze spojrzenie, prawdziwe zrozumienie



Ryc. 1: monitorowanie w czasie rzeczywistym cytotoksyczności poprzez degradację DNA.
Etoposyd to czynnik niszczący DNA, który w wysokim stężeniu indukuje apoptozę, a w niższych stężeniach prowadzi do przejścia w fazę S lub G2.

Doświadcz potęgi dynamiki analizy komórkowej w czasie rzeczywistym, bez użycia barwników przy użyciu nowego systemu xCELLigence. Uzyskuj dane z całych eksperymentów, które przy użyciu dotychczasowych metod nie były osiągalne. Pracuj bez użycia barwników by zapewnić pełną fizjologiczną wiarygodność danych. Wybierz z elastycznych opcji formatów by dostosować system do swoich potrzeb: 48, 96 lub 576 (6 x 96) dołków.

- **Zbieraj dane z całego przebiegu eksperymentu**
- **Otrzymuj fizjologiczną wiarygodność danych i eliminuj konieczność stosowania obcych barwników i reporterów**
- **Maksymalizuj wszechstronność: analizuj komórki w szerokim zakresie dynamicznym oraz wykonuj różne rodzaje analiz (np. proliferację i cytotoksyczność, ryc. 1)**

System xCELLigence to głębsze spojrzenie dla prawdziwego zrozumienia

Odwiedź naszą stronę internetową www.xcelligence.roche.com w celu uzyskania dodatkowych informacji lub skontaktuj się z naszym lokalnym przedstawicielem.

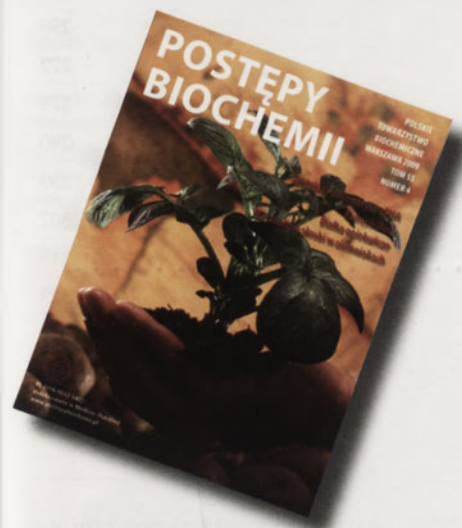


xCELLIGENCE jest zastrzeżonym znakiem towarowym Roche.
© 2008 Roche Diagnostics GmbH. Wszystkie prawa zastrzeżone.

<http://rcin.org.pl>

Roche Diagnostics Polska sp. z o.o.
Ul. Wybrzeże Gdyni 6B
01-531 Warszawa
www.roche-applied-science.com
biologia.molekularna@roche.com
tel. 022 481-55-55
fax. 022 481-55-92





W NASTĘPNYM NUMERZE:

Metabolizm skrobiDominika Czyżewska,
Waldemar Marczewski**Syntetazy aminoacylo-tRNA**Mirosława Skupińska, Agnieszka
Belter, Małgorzata Giel-Pietraszuk,
Leszek Rychlewski, Jan Barciszewski**Endomorfiny**Renata Perlikowska, Jakub Fichna,
Anna Janecka**Mikroskopia FLIM**Jarosław Korczyński,
Jakub Włodarczyk**MAPA POLSKIEJ BIOCHEMII**50 lat studiów biochemicznych na Uniwersytecie Warszawskim
Jadwiga Bryła

249

WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZEWiadomości krajowe
pod red. Teresy Wesołowskiej

253

Listy od czytelników

258

TEMAT NUMERU – CYTOCHROMY P450Izoenzymy cytochromu P450 w metabolizmie
związków endo- i egzogennych
Anita Wiśniewska, Zofia Mazerska

259

Reduktaza NADPH:cytochrom P450 – nie
tylko partner cytochromu P450

Anita Wiśniewska, Karolina Jagiełło, Zofia Mazerska

272

Rola polimorfizmu i zróżnicowanej ekspresji genów
cytochromów P450 w metabolizmie ksenobiotyków

Magdalena Niemira, Anita Wiśniewska, Zofia Mazerska

279

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWEDegradacja transkryptów eukariotycznych.
Funkcja i regulacja tristetraproliny

Aleksandra Karolina Balwierz, Piotr Tymoszek, Aneta Kasza

290

Budowa i biogeneza kompleksu cytochromów *b_f*Katarzyna A. Hombek-Urban, Jarosław Króliczewski,
Andrzej Szczepaniak

299

Chinony prenylowe – występowanie, biosynteza i funkcje

Beatrycze Nowicka, Renata Szymańska, Jerzy Kruk

307

Rola apolipoprotein A-I i A-II w przemianach HDL w osoczu

Małgorzata Wróblewska

315

Zmiany równowagi redukcji-oksydacyjnej u ciężarnych przeżuwaczy

Joanna Kowalska, Dorota Jankowiak

323

Ewolucja poglądów na temat insulinopodobnych czynników wzrostu

Małgorzata Szewczuk, Sławomir Zych, Ewa Czerniawska-Piątkowska

329

Szlak sygnałowy kwasu jasmonowego – nowe informacje

Kamil Frankowski, Brygida Świeżawska, Emilia Wilmowicz,
Jacek Kęsy, Jan Kopcewicz

337

Z HISTORII BIOCHEMII

DNA: od Mieschera do Ventera i dalej

Marta M. Gabryelska, Maciej Szymański, Jan Barciszewski

342

Rysunek na okładce:„Cytochrome P450 reductase” by Dr. Anna
Tanczos, TANCZOS GRAPHICS, Scientific
Image Solutions, www.ScientificImages.
co.uk, with permission.

ADVANCES IN BIOCHEMISTRY VOL. 55, NO. 3, 2007

A map of biochemistry in Poland	249
Events/Opinions/Comments	253

REVIEWS

Cytochrome P450 isoenzymes in metabolism of endo- and exogenic compounds	259
NADPH-cytochrome P450 reductase, not only the partner of cytochrome P450	272
Polymorphism and the level of P450 gene expression in xenobiotic metabolism	279
Degradation of eukaryotic transcripts. Role and regulation of tristetraprolin activity	290
Structure and biogenesis of cytochrome <i>h f</i> complex	299
Prenylquinones – occurrence, biosynthesis and functions	307
The role of apolipoproteins A-I and A-II in plasma HDL remodeling	315
Changes of reduction-oxidation balance in pregnant ruminants	323
An evolutionary outlook on insulin-like growth factors	329
Jasmonate signaling pathway – new insight	337
DNA: from Miescher to Venter and beyond	342

Szanowni Czytelnicy,

Przy okazji trzeciego numeru „Postępów Biochemii”, który trafia do Państwa rąk w 2009 roku, serdecznie zapraszam nie tylko do lektury czasopisma, ale do podejmowania trudu pisania artykułów przeglądowych i zachęcam do ich publikowania na łamach naszego kwartalnika. Oferujemy fachową pomoc w ocenie artykułów, podejmowanie szybkiej decyzji o przyjęciu pracy do druku oraz wysoką jakość druku. Aby przyspieszyć prace redakcyjne, a tym samym podjęcie decyzji, namawiam do korzystania z najnowszych numerów czasopisma oraz wskazówek dla autorów, w celu ścisłego naśladowania stylu czasopisma. Wskazówki dla autorów można bez problemów wydrukować ze strony internetowej „Postępów Biochemii”. W przypadku wątpliwości proszę przysyłać pytania na adres E-mail: s.pikula@nencki.gov.pl.

By pomóc we właściwym planowaniu Państwa publikacji i wyborze odpowiedniego czasu, w którym najwygodniej będzie Państwu przesłać swoją propozycję do redakcji, poniżej zamieszczam tabelę zawierającą harmonogram pracy naszej redakcji nad poszczególnymi numerami „Postępów Biochemii”. Daty podane w tabeli, choć przybliżone, pozwalają zorientować się, kiedy można spodziewać się decyzji redakcyjnej, kiedy prześlemy autorom złożoną elektronicznie wersję artykułu w celu dokonania korekty autorskiej i kiedy artykuł zostanie wydrukowany.

Harmonogram prac redakcji „Postępów Biochemii” w latach 2009/10

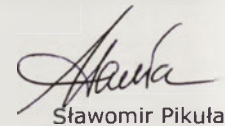
Miesiące:	Tom/nr:	Skład:	Korekta autorska:	Druk:	Początek dystrybucji:
Październik–Grudzień	55/4	15-10-2009	30-10-2009	30-11-2009	30-12-2009
Styczeń–Marzec	56/1	20-01-2010	1-02-2010	1-03-2010	30-03-2010
Kwiecień–Czerwiec	56/2	20-04-2010	10-05-2010	1-06-2010	30-06-2010
Lipiec–Wrzesień	56/3	15-07-2010	1-08-2010	30-08-2010	30-09-2010
Październik–Grudzień	56/4	15-10-2010	30-10-2010	30-11-2010	30-12-2010

Korzystając z okazji ponawiam gorącą prośbę o kierowanie Państwa opinii i uwag na temat zawartości naszego czasopisma i naszej pracy, na adres poczty elektronicznej s.pikula@nencki.gov.pl. Państwa uwagi pomagają nam w codziennej pracy nad udoskonalaniem „Postępów Biochemii”. Zapraszam także do odwiedzania naszej strony internetowej pod adresem www.postepybiochemii.pl.

PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII



Your Vision, Our Future

Sławomir Pikula

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

Redaktor działu krajowego: Teresa Wesołowska; e-mail: redbioch@sci.pam.szczecin.pl, Redaktor działu „Forum Młodych Biochemików”: Grzegorz Bartosz; e-mail: gbartosz@biol.uni.lodz.pl

Redaktorzy: Joanna Bandorowicz-Pikula, Jolanta Barańska, Andrzej Dżugaj, Krystyna Grzelak, Lilla Hryniewiecka, Danuta Hulanicka, Andrzej Jerzmanowski, Andrzej Kasprzak, Wanda Kłopocka, Liliana Konarska, Paweł Pomorski, Aleksander F. Sikorski, Anna Szakiel, Adam Szewczyk, Tomasz Twardowski, Marek Zembala, Krzysztof Zablocki, Alicja Żylicz

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

Korekta językowa: Marta Magdalena Izdebska; e-mail: 3mip@neostrada.pl lub marta.izdebska@gmail.com

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

Wydawca: Polskie Towarzystwo Biochemiczne; ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel/fax (022) 6582099, e-mail: ptbioch@nencki.gov.pl, http://www.ptbioch.edu.pl

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

50 lat studiów biochemicznych na Uniwersytecie Warszawskim

Jadwiga Bryła

Instytut Biochemii,
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
ul. Miecznikowa 1,
02-096 Warszawa
e-mail: bryla@biol.uw.edu.pl



Fotografia 1. Gmach Wydziału Biologii, w którym mieści się Instytut Biochemii.

SPOTKANIE JUBILEUSZOWE NA WYDZIALE BIOLOGII

W 2008 roku minęło 50 lat od czasu utworzenia Katedry Biochemii na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Warszawskiego i zakończenia studiów pierwszych dyplomantów. Z



Fotografia 2. Uczestnicy jubileuszowego spotkania w auli Wydziału Biologii.

tej okazji 8 grudnia 2008 roku odbyło się w gmachu Wydziału Biologii UW przy ul. Ilji Miecznikowa 1 (Fot. 1) spotkanie władz i pracowników Wydziału z byłymi i obecnymi pracownikami Instytutu Biochemii oraz absolwentami Wydziału Biologii (Fot. 2), którzy wykonywali prace licencjackie, magisterskie i doktorskie pod opieką początkowo pracowników Katedry, a od 1969 roku – Instytutu Biochemii.

Uroczystość otworzyła dr hab. Joanna Pijanowska, Dziekan Wydziału Biologii, a następnie uczestników powitała prof. dr hab. Jadwiga Bryła, p.o. Dyrektora Instytutu Biochemii. Uroczystość zaszczytli i głos zabrali: prof. dr hab. Marta Kicińska-Habior, Prorektor UW ds. Studenckich, prof. dr hab. Paweł Kulesza, Dziekan Wydziału Chemii oraz prof. dr hab. Andrzej Dżugaj (Fot. 3), Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, które w 2008 roku również obchodziło 50-lecie swojego istnienia. Podczas spotkania została przedstawiona historia utworzenia i działalność Katedry Biochemii w oczach pierwszego pracownika prof. dr hab. Zbigniewa Kaniugi (autora opracowania „Katedra Biochemii 1958-1968”) oraz pierwszych absolwentek: dr Moniki Fonberg-Mroczek (rocznik 1958) oraz prof. dr hab.

Ireny Szumiel (rocznik 1960). Następnie prof. dr hab. Jadwiga Bryła przedstawiła 40-letnią działalność naukowo-dydaktyczną Instytutu oraz losy absolwentów, którzy wykonywali prace magisterskie w Katedrze i Instytucie, a Kierownicy Zakładów zaprezentowali tematykę badawczą poszczególnych Zakładów. Miłym akcentem były



Fotografia 3. Wystąpienie prof. dr hab. Andrzeja Dżugaja, Prezesa Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, na spotkaniu jubileuszowym. Obok prof. dr hab. Jadwiga Bryła, Dyrektora Instytutu Biochemii od 1993 roku.

kwiaty i gratulacje pracowników i Dyrektorów Instytutów wchodzących w skład Wydziału Biologii oraz zaprzyjaźnionych biochemików, m.in. prof. dr hab. Wiesława Oleszka z Instytutu Upraw, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach oraz prof. dr hab. Wojciecha Rode z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego. Uroczystość zakończono sesją plakatową oraz rozmowami przy lampce wina w holu gmachu Wydziału Biologii, a następnie w Zakładach Instytutu Biochemii.

PROFESOR IRENA CHMIELEWSKA – KREATOR BIOCHEMII NA UNIWERSYTECIE WARSZAWSKIM

Inicjatorką i organizatorką studiów biochemicznych na Uniwersytecie Warszawskim była prof. dr hab. Irena Chmielewska (Fot. 4), która ukończyła studia chemiczne i biologiczne w latach 1922-1929. Tematyka Jej rozprawy doktorskiej (obronionej w

1933 roku) i habilitacyjnej (1939) oraz 9 publikacji z tego okresu dotyczyła barwników antocyjanowych roślin, wskazując na Jej zainteresowania badaniami z dziedziny biochemii. W czasie wojny pracowała w firmach „Bakulit” i „Klawe”. W 1946 roku podjęła pracę w Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Warszawskiego na stanowisku adiunkta, a następnie w 1947 roku jako docent etatowy zorganizowała wykłady i ćwiczenia z chemii organicznej dla studentów Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego. Jednocześnie rozpoczęła pracę w Instytucie Farmaceutycznym na stanowisku Kierownika Zakładu Biochemii, gdzie we współpracy z II Kliniką Chirurgiczną Akademii Medycznej został opracowany hydrolizat białkowy do wlewów dożylnych. Po sprawdzeniu przydatności tego preparatu w lecznictwie, jego produkcja została uruchomiona w 1951 roku. W tym czasie otrzymała nagrodę państwową III stopnia

za zespół prac z dziedziny biochemii i zastosowanie badań w medycynie i farmacji. W 1955 roku uzyskała tytuł profesora nadzwyczajnego, a w 1957 roku została odznaczona Krzyżem Oficerskim Orderu Odrodzenia Polski. Nominację na Profesora zwyczajnego otrzymała w 1961 roku, a w 1964 roku została członkiem korespondentem Polskiej Akademii Nauk.

W latach 50. pod redakcją prof. dr hab. Ireny Chmielewskiej ukazały się trzy monografie biochemiczne: „*Biologiczne procesy oksydoredukcyjne*” (PWN 1953), „*Metody badania składników roślin*” (PWN 1955) oraz przy udziale W. Brzeskiego i Z. Kasprzyk „*Zagadnienia metabolizmu roślin w świetle izotopowej metodyki badań*” (PWRiL 1960). W latach 1958–1965 była redaktorem naczelnym kwartalnika „*Postępy Biochemii*”. Pod Jej kierunkiem na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi były początkowo prowadzone ćwiczenia z biochemii, a od 1956 roku studenci zaczęli wykonywać prace magisterskie,

dając początek kierunkowi biochemicznemu na tym Wydziale.

UTWORZENIE KATEDRY (1958) I INSTYTUTU BIOCHEMII (1969)

We wrześniu 1958 roku została powołana Katedra Biochemii z prof. Ireną Chmielewską jako kierownikiem. Utworzenie Katedry stworzyło trzy podstawowe problemy organizacyjne związane z uruchomieniem tej nowej placówki: 1) kompletowanie i



Fotografia 4. Prof. dr hab. Irena Chmielewska (1905-1986), organizator studiów biochemicznych na Uniwersytecie Warszawskim, Kierownik Katedry Biochemii (1958-1968) i do 1974 roku Dyrektor Instytutu Biochemii.

szkolenie kadry dydaktyczno-badawczej, 2) uzyskanie pomieszczeń laboratoryjnych i dydaktycznych oraz 3) wyposażenie laboratoriów studenckich i pracowniczych w aparaturę, sprzęt laboratoryjny i odczynniki oraz utworzenie biblioteki. Pierwszym zatrudnionym pracownikiem w Katedrze Biochemii był adiunkt dr Zbigniew Kaniuga (Fot. 5), poprzednio adiunkt w Katedrze Biochemii SGGW w Warszawie. Był pracownikiem już z kilkuletnim doświadczeniem organizacyjnym

i naukowym, współautorem wspólnie z W. Brzeskim podręcznika pt. „*Ćwiczenia z biochemii roślin*” (PWN 1956 i 1957), autorem 2 publikacji z dziedziny biochemii pt. „*Udział mocznika w biosyntezie glutaminy w roślinach*” oraz artykułu przeglądowego „*Fizjologia i biochemia owoców po zbiorze*”. W ciągu dwóch pierwszych lat istnienia Katedry pracownikami zostali: mgr Barbara Bułhak, mgr Irena Szumiel, mgr Stanisław Lewak oraz doc. Zofia Kasprzyk po powrocie w 1960 roku ze stażu naukowego w USA. W tym roku odbyła się pierwsza rekrutacja na studia na kierunku biochemii na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi. W następnych latach na długoterminowe staże po doktoracie wyjeżdżali późniejsi długoletni pracownicy Katedry, profesorowie: Zbigniew

Kaniuga, Kazimierz Toczko, Jadwiga Bryła, Zdzisław A. Wojciechowski, Wirginia Janiszowska, Bogusław Wiłkomirski, Krzysztof Staroń, a także doktorzy habilitowani: Jan Fronk i Jan Zimowski.

Nowoutworzona Katedra otrzymała tymczasowe pomieszczenia w budynku Wydziału Chemii, z którego po 2 latach przeprowadziła się do nowych, bardziej obszernych pomieszczeń w gmachu Wydziału Geologii UW. Były to jednak pomieszczenia całkowicie puste. W tej sytuacji doświadczenie dr Z. Kaniugi, zdobyte poprzednio w Katedrze Biochemii SGGW, okazało się niezmiernie przydatne zarówno przy zakupach sprzętu laboratoryjnego, aparatury, odczynników itp., jak i niezbędnych adaptacjach lub przebudowach pomieszczeń w celu ich przekształcenia w pracownie: mikrobiologiczną, eterową, chromatograficzną czy pomieszczenia dla zwierząt i roślin doświadczalnych i magazynu (szkła i odczynników) oraz biblioteki.

Utworzenie Katedry Biochemii zainteresowało studentów tą nową specjalizacją i spowodowało wiele zgłoszeń do wykonywania prac magisterskich z tego zakresu. Stało się to bodźcem do utworzenia w Katedrze Biochemii w 1965 roku trzech Zakładów w celu zróżnicowania problematyki badawczej, a jednocześnie rozsze-

żenia tematyki prac magisterskich. Powstały wówczas następujące Zakłady: *Biochemii Ogólnej*, *Biochemii Roślin* oraz *Enzymatyki*. Kierownikami Zakładu *Biochemii Ogólnej* byli: prof. dr hab. Irena Chmielewska (1965–1974), doc., a następnie prof. dr hab. Kazimierz Toczko (1974–1996), a po przekształceniu w 1996 r. w *Zakład Biologii Molekularnej* – doc., a następnie prof. dr hab. Krzysztof Staroń. *Zakładem Biochemii Roślin* kierowała początkowo prof. dr Zofia Kasprzyk (1965–1987), a następnie doc. i prof. dr hab. Wirginia Janiszowska. Kierownik

Zakładu Enzymatyki był doc. i następnie prof. dr hab. Zbigniew Kaniuga (1965–1995). Przez 30 lat ist-



Fotografia 5. Dr Zbigniew Kaniuga, pierwszy pracownik Katedry Biochemii, późniejszy profesor i Kierownik Zakładu Enzymatyki (1965-1995).

nienia *Zakładu Enzymatyki* wykonano w nim 89 prac magisterskich i 11 doktorskich. Wśród dyplomantów tego Zakładu 20 uzyskało tytuł profesora w uczelniach i instytutach naukowych, 6 – otrzymało stopień doktora habilitowanego, 16 obroniło rozprawy doktorskie, a 3 jest członkami korespondentami Polskiej Akademii Umiejętności i 1 – członkiem korespondentem Polskiej Akademii Nauk. Ich osiągnięcia zostały przedstawione w opracowaniu prof. Zbigniewa Kaniugi „*Naukowe i zawodowe osiągnięcia w kraju i zagranicą magistrantów i doktorantów Zakładu Enzymatyki z lat 1965–1995*”, Warszawa 2008 rok.

W ramach tworzenia od 1968 roku Instytutów na Wydziałach Uniwersytetu Warszawskiego, w 1969 roku Katedra Biochemii została przekształcona w Instytut Biochemii, w skład którego wchodziły wymienione powyżej trzy Zakłady. W 1976 roku zostały ponadto utworzone dwa nowe Zakłady: *Regulacji Metabolizmu* (kierownik: doc., a następnie prof. dr hab. Jadwiga Bryła – do lutego 2008 roku) oraz *Biochemii Związków Naturalnych*, przekształcony w 1996 roku w *Zakład Biochemii Lipidów i Błon Komórkowych* (kierownik: doc., a następnie prof. dr hab. Zdzisław A. Wojciechowski). Zakład ten w 2004 roku został włączony do *Zakładu Biochemii Roślin*. Po 40 latach przebywania w gościnnych progach Wydziału Geologii, w 2000 roku Instytut Biochemii przeprowadził się do części D nowo-wybudowanego gmachu Wydziału Biologii przy ul. Ilji Miecznikowa 1. Było to możliwe dzięki aktywności i niezwykłym umiejętnościom zdobywania funduszy przez prof. dr hab. Ewę Symonides, Dziekan Wydziału Biologii w latach 1993–1999. Jej upór i wytrwałość umożliwiły nie tylko rozpoczęcie, lecz również zakończenie w 2000 r. budowy gmachu Wydziału Biologii, w którym można było w 2008 roku świętować Jubileusz 50-lecia studiów biochemicznych na Uniwersytecie Warszawskim.

DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA

W realizacji pracy dydaktycznej brali i nadal biorą udział pracownicy Zakładów. Obecnie są to 3 Zakłady: *Biochemii Roślin* (Kierownik: prof. dr hab. Wirginia Janiszewska), *Biologii Molekularnej* (Kierownik: prof. dr hab.

Krzysztof Staroń) oraz *Regulacji Metabolizmu* (Kierownik: doc. dr hab. Maciej Garstka). W Instytucie pracuje aktualnie: 4 profesorów, 3 doktorów habilitowanych, 15 doktorów (razem 22 pracowników naukowo-badawczych) oraz 6 doktorantów i 4 pracowników obsługi.

Pracownicy Instytutu Biochemii uczestniczą w kształceniu studentów kierunku Biologia, Biotechnologia i Ochrona Środowiska Wydziału Biologii oraz Międzywydziałowych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych, Międzywydziałowych Studiów Ochrony Środowiska i Centrum Nauk Sądowych Uniwersytetu Warszawskiego. Są to zarówno wykłady jak i zajęcia laboratoryjne obowiązkowe z *Biochemii, Enzymologii, Biotechnologii, Biochemii dla biotechnologów oraz Biologii molekularnej*, jak i zajęcia fakultatywne takie jak: *Białka i kwasy nukleinowe, Biochemia roślin, Biochemiczne podstawy biotechnologii przemysłowej, Analiza biochemiczna i Regulacja Metabolizmu* oraz wykłady monograficzne: *Biochemiczne podstawy chorób metabolicznych oraz Biogeneza i struktura chloroplastów*. Co więcej, w Instytucie są prowadzone pracownie: licencjackie oraz specjalizacyjne i magisterskie dla studentów magisterskich studiów uzupełniających, a także seminaria. Ostatnio trwają prace nad zorganizowaniem na Wydziale Biologii UW specjalizacji biotechnologii medycznej.

Ponadto wielu pracowników Instytutu prowadzi również wykłady z biochemii dla studentów Pomostowego Wydziału Nauki o Zdrowiu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, kierunków: Pielęgniarstwa, Położnictwa, Ratownictwa Medycznego, Dietetyki, Położnictwa Pomostowego i Ratownictwa Medycznego. Należy również dodać, że pracownicy Instytutu uczestniczyli w zorganizowaniu zajęć z biochemii na Wydziale Biotechnologii Politechniki Warszawskiej. Prowadzą także corocznie uzupełniające zajęcia dla nauczycieli, lekcje w liceach ogólnokształcących oraz wykłady i lekcje na Festiwalu Nauki.

Dążąc do zachowania wysokiego standardu nauczania w warunkach wprowadzania zmian programu stu-

diów i tworzenia nowych kierunków i specjalizacji, konieczne było ciągłe przystosowywanie i aktualizacja wykładów, seminariów i zajęć laboratoryjnych. Dlatego pracownicy Katedry i Instytutu Biochemii uczestniczyli w pisaniu 6 podręczników akademickich, w tym: „*Praktikum z biochemii*” (red. W. Brzeski i Z. Kaniuga, PWN 1968 i 1972) oraz „*Regulacja Metabolizmu Komórki*” (autorstwa J. Bryły, PWN 1981 i 1983), wyróżnione nagrodami Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Pracownicy przetłumaczyli z języka angielskiego 8 monografii biochemicznych oraz opracowali 13 skryptów. Ponadto, w związku z unowocześnianiem programu kształcenia w szkołach gimnazjalnych i licealnych byli współautorami 6 podręczników wydanych przez Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne.

Kształcenie studentów na wysokim poziomie wymaga włączania Ich do prowadzenia badań naukowych. Dlatego studenci zarówno magisterskich studiów uzupełniających jak i III roku studiów licencjackich uczestniczą w realizacji badań w poszczególnych Zakładach i zaliczają pracownie specjalizacyjne, magisterskie i licencjackie indywidualnie pod opieką adiunktów. Niektórzy z nich są współautorami prac doświadczalnych i przeglądowych. W czasie 50 lat istnienia biochemii na Uniwersytecie Warszawskim prace licencjackie wykonało 94 studentów kierunku biologia i biotechnologia, a prace magisterskie – 573 studentów Wydziału Biologii oraz MISMaP, studiujących głównie na kierunkach: początkowo biochemii, a potem biologii i biotechnologii.

TEMATYKA BADAWCZA I DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA

Zainteresowania badawcze pracowników Instytutu Biochemii ewoluowały w minionych latach od klasycznej biochemii do badań z pogranicza biochemii, biologii molekularnej, biologii medycznej, biotechnologii, farmacji, fizjologii i mikrobiologii. W ostatnich latach tematyka badawcza prowadzona w Zakładach koncentrowała się wokół następujących zagadnień:

a) metabolizm, transport i funkcje terpenoidów roślinnych, a w szczególności izolowanie i charakterystyka

triterpenoidów cyklicznych z roślin leczniczych i jadalnych oraz ich działanie przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwpasożytnicze i antibakteryjne (*Zakład Biochemii Roślin*);

b) kompleksy białkowe ludzkiej topoisomeryzy I; rola białka ERH (ang. *enhancer of rudimentary homolog*) w regulacji poziomu nukleotydów pirymidynowych, replikacji DNA i wzroście komórki; rola kinazy CK2 w hamowaniu apoptozy; metylacja DNA i struktura chromatyny (*Zakład Biologii Molekularnej*);

c) metabolizm glukozy w warunkach normy i cukrzyca, a w szczególności rola stresu oksydacyjnego, stopnia zredukowania glutationu i kinazy białkowej aktywowanej przez AMP oraz działanie antyoksydantów (melatoniny, kwasu liponowego i tauryny), przeciw cukrzycowych leków stosowanych w terapii (metformina, roziglitazon) oraz związków o działaniu hipoglikemicznym (pochodnych wanadu i selenu oraz chlorochiny, L-DOPA, selegiliny i gatifloksacyny); wpływ stresu chłodu na lipidom i proteom błon tylakoidów oraz modelowanie przestrzennej struktury chloroplastów roślin wrażliwych i odpornych na chłód (*Zakład Regulacji Metabolizmu*).

Badania *Zakładu Enzymatyki* (1965–1995) nad mechanizmem chłodowrażliwości roślin wykazały, że wyższa aktywność galaktolipazy w roślinach wrażliwych niż odpornych na chłód jest głównym czynnikiem zwiększającym podatność roślin na ten czynnik stresowy. To sugeruje, że zwiększenie odporności na stres chłodu można uzyskać przez supresję genu kodującego galaktolipazę. Podsumowaniem tych badań jest ostatnio opublikowany artykuł przeglądowy (Z. Kaniuga, *Plant Biology* 10 (2008) 171–184).

Tematyka badawcza *Zakładu Biochemii Związków Naturalnych* (1976–1996), a w następnych latach *Biochemii Lipidów i Błon Komórkowych* (1997–2004) dotyczyła metabolizmu steroli roślinnych (w szczególności złożonych pochodnych

fitosteroli – estrów, glikozydów i acyloglikozydów) oraz biosyntezy saponin steroidowych i glikoalkaloidów steroidowych ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmu powstawania ich łańcuchów sacharydowych.

W ostatnich latach prowadzona jest współpraca pracowników Instytutu z licznymi grupami badawczymi Wydziału Biologii i Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, Uniwersytetu Jagiellońskiego, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego oraz Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN i Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, a także z firmą farmaceutyczną ADAMED i laboratoriami Uniwersytetów w Liverpool (UK), Neapolu (Włochy), Nancy i Reims (Francja) oraz Groningen i Wageningen (Holandia).

Efektownością naukową pracowników Instytutu Biochemii jest opublikowanie 429 prac doświadczalnych, w przeważającej większości w czasopiśmie międzynarodowym z listy filadelfijskiej o uznanym standardzie naukowym, 104 prac przeglądowych, 20 rozdziałów w opracowaniach monograficznych oraz zgłoszenie ponad 400 doniesień na zjazdy i konferencje naukowe w kraju i zagranicą. Badania były realizowane z funduszy 47 projektów badawczych, przyznanych przez Komitet Badań Naukowych i Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Projekty te były kierowane głównie przez pracowników Instytutu Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

AWANSE NAUKOWE I WYRÓŻNIENIA DYPLOMANTÓW I PRACOWNIKÓW

Spośród pracowników oraz doktorantów wykonujących prace doktorskie w Katedrze i Instytucie Biochemii na Wydziale Biologii zostało wypromowanych 69 doktorów, 13 doktorów

habilitowanych oraz 8 uzyskało tytuły profesora. Za dydaktyczne i naukowe osiągnięcia pracownicy Katedry i Instytutu Biochemii otrzymali nagrody: a) Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za: podręczniki i skrypty (3), badania naukowe (9) oraz rozprawy doktorskie (6) i habilitacyjne (2); b) Sekretarza Naukowego PAN (7), c) Jego Magnificencji Rektora Uniwersytetu Warszawskiego za: badania naukowe (48), rozprawy doktorskie (2) i habilitacyjne (2), osiągnięcia dydaktyczne (25), pracę organizacyjną (14) oraz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (nagroda im. J. Parnasa dla zespołu prof. Z. Kaniugi za najlepsze polskie prace biochemiczne ogłoszone zagranicą w 1988 roku) i Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin (nagroda dla zespołu prof. A. Mostowskiej i dr hab. M. Garstki za najlepszą pracę naukową w zakresie biologii eksperymentalnej roślin w latach 2003–2004).

Pracownicy Katedry i Instytutu Biochemii pracowali również na rzecz środowiska naukowego. Brali udział w organizowaniu Zjazdu (w 1966 roku) i Kongresu FEBS (w 2004 roku) oraz niektórych Zjazdów Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Spośród 573 dyplomantów, którzy wykonali prace magisterskie w Instytucie Biochemii, wielu osiągnęło wysokie szczeble kariery akademickiej. Około 40% byłych magistrantów jest zatrudnionych w Uniwersytecie Warszawskim oraz innych Uczelniach i instytucjach naukowych w kraju i zagranicą. Wśród nich 3 jest członkami Polskiej Akademii Umiejętności, 4 – Polskiej Akademii Nauk (Tabela 1), 56 jest profesorami (w tym 11 pracującymi na stałe zagranicą), 37 doktorami habilitowanymi (w tym 4 na emigracji) oraz 121 doktorami (w tym 40 zagranicą, głównie w USA oraz Anglii). A zatem, spośród osób zatrudnionych w instytucjach naukowych, co czwarta pracuje zagranicą (Tabela 2). Należy również dodać, że w ostatnich latach spośród 36 doktorantów, 12 odbywa studia doktoranckie w różnych krajach Europy zachodniej. Przedstawione dane wskazują, że absolwenci wykonujący prace magisterskie i doktorskie w Instytucie Biochemii uzyskują wykształcenie umożliwiające im otrzymanie pracy i awans naukowy lub zawodowy w placówkach o profilu

Tabela 1. Dyplomanci Instytutu Biochemii – Członkowie korespondencyjni PAN i PAU.

Członkowie PAN:	Członkowie PAU:
Prof. dr hab. Jerzy Duszyński	Prof. dr hab. Jadwiga Bryła
Prof. dr hab. Andrzej Jerzmanowski	Prof. dr hab. Maciej J. Nałęcz
Prof. dr hab. Leszek Kaczmarek	Prof. dr hab. Włodzimierz Zagórski-Ostoja
Prof. dr hab. Jacek Kuźnicki	

Tabela 2. Status naukowy dyplomantów Instytutu Biochemii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Instytucja	Prof.	Dr hab.	Dr	Doktoranci
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego	17	4	23	9
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego	6	8	11	8
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN	7	1	5	2
Warszawski Uniwersytet Medyczny	3	3	3	1
Inne Szkoły Wyższe	7	3	5	1
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego	2	3	4	1
Instytuty Badawcze i Firmy Farmaceutyczne	4	10	31	2
Placówki Naukowe Zagraniczne	11	4	40	12
Razem	57	36	122	36

naukowym zarówno w kraju jak i zagranicą.

Powstanie i rozwój studiów biochemicznych na Uniwersytecie War-

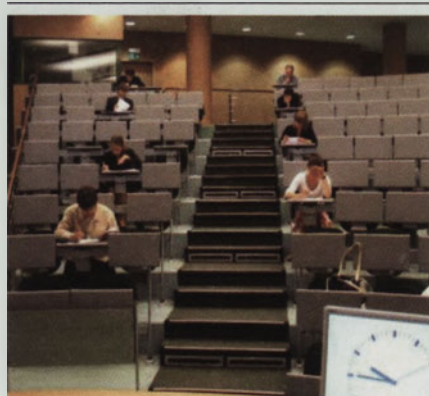
szawskim oraz działalność naukowa i dydaktyczna Katedry i Instytutu Biochemii na Wydziale Biologii są przedmiotem opracowania (Fot. 6) pt. „50 lat Biochemii na Uniwersytecie Warszaw-

WIADOMOŚCI KRAJOWE

VI Edycję Ogólnopolskiego Konkursu Wiedzy Biochemicznej Studentów Wydziałów Lekarskich „SUPERHELISA 2009” przeprowadzono w Krakowie w dniach 15–16 maja br. Konkurs zorganizowali pracownicy Katedry Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, kierowanej przez prof. dr hab. Piotra Laidlera. Do Konkursu przystąpiło jedenaście 3-osobowych zespołów z Akademii Medycznej we Wrocławiu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Zabrze, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (2 zespoły), Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (2 zespoły). Komisja konkursowa składała się z opiekunów dydaktycznych ekip studenckich uczestniczących w Konkursie. 15 maja, podczas uroczystego otwarcia konkursu w auli Centrum Dydaktyczno-Konferencyjnego CM UJ, uczestników powitał prof. dr hab. Piotr Laidler, kierownik Katedry Biochemii Lekarskiej i Pełnomocnik Rektora ds. Badań Naukowych i Współpracy z Zagranicą CM UJ oraz prof. dr hab. Tomasz Brzozowski, prodziekan ds. Badań Naukowych na Wydziale Lekarskim CM UJ. Wkrótce potem studenci przystąpili do rywalizacji, która tradycyjnie już prze-

biegała w trzech etapach, tj. 1. test, 2. pytania opisowe, 3. pytania ustne.

W pierwszej części uczestnicy mieli za zadanie rozwiązać w 120 minut test (Fot. 1) składający się ze 100 pytań. Większość z nich stanowiły pytania jednokrotnego wyboru z pięciu możliwych odpowiedzi, a tylko niewielki procent miał charakter pytań złożonych, gdzie więcej niż jedna odpowiedź mogła być poprawna (regulamin VI edycji Konkursu dopuszczał maksymalnie 30% takich pytań, w których należało określić, które z kilku podanych stwierdzeń są prawdziwe). Za każdą poprawną odpowiedź przyznawano 1 punkt, czyli maksymalna ilość punktów, którą można było zdobyć w I etapie Konkursu wynosiła 100. Test oceniła Komisja, w



Fotografia 1. Uczestnicy „Superhelisy 2009” piszą test. Aula w Centrum Dydaktyczno-Konferencyjnym CM UJ.

Fotografia 6. Strona tytułowa opracowania „50 lat Biochemii na Uniwersytecie Warszawskim”, wydawnego w 2008 roku.



skim (1958–2008) na podstawie materiałów zebranych przez Kierowników Zakładów Instytutu Biochemii.

skład której weszli opiekunowie ekip uczestniczących w Konkursie.

W drugiej części Konkursu uczestnicy udzielali pisemnych odpowiedzi na 5 pytań opisowych, sprawdzających znajomość przemian biochemicznych i wzorów metabolitów (czas na udzielenie odpowiedzi na wszystkie pytania wynosił 50 minut). Za odpowiedź na każde pytań uczestnik mógł otrzymać od 0 do 5 punktów czyli łącznie do 25 punktów. Prace zostały zakodowane, odpowiedzi oceniała Komisja złożona z opiekunów ekip studenckich. Suma punktów trojga członków zespołu uzyskana w dwóch pierwszych etapach Konkursu decydowała o miejscu reprezentacji uczelni w klasyfikacji zespołowej. Klasyfikacja zespołowa VI Edycji Ogólnopolskiego Konkursu Wiedzy Biochemicznej Studentów Wydziałów Lekarskich „SUPERHELISA 2009”. Pierwsze miejsce zajęła drużyna Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie, w składzie Elżbieta Klimiec, Joanna Rutka, Piotr Magoń (318,5 punkta); drugie miejsce zajęła drużyna I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w składzie Kamil Chudziński, Michał Kowara, Mariusz Tomaniak (318 punktów), a trzecie miejsce drużyna Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, w składzie Anna Pietrzak, Agata Peikow, Amadeusz Woźniak (299 punktów).

Na podstawie wyników I i II etapu Konkursu wyłoniono 10 osób, które wzięły udział w trzecim, finałowym etapie. Byli to Anna Pietrzak (110,5), Elżbieta Klimiec (108), Mariusz Tomaniak (107,5), Joanna Rutka (106), Michał Kowara (105,5), Kamil Chudziński (105), Wojciech Magoń (104,5), Katarzyna Włodarczyk (103), Mariusz Śliwa (99) i Agata Peikow (97). Wszyscy finaliści odpowiadali ustnie (Fot. 2) na takie same trzy pytania przekrojowe, wymagające umiejętności analizowania i syntetyzowania wiedzy. Uczestnicy części finałowej odpowiadali w wylosowanej kolejności; pierwsza osoba losowała zestaw pytań finałowych. Każdy z finalistów miał 15 minut na przygotowanie odpowiedzi oraz 15 minut na jej przedstawienie Komisji. Komisja nie zadawała żadnych dodatkowych pytań. Za odpowiedź na każde z pytań uczestnik mógł otrzymać od 0 do 10 punktów. Odpowiedzi finalistów oceniała Komisja złożona z opiekunów poszczególnych ekip, przy czym opiekunowie nie oceniali swoich podopiecznych. Ostateczną ocenę stanowiła średnia arytmetyczna z wystawionych punktów, po odrzuceniu ocen skrajnych. O miejscu uczestnika w końcowej klasyfikacji indywidualnej decydowała suma



Fotografia 2. Uczestnicy "Superhelisy 2009" odpowiadają na pytania ustne. Sala Konferencyjna Katedry Biochemii Lekarskiej CM UJ.

punktów uzyskanych w trzech etapach konkursu. Klasyfikacja indywidualna VI Edycji Ogólnopolskiego Konkursu Wiedzy Biochemicznej Studentów Wydziałów Lekarskich „SUPERHELISA 2009”. Pierwsze miejsce zajęła Anna Pietrzak z Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (132,4 punkta), drugie miejsce Kamil Chudziński z I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (132,3 punkta), a trzecie miejsce Michał

Kowara z I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (130,6 punkta). Zdaniem oceniających poziom Konkursu był bardzo wysoki, o kolejności na podium decydowały różnice dziesiętnych punktów; stąd decyzją Komisji, w klasyfikacji indywidualnej przyznane zostały dwa pierwsze miejsca. W sobotnie popołudnie 16 maja w sali wykładowej Katedry Biochemii Lekarskiej CM UJ uroczyste zakoń-

czono Konkurs (Fot. 3). Wszyscy uczestnicy Konkursu otrzymali z rąk prof. dr hab. Piotra Laidlera dyplomy, a najlepsi także cenne nagrody książkowe, pamiątkowe statuetki oraz upominki (Fot. 4). Następnie wszyscy uczestnicy i ich opiekunowie zostali zaproszeni na spotkanie, w którym udział wzięli również pracownicy Katedry Biochemii Lekarskiej CM UJ, zaangażowani w przygotowanie i przeprowadzenie Konkursu. Czas spotkania upłynął na wymianie doświadczeń, wrażeń i opinii oraz wesołym biesiadowaniu miłośników biochemii, którzy w tym roku spotkali się w Krakowie. Należy też wspomnieć, że dla uczestników SUPERHERLISY 2009 zorganizowano w piątek, 15 maja zwiedzanie bogatych i ciekawych zbiorów Muzeum Anatomii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, które jest najstarszym i największym w Polsce oraz jednym z większych w Europie muzeów anatomicznych. Ponadto uczestnicy miło spędzali wolny czas na zwiedzaniu Krakowa, a dodatkową atrakcją była możliwość włączenia się w imprezy towarzyszące Festiwalowi Nauki, trwającemu w dniach 14-16.05.09, popularyzującemu krakowskie wyższe uczelnie wśród mieszkańców i odwiedzających miasto gości.

Organizatorzy Konkursu pragną podziękować wszystkim, którzy przyczynili się do realizacji VI Edycji Ogólnopolskiego Konkursu Wiedzy Biochemicznej Studentów Wydziałów Lekarskich „SUPERHELISA 2009” w Krakowie. Szczególne podziękowania składają sponsorom: Dziekanowi Wydziału Lekarskiego prof. dr hab. Tomaszowi Grodzickiemu, Urzędowi Miasta Krakowa, a także firmom

Alab, Becton-Dickinson, Immuniq, Lab-Jot, Meranco, Merck, Millipore, Sarstedt i Siemens (przygotowano na podstawie opracowania i fotografii otrzymanych od Anny Bilskiej i Barbary Piekarskiej).

O stypendium programu „Kolumb” Fundacji Nauki Polskiej ubiegało się w 20. edycji konkursu 113 kandydatów. W

wyniku oceny zgłoszonych wniosków do drugiego etapu (rozmowy kwalifikacyjne) zaproszono 28 osób. Zgodnie z decyzją zarządu FNP laureatami konkursu zostało jedenastu młodych uczonych ze stopniem doktora. Zwycięzcy konkursu wyjadą na staże naukowe do prestiżowych zagranicznych ośrodków

badawczych w Danii, Hiszpanii, Niemiec, Stanów Zjednoczonych i Wielkiej Brytanii. Wśród zwycięzców znaleźli się doktoranci Instytutu Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej, Instytutu Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego PAN, Wydziału Chemii Uniwersytetu War-

sawskiego, Katedry i Zakładu Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Białymstoku, Instytutu Fizyki Teoretycznej i Astrofizyki Uniwersytetu Gdańskiego, Instytutu Chemii Organicznej PAN, Instytutu Matematyki PAN, Instytutu Filologii Orientalnej Uniwersytetu Jagiellońskie-



Fotografia 3. Uroczyste zakończenie "SUPERHELISY 2009" w sali wykładowej Katedry Biochemii Lekarskiej CM UJ w Krakowie.



Fotografia 4. Wręczenie nagród.

go, Katedry Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku i Instytutu Archeologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Ze stypendiów programu „Kolumb” mogą skorzystać młodzi naukowcy ze stopniem doktora, którzy jeszcze nie odbyli po doktoracie dłuższego stażu zagranicznego. Program stypendialny „Kolumb” umożliwi im odbycie stażu od sześciu do dwunastu miesięcy w najlepszych ośrodkach naukowych świata. Kandydaci są oceniani na podstawie dotychczasowego dorobku naukowego oraz przedstawionego planu pracy, jaki zamierzają realizować w zagranicznym ośrodku. Ważnym kryterium przyznania stypendium jest ranga naukowa wybranego ośrodka. Średnia wysokość stypendiów wynosi od 3 tys. do 6 tys. euro miesięcznie, w zależności od miejsca odbywania stażu. Fundacja pokrywa koszty podróży stypendysty i jego współmałżonka, jeśli zamierza on przebywać ze stypendystą co najmniej przez połowę okresu stypendium, a także koszty ubezpieczenia stypendysty w czasie pobytu za granicą. Szczegółowe informacje na temat zasad konkursu można znaleźć na stronie: www.fnp.org.pl/aktualności/.

Polscy naukowcy chcą znaleźć związki przeciwbakteryjne umożliwiające stworzenie skuteczniejszych antybiotyków. Nad projektem będzie pracował zespół dr Joanny Trylskiej. Pieniądze na badania i utworzenie zespołu badawczego (około 2 mln złotych) przyznała Fundacja na rzecz Nauki Polskiej, w ramach programu „Team”. Prowadzony, przez dr Joannę Trylską i jej zespół z Interdyscyplinarnego Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego Uniwersytetu Warszawskiego, projekt badawczy „Peptydowy kwas nukleinowy jako inhibitor translacji u bakterii” będzie prowadzony przez cztery lata. W tym czasie zostanie utworzony 12-osobowy zespół złożony m.in. z fizyków, matematyków, informatyków, chemików i biologów molekularnych. Polscy naukowcy będą współpracowali z trzema instytucjami zagranicznymi. Uniwersytet Kalifornijski w San Diego i Scuola Normale Superiore w Pizie

pomogą w rozwijaniu komputerowych technik projektowania, a Uniwersytet w Wirginii w przeprowadzeniu doświadczeń.

Przyznane fundusze umożliwią opracowanie i wstępne przetestowanie doświadczalne nowych związków przeciwbakteryjnych, z których być może powstaną antybiotyki. Mają być one skuteczniejsze niż dotąd i utrudniać szybkie uodpornienie się bakterii na ten rodzaj leków.

Laureatami II i III edycji 2009 konkursu Programu Team zostali dr Andrzej Dziembowski z IBB PAN, prof. dr hab. Robert Hołyst z Instytutu Chemii Fizycznej PAN, prof. dr hab. Józef Korecki z Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH w Krakowie, dr hab. Joanna Kufel z Wydziału Biologii UW, prof. dr hab. Krzysztof Narkiewicz z UM w Gdańsku, prof. dr hab. Maria Nowakowska z Wydziału Chemii UJ, prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn (Fot. 5) z Wydziału Biologii UG, prof. dr hab. Konrad Banaszek z Instytutu Fizyki Teoretycznej UW, prof. dr hab. Wojciech Gawlik z Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ, prof. dr hab. inż. Karol Grela z Wydziału Chemii UW, dr hab. Dorota Gryko z Instytutu Chemii Organicznej PAN, prof. dr hab. Krzysztof Liberek z Międzyuczelnianego Wydział Biotechnologii UG i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, doc. dr hab. Tomasz Lipniacki z Instytutu Podstawowych Problemów Techniki PAN oraz prof. dr hab. Wojciech Młynarski z Wydziału Pediatrii, Onkologii, Hematologii, Diabetologii, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,

W III edycji programu Ventures FNP wyłoniono siedmiu laureatów. Trafi do nich milion złotych, tj. 3 tys. zł miesięcznie oraz grant badawczy do 35 tys. zł rocznie, na realizację projektu. Program wspiera projekty naukowe, których wyniki mają za-

stosowanie w gospodarce, zgłaszane przez studentów, absolwentów lub doktorantów z całej Polski. Dofinansowanie otrzymywane przez laureatów programu pokrywane jest z funduszy europejskich w ramach Działania 1.2 „Wzmocnienie potencjału kadrowego nauki” Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013. AGT. Nagrodzeni przez FNP to Bożena Nej-



Fotografia 6. Mgr Bożena Nejman.

man (Fot. 6) z Uniwersytetu Gdańskiego, Justyna Gromadzka (Fot. 7) z Politechniki Gdańskiej, Agnieszka Butwin z Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego, Paweł Chrustek z Uniwersytetu Jagiellońskiego, Magdalena Iwanicka z Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu, Kamil Kwiatkowski z Uniwersytetu Warszawskiego oraz Joanna Ortyl z Politechniki Krakow-

skiej. Ideą programu Ventures jest zainteresowanie zdolnych, młodych ludzi pracą naukową, aby zwiększyć liczbę projektów, których wyniki można będzie bezpośrednio zastosować w polskiej gospodarce. W ramach otrzymanego dofinansowania, Bożena Nejman z UG będzie prowadzić badania nad mało poznanym procesem replikacji fagów lambdoidalnych przenoszących geny toksyn Shinga; toksyny te są produkowane w przewodzie pokarmowym człowieka i wywołują m. in. zatrucia pokarmowe, małopłytkową płamicę zakrzepową, zapalenie okrężnicy i zespół hemolityczno-mocznicy. Badania pozwolą na zrozumienie molekularnych podstaw procesu replikacji fagów, a w przyszłości mogą zostać wykorzystane do opracowania skutecznych strategii zapobiegania, łagodzenia lub zwalczania infekcji tymi



Fotografia 7. Mgr Justyna Gromadzka.

patogenami. Nowe testy diagnostyczne zwiększyłyby z kolei wykrywalność tych patogenów w materiale klinicznym i żywności. Justyna Gromadzka z Politechniki Gdańskiej będzie pracowała nad przygotowaniem do przemysłowego wdrożenia nowej instrumentalnej metodyki analitycznej oceniającej stabilność oksydacyjną olejów roślinnych z zastosowaniem promieniowania UV oraz technik SPME/GC. Firmy z bran-



Fotografia 5. Profesor Grzegorz Węgrzyn.

zy tłuszczowej współpracując przy opracowywaniu metody widzą możliwość jej wykorzystania jako wewnętrznej procedury kontroli jakości produkowanych olejów w swoich laboratoriach kontrolno-badawczych. Termin przyjmowania wniosków do kolejnej edycji programu Ventures mija 31 października tego roku. Dokumentację konkursową oraz szczegółowe informacje można znaleźć na stronie internetowej Fundacji (www.fnp.org.pl).

Celem programu FNP **Międzynarodowe Projekty Doktoranckie** jest wspieranie jednostek współpracujących z partnerem zagranicznym przy realizacji studiów doktoranckich. **Program obejmuje wszystkie dziedziny nauki, i jest adresowany**

do konsorcjów naukowych złożonych z co najmniej jednej instytucji polskiej i co najmniej jednej zagranicznej, prowadzących wspólnie projekty doktoranckie. W roli koordynatora konsorcjum musi występować jednostka polska, która posiada nadaną przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego pierwszą kategorię w aktualnej ocenie parametrycznej oraz prawo nadawania stopnia naukowego doktora. **W 2009 roku finansowaniu podlegają: imienne stypendia naukowe** dla doktorantów w wysokości 3000 zł miesięcznie (podczas pobytu zagranicznego – 4500 zł); **koszty ubezpieczenia** emerytalnego i rentowego ZUS (jeśli jest opłacane przez doktorantów); **granty badawcze** w wysokości zależnej od liczby doktorantów realizujących projekty oraz rzeczywistych kosztów prowadzonego projektu (nie większej niż 35000 zł rocznie dla jednej osoby). Kolejny termin składania wniosków to **31 października 2009 r.** Laureatami tegorocznego Konkursu zostali Koordynatorzy projektów: prof. Alina Ciach (Instytut Chemii Fizycznej PAN), dr hab. Piotr Gwiazda (Uniwersytet Warszawski), prof. dr hab. Jacek Młynarski (UJ), prof. dr hab. Mirosław Wielgoś (WUM), prof. dr hab. Adam Szewczyk (Instytut Biologii Doświadczalnej PAN) (Fot. 8).

Polski naukowiec pracujący w Stanach Zjednoczonych, prof. Jerzy Leszczyński (Fot. 9), został jednym z laureatów prestiżowej nagrody

przyznawanej przez prezydenta USA, Presidential Award for Excellence In Science, Mathematics and Engineering Mentoring (program PAESMEM). W programie PAESMEM nagradzani są wykładowcy pracujący na



Fotografia 8. Profesor Adam Szewczyk.

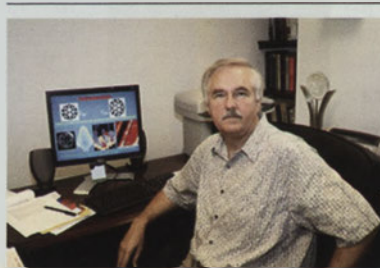
rzecz poprawy pozycji grup stanowiących mniejszość w świecie nauki, technologii, inżynierii i matematyki (np. kobiet, mniejszości, osób upośledzonych). Laureaci to liderzy w staraniach o zbudowanie narodowej kadry naukowej, technologicznej, inżynierskiej i matematycznej w USA. Prof. Leszczyński kieruje Interdyscyplinarnym Centrum Nanotoksikologii (Interdisciplinary Centre for Nanotoxicity) w amerykańskim Jackson State University.

To z jego inicjatywy zawarto umowę o współpracy pomiędzy Politechniką Wrocławską i Jackson State University. W ramach umowy 10 amerykańskich studentów i doktorantów odbyło staże w Politechnice Wrocławskiej, a kilkunastu studentów, doktorantów i pracowników naukowych Politechniki odbyło staże na Uniwersytecie. Laureat zajmuje się badaniami m. in. natury wiązań chemicznych, powierzchni energii potencjalnej, struktury i własności cząsteczek zawierających ciężkie pierwiastki oraz chemią powierzchni i atmosfery. Od 1999

r. współpracuje z Zakładem Modelowania Molekularnego i Chemii Kwantowej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Prof. Leszczyński od roku 2003 współorganizuje cykl corocznych konferencji „Modeling & Design of Molecular Materials” oraz „Biomolecular Interactions”, które odbywają się na przemian w Polsce i w Czechach. Uczony już w 2001 r. został odznaczony przez prezydenta USA, otrzymując wówczas „Millennium Award for Teaching and Research Excellence in Mathematics, Science, Engineering and Technology”.

Za ponad 47 milionów złotych konsorcjum siedmiu krajowych instytucji naukowych utworzy Na-

rodowe Laboratorium Technologii Kwantowych, które sfinansuje Unia Europejska z programu operacyjnego „Innowacyjna Gospodarka. Spotkanie inauguracyjne działalności Laboratorium odbyło się 27 lipca br. na Uniwersytecie Warszawskim. Laboratorium ma być ogólnopolską platformą współpracy i wymiany doświadczeń nad technologiami kwantowymi. W zamierzeniu powstaną cztery nowe pracownie naukowe, a około dwadzieścia już istniejących będzie zmodernizowanych i wyposażonych w nowoczesny sprzęt. Laboratorium przeznaczy także otrzymane fundusze na szkolenia dla doktorantów i studentów, aby pozyskać młodych ludzi zajmujących się bez reszty pracą naukową. Organizatorzy kładąc nacisk na sferę doświadczalną zamierzają roztoczyć opiekę nad rozproszonymi grupami badawczymi zajmującymi się technologiami kwantowymi. Interdyscyplinarne badania w nowej placówce w dziedzinie inżynierii kwantowej mogą mieć znaczenie dla rozwoju technologii informacyjnych, metrologii, nawigacji, inżynierii ma-



Fotografia 9. Profesor Jerzy Leszczyński.

teriałowej, ochrony zdrowia i ochrony środowiska. Narodowe Laboratorium Technologii Kwantowych jest wspólnym projektem Uniwersytetu Warszawskiego – koordynatora projektu, Politechniki Wrocławskiej, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Uniwersytetu Jagiellońskiego, Uniwersytetu Gdańskiego, Uniwersytetu Łódzkiego i Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk (Nauka w Polsce, lipiec 2009).

Biofarma – Centrum Biotechnologii, Bioinżynierii i Bioinformatyki jest tworzone na Śląsku przez konsorcjum wiodących w regionie uczelni. Modernizacja budynków oraz zakup specjalistycznej aparatury naukowo-badawczej na potrzeby 14 nowych i istniejących laboratoriów Centrum pochłonie niemal 90 mln zł do końca 2012 r. Konsorcjum powołały w kwietniu 2007 r. Politechnika Śląska, Uniwersytet Śląski, Śląski Uniwersytet Medyczny oraz Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skło-

dowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach. Uczelnie porozumiały się, by wspólnie aplikować o środki na inwestycje i badania w dziedzinie biotechnologii, bioinżynierii i bioinformatyki, prowadzone przez sieć współpracujących ze sobą laboratoriów, a służące rozwojowi nowoczesnych technologii.

Jako pierwsze będą modernizowane budynek Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej w Gliwicach i laboratorium mikroskopii elektronicznej w Zabrze-Rokitnicy. Projekt będzie realizowany w ramach programu operacyjnego „Innowacyjna Gospodarka”, z puli przeznaczonych na rozwój ośrodków o wysokim potencjale badawczym.

Niewykluczone, że w ramach konsorcjum w gliwickim Centrum Onkologii uda się zbudować bank tkanek. Dałoby to możliwość pozyskiwania kolejnych środków, które mogą być później inwestowane w inne projekty badawcze (Nauka w Polsce, 2009).

Biometryczny terminal, rozpoznający osobę na podstawie unikatowego dla każdego z nas układu żył dłoni skonstruowali pracownicy Instytutu Maszyn Matematycznych w Warszawie (IMM). Może on posłużyć jako urządzenie kontroli dostępu lub system rejestracji czasu pracy. W dobie poszukiwania metod bardziej odpornych na fałszerstwa pobieranie cech biometrycznych jest najbardziej sprawdzoną i pewną metodą identyfikowania człowieka. Układ żył jest indywidualny i niezmienny dla każdego człowieka już od czwartego roku życia. Wprawdzie ciało dziecka rośnie, a wraz z nim cały układ się zwiększa, to jego charakterystyczne elementy pozostają stałe. Zmieniają się jedynie proporcje. Promieniowanie podczerwone wykorzystuje się do zdejmowania obrazu żył, który następnie poddaje się obróbce, aby uzyskać dane najbardziej przydatne do identyfikacji, i dalej obraz przygotowuje się do analizy cyfrowej. Informacje o układzie żył przetwarzają się i przechowują nie w formie obrazów, lecz wzorców. Służą one do porównania z wzorcem uzyskanym z czytnika, a praktycznie ustala się czy osoba jest tą, za którą się podaje. Urządzenie jest obecnie na ostatnim etapie konstrukcji, a prywatne firmy już zgła-

szają zainteresowanie jego produkcją i dystrybucją (Nauka w Polsce, czerwiec 2009).

Białko LRG wykryli w moczu specjaliści z Children's Hospital w Bostonie. Może być ono szczególnie charakterystyczne dla zapalenia wyrostka.

Do jego oznaczania wykorzystuje się teraz technikę spektrometrii masowej, jednak prawdopodobnie uda się opracować odpowiednie paski testowe (PAP, czerwiec 2009).



Fotografia 10. Dr Weronika Chańska.

Debata „Filozofia i etyka jakości życia w medycynie współczesnej. Próba rozstrzygnięcia sporu pomiędzy etyką

jakości życia a etyką świętości życia na tle współczesnej medycyny”, organizowana przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, odbyła się 18 czerwca 2009 roku w Bibliotece Uniwersyteckiej w Warszawie. Pretekstem do podjęcia debaty była książka **dr Weroniki Chańskiej** (Fot. 10) pt. „Nieszczęsny dar życia. Filozofia i etyka jakości życia w medycynie współczesnej”, wydana w serii Monografie FNP. Do dyskusji zaproszono poza autorką **prof. Andrzeja Górskiego** – specjalistę nauk medycznych, **prof. Zbigniewa Szawarskiego** – bioetyka i filozofa medycyny, **księdza prof. Andrzeja Szostka** – filozofa i etyka chrześcijańskiego. Debata prowadził redaktor Krzysztof Michalski z Polskiego Radia.

Spotkanie rozpoczął **prof. Maciej Żylicz**, prezes FNP, pytaniem, czy kryteria moralne mają być w dyskusji o granicach życia takie same, jak te stosowane w trakcie życia człowieka. To są zagadnienia, na które współczesne społeczeństwa będą musiały w najbliższym czasie odpowiedzieć, choćby dlatego, że rozwój medycyny sprzyja przedłużeniu ludzkiego życia. **Dr Weronika Chańska** w swej książce podjęła próbę przedstawienia stanowisk dotyczących sposobów podejmowania decyzji o końcu ludzkiego życia. Autorka nakreśliła w wystąpieniu dwie doktryny, które jej zdaniem reprezentują konkurencyjne wizje rozwiązania poruszonego problemu, przeciwstawiając etykę świętości życia etyce jako-

ści życia. Kwestie te nabierają wielkiego znaczenia w sytuacji, gdy czas, miejsce i sposób, w jaki chorzy umierają, są dla nich bardzo ważne. Autorka pesymistycznie widzi możliwość znalezienia kompromisu w kwestii rozstrzygnięcia stosowania kryterium świętości życia (największe dobro to przede wszystkim podtrzymanie życia), czy jakości życia (największe dobro to zapewnienie człowiekowi satysfakcjonujących warunków życia), choć oczywistym dla niej jest przyjęcie, po debacie publicznej, jednoznacznych rozwiązań prawnych regulujących tę kwestię. **Prof. Andrzej Górski** wyraził opinię, że poszukiwania kompromisu powinny być kontynuowane. Powołując się na zapisy obowiązującego w Polsce Kodeksu Etyki Lekarskiej i Kodeksu Etycznego Światowej Organizacji Lekarzy wykluczył zdecydowanie uczestnictwo lekarza w zadawaniu śmierci, choć lekarz mając swobodę w wyborze metod leczenia, powinien ograniczyć czynności lekarskie do istotnie potrzebnych choremu i może zaprzestać uporczywego leczenia w stanach terminalnych, kiedy rokowania są beznadziejne. W terminie „optymalna jakość życia” prof. Górski upatruje możliwość wypracowania kompromisu. **Prof. Zbigniew Szawarski** zarysował filozoficzną i etyczną perspektywę dramatycznych przypadków medycznych. Stwierdził, że kompromis pomiędzy doktrynami świętości i jakości życia jest możliwy, bo ludzie o różnorodnych poglądach w cywilizowanych społeczeństwach nie muszą się godzić na wszystko, ale mają równe prawa w sferze decyzji moralnych. **Ksiądz prof. Andrzej Szostek**, uznał, że wobec, jego zdaniem, oszczędnego opisu doktryny świętości życia nie jest mu łatwo zaprezentować ją i bronić. Podkreślił, że w rozumieniu Kościoła katolickiego, który reprezentuje stanowisko określane jako doktryna świętości życia, to sam człowiek, nie życie, jest najcenniejszy. Według stanowiska Kościoła ochrona życia człowieka jest dla człowieka podstawowym warunkiem do osiągnięcia jakiegokolwiek innego dobra. Z tego powodu Kościół stawia punkty graniczne, wyznaczając wyraźnie obszar ochrony życia, ale nie zabrania, a wręcz zachęca do dyskusji o sytuacjach granicznych, w których należy dokonywać trudnego wyboru.

Pod redakcją Teresy Wesołowskiej

Szanowny Pan
Prof. Sławomir Pikuła
Redaktor Naczelny
„Postępów Biochemii”
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Szanowny Panie Profesorze,

Zgromadzeni na corocznej konferencji kierowników Katedr Biochemii uczelni medycznych, jaka miała miejsce w Poznaniu w dniach 29–30 maja br., pragniemy ustosunkować się do listu prof. Edwarda Bańkowskiego, skierowanego do Pana /.../. List został ogłoszony w redagowanym przez Pana czasopiśmie w tomie 54/4, str. 347–349 w 2008 roku. Pragniemy również odnieść się do listu /prof./ Zofii Zarębskiej (Postępy Biochemii 55/1, 20, 2009), krytycznie oceniającej zarzuty, jakie znalazły się w liście prof. Bańkowskiego. Profesor wskazał na merytoryczne błędy pojawiające się w niektórych artykułach publikowanych w Postępkach Biochemii. Uwagi zawarte w liście prof. Bańkowskiego dają się ująć w trzy grupy:

– grupa pierwsza dotyczy błędnego posługiwania się terminami medycznymi;

– grupa druga zawiera uwagi wskazujące na błędy w terminologii chemicznej;

– grupa trzecia – najliczniejsza – traktuje o błędach w terminologii biochemicznej oraz o uchybieniach w interpretacji procesów biochemicznych.

Akceptując /.../ uwagi prof. Bańkowskiego, chcemy wyrazić swoje stanowisko wobec polemicznego listu prof. Zofii Zarębskiej poddającej w wątpliwość merytoryczną wartość spostrzeżeń prof. Bańkowskiego. Swoje uwagi prof. Zarębska rozpoczęła od krytycznej oceny stwierdzenia prof. Bańkowskiego, że „nie ma choroby zwanej artretyzmem”. Autorka listu zapewnia, że „termin taki figuruje w polskich słownikach medycznych równoważnie z terminem dna – skaza moczanowa”. Nie wiemy jakie polskie słowniki medyczne skłoniły autorkę do wyrażenia takiego poglądu. Wiemy natomiast, że najbardziej autorytatywne źródło jakim jest Wielki Słownik Medyczny

(PZWL, 1996) hasła „artretyzm” nie zawiera. Ten sam słownik informuje: „dna – arthritis urica /.../ (przebiega) z napadami ostrego zapalenia stawów” (op. cit. str. 283). Podobną informację można znaleźć w rozdziale „Metabolizm nukleotydów purynowych i pirymidynowych” zawartym w Biochemii Harpera (PZWL, 2004). W rozdziale tym czytamy: „dna moczanowa /.../ wywołuje ostre zapalenie stawów”. We wspomnianej Biochemii Harpera również nie znajdujemy hasła „artretyzm”. Fakty te sprawiły, że z polskiego nazewnictwa medycznego usunięto nic nie mówiący termin „artretyzm”, zastępując go oddającym istotę sprawy / terminem/ „arthritis”. Wprawdzie w anglojęzycznych słownikach widnieje hasło „artretyzm” (Jan Stanisławski, Wielki Słownik Polsko-Angielski, Wiedza Powszechna 1966, tom 1, str. 27), ale jest to polskie – niestety błędne – tłumaczenie angielskiego /pojęcia/ „arthritis, gout” (dna). Tak więc uznanie za merytoryczny błąd stwierdzenia prof. Bańkowskiego, że „nie ma choroby zwanej artretyzmem” jest bezpodstawne.

Dla wykazania mylnego poglądu /prof./ Zarębskiej, że spostrzeżenie prof. Bańkowskiego, iż „nie ma skrępow wewnątrznaczyniowych” jest również merytorycznie błędne, przytaczamy definicję skrzepu i zakrzepu. Obie definicje pochodzą ze wspomnianego wyżej Wielkiego Słownika Medycznego. Skrzep (ang. *blood clot*) to „galaretowata masa powstająca w prawidłowych warunkach z krwi znajdującej się poza naczyniami krwionośnymi” (Wielki Słownik /Medyczny/, str. 1237), natomiast zakrzep (ang. *thrombus*) to „osad w świetle żywych naczyń krwionośnych” (Wielki Słownik /Medyczny/ str. 1522).

Przytoczone definicje jednoznacznie potwierdzają słuszność krytycznej oceny prof. Bańkowskiego, że „nie ma skrępow wewnątrznaczyniowych” i każą uznać stanowisko /prof./ Zarębskiej za pozbawione podstaw. Nie wiemy, jakie jeszcze spostrzeżenia /prof. Bańkowskiego/ uważa /prof./ Zarębska za merytorycznie błędne, ponieważ

w swoim liście ograniczyła się do wspomnianych dwóch kwestii.

Zgadza się natomiast z poglądem /prof./ Zarębskiej, że „nadzór merytoryczny nad polszczyzną w czasopiśmie, nie może być dziełem jednej osoby”. Jesteśmy świadomi, że Redakcja Postępów Biochemii dysponuje znakomitymi redaktorami, których kompetencje dotyczące polskiego nazewnictwa medycznego, chemicznego i biochemicznego są niekwestionowane. Zakres oddziaływania „Postępów Biochemii” jest jednak na tyle znaczny, że poprawna terminologia haseł będących treścią publikowanych tam artykułów poza walorami naukowymi ma również walor dydaktyczny. Ten fakt – poza polemiką z listem /prof./ Zofii Zarębskiej – sprawił, że zgromadzeni na konferencji – byli i aktualni – kierownicy Katedr Biochemii uczelni medycznych, podjęli inicjatywę wystąpienia z niniejszym listem do Pana Redaktora Naczelnego.

Z upoważnienia uczestników konferencji, z wyrazami szacunku,

/-/Janusz Greger

Katedra Biochemii Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź
Łódź, 12 czerwca 2009 roku

Szanowny Panie Redaktorze,

Pragnę zwrócić uwagę na rażący błąd, występujący ostatnio w kilku artykułach w Postępkach Biochemii, mianowicie „egzon” zamiast prawidłowego terminu „ekson” (utworzonego od terminu „ekspresja”). Komunikat Komisji Słownictwa Biochemicznego na ten temat ukazał się w Postępkach Biochemii, w tomie 42, str. 369 (1996). Sądzę, że Redakcja powinna uczulać recenzentów artykułów na poprawianie słownictwa.

Z poważaniem,

Janina Kwiatkowska-Korczak

(e-mail: biochsek@bioch.am.wroc.pl)
Wrocław, 2009-06-27

Izoenzymy cytochromu P450 w metabolizmie związków endo- i egzogennych

STRESZCZENIE

Cytochromy P450 (CYP) należą do enzymatycznych białek hemowych występujących we wszystkich organizmach żywych. W komórkach eukariotycznych katalizują biosyntezę związków endogennych, głównie lipidów i ich pochodnych, ale także metabolizm ksenobiotyków, w tym leków. W reakcjach tych substraty ulegają C-oksydacji (hydroksylacja, epoksydacja, peroksydacja), N-oksydacji, S-oksydacji oraz oksydacyjnej O-, S-, i N-dealkilacji. W konsekwencji wymienionych procesów monooksygenacji powstają też produkty dimeryzacji, izomeryzacji oraz struktury cykliczne. Izoenzymy cytochromu P450, kodowane w organizmie człowieka przez 57 genów, różnią się specyficznością substratową. Na przykład, CYP51A1 pełni kluczową rolę w biosyntezie cholesterolu, CYP7A1, 7B1, 8B1, 27A1 i 39A1, w biosyntezie kwasów żółciowych, a CYP46A1 w metabolizmie oksysteroli. Za metabolizm leków odpowiedzialne są głównie CYP3A4, 2D6, 2C9 i 2C19 oraz dodatkowo CYP2E1 związany też z metabolizmem etanolu, a także CYP1A2 znany z metabolizmu związków kancerogennych. Metabolizm ksenobiotyków można uznać za element mechanizmów obronnych organizmu przed pojawiającymi się w środowisku nowymi substancjami obcymi, a jednocześnie spełnia on funkcję aktywacji ksenobiotyków, w tym leków.

WPROWADZENIE

Cytochromy P450 (CYP) to liczna i wielofunkcyjna nadrodzina białek enzymatycznych wykazujących aktywność monooksygenaz [1]. Cytochromy P450 należą do białek hemowych i występują we wszystkich organizmach żywych, począwszy od bakterii, poprzez grzyby i rośliny, do zwierząt i ludzi. Obecne są we wszystkich typach komórek ssaków, za wyjątkiem dojrzałych erytrocytów. Szczególnie wysoką aktywność zróżnicowanych izoenzymów CYP stwierdza się w siateczce śródplazmatycznej hepatocytów i chociaż występują także w komórkach płuc, nerek, serca, jelit, mózgu i skóry, to ich łączna aktywność jest tam niższa, niż w wątrobie [2]. W komórkach eukariotycznych cytochromy P450 zaangażowane są z jednej strony w metabolizm związków endogennych, np. biosyntezę cholesterolu i hormonów steroidowych lub metabolizm kwasów tłuszczowych i ich pochodnych, z drugiej zaś strony w aktywację lub inaktywację leków i metabolizm innych związków obcych dostających się do organizmu. Druga grupa przemian rozwinęła się prawdopodobnie w wyniku ewolucji CYP metabolizujących substraty endogenne [3,4].

W oparciu o strukturę pierwszorzędową izoenzymy cytochromu P450 zostały zaklasyfikowane do rodzin i podrodzin. Enzymy należące do jednej rodziny, np. CYP1, wykazują identyczność struktury pierwszorzędowej co najmniej w 40%, a członkowie podrodzin np. CYP1A, w ponad 55%. Dotychczas zidentyfikowano 781 rodzin cytochromu P450: 205 w komórkach bakterii, 61 w komórkach *Protista*, 310 w organizmach grzybów, 95 roślin i 110 w organizmach zwierząt. Mimo stosunkowo niskiej ogólnej liczby rodzin w organizmach roślin, występuje tam duże wewnętrzne zróżnicowanie podrodzin i izoenzymów CYP. Na przykład, w komórkach ryżu stwierdzono aż 452 geny CYP, podczas gdy u człowieka występuje ich 57, kodujących 58 izoenzymów cytochromu P450 [5,6].

Zdolność cytochromów P450 do metabolizowania dużej liczby różnych związków wynika nie tylko z różnorodności izoenzymów oraz izoform CYP, ale również z faktu, że wiele izoenzymów cytochromu P450 charakteryzuje się szeroką specyficznością substratową. Badania strukturalnych podstaw takiej specyficzności pozwalają na przewidywanie kierunku metabolizmu zarówno leków, jak i innych ksenobiotyków.

Cytochromy P450 to białka zakotwiczone w błonach biologicznych o masie cząsteczkowej od 42 do 62 kDa. Enzymy te różnią się strukturą pierwszorzędową, co wpływa na zróżnicowanie budowy ich centrum aktywnego. [7]. Hem stanowiący grupę prostetyczną CYP, zawiera wyeksponowany w centrum aktywnym atom żelaza, związany koordynacyjnie z czterema atomami azotu pier-

Anita Wiśniewska

Zofia Mazerska[✉]

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

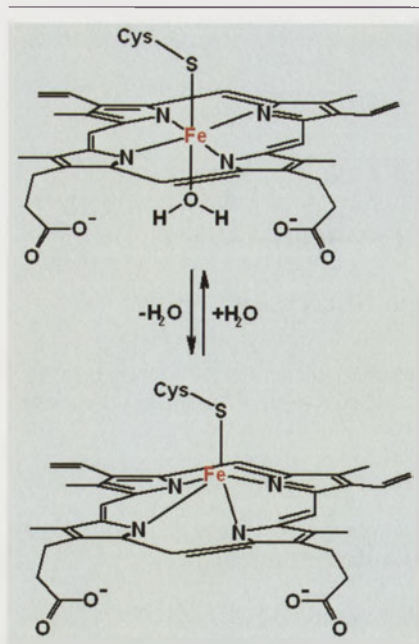
[✉]Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk; e-mail: mazerska@chem.pg.gda.pl

Artykuł otrzymano 25 stycznia 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 8 maja 2009 r.

Słowa kluczowe: biotransformacja leków, cytochrom-P450, izoenzymy CYP, metabolizm ksenobiotyków, monooksygenacja

Wykaz skrótów: CPR – reduktaza NADPH: cytochrom P450; CYP – cytochrom P450; FAD – dinukleotyd flawinoadeninowy; FMN – mononukleotyd flawinoadeninowy; MeIQ – 2-amino-3,5-dimetyloimidazo-[4,5-f]chinolina; NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego; PhIP – 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo-[4,5-b]pirydyna



Rycina 1. Centrum porfirynowo-żelazowe cytochromów P450. Stan równowagi pomiędzy strukturą pięciokoordynacyjnego wysokospinowego jonu Fe(III) z resztą cysteiny jako ligandem i sześciokoordynacyjnego niskospinowego jonu Fe(III) z cząsteczką wody w pozycji *trans* w odniesieniu do reszty cysteiny (na podstawie [1]).

ścienia porfirynowego i dwoma osiowymi ligandami, z których jeden stanowi reszta cysteiny. W stanie spoczynku kompleks porfiryny występuje w równowadze pomiędzy strukturą pięciokoordynacyjnego wysokospinowego jonu Fe(III) z resztą cysteiny jako ligandem i sześciokoordynacyjnego niskospinowego jonu Fe(III) z cząsteczką wody w pozycji *trans* w odniesieniu do reszty cysteiny (Ryc. 1) [1].

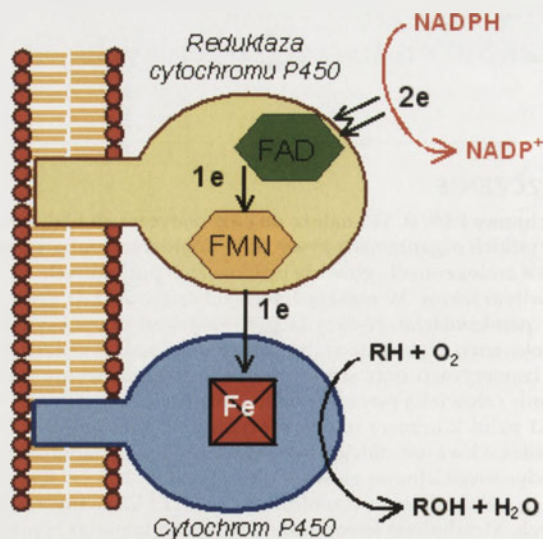
Zasadniczą funkcją enzymów z nadrodziny cytochromów P450

jest kataliza reakcji utleniania związków endo- i egzogennych na drodze monooksygenacji, w której jeden z dwóch atomów cząsteczki tlenu wbudowują się do cząsteczki substratu w reakcji w/g schematu.

$RH + O_2 + H^+ + NAD(P)H \rightarrow R-OH + H_2O + NAD(P)^+$,
gdzie RH – substrat, ROH – produkt. W reakcji tej izoenzymy cytochromu P450 przejmują elektron z NADPH lub z NADH i poprzez inne przenośniki elektronów przenoszą go na cząsteczkę tlenu (Ryc. 2) [8].

Transfer elektronów z NADPH na cytochrom P450 w siateczce śródplazmatycznej u człowieka zachodzi z udziałem flawoproteiny, reduktazy NADPH:cytochrom P450 (CPR). Enzym ten zawiera dwie główne grupy prostetyczne: dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD) i mononukleotyd flawinoadeninowy (FMN). Dwa elektrony z cząsteczki NADPH są przenoszone na FAD, a następnie po jednym elektronie na FMN, skąd są dostarczane na hem cytochromu P450, który z kolei, ulega stopniowej redukcji, przenosząc elektron na substrat RH [9]. W niektórych reakcjach katalizowanych przez retikularne izoenzymy cytochromu P450 transport drugiego elektronu może zachodzić nie bezpośrednio z reduktazy cytochromu P450, ale z cytochromu b₅, małego białka hemowego o masie formy prekursorowej 15.3 kDa, które również znajduje się w siateczce śródplazmatycznej [10,11]¹.

Cykl katalityczny cytochromu P450 jest inicjowany przez związanie substratu z cząsteczką białka hemowego. Związa-



Rycina 2. Schemat transportu elektronów z NADPH na cząsteczkę tlenu w siateczce śródplazmatycznej z udziałem przenośników elektronów FAD i FMN, NADPH reduktazy:cytochromu P450 oraz centrum porfirynowego cytochromu P450.

ny z substratem Fe(III) układu hemowego, znajdujący się w stanie pięciokoordynacyjnym (Ryc. 1) ma wyższy potencjał redukcyjny (-170 mV), niż Fe(III) w stanie sześciokoordynacyjnym (-270 mV), co zwiększa szybkość, z jaką następuje redukcja Fe (III) do Fe (II) z udziałem elektronu przeniesionego z NADPH przez reduktazę cytochromu P450 [7].

IZOENZYMY CYTOCHROMU P450 U CZŁOWIEKA

Izoenzymy cytochromu P450 człowieka po raz pierwszy wyizolowano z siateczki śródplazmatycznej komórek wątroby w latach 80-tych XX wieku. Były to izoenzymy CYP1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2D6 i 3A4 [12-15]. Rozwój technik rekombinacji DNA pozwolił na syntezę rekombinowanych białek w komórkach bakterii, drożdży lub ssaków. Badania roli izoenzymów CYP w metabolizmie leków i innych ksenobiotyków oraz w procesach kancerogenezy ujawniły, że w przemianach tych uczestniczą tylko niektóre spośród izoenzymów CYP człowieka, co pozwoliło zawęzić zakres badań do wybranych białek. Wiedza o udziale izoenzymów CYP w biotransformacji leków wykorzystywana jest w badaniach biodostępności leków, interakcji w układach lek-lek i lek-metabolit oraz w analizie efektów toksycznych farmakoterapii. Ważne miejsce zajmują też badania reakcji katalizowanych przez cytochromy P450 w aspekcie ich roli w procesach nowotworzenia (Tabela 1) [1,13-15].

Badania genomu człowieka pozwoliły na stwierdzenie, że izoenzymy cytochromów P450 kodowane są przez 57 genów. Izoenzymy te należą do 18 rodzin i 43 podrodzin [5]. Niezależnie od tego podziału, biorąc pod uwagę rodzaj substratu, można dokonać klasyfikacji izoenzymów CYP na 6 grup, uwzględniając udział w przemianach związków endogennych czyli steroli, kwasów tłuszczowych i eikozanoidów oraz związków egzogennych, wśród których me-

¹Inne systemy transportu elektronów na cytochromy P450 zostały opisane w artykule pt. „Reduktaza NADPH:cytochrom P450, nie tylko partner cytochromu P450” zamieszczonego w niniejszym numerze „Postępów Biochemii”.

Tabela 1. Klasyfikacja izoenzymów P450 (CYP) człowieka w zależności od typu substratu, wg [28].

Sterole	Kwasy tłuszczowe	Eikozanoidy	Witaminy	Ksenobiotyki	Słabo poznane substraty
1B1	2J2	4F2	2R1	1A1	2A7
7A1	4A11	4F3	24A1	1A2	2S1
7B1	4B1	4F8	26A1	2A6	2U1
8B1	4F12	5A1	26B1	2A13	2W1
11A1		8A1	26C1	2B6	3A43
11B1			27B1	2C8	4A22
11B2				2C9	4F11
17A1				2C18	4F22
19A1				2C19	4V2
21A2				2D6	4X1
27A1				2E1	4Z1
39A1				2F1	20A1
46A1				3A4	27C1
51A1				3A5	
				3A7	

tabolizmowi z udziałem P450 ulegają witaminy z grupy A i D oraz ksenobiotyki (leki i substancje toksyczne) [15]. W Tabeli 1 poza wymienionymi grupami jest też grupa nowo poznanych izoenzymów. Zaliczamy je do tzw. białek „sierocych” dla których, na podstawie struktury genomu określono strukturę pierwszorzędową, ale ich rola fizjologiczna jest dotychczas słabo poznana. Nie znamy funkcji izoenzymów cytochromu P450 wymienionych w rubryce „słabo poznane” CYP2A7, 4F22, 4V2, 27C1, 20A1. O pozostałych wiadomo m.in., że CYP2S1 występuje głównie w komórkach układu oddechowego i pokarmowego, i może uczestniczyć w metabolizmie węglowodorów aromatycznych. CYP2U1 znaleziono w płucach, w trzustce, w wątrobie, w śledzionie, w mięśniach, w sercu i w mózgu. Prawdopodobnie jest odpowiedzialny za metabolizm kwasu arachidonowego i innych kwasów tłuszczowych. Ponadto może odgrywać istotną rolę w regulacji przepływu krwi przez mózg. Natomiast CYP2W1 jest izoenzymem występującym w komórkach nowotworowych. Podobnie jak CYP2S1 bierze udział w aktywacji kancerogennych policyklicznych węglowodorów aromatycznych. Wysoki poziom syntezy tego białka stwierdzono w nowotworowych komórkach wątroby, HepG2. CYP3A43 jest izoenzymem działającym głównie poza wątrobą, podobnie jak CYP4X1, którego ekspresję wykazano selektywnie w komórkach mózgu. Natomiast CYP4F11 jest prawdopodobnie katalizatorem reakcji 20-hydroksylacji trioksyfiliny A3, zaś CYP4Z1 ω -hydroksylacji kwasu laurynowego, mirystynowego i palmitynowego [16].

KLUCZOWE FUNKCJE ISOENZYMÓW CYTOCHROMU P450

Aktywność katalityczna cytochromów P450 jest sterowana z jednej strony poprzez czynniki genetyczne, zaś z drugiej strony przez endogenne systemy regulacji hormonalnej. Na aktywność tych enzymów mają również wpływ związki egzogenne będące ligandami receptorów jądrowych²

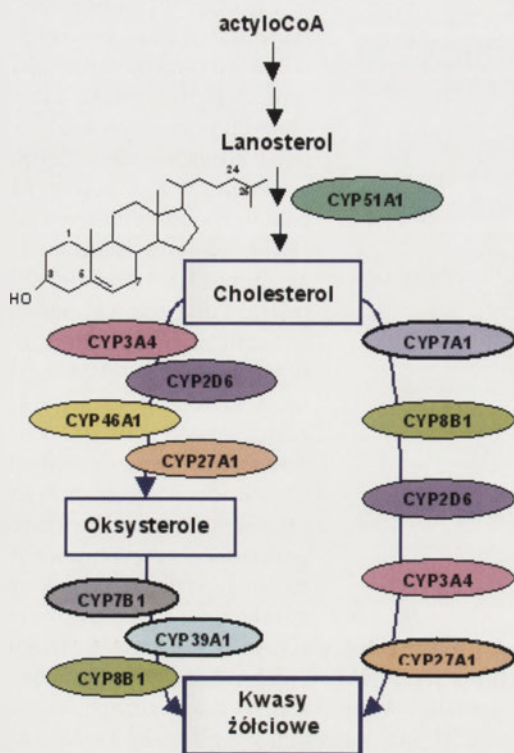
Chociaż w komórkach, oprócz nadrodziny cytochromu P450, jest wiele enzymów utleniających, w tym dehydrogenaza alkoholowa, oksydazy ksantynowa, aldehydowa i aminowa, to izoenzymy cytochromu P450 pełnią kluczową rolę w metabolizmie utleniającym [1,17]. Na przykład, w biosyntezie steroli i ich pochodnych bierze udział kilka różnych izoenzymów cytochromu P450. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa CYP51A1, który katalizuje reakcję 14 α -demetylacji lanosterolu, prowadzącą do powstania cholesterolu (Ryc. 3). Gen kodujący ten enzym występuje w komórkach wszystkich organizmów żywych począwszy od roślin i grzybów po zwierzęta, co sprawia, że CYP51A1 bywa uznawany za prekursora innych eukariotycznych izoenzymów cytochromu P450 [18].

U człowieka wykazano jego obecność w jądrach, w jajnikach, w nadnerczach, w wątrobie i w nerkach. W pierwszym etapie głównego szlaku biosyntezy kwasów żółciowych z cholesterolu ważną funkcję pełni CYP7A1, który katalizuje reakcję hydroksylacji w pozycji 7 (Ryc. 3). CYP7B1 uczestniczy w alternatywnym szlaku biosyntezy kwasów żółciowych katalizując 7-hydroksylację 27-hydroksycholesterolu i kwasu 3 β -hydroksy-5-cholestenowego. Katalizuje on także 7-hydroksylację oksysterolu, podobnie jak CYP39A1. W biosyntezie kwasów żółciowych bierze udział też CYP8B1 katalizujący reakcję 12 α -hydroksylacji oraz CYP27A1, który konieczny jest do syntezy oksysteroli i utleniania łańcucha bocznego [18].

Na uwagę zasługuje, biorący także udział w metabolizmie cholesterolu, CYP46A1. Występuje on głównie w neuronach ośrodkowego systemu nerwowego i bierze udział w metabolizmie cholesterolu, którego stężenie w neuronach jest wysokie [19]. Metabolit, 24S-hydroksycholesterol należący do grupy oksysteroli, po przeniknięciu bariery krew-mózg transportowany jest z krwią do wątroby, gdzie może być przekształcony w kwasy żółciowe lub jest wydalany w postaci siarczanów i glukuronianów. Proces ten jest jednym ze sposobów eliminacji nadmiaru cholesterolu z neuronów mózgu [20]. Wykazano ponadto, że występowanie formy polimorficznej CYP46A1 powstałej w wyniku tranzycji T-C w intronie 2 wiąże się ze wzrostem ryzyka rozwoju choroby Alzheimera.

Izoenzymy cytochromu P450 biorą także udział w syntezie i metabolizmie witaminy D3 (cholekalcyferolu), w którym istotną rolę odgrywają trzy enzymy mitochondrialne, wspomniane powyżej CYP27A1 oraz CYP27B1 i CYP24A1 [21,22]. Pierwszy etap tego procesu, 25-hydroksylacja z udziałem CYP27A1 (Ryc. 4), przebiega w wątrobie, natomiast drugi (1- α -hydroksylacja katalizowana przez CYP27B1) za-

²Wpływ polimorfizmu genów oraz egzogenne ligandów na ekspresję CYP jest przedmiotem artykułu p.t. „Wpływ polimorfizmu i zróżnicowanej ekspresji genów cytochromów P450 na metabolizm ksenobiotyków”, opublikowanego w niniejszym numerze „Postępów Biochemii”.

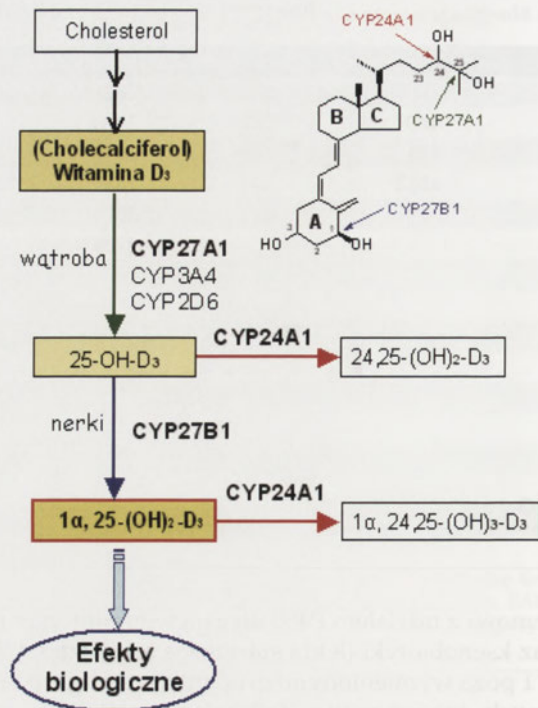


Rycina 3. Izoenzymy cytochromu P450 w szlakach metabolicznych cholesterolu (na podstawie [18]).

chodzi głównie w nerkach. W wyniku tego powstaje $1\alpha,25$ -dihydroksywitamina D₃ czyli aktywna forma witaminy D₃. Z drugiej strony izoenzym CYP24A1 katalizuje sześćoetapowy proces inaktywacji tej formy witaminy [23]. Ważne funkcje pełnią także CYP26A1 i CYP26B1, które biorą udział w przemianach pochodnej witaminy A, kwasu retinowego. Kwas retinowy uczestniczy m.in. w procesie różnicowania się komórek w trakcie rozwoju kręgowców [24]. Metabolity kwasu *trans*-retinowego to pochodne 4-hydroksy, 4-oxo i 18-hydroksy. CYP26A1 i 26B1 nie rozpoznają kwasu *cis*-retinowego, chociaż metabolity obu izomerów oddziałują z receptorami jądrowymi RAR i PXR, regulując transkrypcję wielu genów [18,25].

IZOENZYMY CYTOCHROMU P450 W METABOLIZMIE KSENOBIOTYKÓW

Ksenobiotyki to substancje obce dla organizmu, często o właściwościach lipofilowych, które ulegają przemianom metabolicznym z udziałem enzymów występujących w komórkach. Należą do nich leki, kancerogeny oraz toksyny środowiskowe, np. polichlorowane bifenyle, pestycydy, dioksyny, insektycydy. Biotransformacja ksenobiotyków w organizmie zachodzi w dwóch fazach. Do I fazy przemian zaliczane są głównie reakcje utleniania, w tym hydroksylacji, a także procesy redukcji i hydrolizy. W II fazie biotransformacji, produkty reakcji I fazy poddawane są sprzęganiu z kwasem glukuronowym i siarkowym oraz octowym, a także koniugacji z glutationem lub aminokwasami, a niekiedy także alkilacji. I-sza i II-ga faza metabolizmu ksenobiotyków zachodzi głównie w wątrobie. Powstałe w wyniku tych przemian metabolity stają się zwykle silniej polarne, a więc lepiej rozpuszczalne w wodzie, co ułatwia ich



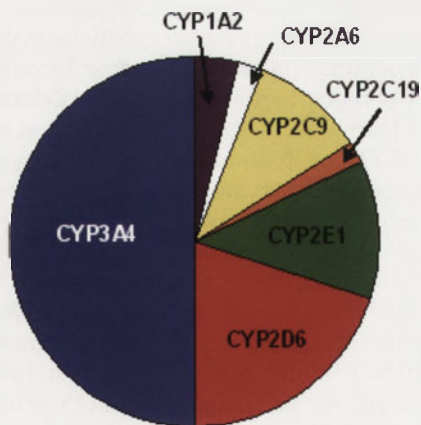
Rycina 4. Udział izoenzymów cytochromu P450 w aktywacji i deaktywacji witaminy D₃ (na podstawie [18]).

eliminację z organizmu, najczęściej poprzez nerki. Jednak reakcje biotransformacji ksenobiotyków to także przemiany prowadzące do aktywacji proleków i prokancerogenów [26]. W wyniku przemian enzymatycznych katalizowanych przez enzymy I fazy związki te ulegają przekształceniu do formy aktywnej, co pozwala im oddziaływać z celem molekularnym w komórce [27]. Na przykład związki przeciwnowotworowe z grupy mitomycyny C lub nitrofurany i nitroimidazole, a także, pochodne 1-nitroakrydyny, swoją aktywność zawdzięczają bioredukcji proleków, która zachodzi w warunkach beztlenowych jakie panują wewnątrz tkanki nowotworowej [28,29].

Spośród enzymów metabolizujących leki największy udział mają cytochromy P450, uczestnicząc w biotransformacji ok. 95% z nich. Jednak tylko kilkanaście spośród 58 izoenzymów CYP człowieka jest zaangażowanych w metabolizm leków i innych ksenobiotyków. Najważniejsze z nich to CYP1A2, członkowie rodziny CYP2 (A6, B6, C8, C9, C19, D6 i E1) oraz CYP3A4. Ten ostatni metabolizuje ok. 50% wszystkich znanych leków (Ryc. 5) [30].

CYP3A4

Izoenzym CYP3A4 jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych izoenzymów cytochromu P450 w komórkach wątroby i jelita cienkiego człowieka. Stanowi około 60% wszystkich cytochromów P450 w wątrobie i około 30% całkowitej puli białek enzymatycznych tego narządu. Aktywność CYP3A4 zaobserwowano też w płucach, żołądku i jelicie grubym. W odróżnieniu od innych cytochromów z rodziny CYP3 nie stwierdzono obecności CYP3A4 w jądrach i w tarczycy u dorosłych oraz bardzo niski poziom w wątrobie w okresie prenatalnym [15,31]. Ponadto, wykaza-

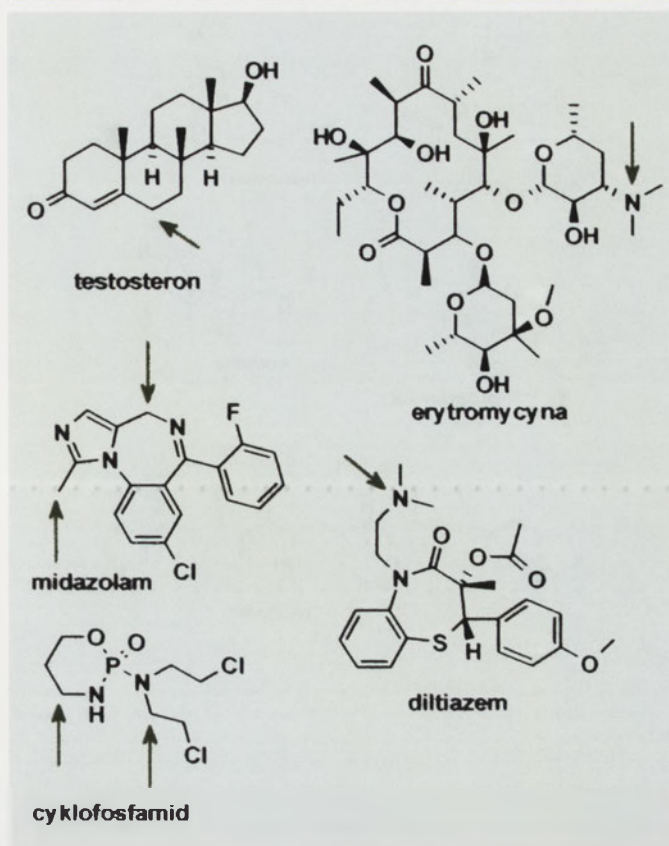


Rycina 5. Udział izoenzymów cytochromu P450 w metabolizmie leków (na podstawie [30]).

no wysoki poziom CYP3A4 w niektórych komórkach nowotworowych, ale doniesienia w tym względzie są sprzeczne [26]. Gen kodujący CYP3A4 jest zlokalizowany na chromosomie 7 (locus:7q22.1).

Za podstawową, w odniesieniu do substratów endogennych, reakcję katalizowaną przez CYP3A4 uznaje się często 6 β -hydroksylację testosteronu. Jednak znaczenie tej reakcji, jak i hydroksylacji innych steroidów, nie jest w pełni udokumentowane [15]. Zdecydowanie największa grupa substratów cytochromu 3A4 to leki posiadające w swej strukturze ugrupowania o właściwościach lipofilowych. Najbardziej znane z nich to antybiotyki (erytromycyna, cyklosporyna), leki psychotropowe (midazolam, triazolam), leki stosowane w chorobach układu krążenia (nifedipina, diltiazem), a także leki przeciwnowotworowe (cyklofosfamid, ifosfamid, etopozyd, metotreksat, imatinib, vinblastyna, taksol i tamoksyfen) [26,27,31,32]. Metabolizm większości wymienionych leków przy udziale CYP3A4 polega zwykle na hydroksylacji lub oksydacyjnej N-dealkilacji i N-dehalogenacji. Hydroksylacji ulegają głównie alifatyczne fragmenty cząsteczek leków, a także ugrupowania benzyłowe. Specyficznej reakcji 4-hydroksylacji ulegają związki przeciwnowotworowe: cyklofosfamid, ifosfamid i tamoksyfen. Natomiast przemiany polegające na N-dealkilacji zachodzą w przypadku innych leków: erytromycyny, lidokainy, diltiazemu, jak i przeciwnowotworowego tamoksyfenu (Ryc. 6) [21,33].

Wspólną cechą substratów izoenzymu CYP3A4 są łańcuchy lub pierścienie węglowodorowe o właściwościach lipofilowych oraz polarne podstawniki w postaci grup hydroksylowych i aminowych. Uważa się, iż oddziaływania hydrofobowe enzym – substrat w centrum aktywnym enzymu są siłą napędową wiązania substratu z izoenzymem CYP3A4. Reakcja ta wymaga usunięcia z miejsca aktywnego cząsteczek wody, co daje energię potrzebną do zmiany stanu spinowego kompleksu Fe(III)=O w centrum hemowym. Mechanizm reakcji tego typu został poznany w badaniach bakteryjnego cytochromu P450_{BM-3} (CYP102). W przypadku tego izoenzymu substratem są kwasy tłuszczowe przyjmujące w roztworze wodnym strukturę globularną. Podczas przemieszczania się w lipofilowym kanale prowadzącym do centrum aktywnego CYP102, kwasy tłuszczowe rozwi-



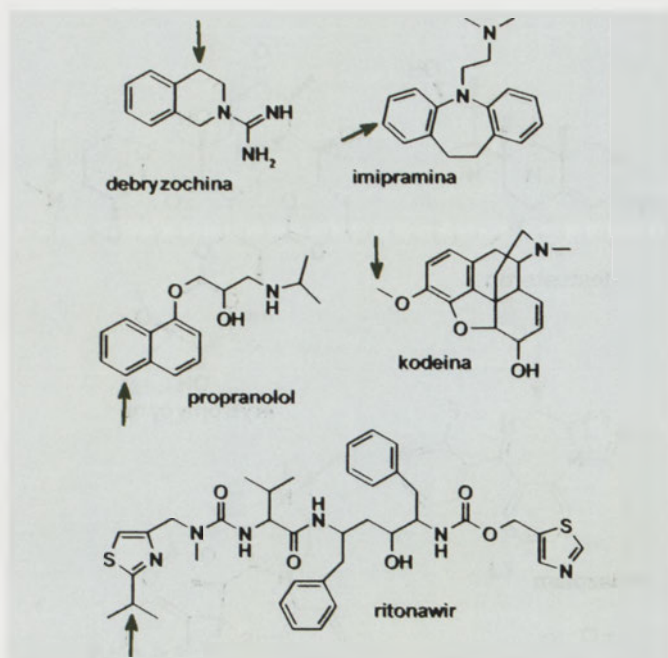
Rycina 6. Porównanie struktur chemicznych wybranych leków – substratów CYP3A4, strzałką zaznaczono miejsca w strukturze, w których zachodzi reakcja metaboliczna.

jają się i przyjmują strukturę liniową, w której lipofilowy łańcuch skierowany jest w kierunku hemu, a polarna głowa zwrócona w stronę rozpuszczalnika. Podobny mechanizm opisano dla znanego substratu CYP3A4, cyklosporyny, w której ugrupowanie podatne na monooksygenację nie jest dostępne dla enzymu w środowisku wodnym. Natomiast w środowisku hydrofobowym ugrupowanie to ulega wyeksponowaniu i wiąże się z enzymem [33].

Przytoczony powyżej mechanizm oddziaływań enzym substrat wyjaśnia szeroki zakres specyficzności CYP3A4. Wiązania oparte głównie na oddziaływaniach hydrofobowych są słabe i bez wiązań jonowych i wodorowych umożliwiają swobodny ruch substratu w centrum aktywnym. Dlatego może on przyjmować więcej niż jedną orientację w centrum aktywnym i ewentualny produkt takiej reakcji jest rezultatem oddziaływań między jedną z tych orientacji a (Fe(III)=O) [31].

CYP2D6

Gen kodujący CYP2D6 zlokalizowany jest na chromosomie 22 (locus:22q13.1) [27]. Isoenzym ten występuje głównie w komórkach wątroby, ale obserwowany jest również w płucach oraz w mózgu, gdzie u alkoholików wykazuje często podwyższoną aktywność. Charakteryzuje się osobniczo zróżnicowanym poziomem syntezy, a u części populacji nie stwierdza się aktywności CYP2D6. Może to sugerować, że nie posiada on fizjologicznie ważnych substra-



Rycina 7. Porównanie struktur chemicznych wybranych leków – substratów CYP2D6, strzałką zaznaczono miejsca w strukturze, w których zachodzi reakcja metaboliczna.

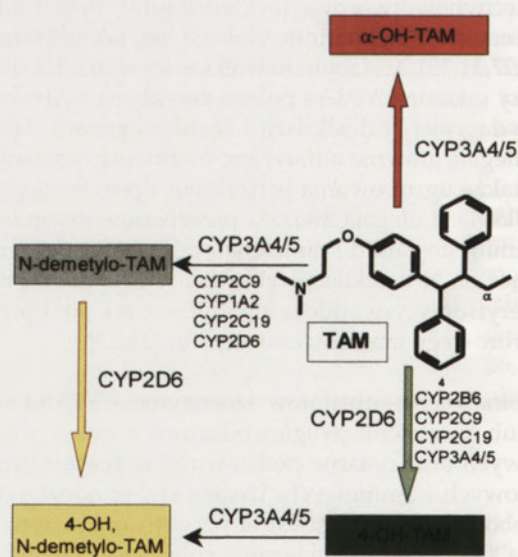
tów, chociaż wykazano, że bierze udział w metabolizmie tryptaminy [15]. Również kontrowersyjne są doniesienia o jego aktywności na różnych etapach ontogenezy człowieka. Wczesniejsze wyniki mówią o najwyższej ekspresji tego enzymu krótko po urodzeniu, podczas gdy nowsze wskazują na brak różnic w aktywności CYP2D6 podczas pierwszego roku życia [34].

CYP2D6 katalizuje transformację około 25% leków (z grupy leków antydepresyjnych, antyarytmicznych, a także inhibitorów biosyntezy serotoniny) głównie na drodze hydroksylacji i dealkilacji [35-37]. Analiza struktur substratów CYP2D6 wskazała, że większość z nich zawiera zasadowy atom azotu, (pKa > 8), który występuje w fizjologicznym pH w postaci uprotonowanej (Ryc. 7) [7,15]. Głównym typem oddziaływań odpowiedzialnym za specyficzność substratową tego izoenzymu jest oddziaływanie par jonowych pomiędzy obdarzonym dodatnim ładunkiem atomem azotu, a resztą kwasu asparaginowego (Asp301) w centrum aktywnym. Ponieważ większość substratów izoenzymu CYP2D6 posiada właściwości zasadowe, wartość pKa powinna mieć decydujący wpływ na ich reaktywność. Jednak obserwowane są również różnice w powinowactwie do enzymu, które należy przypisać oddziaływaniom hydrofobowym lub typu π - π poza centrum aktywnym. Istnieją przesłanki, że w centrum aktywnym CYP2D6, poza Asp301, ważną rolę odgrywa Glu216, która jest w odległości równej długości wiązania z substratem aminowym. Inne sugestie wskazują na rolę Asp301 polegającą na utworzeniu wiązania wodorowego z Phe120, który to reszta aminokwasowa może być zaangażowana w oddziaływania hydrofobowe z substratem. Co więcej, substratami dla CYP2D6 są również związki nie posiadające zasadowego atomu azotu, na przykład ritonawir, testosteron i inne steroidy. Hydroksylacja wymienionych substratów następuje w pierścieniu aromatycznym lub w związanym z nim krótkim łańcuchu bocznym.

Chociaż wykazano, że CYP2D6 ma niewielki udział w przemianach leków przeciwnowotworowych, to jednak znacząco wpływa on na efektywność leczenia nowotworu piersi za pomocą tamoksyfenu [27]. Wykazano, że około 90% tego leku przeciwnowotworowego jest metabolizowane przez CYP3A4/5 do nieaktywnej formy, jaką jest N-demetylotamoksyfen, a tylko około 10% ulega metabolizmowi z udziałem CYP2D6 do aktywnego przeciwnowotworowo produktu, 4-hydroksytamoksyfenu (Ryc. 8). Izoenzym CYP2D6 przekształca także nieaktywną pochodną N-demetylotamoksyfenu do 4-hydroksy-N-demetylotamoksyfenu o działaniu antyestrogennym, również terapeutycznym w stosunku do komórek nowotworu piersi. Inny szlak metabolizmu tego leku katalizuje CYP3A4/5, prowadząc do powstania α -hydroksytamoksyfenu, który jest odpowiedzialny za kancerogenne działanie uboczne.

CYP2C9 I CYP2C19

Podrodzina 2C to grupa izoenzymów cytochromu P450 wyizolowanych z komórek wątroby, jako katalizatory reakcji hydroksylacji tolbutamidu, heksobarbitalu i (S)-mefenytoliny. Izoenzymy CYP2C odpowiedzialne są za metabolizm około 15% stosowanych leków. Geny kodujące te białka zlokalizowane są na chromosomie 10 (locus:10q23-q24) [27]. Określenie specyficzności izoenzymów CYP2C8, 2C9, 2C18 i 2C19 wobec wymienionych substratów jest bardzo trudne. Najniższą aktywność w tych reakcjach wykazuje CYP2C18, a jego udział w puli białek mikrosomalnych wątroby jest najmniejszy. Również CYP2C8 wykazuje stosunkowo niską aktywność właściwą w odniesieniu do ksenobiotyków. Jednak enzym ten wyróżnia się wysoką ekspresją kodującego



Rycina 8. Udział CYP2D6 w metabolizmie leku przeciwnowotworowego tamoksyfenu, na podstawie [27]. 90% tamoksyfenu jest metabolizowane przez CYP3A4/5 do nieaktywnej formy, N-demetylotamoksyfenu, 10% ulega metabolizmowi z udziałem CYP2D6 do aktywnego produktu, 4-hydroksytamoksyfenu. Izoenzym CYP2D6 przekształca także nieaktywną pochodną N-demetylotamoksyfenu do produktu 4-hydroksy-N-demetylotamoksyfenu o działaniu antyestrogennym, również terapeutycznym w stosunku do komórek nowotworu piersi. Inny szlak metabolizmu tego leku katalizuje CYP3A4/5, prowadząc do powstania α -hydroksytamoksyfenu, który jest odpowiedzialny za kancerogenne działanie uboczne.

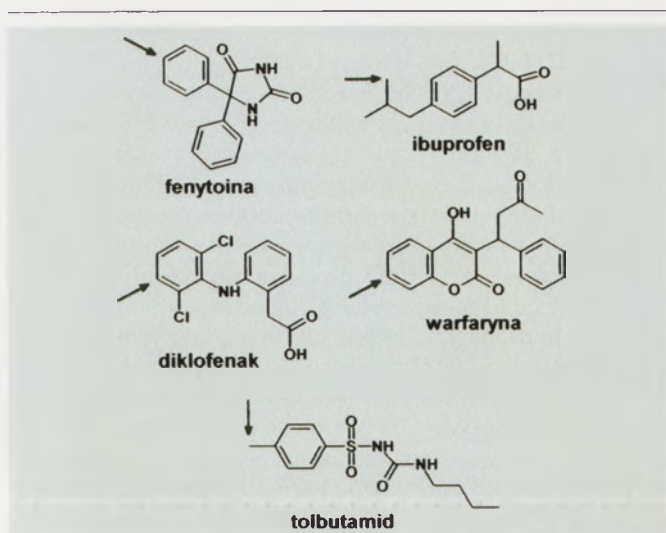
go genu w komórkach nerek. Ważnym substratem CYP2C8 jest lek przeciwnowotworowy, paklitaksel.

Największy udział w metabolizmie leków spośród podrodziny 2C ma CYP2C9. Jest izoenzymem zlokalizowanym głównie w komórkach wątroby. Podobnie jak w przypadku innych enzymów CYP2C, nie wykryto jego obecności w wątrobie u dzieci przed urodzeniem. Natomiast u noworodków następuje intensywny wzrost poziomu izoenzymu, po czym nie zmienia się on z wiekiem [15]. Jednym z pierwszych rozpoznanych substratów CYP2C9, będącym markerem jego aktywności, jest fenytoina (Ryc. 9). CYP2C9 bierze także udział w metabolizmie niesterydowych leków przeciwzapalnych (ibuprofenu, naproksenu, diklofenaku), działającej przeciwzakrzepowo warfaryny i stosowanego w leczeniu cukrzycy tolbutamidu.

Większość substratów CYP2C9 zawiera pierścień aromatyczny. Wykazują one najczęściej charakter kwasowy, co powoduje, że przyjmują w pH fizjologicznym formę zdysocjowaną. Częsteczki tych leków mają też właściwości amfipatyczne: zawierają region lipofilowy podlegający hydroksylacji i obszar hydrofilowy zlokalizowany wokół ugrupowania anionowego. Utlenianie substratu następuje w pierścieniu aromatycznym lub też w krótkim łańcuchu alkilowym [33]. Badania mechanizmu działania katalitycznego CYP2C9 wskazują, że w miejscu aktywnym część lipofilowa cząsteczki, najczęściej pierścień aromatyczny, tworzy wiązania typu $\pi - \pi$ z aminokwasami aromatycznymi, a część anionowa oddziałuje poprzez wiązania wodorowe z aminokwasami polarnymi jak arginina czy glutamina. I tak, niepolarne pierścienie aromatyczne diklofenaku oddziałują z resztami Phe114 i Phe473, ustawiając cząsteczkę w ten sposób, ażeby poprzez grupę karboksylową utworzyć wiązanie wodorowe z resztą Gln214 [38].

Drugi ważny izoenzym z rodziny 2C, CYP2C19 stanowi tylko mniej niż 5% całkowitej puli izoenzymów CYP w komórkach wątroby. Reakcją będącą markerem jego aktywności to 4'-hydroksylacja (S)-mefenytoiny. Substratami CYP2C19 są leki antydepresyjne diazepam, proguanil i imipramina oraz podobnie jak dla CYP2C9, warfaryna i tolbutamid [37]. Istnieją pośrednie przesłanki, że także omeprazol i talidomid ulegają w organizmie hydroksylacji z udziałem CYP2C19 [15]. Analiza struktur chemicznych tych leków, nie pozwala na określenie specyficznych właściwości dla substratów izoenzymu. Prawdopodobnie oddziałuje on ze związkami będącymi potencjalnymi donatorami atomu wodoru w wiązaniach wodorowych. Wydaje się, że dotyczy to zarówno związków słabo zasadowych jakim jest diazepam ($pK_a = 3,4$) jak i silnie zasadowych typu imipraminy ($pK_a = 9,5$), ale też typu kwasowego, jak warfaryna ($pK_a = 5$) [7]. Struktura centrum aktywnego CYP2C19 w obecności omeprazolu wskazuje, że zawarty w cząsteczce fragment benzimidazolu oddziałuje w specyficzny sposób z resztą His99, ale też tworzy wiązanie wodorowe z resztą Gln214. Natomiast drugi aromatyczny element struktury cząsteczki znajduje się w sąsiedztwie hydrofobowych reszt Leu363 i Phe473 [38].

Podobieństwo izoenzymów CYP2C9 i 2C19 jest na tyle duże, że możliwe było przeprowadzenie ukierunkowanej



Rycina 9. Porównanie struktur chemicznych wybranych leków – substratów CYP2C9, strzałką zaznaczono miejsca w strukturze, w których zachodzi reakcja metaboliczna.

mutagenezy, w wyniku której wymiana 6 reszt aminokwasowych w CYP2C9 doprowadziła do białka o specyficzności substratowej identycznej jak CYP2C19. I odwrotnie, CYP2C19 mógł być przekształcony w enzym katalizujący hydroksylację fenytoiny, CYP2C9, po zamianie tylko trzech reszt aminokwasowych I99H, S200P i P221T [15]. Badania struktur krystalicznych takich białek wskazują, że wymienione aminokwasy nie oddziałują bezpośrednio z substratem, ale prawdopodobnie biorą udział w upakowaniu struktury białka wokół miejsca aktywnego oraz w kanale doprowadzającym substrat do miejsca aktywnego.

Izoenzymy rodziny CYP2C, poza wspomnianą powyżej 6α -hydroksylacją paklitakselu z udziałem izoenzymu 2C8, nie pełnią kluczowej roli w metabolizmie leków przeciwnowotworowych. Jednak często kontynuują przemiany katalizowane przez CYP3A4 i 2D6. Na przykład, cyklofosamid i jego analogi oraz tamoksyfen (Ryc. 8) są w dalszych etapach metabolizmu substratami zarówno CYP2C9, jak i CYP2C19 [27,39].

CYP2E1

CYP2E1 odpowiada za transformację około 15% stosowanych leków, jednak jego główna rola polega na udziale w metabolizmie etanolu. Najwyższą aktywność tego cytochromu P450 obserwuje się w komórkach wątroby człowieka pod koniec pierwszego roku życia. Jednak występuje on też w płucach, jelicie cienkim, mózgu i trzustce. Kodowany jest przez gen zlokalizowany w chromosomie 10 (locus:10q24,3). W komórkach wątroby CYP2E1 związany jest z siateczką śródplazmatyczną. Znalezione też nietypową, jak dla *Eukariota*, lokalizację tego cytochromu w błonie mitochondrialnej komórek nowotworowych wątroby [15]. Aktywność CYP2E1 determinują różnice międzyosobnicze w danej populacji. Ale istotnie różny udział poszczególnych form polimorficznych CYP2E1 stwierdza się także pomiędzy zróżnicowanymi etnicznie populacjami ludzkimi. I tak, w azjatyckiej grupie etnicznej, w porównaniu z kaukaską, wykazano wyższy udział izoform CYP2E1 o obniżonej aktywności właściwej.

Najważniejszym czynnikiem wpływającym na wzrost ekspresji CYP2E1 jest intoksykacja organizmu etanolem. Z drugiej strony, CYP2E1 ma zdolność utleniania tego alkoholu, zwłaszcza w przypadku jego wysokich stężeń w organizmie. Wyniki badań na zwierzętach budzą jednak kontrowersje, gdyż np. myszy pozbawione genu *CYP2E1* wykazywały takie same stężenie etanolu we krwi jak zwierzęta o normalnej ekspresji tego izoenzymu. Utlenianie etanolu z udziałem CYP2E1 do aldehydu i octanu indukuje powstawanie reaktywnych metabolitów acetaldehydu i rodników hydroksyetylowych. Obecność takich produktów w komórce powoduje aktywację ksenobiotyków, które znajdują się w otoczeniu. Wykazano, że w warunkach nadmiernego spożycia etanolu CYP2E1 metabolizuje ze zwiększoną efektywnością takie związki, jak czterochlorek węgla, acetaminofen, N-nitrozodimetyloaminę, benzen oraz styren, chlorek winylu i akrylonitryl, dostarczając komórce reaktywnych, toksycznych, w tym kancerogennych, produktów. Metabolizuje też leki znieczulające z grupy chlorowanych pochodnych jak chlorzoksazon, do jego 6-hydroksylowej pochodnej, oraz halotan lub isofluran. Wykazano też, że gdy wzrasta udział CYP2E1 w puli białek retikularnych wątroby wzrasta też stężenie wolnych rodników tlenowych. Tak więc, kolejnym efektem działania enzymu jest podwyższona peroksydacja lipidów [40,41].

Substratem CYP2E1 jest 4-nitrofenol metabolizowany do 4-nitrokatecholu. Charakterystyczną cechą reakcji z udziałem tego izoenzymu u wszystkich organizmów jest konieczna dla katalizy obecność cytochromu b_5 . W centrum aktywnym, w obecności 4-nitrofenolu grupa nitrowa tworzy wiązanie wodorowe z resztą Asn202, natomiast pierścień aromatyczny układa się w sąsiedztwie lipofilowych reszt aminokwasowych Phe205, Phe293 i Ala294 umożliwiając oddziaływanie hydrofobowe i typu $\pi - \pi$. Przeciwny element cząsteczki tworzy przy udziale grupy hydroksylowej słabe wiązanie wodorowe z resztą Thr298 [38].

CYP1A1/A2

Cechą rodziny CYP1A jest rola w metabolicznej aktywacji związków kancerogennych, pomimo że pełnią też istotną rolę w metabolizmie leków. (Ryc. 5). Białka CYP1A1 i 1A2 człowieka wykazują zgodną w 70% sekwencję aminokwasów. Jednak różnią się między sobą poziomem ekspresji ich genów i dystrybucją tkankową. Gen *CYP1A2* wykazuje wyższą ekspresję niż *CYP1A1* szczególnie w hepatocytach osób dorosłych, gdzie nie wykazano ekspresji *CYP1A1*. Aktywność enzymatyczną CYP1A1 stwierdzono w wątrobie człowieka jedynie przed narodzeniem. Istotną aktywność CYP1A1 stwierdza się natomiast u dorosłych w komórkach mięszu płuc, gdzie nie stwierdzono z kolei CYP1A2 [42]. Obydwa izoenzymy CYP1A stanowią około 10 do 15% całkowitej puli izoenzymów cytochromu P450 w organizmie człowieka.

Głównymi substratami obu izoenzymów są związki o potencjalnym działaniu kancerogennym, policykliczne węglowodory aromatyczne, w tym benzo[a]piren, dla CYP1A1 i aminy heterocykliczne, nitrozoaminy i mykotosyny, z jej najlepiej poznanym przedstawicielem aflatoksyną, dla CY-

P1A2. Jak wspomniano, nie da się pominąć udziału izoform CYP1A1/A2 w metabolizmie leków. Często uczestniczą one jako izoenzymy uzupełniający w metabolizmie, gdzie kluczową rolę odgrywają CYP3A4 i podrodzina CYP2C, ale niektóre leki ulegają przemianom głównie pod wpływem CYP1A2. Do ostatniej grupy należą takryna, pochodna akrydyny ulegająca hydroksylacji w pozycji 1, 2 i 4, jak również tyzaniodyna i zolmitrypan. Ostatni ulega przemianom do pochodnej N-desmetylo- i N-tlenku. Metabolizm z udziałem CYP1A2 towarzyszy przemianom katalizowanym przez inne izoenzymy w przypadku kofeiny i większości wymienionych wcześniej leków: klozapiny, propranololu, fenacetyny, imipraminy, naproksenu i teofiliny [43]. Przy czym, N₃-demetylacja kofeiny stanowi około 80% całkowitego metabolizmu tego związku u człowieka. Wspólną cechą struktur substratów CYP1A1 i 1A2 jest płaski układ policykliczny, przy czym substraty CYP1A2 częściej zawierają pierścienie heterocykliczne. Substraty będące lekami mogą zawierać też heteroatom tlenu. Atom tlenu występuje również w tych cząsteczkach w strukturze grupy karbonylowej.

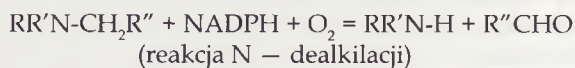
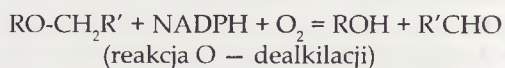
REAKCJE KATALIZOWANE PRZEZ IZOENZYMY CYTOCHROMÓW P450

Opisana różnorodność związków chemicznych, które mogą być substratami cytochromów P450 idzie w parze z różnorodnością reakcji chemicznych katalizowanych przez te enzymy. W tabeli 2 reakcje te zostały sklasyfikowane ze względu na ich charakter chemiczny, z podaniem wybranych substratów i produktów oraz izoenzymów biorących udział.

REAKCJE UTLENIANIA

Reakcja **hydroksylacji** atomu węgla, polega na rozerwaniu wiązania węgiel-wodór i przyłączeniu atomu tlenu. Elektrofilowy element struktury Fe(III)=O w hemie jest wystarczająco reaktywny, żeby przyłączyć atom tlenu do niespolaryzowanego wiązania C-H [44,45]. Reakcje hydroksylacji to najczęściej występujący typ przemian katalizowanych przez cytochromy P450, zarówno wśród związków endo- jak i egzogennych [46].

Efekt reakcji **oksydacyjnej dealkilacji** obserwujemy wówczas, gdy reakcja hydroksylacji zachodzi w pozycji α do heteroatomów np. atomu tlenu w eterach, azotu w aminach i amidach czy siarki w tioeterach. Następuje po tym hydrolityczny rozpad wiązania prowadzący odpowiednio do O-, N- i S – dealkilacji przedstawionych poniżej:



Tego typu reakcje zachodzą w trakcie bioaktywacji i detoksykacji ksenobiotyków. Przykładem reakcji N-dealkilacji jest metabolizm imipraminy [47].

Niektóre izoenzymy cytochromu P450 są również zdolne do katalizowania reakcji **monooksygenacji heteroatomów**.

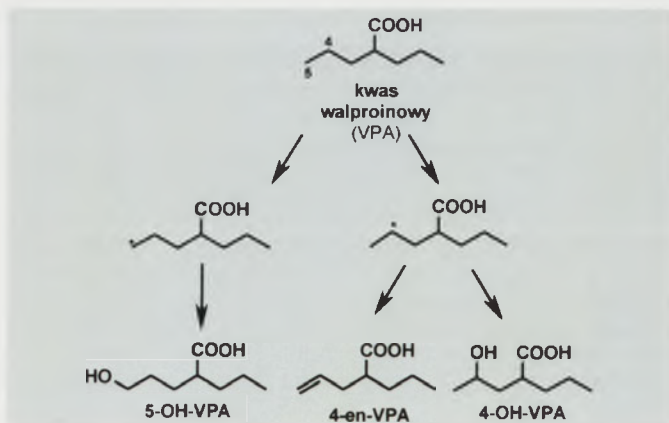
Tabela 2. Typy reakcji chemicznych katalizowanych przez izoenzymy cytochromu P450 oraz wybrane substraty i produkty.

Typ reakcji	Substrat	Produkty	Katalizuje CYP	Piśmien- nictwo
Hydroksylacja	testosteron	1 β -OH, 2 α / β -OH, 6 β -OH, 15 β -OH, 16 β -OH	2C9, 2C19, 3A4	18,46
	cholekalcyferol (wit. D3)	25-OH, 1 α -OH, 1 α ,25-di-OH, 24,25-di-OH	27A1, 27B1, 24A1	24
	kwas retinowy, (wit.A)	4-OH, 18-OH	26A1, 26B1	18
	paracetamol	3-OH	2E1, 1A2, 3A4	37
	imipramina	2-OH	2D6	47
	kwas 2-propylowalerianowy, (VPA) (walproinowy)	4-OH-VPA 5-OH-VPA	2C9,2B6,2A6 2C9,2B6,2A6	44,55,56 44,55,56
	Dealkilacja	imipramina	N-demetyloimipramina, (desipramina	1A2, 3A4
kofeina		N3-demetylo-kofeina (paraksantyna)	1A2	48,56
		N1-demetylo-kofeina (teobromina)	2E1	48,56
		N7-demetylo-kofeina (teofilina)	2E1	48,56
Monooksygenacja heteroatomów	naproksen	O-demetylo-naproksen	2C9	49
	2-amino-3,8-dimetyloimidazo(4,5-f)chinolina, (MeIQx)	2-NHOH-MeIQx	1A1, 1A2	50
	2-amino-1-metyl-6-fenyl- imidazo(4,5-f)pirydyna, (PhIP)	2-NHOH-PhIP	1A1.1A2	50
	promazyna, chloropromazyna	(S)=O-promazyna (S)=O-chloropromazyna	2D6 2D6	51 51
Epoksydacja	benzen	1,2-epoksybenzen	1A1	52
	benzo[a]piren	7,8-dihydroksydiol-,9,10-epoksy- benzo[a]piren	1A1, 3A4	42,52
	aflatoksyna chlorek winylu	2,3-epoksy aflatoksyna 2-chlooacetaldehyd	1A2, 3A4 2E1	42, 50 56
Peroksydacja	fenol	eter benzylofenylowy, dihydroksybifenyl	P450	44
Utlenianie aldehydów (deformylacja)	aldehyd, R ₁ CH ₂ CR ₂ R ₃ CHO	alken, R ₁ CH=CR ₂ R ₃ + HCOOH	P450	44
Dehydrogenacja związków alifatycznych	N-metyloformamid	izocyjanian metylu	2E1	5,44
	kwas 2-propylowalerianowy, (VPA) (walproinowy)	4-diene VPA	2C9	44,53,54
Udział w redukcji	CCl ₄	CCl ₃ · → COCl ₂ (fosgen)	2E1	44
	ArNO ₂	ArNO, ArNHOH, ArNH ₂	P450	29
	N-tlenek tamoksyfenu	tamoksyfen		27
Izomeryzacja	prostaglandyna H ₂ , (PGH ₂)	prostacyklina, PGI ₂	8A1 (syntaza prostacyklinowa)	44
	prostaglandyna H ₂ , (PGH ₂)	tromboksan, TXA ₂	5A1 (syntaza tromboksanowa)	44
	tamoksyfen tamoksyfen	(cis)4-OH-tamoksyfen (trans)4-OH-tamoksyfen	2D6 2D6	27 27
Dimeryzacja	S-tlenek tiklopidyny	dimer S-tlenku tiklopidyny	2C19	1,3
	S-tlenek 2-fenylotiofenu	dimer S-tlenku 2-fenylotiofenu	2C19	1,3
	flawolina	dimer flawoliny	158A2	1
Cyklizacja	esterpirydyny	lakton estrupirydyny	P450	1
	biosynteza	morfina, kodeina	P450	44
	biosynteza	wankomycyna	165B2, 165C1	1
	9-amino-1-nitroakrydyna (nitracrine ^R)	1,9-diazano-1,10-dihydroakrydyna	2C19, 3A4	59,60

W przypadku atomu azotu jest to przede wszystkim reakcja hydroksylacji wiązania N-H w I- i II-rzędowych aminach oraz amidach. Początkowo powstają N-hydroksyloaminy, a następnie, w przypadku amin I-rzędowych, N-hydroksyloaminy, które metabolizowane są dalej do nitrozopochodnych. Oba produkty są bardzo reaktywne i często metabolizm ten stanowi proces aktywacji związków kancerogennych [50] oraz leków [18]. W tabeli 2 podano jako przykład metabolizm heterocyklicznych amin aromatycznych, MeIQ i PhIP, powstających podczas smażenia mięsa i ryb. Natomiast III-rzędowe aminy metabolizowane są do N-tlenków, ale nie jest to reakcja typowa dla izoenzymów P450, częściej

niż cytochromy reakcję tą katalizują monooksygenazy flawinowe, [45]. Enzymy P450 biorą też udział w utlenianiu tioeterów, w wyniku czego powstają sulfotlenki [51].

W reakcjach **epoksydacji** katalizowanych głównie przez CYP1A2 powstają epoksydy, których reaktywność odpowiedzialna jest za właściwości toksyczne metabolitów. Wykazano, że metabolity te wiążą się kowalencyjnie z makrocząsteczkami obecnymi w komórce tj. DNA, RNA lub białkami. Reakcje epoksydów z DNA są bezpośrednią przyczyną kancerogennych właściwości wielu związków [42,52]; niektóre z nich wymieniono w tabeli 2. Szlak two-



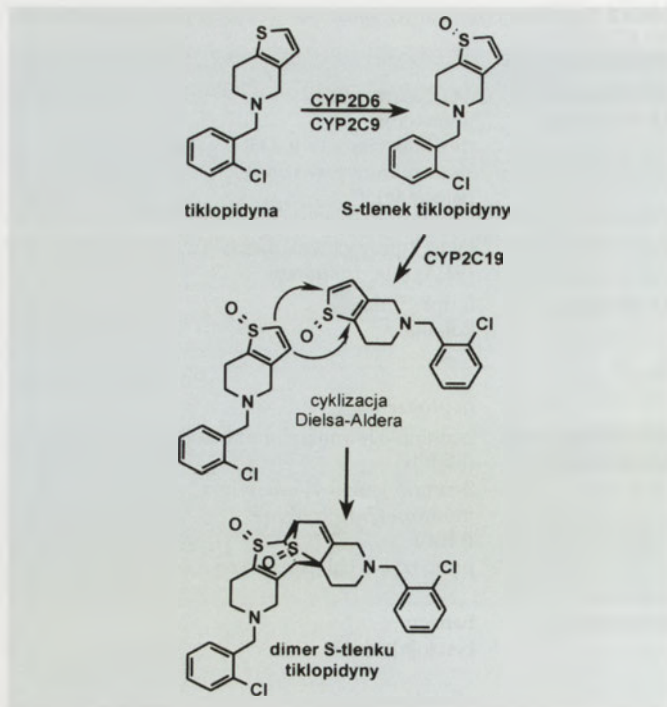
Rycina 10. Metabolizm kwasów walproinowych zachodzący z udziałem CYP2C9, CYP2B6 i CYP2A6. Obecność formy rodnikowej produktu pośredniego powoduje, że produkty hydroksylacji i dehydrogenacji powstają jednocześnie (na podstawie [55,56]).

zenia epoksydów benzo[a]pirenu został bardzo dobrze zbadany, łącznie ze stereochemicznymi aspektami tej reakcji [52]. Ugrupowanie epoksydowe w pozycjach 9,10 jest odpowiedzialne za kowalencyjne wiązanie metabolitu benzo[a]pirenu do DNA i reakcja ta uważana jest za główny mechanizm odpowiedzialny za działanie rakotwórcze benzo[a]pirenu. Natomiast badania reakcji biosyntezy polifenoli ujawniły, że izoenzymy CYP mogą też niekiedy wykazywać aktywność zbliżoną do **peroksydaz** [44]. Katalizowane są wówczas reakcje utleniania fenoli z utworzeniem międzycząsteczkowych wiązań C-C lub C-O. Oksydacyjna dimeryzacja fenoli w przypadku typowych peroksydaz zachodzi poza hemowym centrum aktywnym, podczas gdy w przypadku izoenzymów CYP w centrum aktywnym. Mimo, że w opisanych reakcjach izoenzymy cytochromu P450 zachowują się jak enzymy podobne do peroksydaz, to używają do utlenienia substratu cząsteczkę O_2 i $NAD(P)H$, a nie H_2O_2 , jak peroksydazy [53].

Kilka izoenzymów cytochromu P450 zaangażowanych jest w reakcje **oksydacyjnej deformylacji** z utworzeniem podwójnego wiązania przyległego do atomu węgla związanego z grupą CHO. Reakcja ta zachodzi na przykład w jednym z etapów biosyntezy cholesterolu i estronu [54]. Podobnie jak w reakcjach deformylacji, cytochromy P450 katalizują powstawanie podwójnych wiązań w reakcji **dehydrogenacji związków alifatycznych**. Reakcja dotyczy także grupy leków zwanych walproinami, które stosowane są w leczeniu padaczki. W wyniku metabolizmu kwasu walproinowego (VPA) powstają nie tylko produkty hydroksylacji, ale także metabolit zawierający wiązanie podwójne (Ryc. 10). Wykazano, że oba typy reakcji zachodzą jednocześnie [55,56].

ROLA CYP W PROCESACH REDUKCJI

Sugerowany przez niektórych autorów udział izoenzymów CYP w reakcjach redukcji jest zwykle kwestionowany. Prawdą jest bowiem, iż obecna w kompleksach monooksygenaz retikularnych reduktaza $NADPH:cyt.P450$ (CPR) może, w warunkach niskiej prężności tlenu w komórce,



Rycina 11. Udział cytochromów P450 w metabolizmie utleniającym tiklopidyny, prowadzącym do dimeryzacji (na podstawie [1,3]). Ten sam typ reakcji zachodzi w maku lekarskim, w kluczowym etapie biosyntezy alkaloidów (kodeiny i morfiny) oraz u promieniowców *Streptomyces orientalis* podczas syntezy wankomycyny.

jakie spotykamy np. w tkance nowotworowej, przenosić równoważniki redukcyjne z $NADPH$ na niektóre substraty. Wydaje się jednak, że w reakcji tej nie uczestniczą, w pełnym tego słowa znaczeniu, izoenzymy CYP związane z wymienioną reduktazą. Rola CYP ogranicza się tu prawdopodobnie do stabilizacji poddawanego redukcji substratu, który może oddziaływać z $Fe(II)$ układu hemowego w strukturze CYP. Ta nietrwała w warunkach normalnej podaży tlenu forma CYP jest przejściowo stabilizowana w warunkach niedoboru O_2 . Elektron, który uprzednio zredukował $Fe(III)$ układu hemowego może być niejako biernie przejęty przez podatny na redukcję substrat. Mechanizm ten nie ma charakteru dynamicznej aktywności katalitycznej, niemniej wyniki badań metabolizmu redukcyjnego np. mitomycyny wskazują, że szybkość tej transformacji z udziałem CPR, bez obecności cytochromu P450 jest niższa niż wobec kompletnego systemu monooksygenazy, CPR i cytochromu P450 [57].

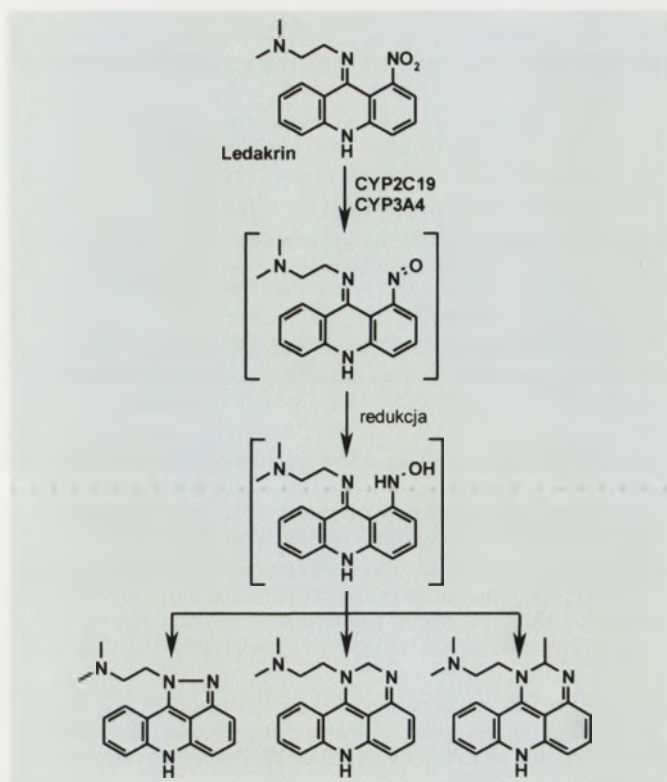
Cytochromy P450 biorą udział w opisany powyżej sposób w reakcjach redukcji pochodnych polihalogenowych, aromatycznych i alifatycznych związków nitrowych, związków azowych oraz trzyczłonowych amin i N-tlenków. Specyficznym przykładem reakcji redukcji katalizowanych przez CPR przy niejako biernym współudziale izoenzymów CYP jest redukcja aromatycznych związków nitrowych. [29,58]. Wszystkie produkty pośrednie powstające podczas tej reakcji są reaktywne i mogą podobnie jak epoksydy oddziaływać z DNA, RNA lub białkami, indukując efekty toksyczne, w tym kancerogenne. Szczególną rolę odgrywa anionorodnik nitrowy, RNO_2^- rodnik nitroksydowy, RNO^{\cdot} i kationorodnik aminowy, $RNH_2^{+\cdot}$.

W Tabeli 2 wymieniono kilka innych, poza opisanymi powyżej, typów reakcji metabolicznych katalizowanych przez cytochromy P450. W warunkach fizjologicznych izoenzymy CYP8A1 i 5A1 katalizują **izomeryzację** prostaglandyny H2 do prostacykliny i tromboksanu [18]. Proces ten ma także charakter oksydacyjny, gdyż dochodzi tu do transoksydacji wewnątrzcząsteczkowej z udziałem atomu tlenu obecnego w strukturze substratu. Podobny charakter ma izomeryzacja zachodząca po hydroksylacji tamoksyfenu [27]. Na uwagę zasługuje także oksydacyjna w swym charakterze **dimeryzacja**, będąca skutkiem peroksydacji fenoli. Inny mechanizm dimeryzacji pokazano na Ryc. 11. CYP2D6 i 2C9 katalizują metabolizm tiklopidyny, leku hamującego agregację płytek krwi, do jej S-tlenku. Następnie CYP2C19 uczestniczy w reakcji dimeryzacji cząsteczki [1,3]. Ten sam typ reakcji zachodzi w maku lekarskim, w kluczowym etapie biosyntezy alkaloidów (kodeiny i morfiny) oraz u promieniowców *Streptomyces orientalis* podczas syntezy antybiotyku, wankomycyny. Natomiast metabolizm flawoliny do jej dimeru katalizowany jest przez izoenzym CYP158A2 występujący u *Streptomyces coelicolor* [1].

Podobnie jak w przypadku dimeryzacji, reakcje **cyklizacji** katalizowane przez cytochromy P450 mają również mechanizm oksydacyjny. Po uprzedniej monooksygenacji, w drugim etapie dochodzi do oddziaływania zaktywowanego w ten sposób podstawnika z innym reaktywnym elementem struktury. Tak powstaje np. pierścień laktonu gdy w pozycji *orto* znajdują się grupa metylowa, zaktywowana przez CYP do hydroksymetylenowej, tworząca z grupą karboksylową wewnętrzną wiązaną estrową [1]. Powstawanie produktu cyklizacji wykazaliśmy też w naszym laboratorium badając metaboliczne przemiany przeciwnowotworowych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny. Wobec mieszaniny enzymów retikularnych oraz wobec rekombinantowych izoenzymów CYP2C19 i CYP3A4 człowieka syntetyzowanych razem z reduktazą, jak i w obecności rekombinantowej reduktazy P450, powstawały produkty z dodatkowym pierścieniem dihydropirazolowym i dihydropirymidynowym (Ryc. 12) [59,60]. Przy czym nie obserwowano takich metabolitów w warunkach anaerobowych.

PODSUMOWANIE

Cytochromy P450 to enzymy rozpowszechnione w świecie ożywionym. Zdolność atomu żelaza, znajdującego się w centrum katalitycznym izoenzymów cytochromu P450, do przyjmowania różnych stanów utlenienia oraz bogactwo struktur białkowych CYP to podstawy molekularne, które decydują o różnorodności właściwości katalitycznych tej grupy enzymów. Jednocześnie zróżnicowanie właściwości fizykochemicznych poszczególnych izoenzymów nie jest duże i określenie ich specyficzności możliwe było dopiero po zastosowaniu białek rekombinantowych. Można uogólnić, że wspólną cechą wszystkich cytochromów jest powinowactwo do niskocząsteczkowych substratów o właściwościach, chociaż po części, lipofilowych. Dlatego, będąc naturalnym katalizatorem biosyntezy i metabolizmu endogennych związków o charakterze lipidowym, przejęły na drodze ewolucji funkcje biotransformacji wielu substancji



Rycina 12. Produkty metabolicznej cyklizacji leku przeciwnowotworowego, Nitracrine®, powstające w wyniku reakcji katalizowanej przez enzymy retikularne oraz kancerogenne izoenzymy CYP2C19, CYP3A4 i CPR (na podstawie [59,60]).

obcych zawierających ugrupowania lipofilowe. Substancje takie nie są zwykle metabolizowane przez inne enzymy, które w większości posiadają hydrofilowe centra aktywne. Tak więc, metabolizm ksenobiotyków przez cytochromy P450 można uznać za element zdolności obronnych organizmów żywych. W sytuacji, gdy trudno uniknąć toksycznego działania związków chemicznych podjęta zostaje próba zmiany ich właściwości w kierunku pochodnych bardziej polarnych, które będą z organizmu eliminowane i nie będą tam magazynowane. Wobec takiej funkcji rozwiązaniem najbardziej optymalnym wydaje się wielka różnorodność enzymów CYP, gdyż wówczas organizm jest najlepiej „przygotowany” na odpowiedź metaboliczną konieczną w obecności nowej substancji toksycznej. Wiadomo też, że obecność substancji obcej może dodatkowo indukować syntezę cytochromów P450, poszerzając możliwości metabolizmu. Można więc podsumować: „...w tej różnorodności jest metoda...”.

PIŚMIENNICTWO

1. Isin EM, Guengerich FP (2007) Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1770: 314-329
2. Wong L-L (1998) Cytochrome P450 monooxygenases. *Curr Opin Chem Biol* 2: 263-268
3. Lamb DC, Waterman MR, Kelly SL, Guengerich FP (2007) Cytochromes P450 and drug discovery. *Curr Opin Biotechnol* 18: 504-512
4. Lewis DF (2000) On the recognition of mammalian microsomal cytochrome P450 substrates and their characteristics. *Biochem Pharmacol* 60: 293-306
5. Bernhard R (2007) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol* 124: 128-145

6. <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>
7. Smith DA, Acland MJ, Jones BC (1997) Properties of cytochrome P-450 and their substrates. Part 1: Active site characteristics. *Drug Discovery Today* 10: 406-414
8. Gerber NC, Sligar SG (1992) Catalytic mechanism of cytochrome P450: evidence for distal charge relay. *J Am Chem Soc* 114: 8742-8743
9. Murataliev MB, Feyereisen R, Wlaker FA (2004) Electron transfer by diflavin reductases. *Biochim Biophys Acta* 1698: 1-26
10. Reed JR, Holenberg PF (2003) Examining the mechanism of stimulation of cytochrome P450 by cytochrome b_5 : the effect of cytochrome b_5 on the interaction between cytochrome P450 2B4 and P450 reductase. *J Inorg Biochem* 97: 265-275
11. Zhang H, Hamdane D, Sang-Choul I, Waskell L (2008) Cytochrome b_5 inhibits electron transfer from NADPH-Cytochrome P450 Reductase to ferric cytochrome P450 2B4. *J Biol Chem* 283: 5217-5225
12. Distlerath LM, Reily PEB, Martin MV, Davis GG, Wilkinson GR, Guengerich FP (1985) Purification and characterization of the human liver cytochromes P-450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin O-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem* 260: 9057-9067
13. Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T, Waxman DJ (1986) Characterisation of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem* 261: 5051-5060
14. Shimada T, Yun CH, Yamazaki H, Gautier JC, Beaune PH, Guengerich FP (1992) Characterisation of human lung microsomal cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens. *Mol Pharmacol* 41: 856-854
15. Guengerich FP (2005) Human cytochrome P450 enzymes. W: Ortiz de Montellano PR (red) *Cytochrome P450: Structure mechanism and biochemistry*, ed by, Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, str. 377-530
16. Karlgren M, Miura S, Igelman-Sundberg M (2005) Novel extrahepatic cytochrome P450s. *Toxicol Appl Pharmacol* 207: 57-61
17. Ekins S, Ring BJ, Grace J (2000) Present and future in vitro approaches for drug metabolism. *J Pharmacol Toxicol Methods* 44: 313-324
18. Nebert D, Russel DW (2002) Clinical importance of cytochrome P450. *Lancet* 360: 1155-1162
19. Russell DW (2000) Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1529: 126-135
20. Ohyama Y, Meaney S, Heverin M, Ekström L, Brafman A, Shafir M, Andersson U, Olin M, Eggertsen G, Diczfalusy U, Feinstein E, Björkhem I (2006) Studies on the Transcriptional Regulation of Cholesterol24-Hydroxylase (CYP46A1): Marked insensitivity toward different regulatory axes. *J Biol Chem* 281: 3810-3820
21. Johnson EF (2005) Structural diversity of human xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 331-336
22. Sakaki T, Inouye K (2000) Practical Application of Mammalian Cytochrome P450. *J Biosci Bioeng* 90: 583-590
23. Conlan R, Sherman E (2003) Unraveling the Enigma of Vitamin D, Beyond Discovery Series, The Path from Research to Human Benefit, a project of the National Academy of Sciences
24. Ray WJ, Bain G, Yao M, Gottlieb DI (1997) CYP26, a novel mammalian Cytochrome P450, is induced by Retinoic Acid and defines a new family. *J Biol Chem* 272: 18702-18708
25. Osanai M, Petkovich M (2005) Expression of the Retinoic Acid-Metabolizing Enzyme CYP26A1 Limits Programmed Cell Death. *Mol Pharmacol* 67: 1808-1817
26. McFadyen MCE, Melvin WT, Murray, GI (2004) Cytochrome P450 enzyme: Novel options for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 3: 363-371
27. Mathijssen RHJ, Schaik RHN (2006) Genotyping and fenotyping cytochrome P450: perspectives for cancer treatment. *Eur J Cancer* 42: 141-148
28. Morag CE, McFayden MCE, Melvin, WT, Murray GI (2004) Cytochrome P450 enzyme: Novel options for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 3: 363-371
29. Rauth AM, Melo T, Misra V (1998) Bioreductive therapies: an overview of drugs and their mechanism of action. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42: 755-762
30. Purnapatre K, Khattar S, Saini KS (2008) Cytochrome P450 in the development of target based anticancer drugs. *Cancer Lett* 259: 1-15
31. De Wildt SN, Kearns GL, Leeder JL, van der Anker JN (1999) Cytochrome P450 3A. *Clin Pharmacokinet* 37: 485-505
32. Omieciński CJ, Rimmel R, Hosagrahara VP (1999) Concise review of the cytochrome P450s and their role in toxicology. *Toxicol Sci* 48: 151-156
33. Spatzenegger M, Jaeger W (1995) Clinical Importance of Hepatic Cytochrome P450 in Drug Metabolism. *Drug Metab Rev* 27: 397-417
34. Blake MJ, Gaedigk A, Pearce RE, Bomgaars LR, Christensen ML, Stowe C, James LP, Wilson JT, Kearns GL, Leeder JS (2007) Ontogeny of Dextromethorphan O-N-demethylation in the first year of life. *Clin Pharmacol Ther* 81: 510-516
35. Frank D, Jachde U, Fuhr U (2007) Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol* 63: 321-333
36. Rendic S (2002) Summary information on human CYP enzymes: Human P450 metabolism. *Drug Metab Rev* 34: 83-448
37. Guengerich FP (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J* 8: E101-E111
38. Lewis DFV (2003) Essential requirements for substrate binding affinity and selectivity toward human CYP2 family enzymes. *Arch Biochem Biophys* 409: 32-44
39. Deeken JF, Figg WD, Bates SE, Sparreboom A (2007) Toward individualized treatment: prediction of anticancer drug disposition and toxicity with pharmacogenetics. *Anti-Cancer Drugs* 18: 111-126
40. Caro AA, Cederbaum AI (2004) Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 27-42
41. Dey A, Dhawan A, Seth PK, Parmar D (2005) Evidence for cytochrome P450 2E1 catalytic activity and expression in rat blood lymphocytes. *Life Sciences* 77: 1082-1093
42. Guengerich FP (2000) Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 21: 345-351
43. Faber MS, Jetter A, Fuhr U (2005) Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97: 125-134
44. Guengerich FP (2000) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 14: 611-650
45. Guengerich FP, Vaz ADN, Raner GN, Pernecky SJ, Coon J (1997) Evidence for a role of a perferryl-oxygen complex, FeO^{3+} , in the N-oxygenation of amines by cytochrome P450 enzymes. *Mol Pharmacol* 51: 147-151
46. Choi MH, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (2005) Characterization of testosterone 11, β hydroxylation catalyzed by human liver microsomal cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* 33: 714-718
47. Richelson E (1997) Pharmacokinetic drug interactions of new antidepressants: a review of the effects on the metabolism of other drugs. *Mayo Clin Proc* 72: 835-847
48. Tassaneeyakul W, Birkett DJ, McManus ME, Tassaneeyakul W, Veronese ME, Andersson T, Tukey RH, Miners JO (1994) Caffeine metabolism by human hepatic cytochromes P450: contributions of 1A2, 2E1 and 3A isoforms. *Biochem Pharmacol* 47: 1767-1776
49. Zhong DF (2003) Microbial transformation of naproxen by *Cunninghamella* species. *Acta Pharmacol Sin* 24: 442-447
50. Mazerska Z (2006) Metabolism of chemical carcinogens, W: Baer-Dubowska W, Bartoszek A, Malejka-Giganti D (red.) *Carcinogenic and anticarcinogenic food components*. CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, str. 37-68

51. Wójcikowski J, Pichard-Garcia L, Maurel P, Daniel WA (2003) Contribution of human cytochrome P-450 isoforms to the metabolism of the simplest phenothiazine neuroleptic promazine. *Br J Pharmacol* 138: 1465-1474
52. Alexandrov K, Rojas M, Rolando C (2006) DNA damage by Benzo(a)pyrene in human cells is increased by cigarette smoke and decreased by a filter containing rosemary extract, which lowers free radicals. *Cancer Res* 66: 11938-11945
53. Wood PM (1992) A comparison of peroxidase and cytochrome P450. *Biochem Soc Transact* 20: 349-352
54. Roberts ES, Vaz ADN, Coon MJ (1991) Catalysis by cytochrome P450 of an oxidative reaction in xenobiotic aldehyde metabolism: with olefin formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8963-8966
55. Rettie AE, Rettenmeier AW, Howald WN, Bailie TA (1987) Cytochrome P450 catalyzed formation δ^+ - VPA, a toxic metabolite of valproic acid. *Science* 235: 890-893
56. Brown CM, Reisfeld B, Mayeno AN (2008) Cytochromes P450: A structure - based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug Metab Rev* 40: 1-100
57. Vs RM, Van de Straat, Groeneveld M, Vermeulen NPE (1990) One-electron reduction of mitomycin c by rat liver: Role of cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Xenobiotica* 20: 967-978
58. Hewitt NJ (2007) Primary hepatocytes; current understanding of the regulation of metabolic enzymes transporter proteins and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 39: 159-234
59. Gorlewska K, Mazerska Z, Sowiński, Konopa J (2001) Products of metabolic activation of the antitumor drug Ledakrin (Nitracrine) in vitro. *Chem Res Toxicol* 14: 1-10
60. Wiśniewska A, Koprowska J, Niemira M, Augustin E, Konopa J, Mazerska Z (2008) Metabolism of antitumor 9-amino-1-nitroacridine derivative, C-1748 (Capridine-beta), in HepG2 tumor cells, Abstracts of 10th ISSX European Meeting, Vienna, May18-21, *Drug Metab Rev* 40 Suppl.1:186

Cytochrome P450 isoenzymes in metabolism of endo- and exogenic compounds

Anita Wiśniewska, Zofia Mazerska[✉]

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

[✉]e-mail: mazerska@chem.pg.gda.pl

Key words: cytochrome-P450, CYP isoenzymes, drug metabolism, monooxygenation, xenobiotic metabolism

ABSTRACT

Cytochrome P450 enzymes (CYPs) belong to hemeproteins found in all living organisms. In eucaryotic cells they are responsible for biosynthesis and transformations of endogenous lipids as well as for the metabolism of xenobiotics, including therapeutic agents. C-Oxidation (hydroxylation, epoxydation, peroxydation), N-oxidation and S-oxidation as well as oxidative O-, S-, and N-dealkylation of substrates are catalysed by CYPs. These monooxygenation reactions sometimes result in dimerisation, isomerisation or cyclisation of the substrate. Human cytochrome P450 isoenzymes are described by 57 genes and products of their expression are different in specificity. For instance CYP51A1 is crucial for sterol biosynthesis, whereas CYP7A1, 7B1 and 39A1 take part in synthesis of bile acids and CYP46A1 in metabolism of cholesterol. Therapeutic agents are metabolised mainly by CYP3A4, 2D6, 2C9 and 2C19. In addition, CYP2E1 takes part in metabolism of ethyl alcohol and CYP1A1/2 in activation of carcinogens. Metabolism of xenobiotics seems to be the defence mechanism against toxic effects of strange chemicals, whereas, it is also the way of drug activation and detoxication.

Anita Wiśniewska

Karolina Jagiełło

Zofia Mazerska

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

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

Artykuł otrzymano 25 stycznia 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 8 maja 2009 r.

Słowa kluczowe: cytochrom P450, metaboliczna redukcja, metabolizm leków, reduktaza NADPH:cytochrom P450

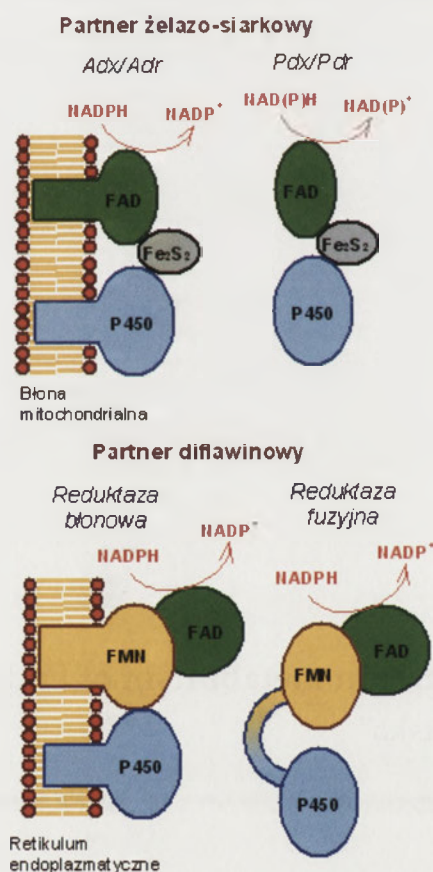
Wykaz skrótów: CPR, reduktaza NADPH:cytochrom P450; CYP, izoenzymy cytochromu P450, FAD, dinukleotyd flawinoadeninowy; FMN, mononukleotyd flawinoadeninowy; NADPH, fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego; TPZ, tirapazamina

STRESZCZENIE

Reduktaza NADPH:cytochrom P450 (CPR) zlokalizowana w siateczce śródplazmatycznej większości komórek eukariotycznych jest przedstawicielem rodziny reduktaz diflawinowych. Białko CPR składa się z trzech domen. Jedna z nich, na C-końcu, wiąże cząsteczkę FAD i NADPH, druga, na N-końcu, cząsteczkę FMN, trzecia jest domeną regulacyjną. Enzym ten posiada zdolność jednoczesnego przyjmowania dwóch równoważników jonu hydronowego z NADPH i przenoszenia ich pojedynczo na hemową grupę prostetyczną izoform cytochromu P450. Cykl katalityczny enzymu przebiega z udziałem kompleksu przejściowego (FMNH-FADH) poprzez znaczne zmiany konformacyjne indukowane związaniem NADPH w centrum aktywnym enzymu. Wykazano, że u myszy reduktaza CPR jest konieczna dla aktywności izoform cytochromu P450, ale kompleks tych białek nie jest niezbędny dla życia zwierząt. Poza udziałem w aktywności izoform cytochromu P450, CPR uczestniczy też w transporcie elektronów na inne fizjologiczne akceptory, m.in. cytochrom *b₅*, oksygenazę hemową oraz monoooksygenazę skwalenu i reduktazę 7-dehydrocholesterolu. Poza tym CPR pełni również funkcję samodzielnego katalizatora metabolizmu redukcyjnego proleków, w szczególności leków przeciwnowotworowych.

WPROWADZENIE

W reakcjach katalizowanych przez izoenzymy cytochromu P450 (CYP) etapem niezbędnym jest dostarczenie elektronów ze zredukowanej formy fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH), poprzez partnerów procesów oksydo-redukcyjnych, na odpowiedni substrat. W procesie tym bierze udział dwóch partnerów różniących się w zależności od lokalizacji cytochromu P450 w komórce (Ryc. 1). Mitochondrialne CYP wykorzystują zawierającą dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD) reduktazę adrenodoksyny (Adr) oraz współpracującą z przenośnikami żelazo-siarkowymi adrenodoksynę (Adx). Podobny, chociaż nie umiejscowiony w błonie, jest system występujący u Prokaryota (reduktaza putidoredoksyny (Pdr) i putidaredoksyna (Pdx)). Drugi typ partnerów cytochromów P450 znajduje się w białkach błonowych siateczki śródplazmatycznej u Eukaryota oraz w białkach transportujących elektrony na cytochromy BM3 u bakterii i grzybów. Są to reduktazy zawierające dwa układy flawinowe: FAD i mononukleotyd flawinoadeninowy (FMN) (Ryc. 1). Różnica pomiędzy nimi polega na tym, że w siateczce śródplazmatycznej reduktaza i cytochrom są niezależnymi białkami, a u bakte-



Rycina 1. Systemy transportu elektronów współpracujące z cytochromami P450 (na podstawie [1]). Mitochondrialne CYP wykorzystują zawierającą FAD reduktazę adrenodoksyny (Adr) oraz współpracującą z przenośnikami żelazo-siarkowymi adrenodoksynę (Adx). U Prokaryota występują niezwiązane z błoną reduktaza putidoredoksyny (Pdr) i putidaredoksyna (Pdx). W białkach błonowych siateczki śródplazmatycznej u Eukaryota oraz w białkach transportujących elektrony na cytochromy BM3 u bakterii i grzybów cytochromy P450 współpracują z reduktazami zawierającymi FAD i FMN. W siateczce śródplazmatycznej reduktaza i cytochrom to niezależne białka, a u bakterii i grzybów tworzą jedną strukturę białka niezwiązanego z błoną komórkową.

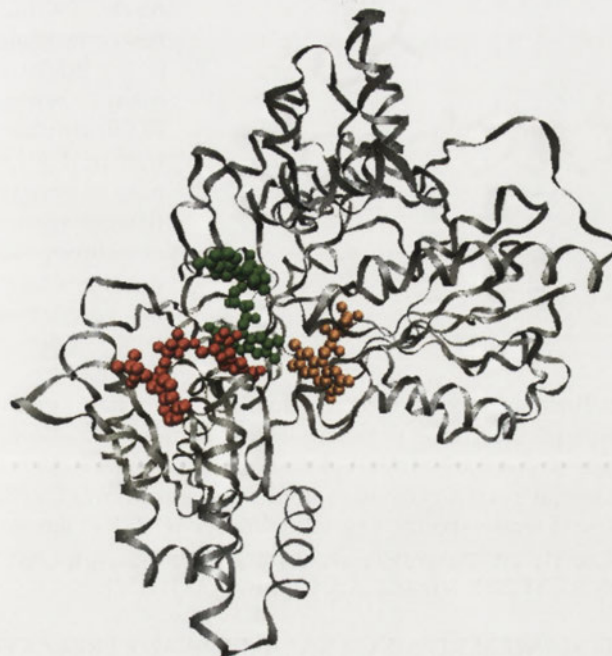
rii i grzybów tworzą jedną wspólną strukturę białka niezwiązanego z błoną komórkową [1].

Reduktaza NADPH:cytochrom P450 (CPR) jest przedstawicielem niewielkiej rodziny reduktaz diflawinowych, które wykształciły się ewolucyjnie na drodze fuzji genów ich poprzedników, dwóch flawoprotein zawierających FMN i FAD. Do reduktaz diflawinowych należą też redukująca syntaza metioninowa, tzw. nowa reduktaza diflawinowa i syntaza tlenu azotu. Porównanie sekwencji nukleotydowej genów kodujących wymienione enzymy wykazało, że istnieją dla nich segmenty identyczne, które kodują reszty aminokwasowe biorące udział w wiązaniu kofaktorów flawinowych [1]. CPR, białko umiejscowione w siateczce śródplazmatycznej, o masie cząsteczkowej 75–80 kDa, zostało po raz pierwszy zidentyfikowane w 1949 roku jako reduktaza cytochromu c [2]. Poziom ekspresji genu kodującego CPR w organizmach ssaków jest regulowany przez stężenie hormonu tyreotropowego i jest najwyższy w wątrobie i w płucach, jakkolwiek niewielkie ilości enzymu zlokalizowane są we wszystkich badanych tkankach [3,4].

W przenoszeniu elektronów w CPR uczestniczą, związane z enzymem, kofaktory: FAD i FMN. FAD pełni funkcję akceptora dwóch równoważników jonu hydroniowego pobieranych z cząsteczki NADPH, a FMN jest donorem jednego elektronu na terminalny akceptor. Reduktaza cytochromu P450 posiada zatem zdolność do jednoczesnego przyjmowania dwóch równoważników jonu hydroniowego z NADPH i przenoszenia ich pojedynczo na hemową grupę prostetyczną cytochromu P450 [5]. Kierunek transportu elektronów jest więc następujący: NADPH → FAD → FMN. Badania wykazały jednak, że istnieją trzy typy cząsteczek współpracujących z CPR, które różnią się preferencją co do związku pełniącego funkcję dawcy elektronów [6]. Akceptory pierwszego typu przyjmują ekwiwalenty redukujące bezpośrednio z FAD i do tej grupy należą ferrocyanid i NADP⁺. Akceptory drugiego typu przyjmują elektrony z FMN i wśród nich znajduje się rodzina izoenzymów cytochromu P450 oraz cytochrom *b₅*. Akceptorem trzeciego typu jest molekularny tlen. Cząsteczka O₂ może przyjmować elektrony zarówno z FAD, jak i z FMN; powstaje wówczas cząsteczka nadtlenu lub ponadtlenu.

STRUKTURA REDUKTAZY CYTOCHROMU P450

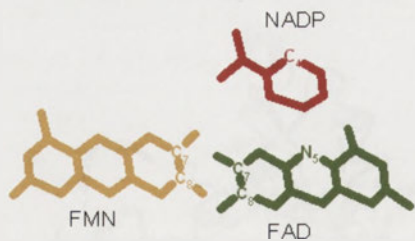
Reduktaza P450 składa się z trzech domen (Ryc. 2). Jedna domena wiąże cząsteczkę FAD i NADPH i jest zlokalizowana na C-końcu, N-końcowa domena wiąże FMN. Dodatkowo obecny jest tzw. element łączący, który prawdopodobnie odpowiada za kontrolę i regulację przepływu elektronów pomiędzy kofaktorami. Enzym zawiera również na N-końcu rejon o charakterze hydrofobowym o długości 20–30 reszt aminokwasowych, który funkcjonuje jako „kotwica” umożliwiająca umiejscowienie białka w błonie i oddziaływanie z cytochromem P450 [6]. Miejsca wiązania kofaktorów FAD i FMN z białkiem CPR mają głównie charakter hydrofobowy. W pobliżu pierścieni izoalloksazynowych cząsteczek flawinowych znajdują się aminokwasy aromatyczne, co umożliwia tworzenie oddziaływań typu π - π , stabilizujących kompleks reduktazy z kofaktorami. Oprócz tych oddziaływań kompleks CPR/kofaktor stabilizowany jest przez siły van



Rycina 2. Trójwymiarowa struktura NADPH-reduktazy:cytochrom P450 [7]. Rycinę wykonano na podstawie pliku 1jaq z bazy PDB (Protein Data Bank); kofaktory: FAD – w kolorze zielonym, FMN – w pomarańczowym, NADPH – w czerwonym.

der Waalsa oraz wiązania wodorowe [6,7]. Cząsteczka FAD łączy się z reduktazą cytochromu P450 w pobliżu miejsca wiązania pierścienia nikotynamidowego NADPH, jednocześnie jest w bliskim kontakcie z pierścieniem izoalloksazynowym FMN, co umożliwia szybkie przeniesienie elektronów między kofaktorami. Odległość między cząsteczkami FAD i FMN wynosi 2–2,5 Å (Ryc. 3).

Jak już wspomniano, CPR współpracuje z izoenzymami cytochromu P450. Tworzy odpowiedni kompleks z tymi białkami, co umożliwia szybki transport elektronów z NADPH na Fe(III). Pomimo że całkowita zawartość reduktazy w mikrosomach komórek zwierzęcych w stosunku do zawartości izoenzymów cytochromu P450 wynosi od 1:10 do 1:20, badania sposobu oddziaływań między obydwoimi białkami wykazały, że tworzą one kompleks w stosunku 1:1 [8]. Kompleks ten stabilizowany jest przez oddziaływania elektrostatyczne, hydrofobowe oraz siły van der Waalsa. Oddziaływania elektrostatyczne zapewniają odpowiednią orientację białek, natomiast oddziaływania hydrofobowe pomiędzy niepolarnymi resztami aminokwasowymi (leucyną, waliną i tryptofanem) umożliwiają bliski kontakt między enzymami, przez co ułatwiają transport elektronów z reduktazy na cytochrom. Stosując chemiczną modyfikację i ukierunkowaną mutagenezę wykazano, że wiązania w kompleksie reduktaza/cytochrom tworzą się pomiędzy dodatnio naładowanymi resztami lizyny i argininy cytochromu, a ujemnie naładowaną resztą kwasu asparaginowego lub glutaminowego reduktazy [9,10]. Wykazano, że dwa zgrupowania reszt aminokwasowych 207Asp-Asp208-Asp209 i 213Glu-Glu214-Asp w strukturze CPR uczestniczą w wiązaniu reduktazy z cytochromami. Za wiązanie cytochromów P450 odpowiada głównie reszta Asp208, natomiast za wiąza-



Rycina 3. Wzajemna orientacja kofaktorów w kompleksie NADPH-reduktaza:cytochrom P450 (na podstawie [6]).

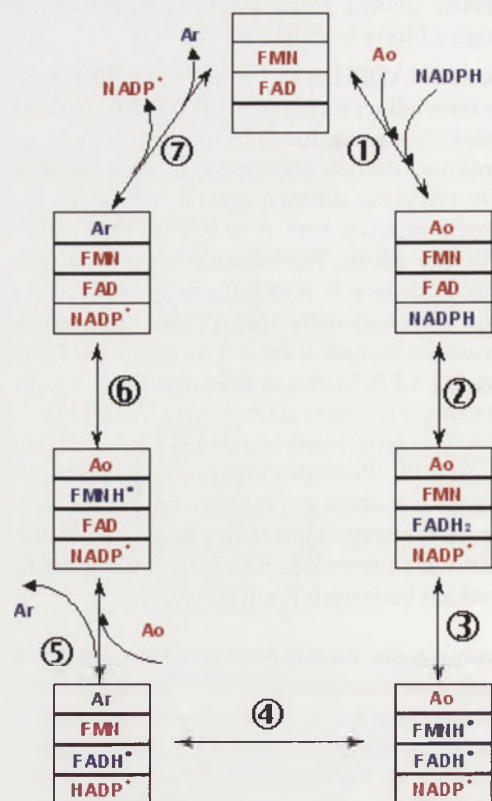
działanie z reduktazą znajduje się w pobliżu hemowej grupy prostetycznej i zawiera liczne, dodatnio naładowane reszty lizyny i argininy. Wykazano, że modyfikacje chemiczne ośmiu reszt lizyny w jednym z izoenzymów, CYP2B1, spowodowały spadek jego aktywności w 95%. Określono też reszty aminokwasów uczestniczące w wiązaniu reduktazy z CYP2B4: Arg422, Arg443 i Lys433 [11,12].

MECHANIZM REDUKCJI KATALIZOWANY PRZEZ CPR

Substratami dla reduktazy cytochromu P450 są NADPH i cząsteczka będąca końcowym akceptorem elektronów, a w wyniku katalizowanej reakcji powstaje NADP⁺ oraz zredukowany akceptor, a więc jest to mechanizm katalizy enzymatycznej z dwoma substratami. Ponieważ wykazano, że w stanie przejściowym cytochrom P450 wiąże się w odmiennym miejscu z CPR niż cząsteczka NADPH, ten typ katalizy enzymatycznej uznano jako podstawienie sekwencyjne, chociaż szczegółowy mechanizm reakcji jest znacznie bardziej skomplikowany [6,13].

Mechanizm redukcji katalizowany przez reduktazę cytochromu P450 (Ryc. 4) oparty jest na kilku obserwacjach. Po pierwsze wykazano, że donorem elektronów na końcowy akceptor jest układ FADH-FMN, pomimo, że w redukcji dwuelektronowej istnieją trzy możliwe stany cząsteczek FAD i FMN czyli FADH₂-FMN, FADH-FMNH, FAD-FMNH₂. Prawdopodobnie zadecydowało o tym utworzenie podwójnej formy semichinonowej. Poza tym zaobserwowano, że w reakcji dwuelektronowej redukcji z udziałem CPR semichinon FMN pełni funkcję dawcy elektronów na końcowy akceptor [6]. Tak więc, w pierwszym etapie cyklu następuje związanie reduktazy cytochromu P450 z NADPH i utlenioną formą akceptora elektronów (Ao) (1). Kompleks taki może powstawać nawet, jeśli kolejne etapy reakcji nie zajądą. W drugim etapie następuje przekazanie dwóch równoważników jonu hydroniowego na pierścień izoalloksazynewy cząsteczki FAD (2). Szybkość procesu jest różna w zależności od pochodzenia enzymu, ale w większości przypadków limituje ona szybkość całej katalizy. W trzecim etapie zachodzi transfer elektronu na cząsteczkę FMN, tworzy się kompleks przejściowy z podwójnym układem semichinonowym (3). Elektron ten jest przekazywany następnie z FMNH na terminalny akceptor (4). Szybkość tego etapu zależy od natury chemicznej akceptora oraz od warunków reakcji. Kolejne procesy, oznaczone numerami 5, 6 i 7 zachodzą analogicznie do procesów 2, 3 i 4, w wyniku czego następuje uwolnienie zredukowanej formy akceptora

nie cytochromu c reszta Glu213; reszty te znajdują się blisko domeny wiążącej FMN, co ułatwia transport elektronów z koenzymu flawinowego na cytochrom. Natomiast powierzchnia izoenzymów P450 odpowiedzialna za od-

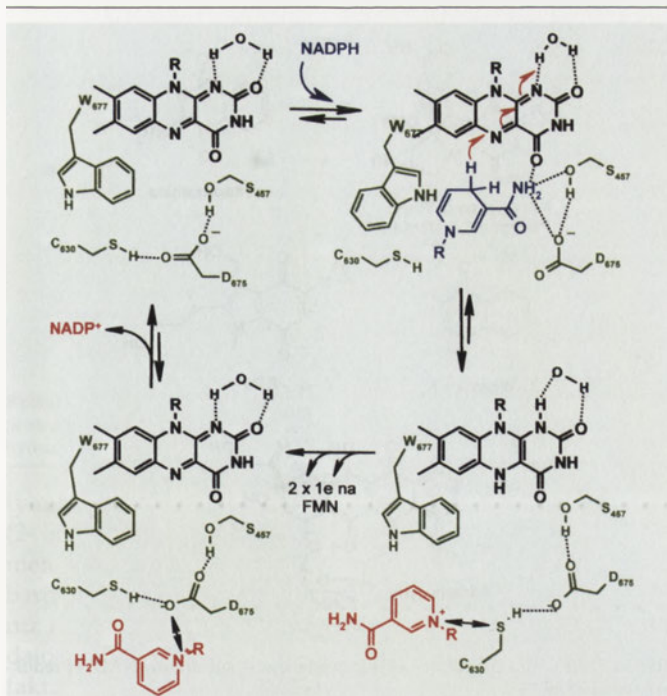


Rycina 4. Cykl katalizy redukcji z udziałem kompleksu NADPH-reduktaza:cytochrom P450, na podstawie [6]. Ao, Ar, odpowiednio, utleniona i zredukowana forma substratu (akceptora elektronów). Formy zredukowane uczestników reakcji przedstawiono w kolorze niebieskim, formy utlenione w kolorze czerwonym.

(Ar) i cząsteczki NADP⁺ oraz odtworzenie wyjściowej formy reduktazy cytochromu P450. Cały cykl można określić symbolem 0-2-1-0, co oznacza, że dwa elektrony są przeniesione z cząsteczki NADPH na cząsteczkę FAD, następnie są transportowane pojedynczo na cząsteczkę FMN, a z niej na akceptor elektronów.

Powyżej opisanemu cyklowi katalizy towarzyszą znaczne zmiany konformacyjne centrum aktywnego CPR. Związanie utlenionej formy NADP⁺ powoduje ruch domeny wiążącej FMN tak, że wzrasta odległość pomiędzy kofaktorami FAD i FMN. Zmienia to potencjał redukcyjny cząsteczek flawinowych i wpływa na aktywność enzymu, regulując przepływ elektronów pomiędzy flawinami. Zredukowana forma NADPH łącząc się z reduktazą powoduje przesunięcia w centrum aktywnym CPR, umożliwiając w ten sposób bliższy kontakt między cząsteczkami NADPH i FAD (Ryc. 5) [7].

W nieobecności NADPH, w utlenionej formie enzymu pierścień indolu Trp677 osłania pierścień izoalloksazynewy cząsteczki FAD. W II etapie reakcji przyłączenie cząsteczki NADPH powoduje wyparcie Trp677, a miejsce pierścienia indolowego zajmuje pierścień pirydynowy NADPH. Tworzące się wiązania wodorowe pomiędzy grupą karboksyaminową NADPH a resztami Asp675 i Ser457 ułatwiają transport jonu hydroniowego i zapewniają odpowiednią orientację cząsteczki NADPH. Podobną funkcję spełnia również reszta Cys630, która tworzy wiązania Van der Wa-



Rycina 5. Proponowany mechanizm zmian konformacyjnych w centrum aktywnym CPR podczas katalitycznej redukcji (na podstawie [7]). W etapie I pierścień indolu Trp677 osłania pierścień izoalloksazynowy FAD. Etap II pozwala na transport jonu hydroniowego z NADPH na FAD dzięki utworzeniu wiązań wodorowych pomiędzy Asp675 i Ser457 i oddziaływaniem Van der Waalsa pomiędzy Cys630 i atomem C4 cząsteczki NADPH. W etapie III utleniona forma NADP⁺ zostaje osłonięta przez Trp677 i Asp675, powraca na swoje miejsce i tworzy stabilizujące karbokation wiązania wodorowe z Ser457 i Cys630. Jednocześnie elektrony z FAD są transportowane na FMN. IV etap to uwolnienie NADP⁺ z deprotonacją FAD i odtworzeniem pierwotnych wiązań wodorowych. CPR powraca do formy wyjściowej. Forma zredukowana NADPH – w kolorze niebieskim, forma utleniona NADP⁺ – w kolorze czerwonym, struktury reszt aminokwasów będą w kolorze zielonym.

alsa z atomem C4 cząsteczki NADPH i stabilizuje tworzenie karbokationu. Cząsteczka wody wiążąca się z atomem N₁ i atomem O₂ pierścienia izoalloksazanowego cząsteczki FAD umożliwia wymianę protonów z rozpuszczalnikiem. Jony hydroniowe są transportowane z cząsteczki NADPH na FAD. W III etapie transportu elektronów utleniona forma NADP⁺ zostaje odsłonięta przez Trp677, Asp675 powraca na swoje miejsce i tworzy wiązania wodorowe z Ser457 i Cys630, które stabilizują karbokation. W tym czasie elektrony z FAD są transportowane pojedynczo na cząsteczkę FMN. W ostatnim, IV etapie katalizowanej reakcji następuje uwolnienie NADP⁺ do środowiska z jednoczesną deprotonacją atomu N₅ w cząsteczce FAD. Wszystkie pierwotne wiązania wodorowe ulegają odtworzeniu i reduktaza cytochromu P450 powraca do formy wyjściowej.

INNA HIPOTEZA NA TEMAT DZIAŁANIA CPR

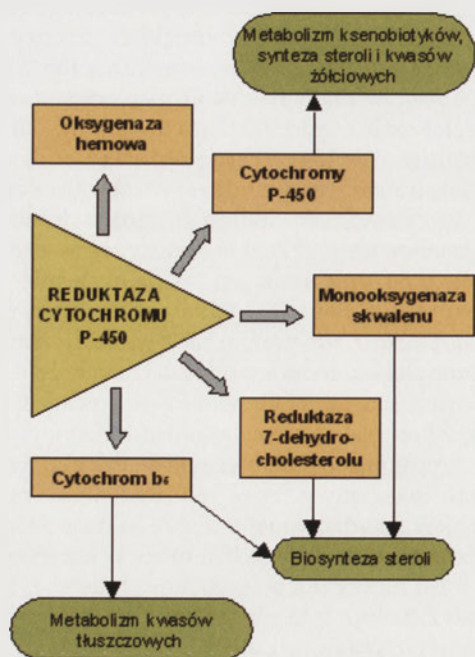
Poza przedstawionym powyżej ogólnie przyjętym mechanizmem działania reduktazy NADPH:cytochrom P450 i jej rolą w cyklu transportu elektronów cytochromu P450, zasługuje na uwagę inna hipoteza dotycząca przemian metabolicznych katalizowanych przez te enzymy. Według K. M. Manoj z Uniwersytetu w Arkansas w pierwszym etapie cyklu katalitycznego cytochromów P450 decydującą rolę odgrywa reduktaza a nie, jak się powszechnie uważa, cytochrom P450 [14]. Reduktaza cytochromu P450 reaguje z

cząsteczką tlenu, w wyniku czego powstają jego reaktywne formy (RFT), które reagują z kompleksem izoenzymu cytochromu P450 i substratu. Reaktywne formy tlenu są znacznie lepiej dostępne dla białek P450, niż obojętna cząsteczka tlenu. Przyłączenie cząsteczki tlenu do kompleksu izoenzymu z substratem wymaga bardzo ścisłego oddziaływania białka z substratem, co przy dużej różnorodności substratów jest, wg cytowanych doniesień, trudne do osiągnięcia. Badania izoenzymu CYP2C9 wykazały, że w centrum aktywnym tego enzymu brak jest specjalnych miejsc wiążących dla substratu. Ponadto badania spektrofotometryczne kompleksu białka z substratem nie wykazały zmiany widma tego kompleksu, co mogłoby wskazywać, że tylko reaktywne formy tlenu np. H₂O₂ generowane przez CPR mogą wiązać się z kompleksem enzym-substrat. To wyjaśniałoby, dlaczego występuje niskie stężenie nadtlenu wodoru w środowisku reakcyjnym. Poza tym RFT, które powstawałyby w reakcji katalizowanej przez reduktazę są silnie toksyczne dla komórki i dlatego być może w komórce poziom reduktazy jest niższy niż poziom izoenzymów cytochromu P450. Powyższa hipoteza ma pewne potwierdzenie w wynikach eksperymentalnych, ale trudno uznać ją za udowodnioną [14].

ZNACZENIE REDUKTAZY CYTOCHROMU P450 DLA ORGANIZMU

Badania fizjologii zwierząt z usuniętym genem kodującym reduktazę P450 jednoznacznie wykazały, że jest ona niezbędna dla prawidłowego rozwoju embrionalnego i całkowite jej usunięcie z organizmu jest dla zwierząt letalne [15]. Usunięcie domeny CPR odpowiedzialnej za wiązanie z błoną też uniemożliwia przeżycie zwierząt, co oznacza, że CPR pełni swoją funkcję tylko wówczas gdy jest umiejscowiona w błonie komórkowej [9,16]. Zastosowanie techniki „*Cre/loxP technology*” pozwoliło wyeliminować gen reduktazy tylko w komórkach wątroby. Otrzymane myszy HRNTM (ang. *hepatic cytochrome P450 reductase null mouse*) są zdolne do życia i rozmnażania, ale nie posiadają funkcjonalnego systemu cytochromu P450. Ich izoenzymy cytochromu P450 występujące w komórkach wątroby są nieaktywne, natomiast obserwuje się znaczny wzrost poziomu białek cytochromu P450 w innych organach (nerkach, sercu i mózgu), co wpływa na odmienny metabolizm związków chemicznych. Zwierzęta te mają znacznie obniżony poziom cholesterolu i triglicerydów we krwi, chociaż w wątrobie jest on wysoki [15,17]. Zaobserwowano też istotne zmiany w metabolizmie leków. Natomiast w komórkach *S.cerevisiae* całkowite usunięcie genu CPR nie było letalne i wiele szlaków metabolicznych zostało zachowanych [1]. Tak więc, u myszy reduktaza CPR jest konieczna dla funkcji cytochromu P450, ale system ten nie jest niezbędny dla życia zwierząt, podczas gdy w komórkach drożdży elektrony z NADPH zostają przeniesione na cytochrom P450 z udziałem innego białka i funkcje cytochromu P450 zostają zachowane.

Reduktaza cytochromu P450 uczestniczy nie tylko w transporcie elektronów z NADPH na cytochromy P450. Współpracują z tym enzymem także inne akceptory elektronów (Ryc. 6), np. oksigenaza hemowa [18] biorąca udział w katabolizmie hemu, cytochrom b₅, katalizujący procesy metabolizmu kwasów tłuszczowych oraz mono-



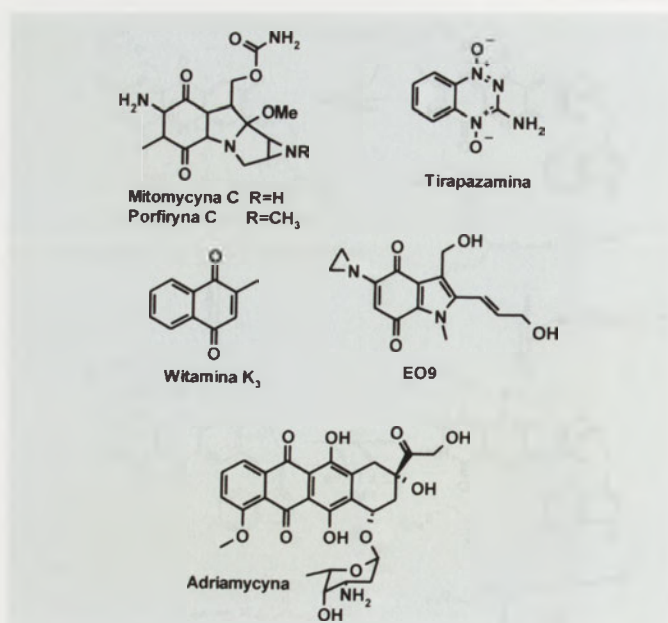
Rycina 6. Udział kompleksu NADPH-reduktaza:cytochrom P450 w procesach metabolicznych związków endo- i egzogennych (na podstawie [5]).

oksygenaza skwalenu i reduktaza 7-dehydrocholesterolu, które wraz z cytochromem b_5 biorą udział w biosyntezie steroli [19]. Poza tym, z reduktazą cytochromu P450 współpracuje również cytochrom c oraz ferrytcyanid. Jednak mechanizm działania kompleksów CPR z białkami innymi niż cytochrom P450 jest słabo poznany. Ustalono m.in. że oksygenaza hemowa człowieka wiąże się z CPR w sposób analogiczny jak cytochrom P450, poprzez oddziaływania elektrostatyczne [18].

WYBRANE REAKCJE REDUKTAZY CYTOCHROMU P450

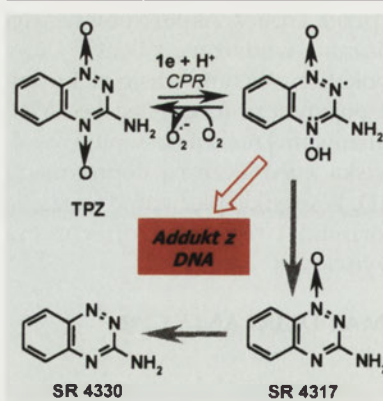
Reduktaza cytochromu P450 pracując samodzielnie, bez udziału cytochromu c czy cytochromu P450, katalizuje reakcje 1-elektronowej redukcji głównie chinonów, ale też aldehydów i pochodnych związków nitrowych, w wyniku czego powstają bardzo reaktywne produkty pośrednie, które mogą oddziaływać z makromolekułami, np. DNA i innymi białkami.

Wśród bezpośrednich substratów CPR, metabolizowanych bez udziału cytochromu P450 znajdują się leki i związki przeciwnowotworowe: mitomycyna C, porfiryna C, adriamycyna, 2,3,5,6-tetrametylobenzochinon, tirapazamina (TPZ), witamina K_3 i EO9 [20-22] (Ryc. 7). Wymienione związki należą do grupy proleków i wymagają enzymatycznej redukcyjnej aktywacji aby utworzyć reaktywne metabolity, które będą oddziaływać z DNA. Na przykład, mitomycyna C, podobnie jak jej metylowy analog (porfiryna C), w obecności reduktazy cytochromu P450 ulegają 1-elektronowej redukcji do semichinonu, a następnie wiążą się kowalencyjnie z DNA. W obecności tlenu reaktywny intermedial semichinonowy ulega utlenieniu do związku wyjściowego [21]. Reakcja ta decyduje o selektywnym działaniu leków w stosunku do komórek niedotlenionych, jakimi są komórki guza nowotworowego.



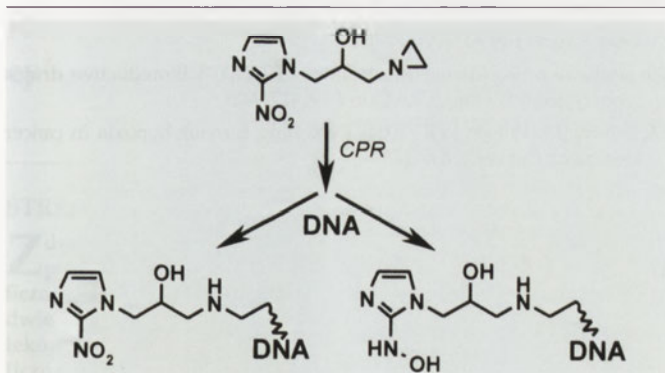
Rycina 7. Struktury chemiczne wybranych leków – substratów NADPH-reduktazy:cytochrom P450.

W przypadku niektórych nowotworów stężenie reduktazy P450 jest znacznie niższe niż w tkance zdrowej, co powoduje ograniczony metabolizm redukcyjny związków przeciwnowotworowych do ich form aktywnych i ograniczony efekt terapii. Natomiast w komórkach nowotworu wątroby zarejestrowano około 2-krotnie wyższą aktywność reduktazy cytochromu P450, niż w zdrowych komórkach wątroby [21]. W przypadku nowotworów płuc i piersi nie obserwowano znaczących różnic w poziomie tego enzymu. Badania wykazały, że reduktaza wpływa na wzrost wrażliwości komórek CHO na mitomycynę C. Natomiast niski poziom enzymu może być odpowiedzialny za oporność komórek nowotworowych na ten lek [22,23].



Rycina 8. Metabolizm aktywacyjny i detoksykacyjny tirapazaminy (TPZ) w obecności reduktazy cytochromu P450 (na podstawie [24]). Redukcja TPZ z udziałem CPR do reaktywnych rodników, które oddziałując z DNA powodują pęknięcie nici. Rodnik może być zobojętniony przez cząsteczkę tlenu, co powoduje deaktywację leku. Dalsza redukcja (2- lub 4-elektronowa) prowadzi do powstania produktów nietoksycznych, SR4317 i SR4330.

Przeciwnowotworowa tirapazamina, stosowana jako lek towarzyszący w terapii cis-platyną, również wymaga aktywacji w warunkach redukcyjnych. TPZ ulega redukcji z udziałem CPR do reaktywnych rodników, które oddziałując z DNA powodują pęknięcie nici (Ryc. 8) [24,25]. Powstający rodnik jest zobojętniany przez cząsteczkę tlenu, co powoduje, że związek ten jest aktywny tylko w warunkach beztlenowych i na



Rycina 9. Metabolizm redukcyjny z udziałem CPR pochodnej 2-nitroimidazolu prowadzący do powstania kowalencyjnych adduktów z DNA oraz reaktywnej hydroksyloaminy (na podstawie [24]).

tym polega selektywność jego działania. Dalsza redukcja (2- lub 4-elektronowa), prowadzi do powstania produktów nietoksycznych, SR4317 i SR4330. Wykazano, że TPZ jest bardziej selektywna w stosunku do komórek beztlenowych niż mitomycyna C i bardziej od niej aktywna. Wysoka wydajność cięcia DNA przez TPZ wynika prawdopodobnie z faktu, że jest ona redukowana w jądrze komórkowym. Podobnie, jak wykazano w przypadku mitomycyny C, komórki nowotworowe z podwyższonym poziomem reduktazy cytochromu P450 są bardziej wrażliwe na TPZ [24].

Reduktaza cytochromu P450 bierze również udział w aktywacyjnej redukcji przeciwnowotworowej pochodnej 2-nitroimidazolu, związku o symbolu RSU1069 (Ryc. 9). W warunkach beztlenowych jest on około 100 razy bardziej aktywny niż mitomycyna C, co wynika z obecności grupy azyrydynowej. Atom azotu azyrydiny jest znacznie bardziej reaktywny od atomów azotu w mitomycynie i w warunkach redukcyjnych wydajnie tworzy wiązanie z cząsteczką DNA [24]. W cząsteczce RSU1069 powstaje podczas redukcji z udziałem reduktazy P450 drugie reaktywne ugrupowanie. Jest to zdolna do wiązania z DNA grupa hydroksyloaminowa.

PODSUMOWANIE

Reduktaza NADPH:cytochrom P450 katalizuje reakcje 1-elektronowej redukcji, pełniąc ważną funkcję w komórkach, jako niezbędny u ssaków element kompleksu monooksygenazy cytochromów P450 odpowiedzialny za transport elektronów z NADPH do centrum aktywnego enzymu. Obecność genu CPR w organizmie myszy jest konieczna dla przeżycia zwierząt w okresie embrionalnym, ale usunięcie tego genu po urodzeniu i tylko w komórkach wątroby nie jest dla zwierząt letalne. Potwierdza to opisaną wcześniej rolę izoenzymów P450, które odpowiedzialne za niektóre etapy metabolizmu związków endogennych, zostały przewidziane głównie do ochrony organizmu przez toksycznymi związkami obcymi. Jednak reduktaza cytochromu P450 uczestniczy nie tylko w transporcie elektronów z NADPH na cytochromy P450. Współpracują z nią inne fizjologiczne akceptory elektronów, m.in. oksygenaza hemowa, cytochrom b_5 , monooksygenaza skwalenu i reduktaza 7-dehydrocholesterolu. CPR pełni też rolę jako samodzielny katalizator metabolizmu redukcyjnego proleków, w szczególności leków przeciwnowotworowych. Metabolizm redukcyj-

ny z udziałem CPR zwiększa selektywność tych związków w stosunku do komórek nowotworów rozwijających się w warunkach niedotlenienia, co korzystnie wpływa na skuteczność stosowanej terapii.

PIŚMIENNICTWO

- Paine MJI, Scrutton NS, Munro AW, Gutierrez A, Roberts GCK, Wolf CR (2005) Electron transfer partners of cytochrome P450. W: Ortiz de Montellano PR (red) *Cytochrome P450: Structure, mechanism and biochemistry*, ed by, Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, str. 115-138
- Elmore CL, Porter TD (2002) Modification of the nucleotide cofactor-binding site of cytochrome P450 reductase to enhance turnover with NADH in vivo. *J Biol Chem* 277: 50, 48960-48964
- Aplatelina EV, Li HC, Waxman DJ (2003) Evaluation of thyroid hormone effects on liver P450 reductase translation. *Arch Biochem Biophys* 409: 172-179
- Li HC, Liu D, Waxman DJ (2001) Transcriptional induction of hepatic NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase by thyroid hormone. *Mol Pharmacol* 59: 987-995
- http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology.htm
- Murataliev MB, Feyereisen R, Wlaker FA (2004) Electron transfer by diflavin reductases. *Biochim Biophys Acta* 1698: 1-26
- Hubbard PA, Shen AL, Paschke R, Kasper CB, Kim JP (2001) NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. Structural basis for hybrid and electron transfer. *J Biol Chem* 276: 29163-170
- Backes WL, Kelley RW (2003) Organization of multiple cytochrome P450s with NADPH-cytochrome P450 reductase in membranes. *Pharmacol Ther* 98: 221-233
- Shen AL, Kasper CK (1995) Role of acidic residues in the interaction of NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase with cytochrome P450 and cytochrome c. *J Biol Chem* 270: 27475-27480
- Masters BS, Marohnic CC (2006) Cytochromes P450 – a family of proteins and Scientists – understanding their relationships. *Drug Metabol Rev* 38: 209-225
- Bhattacharjee A, Banerjee D, Mookherjee S, Acharya M, Banerjee A, Ray A, Sen A, Ray K (2008) Leu432Val polymorphism in CYP1B1 as a susceptible factor towards predisposition to primary open-angle glaucoma. *Mol Vis* 14: 841-850
- Nisimoto Y (1986) Localization of cytochrome c-binding domain on NADPH-cytochrome P450 reductase *J Biol Chem* 261: 14232-14239
- Murataliev MB, Arino A, Guzom VM, Feyereisen R (1999) Kinetic mechanism of cytochrome P450 reductase from house fly. *Insect Biochemistry and Molecular biology* 29: 233-242
- Manoj KM (2007) The di-flavoenzyme reductase directly activates oxygen for the metabolism of diverse drug molecules by liver microsomal cytochrome P450s. 15th International Conference on Cytochromes P450. Bled, Slovenia, Book of abstracts p. 188
- Henderson C, Pass GJ, Wolf R (2006) The hepatic cytochrome P450 reductase null mouse as tool to identify a successful candidate entity. *Toxicol Lett* 162: 111-17
- Szen AL, O'Leary KA, Kasper CB (2002) Association of multiple developmental defects and embryonic lethality with loss of microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* 277: 6536-6541
- Henderson CJ, Otto DME, Magnuson MA, McLaren AW, Rosewell I, Wolf CR (2003) Inactivation of the hepatic Cytochrome P450 system by conditional deletion of Hepatic Cytochrome P450 Reductase. *J Biol Chem* 278: 13480-13486
- Ryter SW, Alam J, Choi AMK (2006) Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86: 583-650
- Munro AW, Girvan HM, McLean KJ (2007) Cytochrome P450 –redox partner fusion enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1770: 345-359
- Roosboom M, Commandeur JNM, Vermeulen NPE (2004) Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharmacol Rev* 56: 53-102

22. Cummings J (2000) The role of reductive enzymes in cancer cell resistance to mitomycin C. *Drug Resist Updat* 3: 143-148
23. Bartoszek A (2002) Metabolic activation of adriamycin by NADPH-cytochrome P450 reductase, overview of its biological and biochemical effects. *Acta Biochim Pol* 49: 323-331
24. Baumann RP, Hodnick WF, Seow HA, Belcourt MF, Rockwell S, Sherman DH, Sartorelli AC (2001) Reversal of mitomycin C resistance by overexpression of bioreductive enzymes in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 61: 7770-7776
25. McKeown SR, Cowen RL, Williams KJ (2007) Bioreductive drugs: from concept to clinic. *Clin Oncol* 19: 427-442
26. Brown JM, Wilson WR (2004) Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Cancer* 4: 437-447

NADPH-cytochrome P450 reductase, not only the partner of cytochrome P450

Anita Wiśniewska, Karolina Jagiełło, Zofia Mazerska✉

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

✉e-mail: mazerska@chem.pg.gda.pl

Keywords: NADPH-cytochrome P450 reductase, cytochrome P450 monooxygenation, metabolic reduction, antitumor drug metabolism

ABSTRACT

NADPH-cytochrome P450 reductase, CPR, the enzyme of the majority of eucaryotic cells belongs to the family of diflavin reductases and is usually located in endoplasmic reticulum. This protein is build of three domains. The first one, C-terminal, binds FAD and NADPH, the second one, N-terminal, binds FMM, whereas the third one is the regulatory domain. Catalytic cycle of the enzyme runs by intermediate FMNH-FADH with the participation of conformational changes induced by NADPH binding to the active centre of the enzyme. It has been shown in mice that CPR was necessary for the action of cytochrome P450 monooxygenase system, but this system is not crucial for animal surviving. CPR participates also in electron transport to cytochrome *b*₅, heme oxidase, squalen monooxygenase and 7-dehydrocholesterole reductase. Furthermore, its own crucial task is the catalysis of reductive metabolism of prodrugs, particularly antitumor agents.

Rola polimorfizmu i zróżnicowanej ekspresji genów cytochromów P450 w metabolizmie ksenobiotyków

STRESZCZENIE

Zdolność do metabolizmu ksenobiotyków przez cytochromy P450 (CYP) określona jest przez polimorfizm i poziom ekspresji genów tych białek. Najwięcej, 40 odmian polimorficznych o zróżnicowanej aktywności enzymatycznej, poznano dla CYP2D6, natomiast tylko dwie w przypadku CYP2C9, których obecność powoduje zahamowanie metabolizmu wielu leków. Z kolei polimorfizm genu CYP3A4 nie miał istotnego wpływu na aktywność metaboliczną jego produktu białkowego. Najważniejsze w regulacji ekspresji genów cytochromów P450 są czynniki transkrypcyjne PXR, CAR i AhR. Odgrywają one główną rolę w indukcji genów, odpowiednio CYP3A4, CYP2B6 i CYP1A2. PXR i AhR aktywowane są poprzez związanie specyficznego liganda, natomiast nie będący ligandem aktywator konstytutywnego receptora androstanu (CAR) indukuje defosforylację. Po przejściu do jądra zaktywowane receptory tworzą heterodimery z receptorem RXR, które po dalszej aktywacji z udziałem koaktywatorów wiążą się do motywów sekwencji DNA: XREM w przypadku PXR, PBREM dla CAR oraz DRE dla AhR. Aktywacja tych receptorów powoduje ważne z klinicznego punktu widzenia oddziaływanie pomiędzy stosowanymi lekami, w tym lekami przeciwnowotworowymi.

WSTĘP

Przebieg metabolizmu ksenobiotyków w organizmach wyższych jest indywidualną cechą osobniczą. Decyduje o niej aktywność enzymów metabolizujących poszczególne związki. Aktywność enzymów z grupy cytochromu P450 zależy u poszczególnych osób zarówno od warunków środowiska, w którym żyją, jak i od czynników genetycznych. Zdolność do metabolizmu ksenobiotyków przez cytochromy P450¹ zależy w danym organizmie od struktury genów kodujących te białka oraz od poziomu ich ekspresji. Ze strukturą genów kodujących enzymy metabolizujące związane jest zjawisko polimorfizmu, natomiast zmiany poziomu ekspresji genów białek P450 są regulowane z udziałem receptorów jądrowych lub innych czynników transkrypcyjnych, indukowanych z udziałem niskocząsteczkowych ligandów. [1,2]

Polimorfizm jest cechą genomu ludzkiego definiowaną jako różnica w sekwencji DNA określonego genu występująca w danej populacji ludzi częściej niż u 1% osobników. Przy niższej częstości różnic w sekwencji genu mówimy o wystąpieniu rzadkiej cechy genetycznej lub w skrajnym przypadku o metabolicznej wadzie wrodzonej [3]. Powszechną przyczyną zmiany struktury DNA są mutacje punktowe (SNP), polegające na zmianie jednego lub kilku nukleotydów w łańcuchu DNA, co prowadzi do powstania różnych alleli danego genu i w konsekwencji zróżnicowanej aktywności enzymu [4]. Z drugiej strony aktywność katalityczna P450 może być regulowana z udziałem czynników zewnętrznych [5]. W tym przypadku procesy regulacji ekspresji genów CYP w komórce oparte są na kilku mechanizmach. Należą do nich regulacja transkrypcji genów kodujących izoenzymy P450, stabilizacja mRNA tych genów lub modyfikacje potranslacyjne. Podczas indukcji transkrypcji czynniki transkrypcyjne wiążą się z DNA w miejscu regulatorowym. Wiązanie to jest kontrolowane przy udziale niskocząsteczkowych ligandów endo- lub egzogennych. Ligandy, wiążąc się do receptorów ją-

sygnał cAMP (ang. *p300/Cyclic-AMP response element protein binding*); RF – rifampicyna; RXR – receptor retinoidowy X (ang. *retinoid X receptor*); SNP – pojedyncze mutacje punktowe (ang. *single nucleotide polymorphism*); SMRT – czynnik wyciszający dla receptora kwasu retinowego i hormonów tarczycy (ang. *silencing mediator for retinoic acid repressor and thyroid hormone receptor*); SRC-1 – koaktywator receptora steroidowego (ang. *steroidogenic receptor coactivator*); UM – osoba bardzo intensywnie metabolizująca (ang. *ultraextensive metabolizer*); XR – receptory ksenobiotyków (ang. *xenobiotic receptors*); XREM – region odpowiedzi na ksenobiotyki (ang. *xenobiotic response element module*)


¹Funkcje cytochromów P450 oraz sprzężonej z nimi NADPH-reduktazy:cytochrom P450 opisano w dwóch artykułach, „Izoenzymy cytochromy P450 w metabolizmie związków endo- i egzogennych” oraz „NADPH-reduktaza:cytochrom P450 – nie tylko partner cytochromu P450”, opublikowanych w niniejszym zeszycie „Postępów Biochemii”.

Magdalena Niemira

Anita Wiśniewska

Zofia Mazerska 

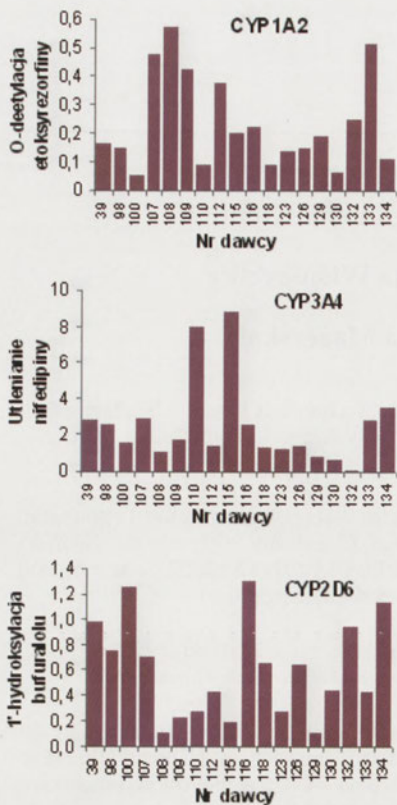
Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

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

Artykuł otrzymano 25 stycznia 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 8 maja 2009 r.

Słowa kluczowe: AhR, CAR, ekspresja genów P450, metabolizm leków, polimorfizm cytochromu P450, metabolizm kancerogenów, PXR, ligandy receptorów jądrowych

Wykaz stosowanych skrótów: AF-1, AF-2 – domeny aktywujące transkrypcję; AhR – receptor węglowodorów aromatycznych (ang. *aromatic hydrocarbon receptor*); AHRR – represor receptora AhR (ang. *AhR repressor*); ARNT – translokator jądrowy AHR (ang. *AHR nuclear translocator*); CAR – konstytutywny receptor androstanu (ang. *constitutive androstane receptor*); CYP – cytochrom P450; CYP – gen cytochromu P450; DBD – domena wiążąca DNA (ang. *DNA binding domain*); DOC – docetaksole; DR – powtórzenia sekwencji proste (ang. *direct repeats*); EM – osoba z prawidłowym metabolizmem (ang. *extensive metabolizer*); ER – powtórzenia sekwencji naprzeciwległe; FXR – receptor kwasów żółciowych (ang. *farnesoid X receptor*); HAT – acetylotransferaza histonowa (ang. *histone acetyl transferase*); HDAC – deacetylaza histonowa (ang. *histone deacetylase*); IM – osoba ze zmienionym metabolizmem (ang. *intermediate metabolizer*); IR – powtórzenia sekwencji odwrócone (ang. *indirect repeats*); LXR – wątrobowy receptor X (ang. *liver X receptor*); LBD – domena wiążąca ligand (ang. *ligand binding domain*); NcoR – ko-represor receptora jądrowego (ang. *nuclear receptor co-repressor*); NLS – sekwencja kierująca do jądra (ang. *nuclear localization signal*); OR – receptory „sieroco”; PAC – paklitaksole; PB – fenobarbital (ang. *phenobarbital*); PBREM – region wzmacniający odpowiedź na fenobarbital (ang. *PB response enhancer module*); PM – osoba słabo metabolizująca (ang. *poor metabolizer*); PPAR – receptor aktywowany przez proliferatory peroksyosomów (ang. *peroxisome proliferator activated receptor*); PXR – receptor X pregnanu (ang. *pregnane X receptor*); p300/CPB – koaktywator transkrypcji w odpowiedzi na



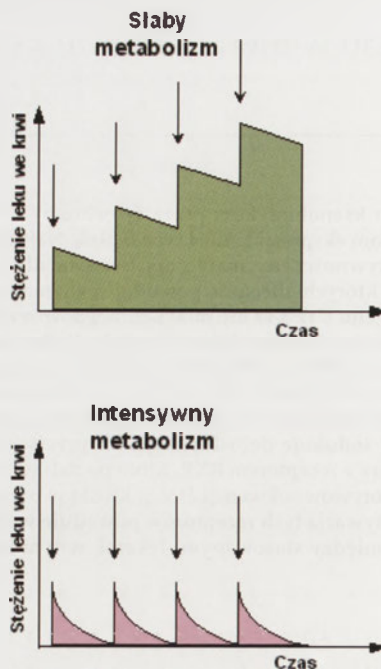
Rycina 1. Zmienność aktywności wobec specyficznych substratów izoenzymów cytochromu P450 w komórkach wątroby pobranych od 18 pacjentów (na podstawie [10,11]).

Zawartość białek cytochromów P450 jest też odmienna u ludzi w zależności od przynależności do populacji. Na ogół, azjatycką grupę etniczną charakteryzują niższe, w porównaniu z innymi, poziomy enzymów metabolizujących [10,11].

W zależności od zdolności do metabolizowania głównych leków wyróżnia się zasadniczo trzy typy pacjentów. Najczęściej występującą grupą są pacjenci przeciętnie metabolizujący leki. Osoby słabo metabolizujące charakteryzuje obniżona aktywność danego enzymu lub brak jego aktywności. Natomiast pacjenci charakteryzujący się znacznie podwyższoną aktywnością danego enzymu należą do grupy, która bardzo szybko metabolizuje podawane leki. W przypadku gdy metabolizm leku prowadzi do jego deaktywacji (Ryc. 2), wówczas u pacjentów słabo metabolizujących stężenie tego leku we krwi, podczas wielokrotnego podawania jest wysokie i wysoki jego poziom utrzymuje się przez dłuższy okres czasu. Istnieje jednak niebezpieczeństwo, że wysokie stężenie leku może w tym przypadku powodować nasilenie działań niepożądanych. U osób ze zdolnością do bardzo szybkiego metabolizmu stężenie leku będzie szybko obniżać się po jego podaniu i aby uzyskać taki sam efekt terapeutyczny trzeba u nich stosować wyższe dawki lub podawać je częściej. Natomiast w sytuacji, gdy metabolizm prowadzi do aktywacji podawanego leku, pacjenci wolno metabolizujący muszą otrzymywać wyższe jego dawki, gdyż to zapewni odpowiednio wysokie, terapeutyczne stężenie aktywnego metabolitu. U osób z szybkim metabolizmem aktywny me-

drowych, mogą, wraz z innymi specyficznymi białkami, doprowadzić do zmian ekspresji genów odpowiedzialnych za metabolizm katalizowany przez cytochromy P450 [6,7].

Leki podawane pacjentom są w każdym przypadku odmiennie i specyficznie metabolizowane [8,9]. Fakt ten ilustruje rycina 1, na której przedstawiono zróżnicowaną aktywność izoenzymów cytochromu P450 u 18 różnych pacjentów, określoną na podstawie szybkości metabolizmu substratów charakterystycznych dla tych enzymów.



Rycina 2. Zmiana stężenia leku we krwi u pacjentów z różnym poziomem enzymów metabolizujących, po kolejnych dawkach leku, co oznaczono strzałkami. Wykresy dotyczą sytuacji, gdy metabolizm prowadzi do deaktywacji (na podstawie [1]).

P450, tj. CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 oraz, jak stwierdzono ostatnio, także CYP3A4, występują w kilku odmianach polimorficznych. Pacjenci „przeciętnie metabolizujący” (EM) posiadają prawidłową formę Izoenzymu CYP z niezmiennymi allelami. Osoby „pośrednio metabolizujące” (IM) są heterozygotami czyli posiadają zmieniony jeden z alleli kodujących CYP. Z kolei osoby „słabo metabolizujące” (PM) charakteryzują się mutacją w genie (homozygota recesywna), która powoduje zmniejszoną aktywność danego izoenzymu lub jego brak. Natomiast pacjenci posiadający więcej niż dwie kopie danego genu należą do grupy „bardzo intensywnie metabolizujących” (UM) [12]. W tabeli 1 przedstawiono właściwości poszczególnych odmian polimorficznych izoenzymów P450 oraz częstość ich występowania w kaukaskiej i azjatyckiej grupie etnicznej.

CYP2D6

Najlepiej poznany został polimorfizm izoenzymu CYP2D6. Do tej pory znaleziono ponad 40 różnych odmian polimorficznych tego enzymu oznaczonych symbolami od *1 do *43. Obejmują one 26 alleli kodujących niefunkcyjny enzym oraz 6 alleli kodujących białko o obniżonej aktywności [13,14]. Izoenzym CYP2D6 uczestniczy w metabolizmie około 25% stosowanych powszechnie leków takich jak β -blokery, leki antydepresyjne, neuroleptyki, leki antyarytmiczne i opioidy [15]. 20% osób kaukaskiej grupy etnicznej i około 1% pozostałej części populacji ludzkiej posiada nieaktywny izoenzym CYP2D6. Natomiast blisko 6% populacji pozbawionej jest tego enzymu. Na rycinie 3 przedstawiono rozkład częstości występowania pacjentów kaukaskiej grupy etnicznej o różnej zdolności do metabolizmu z udziałem

tabolit powstaje w szybkim tempie i dlatego już niskie dawki leku przynoszą pożądany efekt terapeutyczny. Od profilu metabolicznego pacjenta zależy też jego zdolność do zapadania na niektóre choroby, w tym na, indukowane aktywnymi metabolitami związków nowotworowych [2].

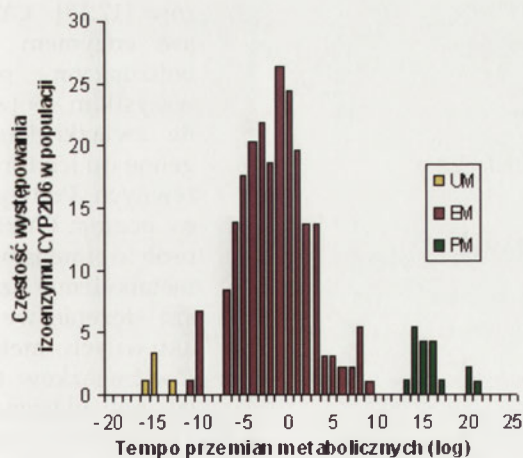
POLIMORFIZM IZOENZYMÓW P450

W s z y s t k i e kluczowe dla biotransformacji leków izoenzymy cytochromu

Tabela 1. Polimorfizm genów wybranych izoenzymów cytochromu P450 człowieka, wg. [3].

Izoenzym cytochromu P450	Wersje genów	Funkcje	Częstość występowania w populacji ludzkiej	
			kaukaska grupa etniczna [%]	azjatycka grupa etniczna [%]
CYP2A6	CYP2A6*2	enzym nieaktywny	1-3	0
	CYP2A6*3	nieznana	0	0
	CYP2A6*4	nieznana	1	15
	CYP2A6*5	defekt enzymu	0	1
CYP2C9	CYP2C9*2	obniżone powinowactwo do reduktazy P450	0-13	0
	CYP2C9*3	zmieniona specyficzność substratowa	7-9	2-3
CYP2C19	CYP2C19*2	enzym nieaktywny	13	23-32
	CYP2C19*3	enzym nieaktywny	0	6-10
CYP2D6	CYP2D6*2 <i>xt</i>	obniżona aktywność	1-5	0-2
	CYP2D6*4	enzym nieaktywny	12-21	1
	CYP2D6*5	brak enzymu	4-6	6
	CYP2D6*10	enzym niestabilny	1-2	50
	CYP2D6*17	zmniejszone powinowactwo do substratu	0	nieokreślona
CYP2E1	CYP2E1*2	obniżony poziom ekspresji	0	0
	CYP2E1*3	efekt nieznan	<1	1
	CYP2E1*4	efekt nieznan	<1	nieokreślona
CYP3A4	CYP3A4*2	wyższe K_m dla substratu	3	0
	CYP3A4*3	efekt nieznan	0	<1

CYP2D6. Obok przeważającej liczby osób przeciętnie metabolizujących (EM) i niewielkiej populacji słabo metabolizujących (PM), występuje znaczna liczba pacjentów o bardzo intensywnej zdolności do transformacji (UM). W przypadku pacjentów PM zahamowany metabolizm deaktywacyjny leków katalizowany przez CYP2D6 obniża ich tempo wydalania z organizmu, co zwiększa ryzyko występowania toksycznych działań niepożądanych [3,16]. Jednym z przykładów są leki antydepresyjne, np. nortryptylina, które są toksyczne dla pacjentów ze słabym metabolizmem (Tabela 2) [14]. W przypadku zaś leków wymagających enzymatycznej aktywacji w obecności CYP2D6, np. leków o działaniu antyarytmicznym czy opioidowych leków przeciwbólowych (kodeiny i tramadolu), brak izoenzymu CYP2D6 znacznie obniża skuteczność działania tych farmaceutyków [14,15].



Rycina 3. Rozkład częstości występowania pacjentów o różnej zdolności do metabolizmu z udziałem CYP2D6; EM, pacjenci z prawidłowym metabolizmem, PM, pacjenci „słabo metabolizujący” i UM, pacjenci „bardzo silnie metabolizujący” (na podstawie [11]).

Pełniący ważną rolę w metabolizmie ponad stu leków, izoenzym CYP2C9 występuje w kilku odmianach polimorficznych. Odmiany tego białka różniące się jednym aminokwasem, CYP2C9*2 i CYP2C9*3, występują odpowiednio u około 20% populacji kaukaskiej i zaledwie u 2 do 3% azjatyckiej grupy etnicznej. Ich obecność odpowiada za obniżony metabolizm wielu leków, wśród których znajdują się m.in. leki antykoagulacyjne (warfaryna i acenokumarol), powszechnie stosowane niesteroidowe leki przeciwzapalne (ibuprofen i diklofenak) i lek przeciwpadaczkowy (fenytoina). Dobrze poznano w klinice wpływ polimorfizmu CYP2C9 na działanie warfaryny, obniżającej krzepliwość krwi. Szczególnie pacjenci z wersją genu CYP2C9*3 bardzo słabo metabolizują warfarynę, co powoduje, że tylko 10% jej ilości zostaje wydalone z organizmu w określonym czasie. Utrzymujące się zbyt długo wysokie stężenie leku we krwi stwarza zagrożenie krwotoku wewnętrznego [15]. W przypadku tych pacjentów dawka warfaryny powinna być około 10-16 razy niższa. Podobnie jest w przypadku fenytoiny. Pacjenci z allelem CYP2C9*2 i CYP2C9*3 wymagają stosowania dawki leku niższej o jedną trzecią niż osoby z niezmiennym typem białka. W przeciwnym razie za wysokie stężenie fenytoiny jest toksyczne dla układu nerwowego [14].

CYP2C19

Badania przemian mefenytoiny stosowanej w leczeniu padaczki i obserwacja nietypowego przebiegu terapii tym lekiem pozwoliły na odkrycie odmian polimorficznych izoenzymu CYP2C19. Grupa słabo metabolizujących pacjentów znacznie częściej występuje u Azjatów (23-30%) niż wśród kaukaskiej grupy etnicznej (1-13%). Dotychczas zidentyfikowano około 15 alleli tego genu, z których sześć, CYP2C19*2 do *8 koduje nieaktywny enzym. Dwa główne allele to CYP2C19*2 z mutacją punktową w eksonie 5 i CYP2C19*3 zawierający kodon „stop” w eksonie 4 [14,16]. Jednym z leków metabolizowanych przez izoenzym CYP2C19 jest omeprazol, który należy do inhibitorów pompy protonowej, zmniejszając wydzielanie protonów do światła żołądka i jest stosowany w leczeniu wrzodów żołądka. Podczas stosowania omeprazolu u pacjentów słabo metabolizujących (Tabela 2) zaobserwowano niekorzystny efekt wzrostu stężenia jonów

wodorowych, a przy dłuższej terapii wzrost wydzielania kwasu solnego w jamie żołądka [15].

CYP3A4

Izoenzym CYP3A4 jest jednym z kluczowych izoenzymów cytochromu P450 i uczestniczy w metabolizmie wielu różnych związków endogennych (takich jak kortyzol, testosteron, estradiol i progesteron), jak i powszechnie stosowanych leków [17]. Należą do nich erytromycyna, midazolam, a także leki przeciwnowotworowe np. etopozyd i tamoksyfen. Obecnie znanych jest około 40 alleli genu kodującego izoenzym CYP3A4. Najbardziej rozpowszechnioną wśród ludzi odmianą polimorficzną genu tego białka jest *CYP3A4*1B* występująca u ponad połowy populacji afroamerykanów i tylko u 5% populacji kaukaskiej, natomiast nie występująca u azjatyckiej grupy etnicznej. Pozostałe odmiany polimorficzne izoenzymu CYP3A4 mimo, że jest ich stosunkowo dużo, występują znacznie rzadziej, bo tylko u 2-3% ogólnej populacji [18]. Nie udało się w pełni wyjaśnić znaczenia mutacji w genie *CYP3A4* dla przemian metabolicznych katalizowanych przez ten enzym. Okazało się bowiem, że większość badanych reakcji, w tym metabolizm testosteronu i progesteronu, zachodzi w bardzo zbliżony sposób z udziałem prawidłowego i zmutowanego enzymu CYP3A4. Wyjątkiem jest zmiana w przebiegu metabolizmu testosteronu w obecności genów białek o allelach *CYP3A4*17* i *CYP3A4*18*. Obniżoną aktywność enzymu CYP3A4 zaobserwowano także podczas reakcji przemiany 6-hydroksykortyzolu do kortyzolu u pacjentów posiadających odmiany genów *CYP3A4*4*, **5*, i **6* [19,20]. Nie wykazano więc jednoznacznie, że mutacje w genie kodującym izoenzym

CYP3A4 mają, w przeciwieństwie do innych izoenzymów cytochromu P450, istotny wpływ na aktywność katalityczną tego białka. Biorąc pod uwagę niską częstotliwość występowania zmutowanych form u ludzi, polimorfizm izoenzymu CYP3A4 ma niewielki wpływ na metabolizm leków i ich wydalanie z organizmu.

POLIMORFIZM A TERAPIA PRZECIWNOWOTWOROWA I PODATNOŚĆ NA NOWOTWORY

Problemy wynikające z polimorfizmu genów cytochromów P450 występują zwłaszcza w terapii przeciwnowotworowej. Wąskie „okno terapeutyczne” optymalnego stężenia leku jest przyczyną dużej podatności na metabolizm leków przeciwnowotworowych, a w konsekwencji na efekty terapii u poszczególnych pacjentów. Jednym z głównych izoenzymów metabolizującym leki przeciwnowotworowe jest CYP2B6. Dotychczas zidentyfikowano 25 różnych alleli genu tego białka. Wykazano też, że aktywność izoenzymu CYP2B6 zależy również od płci. Na przykład w reakcji N-demetylacji S-mefenytoiny 7% kobiet i 20% mężczyzn wykazywało obniżoną aktywność tego izoenzymu [15]. Cyklofosfamid o właściwościach przeciwnowotworowych ulega aktywacyjnej 4-hydroksylacji przed wszystkim w obecności izoformy CYP2B6*6 [9,17]. U pacjentów PM metabolizm cyklofosfamidu do jego aktywnej pochodnej hydroksylowej jest zahamowany, co wywołuje osłabiony efekt terapeutyczny przy danej dawce (Tabela 2). Izoforma CYP2B6*6 bierze również udział w metabolizmie leku o nazwie efawirenz stosowanego w terapii skierowanej przeciw HIV. W tym przypadku obniżona aktywność metaboliczna hamuje detoksykację i obserwuje się silniejsze efekty uboczne związane z

zaburzeniami funkcjonowania układu nerwowego [13,15]. Wiadomo również, że zmieniony poziom niektórych izoenzymów np. CYP1A1/2 może mieć wpływ na ryzyko zachorowania i rozwoju nowotworów [17,18]. CYP1A2 jest enzymem metabolizującym przede wszystkim potencjalnie związki kancerogenne do ich form aktywnych. Podwyższony poziom CYP1A2 u osób o intensywnym metabolizmie zwiększa stężenie we krwi aktywnych metabolitów związków takich jak policykliczne węglowodory aromatyczne, w tym benzo[a]piren, aminy heterocykliczne pochodzące z przetworzonej

Tabela 2. Efekty zahamowania metabolizmu leków u pacjentów z niską aktywnością izoenzymów cytochromu P450.

Izoenzym cyt. P450	Substrat	Kategoria leku	Wywołany efekt u PM	Piśmienictwo
CYP2D6	debrisoquina	p/nadciśnieniu	zaostrome efekty uboczne	19
	nortryptylina	p/depresyjny		13
	fluoksetyna kodeina	p/bólowe	zaostrome efekty uboczne oslabiony efekt p/bólowy	
	tramadol		oslabiony efekt p/bólowy	3,13,14
CYP2C9	warfaryna acenokumarol	antykoagulacyjn antykoagulacyjn	krwotok wewnetrzny krwotok wewnetrzny	3,12,13 13
	fenytoina	p/padaczkowy	toksyczne efekty neurologiczne	
	tolbutamid omeprazol	p/cukrzycowy podwyzszajacy pH zoladka	hipoglikemia zaostrome efekty uboczne,	3,13 3,12,13
CYP2C19			przyspieszone tempo leczenia przy stosowaniu klarytromycyny	
	diazepam	antydepresyjny	wydłużone i nasilone działanie uspakajające	13
CYP2B6	cyklofosfamid*	p./nowotworowy	przyspieszony metabolizm leku, silne efekty uboczne	14,16
	efawirenz*	p/HIV	zaostrome skutki uboczne dotyczące układu nerwowego	12,14,16

żywności czy mykotoksyny, takie jak aflatoksyna. Spowodowana polimorfizmem ograniczona zdolność części populacji do metabolizmu prokancerogenów stanowić może jej naturalną obronę przed działaniem reaktywnych metabolitów.

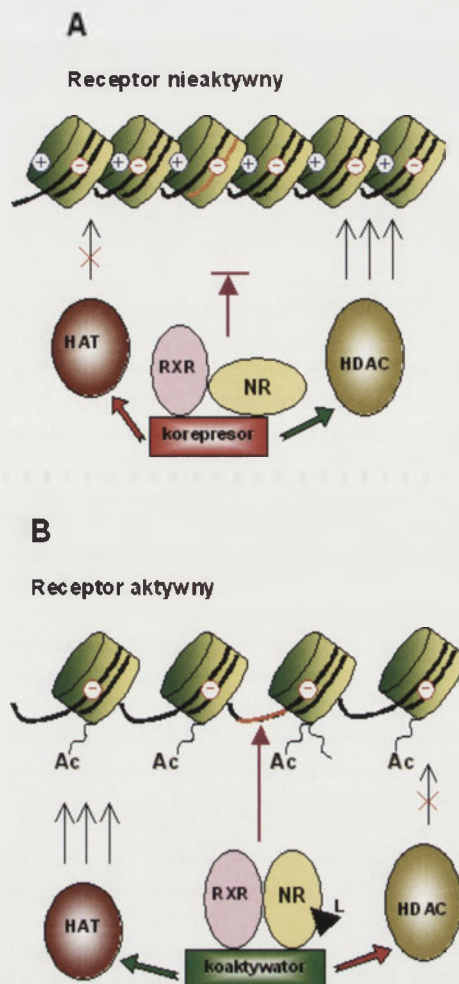
INDUKCJA EKSPRESJI GENÓW IZOENZYMÓW P450

Jak wspomniano, aktywność katalityczna i poziom izoenzymów cytochromu P450 w różnorodnych tkankach zależy nie tylko od profilu genetycznego pacjenta, ale również od wpływu czynników zewnętrznych, w tym kontaktu z ksenobiotykami [5]. Obecność ksenobiotyków w organizmie może mieć wpływ na indukcję ekspresji określonych izoenzymów cytochromu P450 i wpływać, podobnie jak polimorfizm ich genów, na zróżnicowany metabolizm leków, a tym samym modulować ich działanie. Podczas indukcji transkrypcji decydującą rolę odgrywają czynniki transkrypcyjne regulujące aktywność grupy genów, poprzez związanie się do DNA w miejscach regulatorowych.

RECEPTORY JĄDROWE

Wśród czynników transkrypcyjnych wyodrębniono białka z rodziny bHLH-PAS i receptory jądrowe, do których należą: hormonalne receptory jądrowe (NHR). Przedstawicielem bHLH-PAS jest czynnik AhR aktywowany przez wielopierścieniowe związki organiczne, w tym dioksyny i ich pochodne [21]. Hormonalne receptory jądrowe tworzą rodzinę białek, w obrębie której wyróżniono trzy główne klasy. Klasę I reprezentują receptory steroidowe, do których należą receptory: progesteronowy (PR), estrogenowy (ER), glukokortykoidowy (GR), androgenowy (AR) i mineralokortykoidowy (MR). Receptory tyroidowe stanowią II klasę, w skład której wchodzi receptor tyroidowy (TR), receptor witaminy D (VDR) i receptor kwasu retinolowego (RAR) [22]. Klasę III tworzą tzw. receptory „sieroce”, do których należą: receptor pregnanu X (PXR), konstytutywny receptor androstanu (CAR), receptor aktywowany przez proliferatory peroksyosomów (PPAR), wątrobowy receptor X (LXR), receptor kwasów żółciowych (FXR) i receptor retinoidowy X (RXR) [23]. Wszystkie wymienione czynniki transkrypcyjne określono mianem receptorów ksenobiotyków (XR), ponieważ aktywność biologiczna związków egzogennych zależy bezpośrednio od tych receptorów [21].

Hormonalne receptory jądrowe wykazują w obrębie całej rodziny podobieństwa strukturalne i funkcjonalne. W ich strukturze wyróżnia się w rejonie C-końcowym domenę wiążącą ligand (LBD), o sekwencji zachowanej w ewolucji, położoną centralnie domenę wiążącą DNA (DBD), domeny aktywujące transkrypcję (AF-1 i AF-2) i centralną domenę typu „zawiasu” [24]. Domena DBD składa się z dwóch palców cynkowych, stanowiących motyw umożliwiający rozpoznanie sekwencji i związanie się białka do dużego rowka DNA w miejscu regulatorowym genu docelowego. Domena ta wiąże się z sekwencją zawierającą powtórzenia AGAACA lub AGGTC. Powtórzenia tworzą sekwencje zgodne, które mogą być proste (DR), odwrócone (IR) lub naprzeciwległe (ER). Domena LBD składa się z α -helisy osłaniającej hydrofobowy rdzeń będący miejscem wiązania z ligandem. Za-



Rycina 4. Schemat działania receptorów jądrowych (na podstawie [24,27]). A, nieaktywny heterodimer receptorów NR i RXR, przyciąga białka koorepresorowe, które oddziałują z deacetylazą histonową, HDAC, uniemożliwiając rozluźnienie chromatyny; B, aktywny receptor indukuje zmiany konformacyjne tak, że w miejsce koorepresora przylączy się koaktywator. Koaktywator aktywuje acetylotransferazę histonową, HAT i białka histonowe ulegają acetylacji, co powoduje zmniejszenie ich powinowactwa do DNA, rozluźnienie struktury chromatyny, a przez to udostępnienie rejonów genu dla czynników transkrypcyjnych.

wiera również sygnał kierujący do jądra komórkowego oraz motyw odpowiedzialny za zmianę konformacji receptora pod wpływem związania liganda lub agonisty. Na C-końcu LBD znajduje się motyw AF-2, o sekwencji Leu-X-X-X-Leu, którego rolą jest aktywacja transkrypcji. Podobną rolę pełni AF-1. W regionach domen AF znajdują się też sekwencje wiązania specyficznych koaktywatorów oraz sekwencje warunkujące powinowactwo receptora do określonych promotorów. Region „zawiasowy” pozwala na zmienność konformacji białka pod wpływem wiązania z ligandem. Jest miejscem wiązania się koorepresorów transkrypcji i zawiera też sygnał translokacji do jądra [25].

Przed związaniem do sekwencji regulatorowej w DNA etapem wstępnym mechanizmu działania receptorów jądrowych jest modyfikacja struktury chromatyny, prowadząca do jej rozluźnienia. W sytuacji gdy receptor nie jest aktywny, chromatyna występuje w formie skondensowanej (Ryc. 4A), gdyż reszty lizyn w histonach nie są zacetylowane i dostęp do DNA jest utrudniony. W taki wypadku heterodimer receptora NR i RXR może wiązać specyficzne

Tabela 3. Zestawienie receptorów i indukowanych przez nie izoenzymów cytochromu P450.

Receptor	Izoenzymy cytochromu P450
PXR – receptor X pregnanu	CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP2C9, CYP2C19, CYP2C8
CAR – konstytutywny receptor androstanu	CYP2B1, CYP2B2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4
AHR – Aryl hydrocarbon receptor	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1
PPAR – receptor aktywowany przez proliferatory peroksydomów	CYP4A1, CYP4A2, CYP4A3
LXR – receptor X wątrobowy	CYP7A1
FXR – receptor X farnesolu	CYP7A1

korepresory, NCoR i SMRT, oddziałujące z deacetylazami histonowymi (HDAC). Konsekwencją takiego stanu jest zahamowanie transkrypcji [26]. W odpowiedzi na aktywację receptora, np. poprzez związanie z ligandem lub poprzez fosforylację, znacząco zmienia się struktura domeny wiążącej ligand, prowadząc do zmiany położenia domeny aktywacyjnej AF-2 (Ryc. 4B). Następuje wówczas dysocjacja korepresora, którego zastępuje koaktywator, np. SRC-1, lub p300/CPB. Koaktywator aktywuje acetylotransferazę histonową (HAT) i białka histonowe zostają zacetylowane, co powoduje zmniejszenie ich powinowactwa w stosunku do DNA. W konsekwencji obserwuje się rozluźnienie struktury chromatyny, dzięki czemu odpowiednie rejony genów stają się dostępne. W ten sposób lub poprzez inne działanie koaktywatora aktywowane są kolejne białka i kompleks transkrypcyjny przechodzi do stanu aktywnego, co umożliwia przyłączenie polimerazy RNAII [27].

Badania ostatniej dekady wykazały, że wiele różnorodnych ksenobiotyków będących substratami izoenzymów cytochromu P450, jest również induktorami ich receptorów jądrowych [28]. Tak więc receptory jądrowe i geny kodujące izoenzymy P450 tworzą sieć powiązań i zależności, w których enzymy metabolizując specyficzne ligandy receptorów wpływają na ich odpowiedź prowadzącą do indukcji ekspresji genów tych enzymów. Zależność ta ma zatem charakter regulacji typu sprzężenia zwrotne. Spośród receptorów jądrowych najważniejsze w regulacji ekspresji genów kodujących cytochromy P450 są dwa z nich, PXR, CAR. W tym procesie odgrywają również role receptory PPAR, LXR i FXR (Tabela 3).

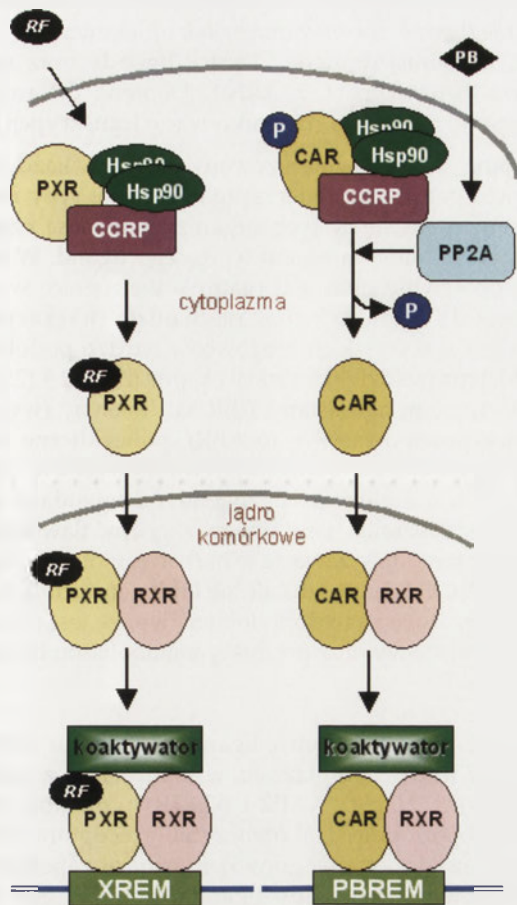
EKSPRESJA GENÓW CYP3A I CYP2B

Dwa receptory jądrowe, PXR i CAR, odgrywają główną rolę w indukcji genów, odpowiednio CYP3A i CYP2B. Rodziny białek CYP3A i CYP2B to izoenzymy P450 kluczowe dla metabolizmu większości leków stosowanych w klinice, stąd receptory jądrowe PXR i CAR wzbudzają największe zainteresowanie spośród wszystkich receptorów jądrowych. Oba receptory określone były wcześniej, zgodnie z koncepcją „odwrotnej endokrynologii”, jako „receptory sieroce”, gdyż najpierw zidentyfikowano ich geny, a następnie dzięki identyfikacji ligandów specyficznych dla białek PXR i CAR poznano ich rolę w metabolizmie ksenobiotyków [29]. Jednak lista genów regulowanych przez oba receptory jest znacznie szersza (Tabela 4). Należą do niej zarówno enzymy biorące udział w oksydacyjnym utlenianiu ksenobiotyków w fazie I metabolizmu, jak i w koniugacji fazy II i w transporcie zaliczanym do fazy III przemian ksenobiotyków [30]. PXR i CAR okazały się również niezbędne w ochronie

mózgu, ponieważ mogą wzmacniać barierę krew–mózg poprzez indukcję syntezy glikoproteiny P, należącej do rodziny białek ABC, która jest transporterem błonowym [31]. W przypadku obu receptorów droga przekazywania sygnałów dla uruchomienia transkrypcji jest jeszcze niejasna. Wyniki badań prowadzonych na myszach pozwoliły na stwierdzenie, że przynajmniej na ostatnim etapie zachodzącym w jądrze komórkowym, mechanizmy działania obu receptorów PXR i CAR, są podobne.

Pierwsze doniesienia na temat receptora pregnanu (PXR) pojawiły się w 1998 roku [32]. Receptor PXR występuje przede wszystkim w wątrobie, w jelicie cienkim, w jelicie grubym i w nerkach. Endogennymi ligandami PXR są pregnany, od których receptor wzięł swoją nazwę i do których wykazuje najsilniejsze powinowactwo. W nieobecności liganda w cytoplazmie receptor tworzy kompleks z białkami Hsp90 i CCRP (Ryc. 5). Istnienie kompleksu PXR:Hsp90:CCRP zostało potwierdzone eksperymentalnie. Stwierdzono bowiem, że w wyniku nadekspresji genów kodujących białko CCRP, ilość cząsteczek receptora PXR w cytoplazmie wzrasta [33]. Przyłączenie liganda, którym może być np. rifampicyna (RF), aktywuje receptor, co prowadzi do dysocjacji kompleksu z białkami opiekuńczymi i umożliwia transport receptora do jądra. Tam receptor pregnanu tworzy heterodimer z receptorem RXR. Jednocześnie następuje związanie koaktywatora, rozluźnienie chromatyny i dimer PXR/RXR wiąże się ze specyficznymi sekwencjami DNA. W przypadku CYP3A4 człowieka są to tzw. elementy odpowiedzi na ksenobiotyki (XREM i ER6), które bezpośrednio indukują transkrypcję [34,35].

PXR jest receptorem o dość szerokiej specyficzności i słabym powinowactwie do ligandów. Na podstawie struktury krystalicznej domeny wiążącej ligand stwierdzono, że hydrofobowa kieszeń, jako miejsce wiązania liganda jest większa niż u większości receptorów jądrowych. W pobliżu kieszeni znajduje się dodatkowa pętla, co prawdopodobnie daje możliwość wiązania się do niej zarówno większych jak i mniejszych ligandów. Co więcej, analiza struktury krystalicznej LBD z wybranym ligandem pozwoliła stwierdzić, że ligand może być umieszczony w niszy domeny w trzech różnych położeniach [25]. Tak więc PXR, odmiennie od innych receptorów jądrowych, jest dość „wszechstronnym” receptorem, zdolnym do oddziaływania z wieloma ligandami. Jest też zaangażowany w metabolizm kwasów żółciowych. Z jednej strony może być indukowany przez kwasy żółciowe, z drugiej strony jest zaangażowany w hamowanie ekspresji genu izoenzymu CYP7A, katalizującego reakcję biosyntezy kwasów żółciowych z cholesterolu. Dodatko-



Rycina 5. Schemat szlaku przesyłania sygnału z udziałem receptorów jądrowych PXR i CAR (według [32,34]). W nieobecności liganda, w cytoplazmie receptory PXR i CAR tworzą kompleks z białkami opiekuńczymi i umożliwia transport receptora do jądra, gdzie tworzy heterodimer z RXR. Jednocześnie następuje związanie koaktywatora i dimer PXR/RXR wiąże się do motywu XREM sekwencji DNA, co indukuje transkrypcję mRNA. Fenobarbital (PB) prawdopodobnie indukuje fosfatazę PP2A, która katalizuje reakcję defosforylacji receptora CAR, umożliwiając jego transport do jądra. Tam mogą nastąpić dalsze modyfikacje CAR, po czym tworzy się heterodimer CAR/RXR, który rozpoznaje specyficzną sekwencję PBREM, aktywując polimerazę RNAII.

wo, PXR bierze udział w indukcji ekspresji genów białek transformujących kwasy żółciowe do ich nietoksycznych metabolitów oraz genów kodujących białka transportujące te metabolity poza komórkę [21]

Konstytutywny receptor androstanu (CAR), występuje głównie w wątrobie, a w mniejszej ilości w jelicie cienkim i w żołądku. W odróżnieniu od większości receptorów jądrowych, które składają się z pięciu domen, CAR posiada trzy: domenę wiążącą DNA, region zawiasowy i domenę wiążącą ligand [33]. Został początkowo zidentyfikowany jako receptor konstytutywny niewymagający do aktywacji wiązania z ligandem. Wcześniej wykazano, że fenobarbital (PB), indukuje ekspresję genów kilku rodzin izoenzymów P450, szczególnie *CYP2B*. Jednak nie udało się wówczas wykazać, że PB jest ligandem jakiegokolwiek receptora. Znalaziono natomiast rejon regulatorowy genu *CYP2B2*, na którego aktywację miał wpływ PB. Region ten nazwany PBREM [36,37] wzbudził nadzieję na identyfikację receptora PB. Jednocześnie, w trakcie niezależnie prowadzonych badań odkryto jądrowy receptor sierocy, tworzący heterodimer z RXR i wiążący się z sekwencją RARE DNA. Drugie białko dimeru zidentyfikowano wówczas jako CAR, opierając się na fakcie, że może on aktywować transkrypcję z modułu RARE, bez konieczności przyłączenia egzogenego liganda. W wyniku dalszych badań udało się wykazać, że CAR wykryty w kompleksie RXR wiążącym się do sekwencji RARE jest tym samym receptorem, który miał wpływ na ekspresję genu *CYP2B* poprzez oddziaływanie z regionem PBREM. Okazało się zatem, że CAR może regulować indukcję *CYP2B* z udziałem PB. Wykazano też, że w hepatocytach w nieobecności liganda, CAR, podobnie jak PXR, jest zlokalizowany w cytosolu, a jego transport do jądra jest zależny od PB lub od związków o podobnych właściwościach mimo, że nie są ligandami tego receptora [25]. Wyniki innych badań udowodniły, że ligandem CAR u myszy jest metabolit testosteronu, androstan, będący odwrotnym agonistą tego receptora. Odwrotnymi agonistami CAR człowieka są oprócz androstanu także polichlorowane węglowodory aromatyczne, chlorowane pestycydy (np. DDT i metoksychlor) oraz lek przeciwgrzybiczy, klotrimazol [37]. Zidentyfikowano też

związek o właściwościach selektywnego agonisty CAR; jest nim pochodna imidazotiazolu – CITCO.[38]

W świetle powyższych faktów wydaje się, że działanie receptora CAR może przebiegać co najmniej dwoma drogami, poprzez jego ligandy będące odwrotnymi agonistami oraz poprzez działanie fenobarbitalu, którego struktura odbiega od agonistów CAR (Ryc. 5). Obie drogi prowadzą jednak do umiejscowienia tego receptora w jądrze i wiązania z tą samą sekwencją DNA. Fenobarbital prawdopodobnie indukuje fosfatazę PP2A, która katalizuje reakcję defosforylacji receptora,

Tabela 4. Geny docelowe dla receptorów PXR i CAR oraz AhR.

Geny docelowe dla receptora PXR
<i>CYP3A4</i> ; <i>CYP3A5</i> ; <i>CYP3A7</i> ; <i>CYP2B6</i> ; <i>CYP2C8</i> ; <i>CYP2C9</i> ; <i>CYP2C19</i> – I faza metabolizmu <i>SULT</i> (sulfotransferaza); <i>UGT1A1</i> , <i>UGT1A3</i> (UDP-glukuronylotransferaza) – II faza metabolizmu <i>MDR1</i> , <i>MRP1</i> – geny kodujące białka transportowe z rodziny ABC
Geny docelowe dla receptora CAR
<i>CYP2B1</i> ; <i>CYP2B2</i> ; <i>CYP2B6</i> ; <i>CYP2C9</i> ; <i>CYP2C19</i> ; <i>CYP3A4</i> – I faza metabolizmu <i>SULT</i> (sulfotransferaza); <i>UGT1A1</i> , <i>UGT2B1</i> (UDP-glukuronylotransferaza) – II faza metabolizmu <i>MRP1</i> – geny kodujące białka transportowe z rodziny ABC
Geny docelowe dla receptora AHR
<i>CYP1A1</i> ; <i>CYP1A2</i> ; <i>CYP1B1</i> – I faza metabolizmu <i>GSTA2</i> – tranferaza glutationu – II faza metabolizmu <i>UGT1A1</i> , <i>UGT1A6</i> (UDP-glukuronylotransferaza) – II faza metabolizmu <i>p21</i> ; <i>p27</i> ; <i>c-jun</i> ; <i>junD</i> ; <i>IL-2</i> ; <i>Bax</i> ; <i>IGFBP-1</i> – proliferacja i różnicowanie komórek

umożliwiając w ten sposób jego transport do jądra, gdzie być może zachodzi ponowna fosforylacja. W jądrze mogą nastąpić dalsze modyfikacje CAR, związane z oddziaływaniem koregulatorów typu SMRT, SRC-1 lub GRIP-1, po czym, podobnie jak w przypadku PXR, tworzy się heterodimer CAR/RXR. W formie dimeru receptor rozpoznaje specyficzną sekwencję PBREM, która jest zachowana w ewolucji u różnych gatunków i zawiera motywy DR3, DR5 i ER6, będące również sekwencjami rozpoznawczymi dla PXR. W następstwie rozpoznania sekwencji następuje oddziaływanie z białkami odpowiedzialnymi za transkrypcję [38,39].

Podsumowując, indukcja ekspresji genów z udziałem PXR i CAR ma wiele punktów stycznych. Oba receptory mogą indukować te same geny poprzez te same sekwencje rozpoznawcze, chociaż rola typowych induktorów rifampicyny i fenobarbitalu w ekspresji tych genów jest odmienna. Szczególnie zaproponowany model działania PB, nie będącego ligandem CAR, może wskazywać, że mechanizm kowalencyjnej modyfikacji aktywności białka przez fosforylację może być istotny również w przypadku innych receptorów jądrowych. Do wyjaśnienia pozostaje też odpowiedź na pytanie czy istnieją endogenne ligandy tych receptorów lub ich endogenni agoniści.

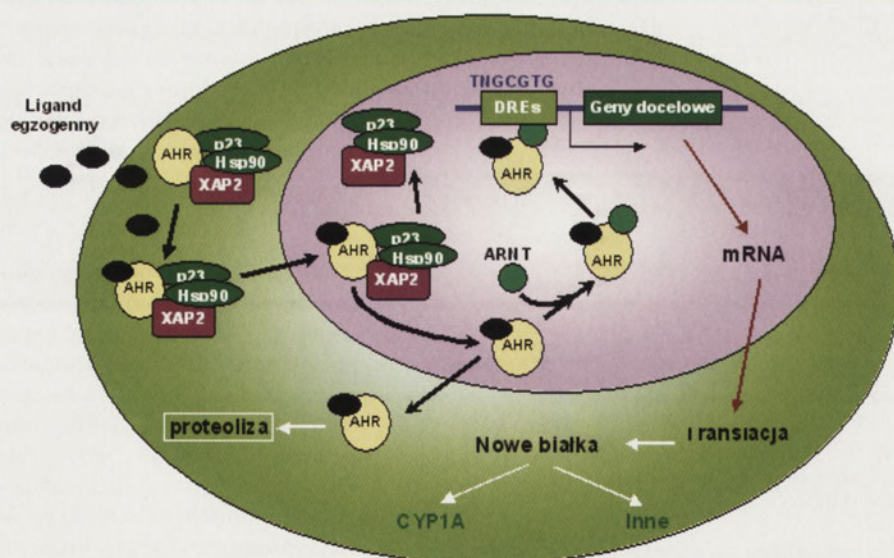
EKSPRESJA GENÓW CYP1A

Geny kodujące izoenzymy CYP1A są genami docelowymi dla receptora AhR należącego do rodziny czynników transkrypcyjnych bHLH-PAS. Jego rola w indukcji metabolizmu związków kancerogennych została poznana wcześniej niż rola PXR i CAR w metabolizmie leków. AhR zawiera domenę bHLH, znajdującą się na N-końcu białka, którą tworzą dwie α -helisy oraz motyw zbudowany z hydrofobowych reszt aminokwasowych. Bierze on udział w tworzeniu dimerów na szlaku przekazywania sygnałów i odpowiednim

ich „ustawieniu” w rejonie regulatora transkrypcji. Domeny PAS są niezbędne dla wiązania białek opiekuńczych, Hsp90 i XAP2, zawierają domenę wiążącą ligandy oraz miejsce tworzenia heterodimeru z ARNT. Domena C-terminalna (TAD) jest odpowiedzialna za aktywację transkrypcji [21].

Receptor AhR jest syntetyzowany prawie w każdej tkance, u wielu gatunków zwierząt (gady, ptaki, ryby i ssaki), przy czym różni się w tych organizmach masą cząsteczkową, a także budową rejonu wiążącego ligand. W konsekwencji obserwuje się międzygatunkowe różnice w powinowactwie do liganda. Jednak mechanizm przekazywania sygnału jest u wszystkich kręgowców bardzo podobny i u wszystkich prowadzi do indukcji ekspresji CYP1A [25]. Najlepiej poznanymi agonistami AhR są dioksyny (wykazują najwyższe powinowactwo do AhR), policykliczne węglowodory aromatyczne (benzo[a]piren i 3-metylocholanren) i polichlorowane bifenyle. Egzogenne ligandy są też związki pochodzenia naturalnego z grupy flawonoidów, indoli i karotenoidów zawarte w herbacie, ziołach, owocach i warzywach. Ciągłe poszukuje się endogennych ligandów AhR. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że jest nim m.in. kwas arachidonowy oraz produkty metabolizmu hemu, np. bilirubina [40].

W stanie niezwiązanym z ligandem receptor AhR zlokalizowany jest w cytoplazmie, w kompleksie z białkami opiekuńczymi, Hsp90, XAP2 i p23 (Ryc. 6). Rolą Hsp90 jest prawdopodobnie „zakotwiczenie” receptora w cytoplazmie oraz utrzymanie go w konformacji zapewniającej wysokie powinowactwo do liganda, podczas gdy XAP2 utrzymuje odpowiedni stopień pofałdowania białka, a p23 kontroluje etap związania liganda. Po związaniu liganda AhR ulega zmianie konformacyjnej, eksponując sekwencję kierującą do jądra komórkowego (NLS) i w konsekwencji transportowany jest do jądra. Tam następuje dysocjacja kompleksu receptora z białkami opiekuńczymi i wiązany z ligandem receptor wiąże się z białkiem ARNT. Heterodimer AhR/ARNT oddziałuje następnie z koaktywatorami (p300/CPB) indukującymi acetylotransferazę histonową (HAT), po czym wiąże się ze rejonem genu docelowego o sekwencji 5'-TNGCGTG-3' i aktywuje transkrypcję [40]. Podana sekwencja regulatorowa została po raz pierwszy zidentyfikowana w genie kodującym CYP1A1 myszy i nazwano ją DRE lub XRE. Sekwencję DRE zidentyfikowano w wielu genach indukowanych przez receptor AhR, nazwanych genami *Ah*, do których należą nie tylko CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, ale także geny kodujące inne enzymy, np. zależną od NADPH oksydoreduktazę chinonową, dehydrogenazę aldehydową, transferazę UDP-glukuronianową i transferazę glutationową. AhR pełni zatem rolę mediatora pomiędzy indukcją metabolizmu aktywacyjnego i detoksykacyjnego ksenobiotyków [25].



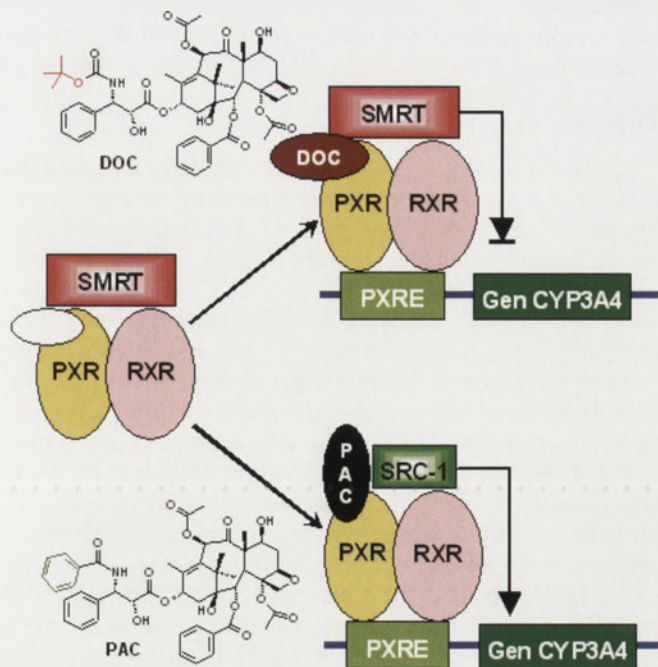
Rycina 6. Schemat działania receptora AhR (na podstawie [39]). W stanie niezwiązanym z ligandem receptor AhR znajduje się w cytoplazmie, w kompleksie z białkami opiekuńczymi: Hsp90, XAP2 i p23. Po związaniu liganda AhR transportowany jest do jądra, gdzie następuje dysocjacja kompleksu receptora z białkami opiekuńczymi i wiązanie z ligandem receptor wiąże się z białkiem ARNT. Heterodimer AhR/ARNT oddziałuje z koaktywatorami po czym wiąże się do specyficznego regionu regulatorowego o sekwencji 5'-TNGCGTG-3' i aktywuje transkrypcję CYP1A

Zwraca uwagę fakt, że przedłużone działanie agonisty AhR nie tylko aktywuje jego transkrypcję, ale indukuje również syntezę własnego represora, białka AhRR. Znajduje się ono w jądrze komórkowym i wiąże ARNT. Powstały heterodimer, AhRR/ARNT, podobnie jak AhR/ARNT, wiąże się z sekwencją DRE i tym samym hamuje działanie receptora AhR [41]. Natomiast droga proteolitycznej degradacji białka AhR jest indukowana przez sekwencję eksportu jądrowego, która odgrywa kluczową rolę w usuwaniu receptora z jądra. W cytoplazmie, AhR ulega niemal natychmiastowej ubikwitylacji. W nieobecności liganda, receptor w kompleksie z białkami opiekuńczymi nie ulega degradacji [42].

ROLA RECEPTORÓW JĄDROWYCH W ODDZIAŁYWANIACH LEK-LEK

Chociaż indukcja ekspresji genów kodujących izoenzymy cytochromu P450 jest odpowiedzią adaptacyjną jako ochrona przeciwko działaniu ksenobiotyków, jednakże odpowiedź ta stanowi jednocześnie źródło oddziaływań lek-lek. Analizując geny docelowe dla poszczególnych receptorów jądrowych można zauważyć, że receptory PXR i CAR pośredniczą w regulacji największej liczby enzymów i białek transportujących uczestniczących w biotransformacji leków. Aktywacja tych receptorów wiąże się, z ważnymi z klinicznego punku widzenia, oddziaływaniami pomiędzy stosowanymi farmaketykami. Klasyčnym tego przykładem są rifampicyna i hyperforyna, będące aktywatorami PXR oraz fenobarbital i fenytoina, aktywatory CAR. Aktywacja PXR i CAR powoduje obniżenie stężenia innych ksenobiotyków i leków, które są przekształcane przez ulegające jednoczesnej indukcji izoenzymy CYP3A i CYP2B. Rifampicyna wpływa na poziom metabolizmu leków z grupy przeciwzkrzepowych, antykonceptyjnych i glikokortykoidów. Wykazano, że stosowanie RF już po 8 dniach powoduje wzrost stężenia mRNA kodującego CYP3A4, glikoproteinę P i MRP2, co prowadzi do wzrostu tempa metabolizmu innych leków np. warfaryny. Podobnie jest w przypadku hyperforyny, agonisty receptora PXR. Będąc aktywnym składnikiem leków antydepresyjnych przyjmowana w terapii łącznie z innymi lekami powoduje znaczącą zmianę w ich farmakokinetyce [43].

Aktywacja receptora PXR pociąga za sobą istotne konsekwencje kliniczne również w przypadku leków przeciwnowotworowych. Długa ekspozycja komórek organizmu na działanie leków przeciwnowotworowych i ich metabolitów, może prowadzić do niebezpiecznych skutków sprzyjając nawrotowi choroby [44]. Charakterystycznym przykładem leków, których działanie wywołuje odmienne oddziaływanie lek-lek są przeciwnowotworowe leki antymitotyczne: paklitaksol (PAC) i docetaksol (DOC). Oba związki są podobne strukturalnie, jednak działają odmiennie na receptor PXR (Ryc. 7). Paklitaksol zachowuje się jak typowy agonista tego receptora. Wiąże się z nim, indukując dysocjację korepresora SMRT, a następnie przyłączenie koaktywatora SRC-1, co pozwala na oddziaływanie z kompleksem transkrypcyjnym i ekspresję genów kodujących izoformy CYP3A4. Badania *in vitro* potwierdziły indukcję syntezy izoenzymu CYP3A4 w wyniku traktowania komórek paklitaksolem. Docetaksol nie wykazuje takiej zdolności. Okazało się, że powoduje on taką zmianę konformacji w obrębie domeny receptora wiążącej ligand (LBD), która uniemożliwia dysocjację kompleksu



Rycina 7. Mechanizm oddziaływania leków przeciwnowotworowych paclitaksolu (PAC) i docetaksolu (DOC) z receptorem PXR (na podstawie [41,42]). PAC wiąże się z PXR indukując dysocjację korepresora SMRT, a następnie przyłączenie koaktywatora SRC-1, co pozwala na oddziaływanie z kompleksem transkrypcyjnym i ekspresję genów CYP3A4. DOC powoduje zmianę konformacji w obrębie domeny receptora wiążącej ligand, co uniemożliwia dysocjację kompleksu z korepresorem SMRT, a więc uniemożliwia związaną z koaktywatorem i indukcją ekspresji genu CYP3A4 nie zachodzi.

su z korepresorem SMRT, a więc uniemożliwia związaną z koaktywatorem i w konsekwencji nie obserwuje się indukcji ekspresji genu CYP3A4 [45,46]. Tak więc podczas terapii wielolekowej z paklitaksolem podwyższonej metabolicznej aktywacji będą ulegały leki metabolizowane przez CYP3A4, co nie nastąpi w przypadku docetaksolu.

Oddziaływania lek-lek są również obserwowane podczas stosowania tamoksyfenu i cyklofosfamidu. Z jednej strony oba leki obniżają stężenie w cytoplazmie związków podawanych z nimi jednocześnie. Z drugiej strony tamoksyfen, będąc antagonistą receptorów estrogenowych, wiąże się z receptorem w tym samym miejscu co estradiol. Jednak nie mieści się w kieszeni wiążącej ligand i indukuje takie zmiany konformacyjne białka, które powodują zablokowanie ekspresji odpowiednich genów [46]. Cyklofosfamid z kolei, jest metabolizowany przez CYP3A4 i CYP2B6 do cytotoksycznego 4-hydroksycyklofosfamidu. Stosowanie łącznie cyklofosfamidu z typowymi agonistami receptorów PXR i CAR, fenobarbitalem, dexametazonem i rifampicyną, prowadzi do wysokiego stężenia toksycznego metabolitu [48].

Inaczej niż paklitaksol, tamoksyfen i cyklofosfamid działała ET-743 (Yondelis®). Związek jest antagonistą receptora PXR i wykazano, że prowadzi do inhibicji ekspresji nie tylko genu *Cyp3A4*, ale również genu białka błonowego *MDR1*. Funkcją białka *MDR1* jest usuwanie z komórki związków hydrofobowych, w tym większości leków przeciwnowotworowych, co znacznie obniża ich efektywne stężenie prowadząc do oporności na leki. Dlatego stosowanie ET-743

łącznie z doksorubicyną podwyższa jej stężenie w komórce, co w rezultacie daje lepszy efekt terapii przeciwnowotworowej [49].

PODSUMOWANIE

Polimorfizm genów cytochromów P450 oraz indukcja ich ekspresji, różnią się w swojej naturze, mimo że obie grupy czynników mają istotny wpływ na aktywność enzymów metabolizujących substancje endo- i egzogenne, w tym leki, substancje toksyczne i kancerogeny. Wiedza o skutkach polimorfizmu genów enzymów metabolizujących pozwala z jednej strony przewidzieć różnice w efekcie działania leków u różnych pacjentów, z drugiej zaś określić ryzyko zachorowania na choroby wynikające z metabolizmu związków toksycznych obecnych w środowisku, w tym związków prokancerogennych. Zatem genotypowanie izoenzymów P450 może pomóc w identyfikacji pacjentów zagrożonych wystąpieniem efektów ubocznych związanych z osłabionym metabolizmem lub ze zbyt silną aktywacją leków. Powstały w tym celu bazy danych o różnicach w strukturze genów enzymów i o częstości ich występowania wśród różnych populacji, m.in. „Hap Map Project” [13]. Identyfikacja receptorów odpowiedzialnych za ekspresję genów kodujących enzymy metabolizujące leki oraz ich ligandów, agonistów i antagonistów to ciągle cel intensywnych prac badawczych. Zmierzają one do określenia mechanizmów przekazywania informacji od receptora do czynników transkrypcyjnych i polimerazy RNAII. Ostatnie 10 lat przyniosło istotne poszerzenie wiedzy o receptorach jądrowych PXR i CAR związanych z metabolizmem leków, wcześniej poznano rolę AhR w aktywacji związków kancerogennych oraz znaczenie PPAR dla metabolizmu kwasów tłuszczowych. Wiedza o indukcji genów enzymów katalizujących β - i ω -oksydację kwasów tłuszczowych z udziałem PPAR pozwoliła znaleźć nowe ligandy tego receptora i rozszerzyć grupę leków zwanych fibratami, których prekursorem jest obniżający stężenie triglicerydów i cholesterolu w osoczu, klofibrat. Fakt ten stwarza nadzieję, że poszerzenie wiedzy o mechanizmach indukcji genów metabolizujących z udziałem PXR i CAR pozwoli efektywniej sterować terapią wielolekową pacjentów cierpiących na wiele trudnych do wyleczenia chorób, w tym chorób nowotworowych.

PIŚMIENNICTWO

- Guengerich FP (2003) Cytochromes P450, Drugs and Diseases. *Mol Interv* 3: 194-204
- Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M (2006) Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 13: 1679-1691
- Ingelman-Sundberg M (2001) Implications of polymorphic cytochrome P450-dependent drug metabolism for drug development. *Drug Metab Dispos* 29: 570-573
- Buetow KH, Edmonson MN, Cassidy AB (1999) Reliable identification of large numbers of candidate SNPs from public EST data. *Nat Genet* 21: 323-325
- Hewitt NJ (2007) Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes transporter proteins and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter clearance and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 39: 159-234
- Tang C, Lin JH, Lu AYH (2005) Metabolism – based drug – drug interactions: what determines individual variability in cytochrome P450 induction? *Drug Metab Dispos* 33: 603-613
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839
- Rowland P, Blaney FE, Smyth MG, Jones JJ (2006) Crystal structure of human Cytochrome P450 2D6. *J Biol Chem* 281: 7614-7622
- Sakaki T, Inouye K (2000) Practical application of mammalian cytochrome P450. *J Biosci Bioeng* 90: 583-590
- Guengerich FP (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J* 8: E101-E111
- Guengerich FP (2005) Human cytochrome P450 enzymes. W: Ortiz de Montellano PR (red) *Cytochrome P450: Structure mechanism and biochemistry*, Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, str. 377-530
- Guttmacher AE, Collins FS (2003) Inheritance and drug response. *NEJM* 348: 529-537
- Ingelman-Sundberg M, Rodriguez-Antona C (2005) Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy. *Phil Trans R Soc B* 360: 1563-1570
- Gardiner SJ, Begg EJ (2006) Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes and clinical practice. *Pharmacol Rev* 58: 521-590
- Mathijssen RHJ, Schaik RHN (2006) Genotyping and phenotyping cytochrome P450: perspectives for cancer treatment. *Eur J Cancer* 42: 141-148
- Morag CE, McFadyen MCE, Melvin WT, Murray GI (2004) Cytochrome P450 enzyme: novel options for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 3: 363-371
- Van Shaik RHN (2005) Cancer treatment and pharmacogenetics of cytochrome P450 enzymes. *Investigational New Drugs* 23: 513-522
- Nebert D, Russel DW (2002) Clinical importance of cytochrome P450. *Lancet* 360: 1155-1162
- Van Shaik RHN (2004) Implications of cytochrome P450 genetic polymorphism on the toxicity of antitumor agents. *Ther Drug Monit* 26: 236-240
- Buzkova H, Pechandova K, Slanar O, Perlik F (2006) Genetic polymorphism of cytochrome P450 and methods for its determination. *Prague Medical Report* 107: 383-393
- Vandel Heuvel JP (2002) Xenobiotic receptor system, W: Vanden Heuvel JP, Perdeu GH, Mattes WB, Greenlee WF (red) *Comprehensive Toxicology*, vol. XIV. Cellular and molecular Toxicology, Elsevier Science, str. 86-92
- Bain DJ, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, Miura MT (2007) Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu Rev Physiol* 69: 201-220
- Synold TW, Dussalt I, Forman BM (2001) The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med* 7: 584-590
- Monostory K, Pascucci JM (2008) Regulation of drug – metabolizing human cytochrome P450s. *Acta Chim Slov* 55: 20-37
- Williams SN, Dunham E, Bradfield CA (2005) Induction of cytochrome P450 enzymes. W: Ortiz de Montellano PR (red.), *Cytochrome P450: Structure mechanism and biochemistry*, Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, str. 323-346
- Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG (1999) Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 9: 147-149
- Ruan XZ, Varghese Z, Powis SH, Moorhead JF (2005) Nuclear receptors and their coregulators in kidney. *Kidney International* 68: 2444-2461
- Honkakoski P, Negishi M (2000) Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* 347: 321-337
- Kliwer SA, Goodwin B, Willson TM (2002) The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocrine Rev* 23: 687-702
- Kliwer SA (2003) The nuclear pregnane X receptor regulates xenobiotic detoxification. *J Nut* 133: 2444S-2447S
- Bauer B, Yang X, Hartz AM, Olson ER, Zhao R, Kalvess JC (2006) *In vitro* activation of human pregnane X receptor tightens the blood-brain

- barrier to methadone through P-glycoprotein up-regulation. *Mol Pharmacol* 70: 1212-1219
32. Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterstrom RH, Perlmann T, Lehmann JM (1998) An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 92: 73-82
 33. Squires EJ, Sueyoshi T, Negishi M (2004) Cytoplasmic localization of pregnane X receptor and ligand independent nuclear translocation in mouse liver. *J Biol Chem* 279: 49307-49314
 34. Svecova L, Vrzal R, Burysek L, Anzenbacherova E, Cerveny L, Grim J, Tretnar F, Kunes J, Pour M, Staud F, Anzenbacher P (2008) Azole antimycotics differentially affect rifampicin-induced pregnane X receptor-mediated CYP3A4 gene expression. *Drug Metab Dispos* 36: 339-348
 35. Timsit Y, Negishi M (2007) CAR and PXR: The xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* 72: 231-246
 36. Trottier E, Belzil A, Stoltz C, Anderson A (1995) Localization of a Phenobarbital-responsive element (PBRE) in the 5'-flanking region of the rat CYP2B2 gene. *Gene* 156: 263-268
 37. Moore LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB (2000) Orphan nuclear receptors, constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem* 275: 15122-15127
 38. Maglich JM, Parks DJ, Moore LB, Collins JL, Goodwin B, Billin AN (2003) Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. *J Biol Chem* 278: 17277-17283
 39. Wei P, Zhang J, Egan-Hafley M, Liang S, Moore DD (2000) The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature* 407: 920-923
 40. Nguyen LP, Bradfield CA (2008) The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol* 21: 102-116
 41. Baba T, Mimura J, Gradin K, Kuroiwa A, Watanabe T, Matsuda Y, Inazawa J, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (2001) Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J Biol Chem* 276: 33101-33110
 42. Lees MJ, Peet DJ, Whitelaw (2003) Defining the role for XAP2 in stabilization of the dioxin receptor. *J Biol Chem* 278: 35878-35888
 43. Willson TM, Kliewer SA (2002) PXR, CAR and drug metabolism. *Nature Rev* 1: 259-266
 44. Relling MV, Pui CH, Sandlund JT, Rivera GK, Hancock ML, Boyett JM (2000) Adverse effect of anticonvulsant on efficacy of chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 356: 285-290
 45. Nallani SC, Goodwin B, Maglich JM, Buckley DJ, Buckley AR, Desai PB (2003) Induction of cytochrome P450 3A by paclitaxel in mice: pivotal role of the nuclear xenobiotic receptor, pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos* 31: 681-684
 46. Nallani SC, Goodwin B, Buckley AR, Buckley DJ, Desai PB (2004) Differences in the induction of cytochrome P450 3A4 by taxane anticancer drugs, docetaxel and paclitaxel, assessed employing primary human hepatocytes. *Cancer Chemother Pharmacol* 54: 219-229
 47. Shiao AK, Brstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL (1998) The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95: 927-937
 48. Lindley C, Hamilton G, McCune JS, Faucette S, Shord SS, Hawke RL (2002) The effect of cyclophosphamide with and without dexamethasone on cytochrome P450 3A4 and 2B6 in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 30: 814-822
 49. Kanzaki A, Takebayashi Y, Ren XQ, Miyashita H, Mori S, Akiyama S (2002) Overcoming multidrug drug resistance in P-glycoprotein/MDR1 – overexpressing cell lines by ecteinascidin. *Mol Cancer Ther* 1: 1327-1334

Polymorphism and the level of P450 gene expression in xenobiotic metabolism

Magdalena Niemira, Anita Wiśniewska, Zofia Mazerska

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

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

Keywords: AhR, antitumor drug metabolism, CAR, drug metabolism, nuclear receptors, P450 gene expression, P450 polymorphism, PXR

ABSTRACT

Polymorphism and the level of P450 gene expression influence metabolic pathway of xenobiotics. The highest number, over 40 polymorphic forms were determined for CYP2D6 enzyme and they expressed various activity. Whereas, only two forms of lower activity were found in the case of CYP2C9. However, CYP3A4 mutations have not influenced metabolic activity of the enzyme. Three transcription factors PXR, CAR and AhR are crucial for gene expression regulation of cytochrome P450. They regulate the induction of CYP3A4, CYP2B6 and CYP1A2 genes, respectively. PXR is activated by binding specific ligand, whereas the activator of constitutive CAR receptor seems not to be the ligand and it might induce dephosphorylation. After being transported to the nucleus, activated receptors PXR, CAR or AhR formed heterodimers and then, with participation of the following coactivators bind to PBREM, XREM or DRE regulatory motifs of DNA, respectively. The activation of nuclear receptors strongly influences the drug-drug interactions that are essential for the efficiency of drug, particularly in the field of anticancer therapy.

Aleksandra Karolina
Balwierz

Piotr Tymoszuik

Aneta Kasza

Zakład Biochemii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Zakład Biochemii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; tel.: (012) 664 65 21, e-mail: aneta.kasza@uj.edu.pl

Artykuł otrzymano 21 października 2008 r.
Artykuł zaakceptowano 8 maja 2009 r.

Słowa kluczowe: TTP, ZFP36, regulacja stabilności mRNA, degradacja mRNA, regulacja ekspresji genów, sekwencje ARE

Wykaz skrótów: ARE (ang. *AU rich elements*) – sekwencje bogate w adeninę i uracyl; DCP (ang. *decapping protein*) – białko usuwające czapkę; EJC (ang. *exon junction complex*) – eksonowy kompleks łącznikowy; MK2 (ang. *MAPK-activated kinase 2*) – kinaza aktywowana przez MAPK 2; TIA/TIAR (ang. *T-cell inhibitor of apoptosis/TIA-related protein*) – represory translacji związane z granulami stresowymi; TNF (ang. *tumour necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu; TTP – tristetraprolina; TRAMP (ang. *Trf4/Air2/Mtr4p polyadenylation complex*) – kompleks jądrowy o aktywności polimerazy poliadenylanowej i helikazy, aktywujący egzozom; ZFP36/Zfp36 (ang. *zinc finger protein 36*) – gen tristetraproliny człowieka/myszy

Podziękowanie: Artykuł powstał w trakcie realizacji projektu badawczego 2PO4A07829 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

STRESZCZENIE

Jednym z czynników bezpośrednio wpływających na zawartość określonego białka w komórce jest regulacja czasu półtrwania jego transkryptu. Dany transkrypt może pełnić swoją funkcję jako matryca dla wielokrotnej syntezy tego samego białka tak długo, jak długo pozostaje on w cytoplazmie, w formie związanej z rybosomami. Transkrypt ten może być także aktywnie usuwany w procesie degradacji, który podobnie jak proces transkrypcji podlega ścisłej regulacji. Ilość wolnego mRNA, które może ulec związaniu z rybosomami jest najczęściej bardzo mała i jest wynikiem różnicy w szybkości jego syntezy i rozkładu. O tym czy dany transkrypt będzie stabilny, czy też zostanie skierowany na drogę degradacji decydują głównie białka wiążące mRNA. Stanowią więc one ważny czynnik decydujący o wydajności wykorzystania danego transkryptu. W niniejszym artykule opisano podstawowe ścieżki degradacji zarówno prawidłowo zsintetyzowanego, jak i wadliwego mRNA, a następnie scharakteryzowano jedno z lepiej poznanych białek, pełniących istotną rolę w metabolizmie krótko-żyjących mRNA – tristetraprolinę (TTP).

WPROWADZENIE

Powstawanie określonego białka w komórce jest procesem wieloetapowym, obejmującym transkrypcję, translację, fałdowanie oraz modyfikacje potranslacyjne. Syntetyzowany w jądrze transkrypt podlega serii przekształceń. Do jego końca 5' dodawana jest czapeczka, wycinane są introny, a na końcu 3' dodawany jest ogon poli(A). Jeszcze przed zakończeniem transkrypcji, do mRNA przyłączane są białka odpowiadające za jego transport do cytoplazmy, między innymi kompleks wiążący czapkę, dimer białek CBP20 i CBP80 (ang. *cap-binding protein*), odpowiadający za oddziaływanie mRNA z porę jądrowym i jego eksport [1]. Już na tym etapie do nowopowstałego transkryptu przyłączone mogą zostać białka mające zdolność do kierowania go na drogę degradacji. Jeśli aktywowany zostanie egzozom (kompleks egzozonuleaz i białek wiążących RNA) degradacja może zachodzić jeszcze w jądrze. Aktywacja egzozomu odbywa się za pośrednictwem kompleksu białek TRAMP (ang. *Trf4/5-Air1/2-Mtr4p polyadenylation complex*), którego poszczególne podjednostki posiadają aktywność niezależną od matrycy polimerazy poli(A), białka wiążącego RNA oraz helikazy RNA. Ten typ degradacji dotyczy głównie rRNA, nieprawidłowych tRNA, innych populacji jądrowych RNA oraz transkryptów, które są strukturalnie wadliwe, np. nie uległy poliadenylacji [2].

Na terenie jądra komórkowego do transkryptów przyłączany jest również kompleks białek EJC (eksonowy kompleks łącznikowy, ang. *exon junctional complex*), wiążący się z mRNA w odległości 20-24 nukleotydów powyżej miejsc łączenia eksonów [3]. Jest on odpowiedzialny, razem z kompleksem inicjacji translacji i rybosomem, za aktywację mechanizmu prowadzącego do cytoplazmatycznej degradacji transkryptów posiadających przedwczesny kodon STOP (proces opisywany angielskim terminem NMD – *nonsense-mediated decay*) [4,5]. Także transkrypty pozbawione kodonu STOP czy też transkrypty, których translacja została zablokowana, zostają szybko zdegradowane, głównie w wyniku aktywacji cytoplazmatycznego egzozomu (mechanizmy określane w angielskojęzycznej literaturze terminami *no-stop decay* oraz *no-go decay*) [6].

Istnienie procesów wymienionych powyżej (NMD, *no-go decay*, *no-stop decay*) gwarantuje kontrolę jakości transkryptów. Jedynie mRNA z prawidłową strukturą (właściwe złożenie eksonów, brak przedwczesnych kodonów STOP, obecność ogona poliadenylowego) jest stabilny, pozostaje w cytoplazmie i może służyć jako matryca dla syntezy białka.

DEGRADACJA PRAWIDŁOWYCH TRANSKRYPTÓW

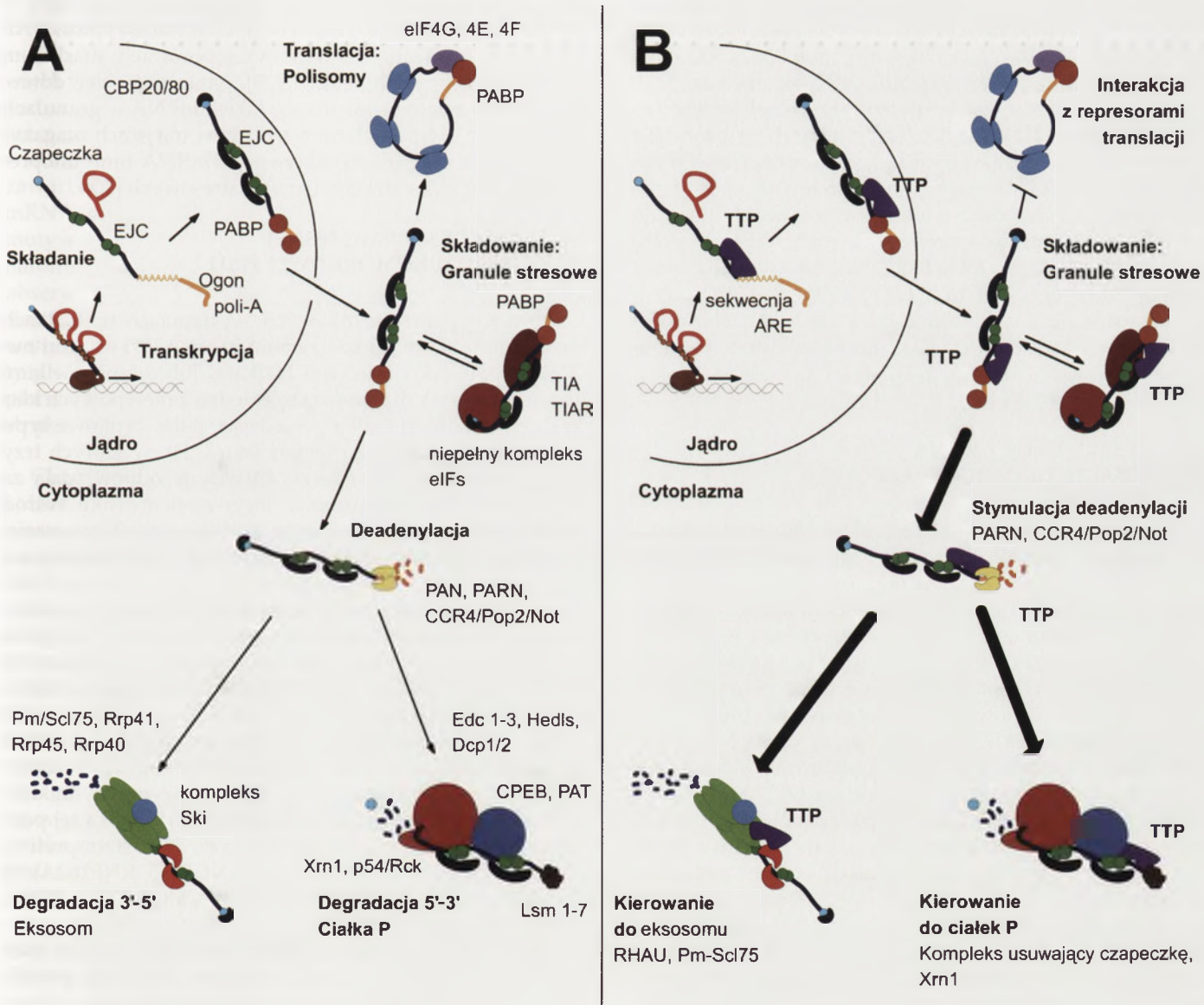
Pula mRNA dostępnego w cytoplazmie jako matryca dla syntezy białka jest determinowana przez szybkość transkrypcji i eksportu z jądra oraz przez szyb-

kość degradacji na dwóch wyspecjalizowanych drogach – w kierunku 5' do 3' oraz 3' do 5'. Możliwe jest również magazynowanie mRNA w formie związanej z represorami translacji, na przykład z białkami TIA lub TIAR (ang. *T-cell inhibitor of apoptosis* oraz *TIA-related protein*) i niepełnym kompleksem inicjacji translacji. W formie związanej z wymienionymi białkami mRNA nie ulega translacji [7]. Dobrze udokumentowane są ponadto procesy składowania transkryptów genów odpowiedzi zapalnej w tzw. granulach stresowych [8].

Degradacja prawidłowego mRNA, niezależnie od drogi rozkładu, rozpoczyna się najczęściej od deadenylicacji. Skracanie ogona poli(A) dotyczy wszystkich posiadających go

transkryptów. W komórkach eukariotycznych za deadenylicację odpowiedzialne są białka CCR4/POP2/NOT [9,10], PARN (ang. *polyA-specific RNase*) [11] i PAN (ang. *polyA-specific nuclease*) [12,13]. Deadenylicacja nie polega na usunięciu wszystkich nukleotydów adeninowych z końca 3' transkryptu. Zazwyczaj pozostaje ich kilkanaście – kilkadziesiąt z ogona liczącego pierwotnie ponad 200 [12]. Najprawdopodobniej obecność pozostałych nukleotydów adeninowych jest sygnałem aktywującym obie ścieżki degradacji.

W przypadku ścieżki 5' do 3' znacznie skrócona sekwencja poli(A) jest rozpoznawana przez kompleks LSM1-7 (ang. *U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm*), który uniemożliwia utworzenie funkcjonalnego kompleksu inicjacji transla-



Rycina 1. Podstawowe ścieżki niespecyficznego degradacji transkryptów (A) i udział białka TTP w mechanizmach degradacji niestabilnych transkryptów z elementami ARE (B). Zaznaczono charakterystyczne białka każdego z etapów degradacji i markery struktur biorących w niej udział (A) oraz białka oddziałujące z TTP (B). ARE – elementy bogate w adeninę i uracyl; CBP-białko wiążące czapeczkę 1 i 2; Edc 1-3 – kompleks stymulujący usuwanie czapeczki; Ccr/Pop/Not – kompleks o aktywności nukleazy poli(A); CPEB – represor translacji związany z ciałkami P; Dcp1/2 – białka usuwające czapeczkę; Hedls – duża podjednostka białka stymulującego usuwanie czapeczki; eIF4 E, F, G – eukariotyczne czynniki inicjacji translacji; EJC – egzonowy kompleks łącznikowy; Hedls – duża podjednostka białka stymulującego usuwanie czapeczki; Lsm1-7 – kompleks represorów translacji rekrutujący kompleks usuwający czapeczkę; U6 snRNA- białka podobne do Sm związane z U6 snRNA; p54/Rck – helikaza RNA p54 zależna od ATP związana z egzoknukleazą Xrn1; PABP – białko wiążące ogon poli(A); PAN – nukleaza poli(A); PARN – RNaza specyficzna dla poli(A); PAT – represor translacji i aktywator deadenylicacji związany z ciałkami P; Pm/Scf75, Rrp41, Rrp45, Rrp40 – niektóre składniki eksosomu cytoplazmatycznego; RHAU – helikaza swoista dla mRNA z sekwencjami ARE; Ski – kompleks białek o aktywności helikazy RNA i GTPazy, aktywujący cytoplazmatyczny egzosom; TIA/TIAR – represory translacji związane z granulami stresowymi; Xrn1 – 5'-3' egzoknukleaza 1.

cji i ułatwia przyłączenie kompleksu usuwającego czapkę [14]. Głównym składnikiem tego ostatniego kompleksu jest dimer białek DCP1/2 (ang. *mRNA-decapping enzyme*) o aktywności 5' guanylofosforylazy [15, 16]. Z transkryptem pozbawionym czapki oddziałuje następnie helikaza RCK/p54 (ang. *ATP-dependent RNA helicase p54*) [17] i współpracująca z nią RNaza XRN1 (ang. *5'-3' exoribonuclease 1*), która ostatecznie trawi transkrypt [18]. Niekiedy składniki tej ścieżki degradacji transkryptów występują w komórkach w postaci wyraźnych skupisk przypominających organelle, zwanych ciałkami P (ciałka procesywne, ang. *processive bodies, P-bodies*), będących również miejscem gromadzenia się mRNA nie ulegających translacji [19].

Druga ścieżka degradacji, odbywająca się w kierunku od 3' do 5', także ulega aktywacji w obecności deadenylowanego transkryptu [20]. Przyłączany jest jednak do niego nie kompleks LSM1-7, lecz heterooligomer białek SKI (ang. *superkiller protein*), z których jedno, SKI2, jest helikazą [21]. Aktywność helikazy jest konieczna do pełnej funkcjonalności egzozomu [21]. Jak już wspomniano, egzozom jest zespołem białek wiążących mRNA, RNaz oraz białek regulatorowych [22, 23]. Występuje on w cytoplazmie w stanie nieaktywnym, przypuszczalnie z powodu niezdolności do rozwijania struktur drugorzędowych mRNA [21]. Dopiero rozwinięty transkrypt, związany z kompleksem SKI, może oddziaływać z egzozomem [20,24] i zostać poddany procesywnej fosforolizie w kierunku od 3' do 5' [22,23]. Końcowym etapem degradacji transkryptu w egzozomie jest usunięcie czapki przez enzym DCPS (ang. *decapping scavenger protein*) [25,26] (Ryc. 1).

WPLYW SEKWENCJI ARE NA DEGRADACJĘ TRANSKRYPTÓW

Duży wpływ na stabilność transkryptów mają sekwencje bogate w adeninę i uracyl, zwane sekwencjami ARE (ang. *AU-rich element*). Można je często znaleźć w nie ulegającym translacji rejonie 3'-UTR wielu labilnych mRNA; sekwencje ARE są jednym z najpowszechniej występujących elementów destabilizujących RNA w komórkach ssaków. Bioinformatyczna analiza oparta na poszukiwaniu jednego z częściej spotykanych motywów w obrębie ARE, o rdzeniu UAUUUAU, wykazała, że aż około 8% genów człowieka zawiera te sekwencje regulatorowe. Tradycyjnie sekwencje ARE dzieli się na trzy klasy [27]: ARE klasy I zawierają kilka do kilkunastu rozproszonych kopii motywu AUUUA w rejonie bogatym w uracyl, ARE klasy II zawierają przynajmniej dwa nakładające się na siebie nonamery: UUAUUUA(U/A)(U/A), ARE klasy III stanowią regiony bogate w uracyl, ale niezawierające motywu AUUUA. ARE klasy I i częściowo też klasy III zlokalizowane są przede wszystkim w transkryptach genów wczesnej odpowiedzi komórkowej, kodujących zarówno czynniki transkrypcyjne (c-FOS), jak i białka regulujące cykl komórkowy. ARE klasy II występują natomiast prawie wyłącznie w transkryptach cytokin, z których wymienić należy m.in. transkrypty kodujące czynnik wzrostu granulocytów i makrofagów (GM-CSF, ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), czynnik martwicy nowotworów (TNF, ang. *tumor necrosis factor*) oraz interleukinę 3 (IL-3). Sekwencje ARE przyczyniają się głównie do szybszej

deadenylacji mRNA, pierwszego etapu na drodze degradacji transkryptu. Taki deadenylowany transkrypt ulega następnie dalszej degradacji w egzozomie albo w ciałkach procesywnych. Proponowany mechanizm deadenylicji polega na rozpoznaniu sekwencji ARE przez specyficzne białko, mogące jednocześnie oddziaływać z białkami wiążącymi ogon poli(A) (PABP, ang. *poly(A)-binding protein*) i z białkami pośredniczącymi w przyłączaniu egzozonukleaz [28]. Białka te konkurują o wiązanie transkryptu z białkami wiążącymi ARE o charakterze stabilizującym mRNA, jak np. HuR (ang. *Hu-antigen R*) [27].

Sekwencje ARE są nie tylko odpowiedzialne za krótki czas życia mRNA, ale również za ich lokalizację w obrębie komórki. Transkrypty z ARE gromadzą się często w skupiskach. Z zastosowaniem odpowiednio zmodyfikowanych mRNA β -globiny, zawierających 3' UTR transkryptów TNF i GM-CSF pokazano ich współwystępowanie z markerem ciałek procesywnych, hDCP1 [29]. Istnieją również doniesienia wskazujące na lokalizację takich mRNA w granulach stresowych - wspomnianych wcześniej miejscach magazynowania translacyjnie nieaktywnego mRNA (immunoprecipitacja z TIA1, markerem granul stresowych [30]).

RODZINA GENÓW WCZESNEJ ODPOWIEDZI KOMÓRKOWEJ TIS11

Motywy palców cynkowych występujące w białkach pośredniczą w ich oddziaływaniu zarówno z kwasami nukleinowymi, jak i z innymi białkami lub też niewielkimi cząsteczkami jak diacyloglicerole. Jedną z nietypowych klas tych związków są białka posiadające palce cynkowe typu CCCH (typ oznaczany również jako C_3H), w których trzy reszty cysteiny i jedna reszta histydyny odpowiadają za tworzenie wiązania koordynacyjnego z jonem cynku. Wśród białek tej klasy znajduje się m.in. podklasa białek zawierających tzw. domenę TZF (ang. *tandem zinc finger*), obejmującą dwa występujące w postaci tandemu palce cynkowe, odległe od siebie o dokładnie 18 reszt aminokwasowych i utworzone przez sekwencje aminokwasowe: $CX_8CX_5CX_3H$, gdzie X stanowi dowolną resztę aminokwasową. Do podklasy tej należą cztery białka kodowane przez rodzinę genów wczesnej odpowiedzi komórkowej TIS11 (ang. *TPA-inducible sequence 11*); geny te ulegają ekspresji w wyniku działania na komórkę m.in. estrami forbolu (TPA, ang. *12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate*) oraz naskórkowym czynnikiem wzrostu (EGF, ang. *epidermal growth factor*). Białka tej podklasy to: i) ZFP36 (ang. *zinc finger protein 36*, tristetrapolina, TTP, GOS24, ZFP-36, TIS11, NUP475, RNF162A); ii) ZFP36L1 (*ZFP36-like protein 1*, TIS11B, CMG1, ERF1, ERF-1, BRF1, BERG36, RNF162B); iii) ZFP36L2 (*ZFP36-like protein 2*, TIS11D, ERF2, ERF-2, BRF2, RNF162C); iv) ZFP36L3 (*ZFP36-like protein 3*) – białko dopiero niedawno przypisane do rodziny TIS11; przy czym u człowieka nie wykryto genu *Zfp36l3* ani też jego homologu. Białka rodziny TIS11 poza domeną TZF, posiadają również zachowaną w ewolucji domenę centralną zawierającą dwa powtórzenia sekwencji (R/K)YKTELC (w przypadku *Zfp36l3* u myszy obecna jest tylko pojedyncza sekwencja). Występująca w nich reszta cysteiny jest w obu przypadkach pierwszą resztą cysteiny palca cynkowego. Poza tymi cechami białka te nie wykazują homologii [31,32].

Przypisanie wszystkich czterech białek do jednej rodziny wydaje się być jednak słuszne, jeśli pod uwagę weźmie się ich wspólną właściwość - zdolność do wiązania mRNA i promowania jego degradacji. W oddziaływaniu z kwasem rybonukleinowym biorą udział zarówno oba palce cynkowe białek, jak i ich centralna zachowana w ewolucji domena, która umożliwia im rozpoznanie i wiązanie sekwencji ARE. Rozpoznanie mRNA odbywa się specyficznym i wynika z powstawania sieci wiązań wodorowych i elektrostatycznych pomiędzy palcami cynkowymi a kwasem nukleowym [33].

TRISTETRAPROLINA

Prototypem białek typu C₂H jest tristetraprolina (TTP), która została zidentyfikowana jako produkt genu wczesnej odpowiedzi komórkowej w fibroblastach oraz w wielu innych typach komórek po ich stymulacji insuliną, surowicą lub estrami forbolu. Jej obecność stwierdza się już nawet po pół godziny od stymulacji komórek odpowiednimi czynnikami. W komórkach niestymulowanych, zawartość TTP jest niewielka, co wynika m.in. z faktu, że mRNA kodujący to białko jest niestabilny, gdyż posiada motyw ARE w regionie 3' UTR. Sama tristetraprolina jest natomiast stosunkowo trwała. Najwyższy poziom TTP obserwuje się w śledzionie, w węzłach chłonnych i w grasicy [34]. Tristetraprolina człowieka jest białkiem zbudowanym z 326 reszt aminokwasowych, bogatym w reszty proliny, zawierającym 3 sekwencje PPPPG. Struktura pierwszorzędowa białka myszy jest w 87% identyczna ze strukturą białka człowieka [35].

Choć początkowo TTP opisywana była jako białko jądrowe, zarówno w komórkach stymulowanych, jak i niestymulowanych, szczegółowe badania wykazały jej translokację do cytoplazmy po dodaniu do hodowli komórkowych surowicy lub mitogenów [36]. Szczegółowa analiza białka wykazała, że jego N-końcowa domena oddziałuje z receptorem eksportu jądrowego CRM1 (ang. *chromosome region maintenance 1 protein homolog*) i przyczynia się do transportu TTP do cytoplazmy [36]. Dużą rolę w lokalizacji tristetraproliny odgrywa fosforylacja. Białko, w którym reszty seryny 52 i 178 są ufosforylowane gromadzi się w cytoplazmie, natomiast defosforylacja TTP powoduje jej powrót do jądra, a następnie degradację w proteasomie 20S/26S [37]. Wpływ na wewnątrzkomórkową lokalizację TTP ma również jej oddziaływanie z białkiem 14-3-3, promujące transport TTP do cytoplazmy [38].

ROLA TRISTETRAPROLINY W DEGRADACJI TRANSKRYPTÓW

TTP może uczestniczyć zarówno w inicjacji deadenylacji, jak również w kierowaniu do ostatecznej degradacji niektórych typów mRNA, zawierających głównie sekwencje ARE klasy II. TTP bierze udział nie tylko w degradacji transkryptów posiadających ogon poli(A), lecz również takich, które są go pozbawione [39]. Tristetraprolina wpływa na czas półtrwania wielu rozmaitych transkryptów. Należą do nich mRNA kodujące TNF, GM-CSF, IL-3, IL-2, c-FOS [40], PAI-2

(ang. *plasminogen activator inhibitor 2*) [41], VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor A*) [42], samą TTP [43] oraz wiele innych.

Najlepiej zbadanym przykładem transkryptu regulowanego przez TTP jest mRNA TNF. Wiązanie się TTP z sekwencją ARE w transkrypcie TNF jest zależne od integralności obu palców cynkowych i obecności jonów cynku. Związanie TTP z mRNA nie powoduje znacznej zmiany konformacyjnej RNA, wpływa natomiast na zmianę struktury tristetraproliny. Niezwykle istotną rolę w wiązaniu TTP odgrywa obecność dwóch nukleotydów adeninowych oddalonych od siebie o 3-6 par zasad w regionie bogatym w uracyl, przy czym największą siłę oddziaływania zaobserwowano dla sekwencji zawierającej AUUUUA lub AUUUUA. Zastosowanie metody NMR pozwoliło na wykazanie, że wiązanie domeny TZF tristetraproliny zachodzi tylko z jedną kopią sekwencji 5'-UUAUUUUU-3'. Transkrypt TNF zawiera pięć takich sekwencji, zachodzących na siebie w taki sposób, że przypuszcza się, iż TTP wiąże się w tym regionie w postaci tetrameru, przy czym każda z cząsteczek tristetraproliny rozpoznaje osobny motyw [44].

Być może rola tristetraproliny w regulacji czasu półtrwania transkryptów polega m.in. na zdolności do usuwania niektórych białek o charakterze protekcyjnym, wiążących się z sekwencją ARE transkryptu TNF oraz na zdolności do przyłączania egzonukleazy PARN [28]. Dokładny mechanizm i działanie TTP są jednak nadal przedmiotem badań. Pewnym jest natomiast, że sekwencje ARE pochodzące z mRNA kodującego TNF, GM-CSF [45] oraz IL-3 [46], umieszczone za sekwencją kodującą β-globinę, użyte jako gen reporterowy, kierują jej mRNA na drogę degradacji z udziałem TTP. Badając udział TTP w degradacji TNF człowieka stwierdzono, że tristetraprolina wraz z białkiem z rodziny argonautów, Ago/eIF2C, oddziałuje z jednym z mikroRNA, a konkretnie z miR-NA16 (miR16), który posiada sekwencję UAAAUAUU komplementarną do sekwencji ARE w 3' UTR mRNA dla TNF [47].

TNF jest głównym mediatorem odpowiedzi zapalnej w wielu chorobach. Związek TTP z regulacją zawartości TNF udowodniono w wielu doświadczeniach *in vivo* wykorzystujących modele chorób o podłożu zapalnym. U myszy pozbawionych genu kodującego tristetraprolinę tuż po porodzie obserwowano szybki rozwój zapalenia stawów, skóry, kacheksję, reakcję autoimmunologiczną oraz przerost szpiku, a zatem te same objawy co w przypadku podwyższonego poziomu TNF. Co więcej objawy te nie występowały u tych samych myszy, jeśli podano im przeciwciała skierowane przeciwko TNF [48]. Terapie oparte na regulacji ekspresji genu kodującego tristetraprolinę mogą zatem być skuteczne w leczeniu chorób o podłożu zapalnym, jak choroby autoimmunizacyjne czy reumatoidalne zapalenie stawów.

Ciekawym faktem jest również obecność trzech domen bogatych w AU w rejonie 3'UTR mRNA kodującym tristetraprolinę. Wykazano, że podobnie jak w przypadku TNF, obecność tego rejonu powoduje destabilizację

mRNA genu reporterowego β -globiny. Tym samym okazało się, że TTP reguluje swoją własną syntezę w sposób identyczny, jak w przypadku TNF lub GM-CSF, a więc na poziomie regulacji czasu półtrwania transkryptu. Taka autoregulacja zapobiega nadmiernej odpowiedzi komórki po stymulacji przez lipopolisacharyd (LPS) i utrzymuje zawartość TTP na odpowiednim poziomie [43].

FOSFORYLACJA TRISTETRAPROLINY

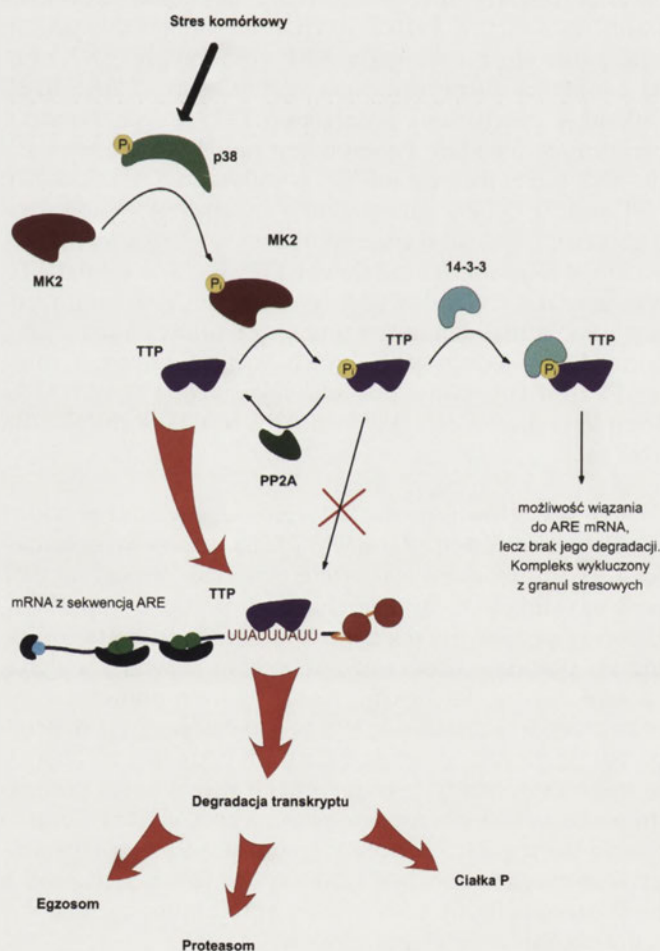
Wyniki dalszych badań nad funkcjonowaniem tristetraproliny przynosiły nowe wiadomości wskazujące na zupełnie odmienne zachowanie się białka w formie ufosforylowanej i nieufosforylowanej. Z tego względu dokładniej zbadano szlaki przekazywania sygnału odpowiedzialne za fosforylację TTP. Wykazano, że choć tristetraprolina człowieka może być ufosforylowana na wielu resztach seryny (Ser⁶⁶, Ser⁸⁸, Thr⁹², Ser¹⁶⁹, Ser¹⁸⁶, Ser¹⁹⁷, Ser²¹⁸, Ser²²⁸, Ser²⁷⁶ i Ser²⁹⁶), to najczęściej ulegają fosforylacji reszty Ser¹⁹⁷, Ser²¹⁸ oraz Ser²²⁸. Są to reszty, które potencjalnie stanowią cel kinazy białkowej A, kinazy-3 syntazy glikogenowej (GSK-3) oraz kinazy ERK-1 (ang. *extracellular signal-regulated kinase 1*) [49]. W proces fos-

forylacji tristetraproliny zaangażowane są bezpośrednio również inne, poza ERK-1, kinazy z rodziny MAP: p38, p42 (ERK2) oraz JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinase 1*) [50]. Kinaza p38 poprzez aktywację kinazy MK2 (ang. *MAPK-activated kinase 2*) przyczynia się do zwiększenia stabilności wielu mRNA kodujących białka prozapalne i posiadających sekwencję ARE. MK2 wpływa bowiem na modulację syntezy i/lub aktywności białek wiążących ARE. Badania wykazały, że MK2 katalizuje reakcję fosforylacji przede wszystkim rest Ser⁵² i Ser¹⁷⁸ tristetraproliny myszy, odpowiadające resztom Ser⁶⁰ i Ser¹⁸⁶ tristetraproliny człowieka [37]. Tak ufosforylowana TTP wiąże się z białkiem opiekuńczym 14-3-3. Pozostając w kompleksie z 14-3-3, tristetraprolina, choć nadal może wiązać się z mRNA zawierających ARE, nie jest w stanie kierować te cząsteczki na drogę degradacji [51]. Białko p38 wpływa również na stabilizację samej TTP, gdyż obecność inhibitora kinazy p38, powoduje defosforylację TTP, jej translokację z cytoplazmy do jądra i degradację w proteasomie 20S/26S [37]. Inne źródła wskazują dodatkowo na synergistyczny efekt kinaz ERK oraz p38 w stabilizacji TNF mRNA [52]. Udział kinazy JNK wydaje się natomiast sprzyjać degradacji mRNA z udziałem TTP [53] (Ryc. 2).

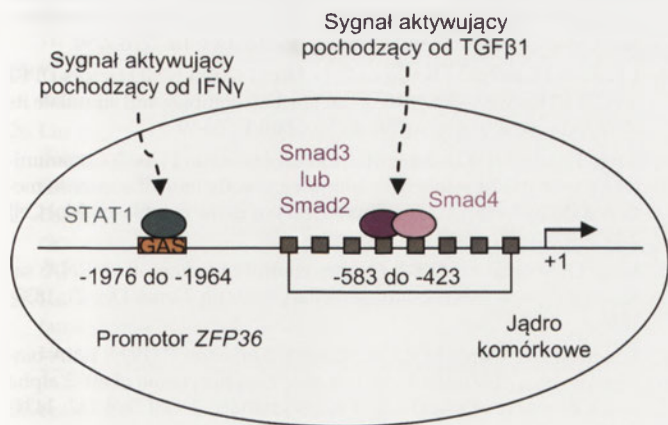
GEN ZFP36 I REGULACJA JEGO EKSPRESJI

Tristetraprolina jest kodowana przez gen *ZFP36*. Gen *ZFP36* człowieka położony jest na dłuższym ramieniu 19 chromosomu w pozycji 19q13.1 [35]. Dzięki obecności charakterystycznej sekwencji oligonukleotydu został on wytypowany jako jeden ze 101 genów człowieka potencjalnie kodujących białka posiadające motyw palców cynkowych [54].

Dotychczas niewiele wiadomo na temat indukcji transkrypcji genu *ZFP36*. Jednym z lepiej poznanych regulatorów ekspresji genu kodującego TTP jest TGF β (ang. *transforming growth factor beta*), a konkretnie jego izoforma TGF β 1. Stymulacja komórek linii HuT78, THP-1 oraz dziewiczych limfocytów T człowieka w obecności TGF β 1 prowadzi do gwałtownego zwiększenia poziomu transkryptu TTP. Badania promotora *ZFP36* (sekwencja -2682 do +56) wykazały, że jest on aktywowany przez TGF β 1. Czynniki te, wiążąc się z receptorem typu I dla TGF β , aktywuje białka SMAD (ang. *small mothers against decapentaplegic homolog*) charakterystyczne dla tej ścieżki przekazu sygnału (SMAD2 oraz SMAD3). W efekcie umożliwia to ich oddziaływanie ze SMAD4 i migrację kompleksu do jądra. Białka SMAD wiążą się w rejonie -583 do -263 promotora *ZFP36*, przy czym kolejne mutanty delecyjne wskazały na największy udział w tej regulacji obszaru -583--423, zawierającego osiem powtórzeń GTCT, rozpoznawanych przez białka SMAD [34]. Kolejnym czynnikiem wpływającym na ekspresję genu tristetraproliny jest interferon gamma (IFN γ), który działa na promotor *ZFP36* poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego STAT1 (ang. *signal transducer and activator of transcription 1*). Wiązanie dimeru STAT1 z elementem GAS (ang. *gamma activated sequences*) w pozycji -1976 do -1964 wykazano dla promotora myszy. Analiza sekwencji genu *ZFP36* człowieka wskazuje na obecność elementu GAS również w obrębie promotora [55] (Ryc. 3).



Rycina 2. Regulacja aktywności TTP poprzez fosforylację. Formy ufosforylowane poszczególnych białek oznaczono symbolicznie za pomocą litery P. p38 – kinaza MAP; MK2 – Kinaza aktywowana przez MAPK 2; TTP – Tristetraprolina; 14-3-3 – białko opiekuńcze, wiążące białka zawierające fosfoserynę; PP2A – fosfataza białkowa 2A.



Rycina 3. Aktywacja promotora ZFP36 na drodze zależnej od IFN γ oraz TGF β 1. IFN γ – Interferon gamma; TGF β 1 – Czynniki transformujący β 1; STAT1 – przekaznik sygnału i aktywator transkrypcji 1; Smad2,3,4 – czynniki transkrypcyjne z rodziny Smad; GAS – sekwencja regulatorowa, aktywowana przez IFN γ .

W przypadku neutrofilii, monocytów i limfocytów człowieka, a także linii monocytarnej THP-1 czynnikiem stymulującym syntezę TTP jest LPS. Po stymulacji tych komórek w obecności LPS ekspresja genu kodującego TTP przebiega dwuetapowo. Początkowy wzrost wynika z bezpośredniej aktywacji komórek przez LPS, natomiast kolejny wzrost ekspresji, obserwowany już po około 12 godzinach, wynika z autokrynnego wpływu TNF oraz prawdopodobnie innych cytokin, jak IL-1, IL-6 i IL-8 [56]. W postmitotycznych neutrofilach ekspresja genu tristetraproliny jest również stymulowana przez GM-CSF oraz TPA [57,58].

Jednym z czynników stymulujących transkrypcję mysiego *Zfp36* jest aktywowany przez IL-4 czynnik transkrypcyjny STAT6. Regulacja ta odbywa się poprzez bezpośrednie wiązanie się STAT6 z promotorem *Zfp36* w rejonie -576 do -567 (sekwencja TTCctaaGAA). Przeciwwzajemne działanie interleukiny 4 (IL-4) może zatem być wyjaśnione m.in. indukowaniem przez IL-4 ekspresji genu tristetraproliny, co przyczynia się do obniżenia poziomu TNF i innych cytokin prozapalnych [59]. Wyniki badań promotora *Zfp36* [60] wykazały, że już obecność zaledwie 77 par zasad powyżej miejsca startu transkrypcji wystarcza, aby uzyskać indukcję promotora *Zfp36* po stymulacji w obecności surowicy. Rejon ten zawiera sekwencje odpowiedzialne za wiązanie takich czynników transkrypcyjnych, jak EGR-1, AP2 (ang. *activator protein 2*) oraz SP1, a także sekwencję oznaczoną jako TPE1 (ang. *TTP promotor element 1*). Analiza bioinformatyczna wykazała obecność tych miejsc również w promotorze ZFP36 człowieka; prawdopodobnie zatem uczestniczą one również w regulacji ekspresji ZFP36 w organizmie człowieka.

Białko EGR-1 (ang. *early growth response protein 1*) reguluje transkrypcję niektórych protoonkogenów i czynników wzrostowych, będąc jednocześnie jednym z najpowszechniejszych regulatorów genów eukariotycznych. Czynnikiem transkrypcyjnym EGR-1 jest również

białkiem zawierającym motyw palców cynkowych. Wiąże się on w rejonie promotora *Zfp36* bogatym w GC, a konkretnie z sekwencją GCGGGGGCG. W promotorze myszy wykazano obecność rejonu odpowiedzialnego za wiązanie EGR-1 i spadek poziomu mRNA dla TTP po usunięciu tego rejonu w 35% [60]. Wykazano, że u myszy znaczenie w regulacji ekspresji genu kodującego TTP ma również sekwencja wiążąca czynnik transkrypcyjny AP2 [60]. Sekwencja ta posiada swój odpowiednik w promotorze człowieka, i co ciekawe, miejsce to pokrywa się z drugim potencjalnym miejscem wiązania czynnika EGR-1. Obserwowany wyraźny spadek ekspresji *Zfp36* po usunięciu tego rejonu (w około 18%) [60] może zatem wynikać zarówno z zahamowania efektu czynnika AP2, jak i z zahamowania efektu EGR-1.

Czynnik transkrypcyjny AP2 rozpoznaje sekwencję GCCNNNGGC. Wiążąc się jako homodimer reguluje transkrypcję kilkunastu komórkowych i wirusowych genów w odpowiedzi na pobudzenie różnych ścieżek przekazywania sygnału, m.in. w obecności niektórych estrów forbolu oraz czynników powodujących zwiększenie stężenia cAMP [60].

Miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego SP1 zidentyfikowano w rejonie -35 do -30 od miejsca startu transkrypcji w mysim promotorze genu *Zfp36*. Czynnikiem ten wpływa na ekspresję genu kodującego TTP poprzez oddziaływanie z polimerazą II RNA po związaniu z heksanukleotydem GGGCGG trzema palcami cynkowymi [60].

Pomiędzy -66 a -60 nukleotydem znajduje się obszar zwany TPE1 zawierający zachowaną w ewolucji sekwencję TCC(C/G)GGA. Jej mutacja lub delecja prowadzi do znacznego obniżenia ekspresji genu kodującego TTP, natomiast zmiana orientacji TPE1 nie wpływa na zmianę poziomu TTP po stymulacji w obecności surowicy. Czynniki transkrypcyjne EGR-1, AP2 oraz białko wiążące TPE1 wpływają synergistycznie na ekspresję genu kodującego TTP, a usunięcie miejsc wiązania poszczególnych czynników powoduje wyraźne zahamowanie transkrypcji [60].

Bardzo ważną rolę w kontroli ekspresji genu *Zfp3 6* myszy pełni również intron. Występują tu trzy potencjalne miejsca wiązania czynnika SP1. Ciekawe, że również NF κ B (ang. *nuclear factor kappa B*), główny czynnik transkrypcyjny aktywowany w komórkach podczas stanu zapalnego, reguluje transkrypcję *Zfp36*, rozpoznając sekwencję GGCGATCCCC, położoną w intronie (rejon +137-+157). Możliwe, że obserwowana indukcja syntezy TTP przez TNF jest wynikiem aktywacji przez TNF czynnika NF κ B, który stymuluje ekspresję genu kodującego TTP [61].

INNE BIAŁKA WIĄŻĄCE SIĘ Z SEKWENCJĄ ARE

Poza tristetraproliną szereg innych białek posiada zdolność do oddziaływania z sekwencjami ARE zawartymi w mRNA. Zdolność taką wykazują między innymi białka wchodzące w skład rodziny TIS11 – białka BRF1 i BRF2 (ang. *butyrate response factor 1/2*). Białka te rozpoznają sekwencję UUAUUUAUU, spotykaną w ARE drugiej klasy.

Generalnie związanie wymienionych białek z ARE prowadzi do przyspieszenia degradacji transkryptu [65]. Przy czym, jak już wspomniano, ich fosforylacja chroni mRNA przed degradacją, znosi również jego translacyjną represję [65].

Do białek oddziałujących specyficznie z ARE pierwszej i drugiej klasy należą białka z rodziny AUF (ang. *AU-rich element RNA-binding proteins*): AUF1, AUBF, AU-A, AU-B i AU-C. Ich działanie na transkrypty jest najczęściej destabilizujące. Białka z rodziny AUF wiążą transkrypty m.in. TNF, GM-CSF, C-MYC, C-FOS, IFN γ [62]. Funkcję destabilizującą pełni również białko KSRP (ang. *KH type-splicing regulatory protein*). Aktywność KSRP jest hamowana w wyniku fosforylacji przez kinazę p38. Jak już wspomniano, aktywacja tego szlaku kinaz MAP prowadzi do stabilizacji mRNA zawierających ARE. KSRP w aktywnej, nieufosforylowanej formie przyłącza do związanego z nim mRNA kompleks deadenylujący. Taki mechanizm udowodniono dla produktów transkrypcji genów *p21* i *MyoD* (ang. *myoblast determination protein*) [62,63].

Poza białkami, które przyspieszają degradację transkryptów istnieją również białka, które stabilizującym czas ich półtrwania. Należą do nich przedstawiciele rodziny białek ELAV (ang. *embryonic lethal, abnormal vision*), w skład której wchodzi białka HuR, HuD i HuC. Stabilizacja transkryptów przez te białka najprawdopodobniej odbywa się w wyniku zablokowania przez nie miejsc wiązania białek destabilizujących [27,62]. Interesujący wydaje się sposób regulacji lokalizacji i czasu życia nietrwałego białka HuR. W odpowiedzi na aktywującą fosforylację specyficznej metylotransferazy przez kinazę p38 białko to ulega metylacji, co wpływa na zmianę jego lokalizacji na cytoplazmatyczną i chroni przed strawieniem w proteasomie [64].

PODSUMOWANIE

Białka regulujące czas półtrwania transkryptów pełnią w komórce bardzo ważną funkcję. Ich aktywność przekłada się bezpośrednio na regulację liczby matryc, na których może przebiegać synteza łańcuchów polipeptydowych. Jednym z lepiej poznanych przedstawicieli tych białek jest tristetraprolina. Rozpoznaje ona sekwencje ARE obecne w transkryptach wielu czynników prozapalnych, takich jak TNF, GM-CSF i IL-2 i kieruje je na drogę degradacji [40]. Pełne poznanie czynników wpływających na regulację aktywności tristetraproliny oraz białek regulujących ekspresję jej genu pozwoli na lepsze poznanie mechanizmów przebiegu reakcji zapalnej i może w przyszłości pomóc w opracowaniu metody hamowania nadmiernej odpowiedzi zapalnej u osób cierpiących na różnego rodzaju schorzenia, których podłożem jest chroniczny stan zapalny.

PIŚMIENNICTWO

- Braun IC, Herold A, Rode M, Conti E, Izaurralde E (2001) Overexpression of TAP/p15 heterodimers bypasses nuclear retention and stimulates nuclear mRNA export. *J Biol Chem* 276: 20536-20543
- Rougemaille M, Gudipati RK, Olesen JR, Thomsen R, Seraphin B, Libri D, Jensen TH (2007) Dissecting mechanisms of nuclear mRNA surveillance in THO/sub2 complex mutants. *EMBO J* 26: 2317-2326
- Reichert VL, Le Hir H, Jurica MS, Moore MJ (2002) 5' exon interactions within the human spliceosome establish a framework for exon junction complex structure and assembly. *Genes Dev* 16: 2778-2791
- Chamieh H, Ballut L, Bonneau F, Le Hir H (2008) NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat Struct Mol Biol* 15: 85-93
- Singh G, Jakob S, Kleedehn MG, Lykke-Anderson J (2007) Communication with the exon-junction complex and activation of nonsense-mediated decay by human Upf proteins occur in the cytoplasm. *Mol Cell* 27: 780-792
- Isken O, Maquat LE (2007) Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* 21: 1833-1856
- Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* 147: 1431-1442
- Kedersha N, Anderson P (2002) Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 30: 963-969
- Daugeron MC, Mauxion F, Séraphin B (2001) The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res* 29: 2448-2455
- Chen J, Chiang YC, Denis CL (2002) CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *EMBO J* 21: 1414-1426
- Monecke T, Schell S, Dickmanns A, Ficner R (2008) Crystal structure of the RRM domain of poly(A)-specific ribonuclease reveals a novel m(7)G-cap-binding mode. *J Mol Biol* 382: 827-834
- Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, Shyu AB (2004) Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzymes in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 12: 1054-1063
- Uchida N, Hoshino S, Katada T (2004) Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* 279: 1383-1391
- Chowdhury A, Mukhopadhyay J, Tharun S (2007) The decapping activator Lsm1p-7p-Pat1p complex has the intrinsic ability to distinguish between oligoadenylated and polyadenylated RNAs. *RNA* 13: 998-1016
- LaGrandeur TE, Parker R (1998) Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. *EMBO J* 17: 1487-1496
- Dunkley T, Parker R (1999) The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *EMBO J* 18: 5411-5422
- Coller JM, Tucker M, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Parker R (2001) The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA* 7: 1717-1727
- Fischer N, Weis K (2002) The DEAD box protein Dhh1 stimulates the decapping enzyme Dcp1. *EMBO J* 21: 2788-2797
- Sheth U, Parker R (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300: 805-808
- Araki Y, Takahashi S, Kobayashi T, Kajiho H, Hoshino S, Katada T (2001) Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J* 20: 4684-4693
- Anderson JS, Parker RP (1998) The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J* 17: 1497-1506
- Mitchell P, Petfalski E, Shevchenko A, Mann M, Tollervey D (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3' to 5' exoribonucleases. *Cell* 91: 457-466
- Liu Q, Greimann JC, Lima CD (2006) Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* 127: 1223-1237

24. Wang L, Lewis MS, Johnson AW (2005) Domain interactions within the Ski2/3/8 complex and between the Ski complex and Ski7p. *RNA* 11: 1291-1302
25. Wang Z, Kiledjian M (2001) Functional link between the mammalian exosome and RNA decapping. *Cell* 107: 751-762
26. Liu H, Rodgers ND, Jiao X, Kiledjian M (2002) The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J* 21: 4699-4708
27. Barreau C, Paillard L, Osborne B (2006) Survey and Summary: AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* 33: 7138-7150
28. Lai WS, Kennington EA, Blackshear PJ (2003) Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Cell Biol* 23: 3798-3812
29. Franks TM, Lykke-Anderson J (2007) TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes Dev* 21: 719-735
30. Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* 147: 1431-1442
31. Lai WS, Carballo E, Thorn JM, Kennington EA, Blackshear PJ (2000) Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to AU-rich elements and destabilization of mRNA. *J Biol Chem* 275: 17827-17837
32. Blackshear PJ, Philips RS, Ghosh S, Ramos SB, Richfield EK, Lai WS (2005) Zfp3613, a rodent X chromosome gene encoding a placenta-specific member of the tristetraprolin family of CCCH tandem zinc finger proteins. *Biol Reprod* 73: 297-307
33. Hudson BP, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE (2004) Recognition of the mRNA AU-rich element by the zinc finger domain of TIS11d. *Nat Struct Mol Biol* 11: 257-264
34. Ogawa K, Chen F, Kim YJ, Chen Y (2003) Transcriptional regulation of tristetraprolin by transforming growth factor beta in human T cells. *J Biol Chem* 278: 30373-30381
35. Taylor GA, Lai WS, Oakey RJ, Seldin MF, Shows TB, Eddy RL, Jr, Blackshear PJ (1991) The human TTP protein: sequence, alignment with related proteins, and chromosomal localization of the mouse and human genes. *Nucleic Acids Res* 19: 3454
36. Carrick DM, Lai WS, Blackshear PJ (2004) The tandem CCCH zinc finger protein tristetraprolin and its relevance to cytokine mRNA turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther* 6: 248-264
37. Brook M, Tchen CR, Santalucia T, McIlrath J, Arthur JS, Saklatvala J, Clark AR (2006) Posttranslational regulation of tristetraprolin subcellular localization and protein stability by p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Mol Cell Biol* 26: 2408-2418
38. Johnson BA, Stehn JR, Yaffe MB, Blackwell TK (2002) Cytoplasmic localization of tristetraprolin involves 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 277: 18029-18036
39. Lai WS, Blackshear PJ (2001) Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: tristetraprolin-mediated AU-rich element-dependent mRNA degradation can occur in the absence of a poly(A) tail. *J Biol Chem* 276: 23144-23154
40. Hau HH, Walsh RJ, Ogilvie RL, Williams DA, Reilly CS, Bohjanen PR (2007) Tristetraprolin recruits functional mRNA decay complexes to ARE sequences. *J Cell Biochem* 100: 1477-1492
41. Yu H, Stasinopoulos S, Leadman P, Medcalf RL (2003) Inherent instability of plasminogen activator inhibitor type 2 mRNA is regulated by tristetraprolin. *J Biol Chem* 278: 13912-13918
42. Essafi-Benkhadir K, Onesto C, Stebe E, Moroni C, Page's G (2007) Tristetraprolin inhibits Ras-dependent tumor vascularization by inducing vascular endothelial growth factor mRNA degradation. *Mol Biol Cell* 18: 4648-4658
43. Brooks SA, Connolly JE, Rigby WF (2004) The role of mRNA turnover in the regulation of tristetraprolin expression: evidence for an extra-cellular signal-regulated kinase-specific, AU-rich element-dependent, autoregulatory pathway. *J Immunol* 172: 7263-7271
44. Lai WS, Carballo E, Strum JR, Kennington EA, Phillips RS, Blackshear PJ (1999) Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol Cell Biol* 19: 4311-4323
45. Carballo E, Lai WS, Blackshear PJ (2000) Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood* 95: 1891-1899
46. Stoecklin G, Lu M, Rattenbacher B, Moroni C (2003) A constitutive decay element promotes tumor necrosis factor alpha mRNA degradation via an AU-rich element-independent pathway. *Mol Cell Biol* 23: 3506-3515
47. Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, Di Padova F, Lin SC, Gram H, Han J (2005) Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120: 623-634
48. Carballo E, Blackshear PJ (2001) Roles of tumor necrosis factor-alpha receptor subtypes in the pathogenesis of the tristetraprolin-deficiency syndrome. *Blood* 98: 2389-2395
49. Cao H, Deterding LJ, Venable JD, Kennington EA, Yates JR 3rd, Tomer KB, Blackshear PJ (2006) Identification of the anti-inflammatory protein tristetraprolin as a hyperphosphorylated protein by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *Biochem J* 394: 285-297
50. Cao H, Dzineku F, Blackshear PJ (2003) Expression and purification of recombinant tristetraprolin that can bind to tumor necrosis factor-alpha mRNA and serve as a substrate for mitogen-activated protein kinases. *Arch Biochem Biophys* 412: 106-120
51. Stoecklin G, Stubbs T, Kedersha N, Wax S, Rigby WF, Blackwell TK, Anderson P (2004) MK2-induced tristetraprolin: 14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J* 23: 1313-1324
52. Deleault KM, Skinner SJ, Brooks SA (2008) Tristetraprolin regulates TNF-alpha mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways. *Mol Immunol* 45: 13-24
53. Sze KL, Lui WY, Lee WM (2008) Post-transcriptional regulation of CLMP mRNA is controlled by tristetraprolin in response to TNF-alpha via c-Jun N-terminal kinase signaling. *Biochem J* 410: 575-583
54. Hoovers JM, Mannens M, John R, Blik J, van Heyningen V, Porteous DJ, Leschot NJ, Westerveld A, Little PF (1992) High-resolution localization of 69 potential human zinc finger protein genes: a number are clustered. *Genomics* 12: 254-263
55. Sauer I, Schaljo B, Vogl C, Gattermeier I, Kolbe T, Müller M, Blackshear PJ, Kovarik P (2006) Interferons limit inflammatory responses by induction of tristetraprolin. *Blood* 107: 4790-4797
56. Fairhurst AM, Connolly JE, Hintz KA, Goulding NJ, Rassias AJ, Yeager MP, Rigby W, Wallace PK (2003) Regulation and localization of endogenous human tristetraprolin. *Arthritis Res Ther* 5: R214-R225
57. Varnum BC, Lim RW, Kujubu DA, Luner SJ, Kaufman SE, Greenberger JS, Gasson JC, Herschman HR (1989) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tetradecanoyl phorbol acetate induce a distinct, restricted subset of primary-response TIS genes in both proliferating and terminally differentiated myeloid cells. *Mol Cell Biol* 9: 3580-3583
58. Raghavan A, Robison RL, McNabb J, Miller CR, Williams DA, Bohjanen PR (2001) HuA and tristetraprolin are induced following T cell activation and display distinct but overlapping RNA binding specificities. *J Biol Chem* 276: 47958-47965
59. Suzuki K, Nakajima H, Ikeda K, Maezawa Y, Suto A, Takatori H, Saito Y, Iwamoto I (2003) IL-4-Stat6 signaling induces tristetraprolin expression and inhibits TNF-alpha production in mast cells. *J Exp Med* 198: 1717-1727
60. Lai WS, Thompson MJ, Taylor GA, Liu Y, Blackshear PJ (1995) Promoter analysis of Zfp-36, the mitogen-inducible gene encoding the zinc finger protein tristetraprolin. *J Biol Chem* 270: 25266-2527

61. Lai WS, Thompson MJ, Blackshear PJ (1998) Characteristics of the intron involvement in the mitogen-induced expression of Zfp-36. *J Biol Chem* 273: 506-517
62. Zhang T, Krays V, Huez G, Guedyan C (2002) AU-rich element-mediated translational control: complexity and multiple activities of transactivating factors. *Biochem Soc Trans* 30: 952-958
63. Briata P, Forcales SV, Ponassi M, Corte G, Chen CY, Karin M, Puri PL, Gherzi R (2005) p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Mol Cell* 20: 891-903
64. Lin FY, Chen YH, Lin YW, Tsai JS, Chen JW, Wang HJ, Chen YL, Li CY, Lin SJ (2006) The role of human antigen R, an RNA-binding protein, in mediating the stabilization of toll-like receptor 4 mRNA induced by endotoxin: a novel mechanism involved in vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2622-2629
65. Benjamin D, Schmidlin M, Min L, Gross B, Moroni C (2006) BRF1 protein turnover and mRNA decay activity are regulated by protein kinase B at the same phosphorylation sites. *Mol Cell Biol* 26: 9497-9507

Degradation of eukaryotic transcripts. Role and regulation of tristetraprolin activity

Aleksandra Karolina Balwierz, Piotr Tymoszek, Aneta Kasza 

Department of Cell Biochemistry, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University. 7 Gronostajowa St., 30-387 Krakow, Poland

 e-mail: aneta.kasza@uj.edu.pl

Key words: TTP, ZFP36, mRNA stability, mRNA degradation, ARE, regulation of gene expression

ABSTRACT

The kinetics of transcripts turnover is a very important aspect of the regulation of the amount of newly synthesized proteins. Transcripts can serve as a template for protein synthesis as long as they remain in the cytoplasm, bound to the ribosomes. Degradation of mRNAs effectively influences quantity of transcripts in this pool. The process of mRNA degradation, similarly to transcription, is precisely regulated, mainly by proteins which interact with mRNA. These proteins are responsible both for transcripts stabilization and degradation. In this article we have summarized known pathways of mRNA degradation. We have also reviewed the present state of knowledge on tristetraprolin, one of the best characterized proteins that takes part in the transcripts turnover.

STRESZCZENIE

Zarówno fotosyntetyczny kompleks cytochromów *b₆f*, jak i oddechowy kompleks cytochromów *bc₁*, należą do rodziny kompleksów *bc*. Oba superkompleksy białkowe pośredniczą w transporcie elektronów, translokacji protonów w poprzek błony biologicznej oraz katalizują utlenianie chinonów. Funkcja, skład polipeptydowy, organizacja przestrzenna oraz składanie kompleksu cytochromów *b₆f* od wielu lat jest przedmiotem badań. Analiza struktur krystalicznych ujawniła obecność trzeciego hemu w cytochromie *b₆*, zaś wyniki badań z zastosowaniem mutagenyzy wskazały na udział dodatkowego czynnika białkowego (TCA) zaangażowanego w regulację składania kompleksu cytochromów *b₆f* poprzez oddziaływanie z 5'UTR mRNA genu *PETA*. Niniejsze opracowanie stanowi podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat budowy i biogenezy kompleksu cytochromów *b₆f*.

WPROWADZENIE

Mechanizm przekształcania energii świetlnej w energię potencjału oksydoredukcyjnego w procesie fotosyntezy to jeden z podstawowych procesów biologicznych. Centralnym elementem współuczestniczącym w tym procesie jest kompleks cytochromów *b₆f*, oksydoredukcyjny enzym o systematycznej nazwie oksydoreduktaza plastochinol-plastocyanina zlokalizowany w chloroplastach [1-5]. Kompleks ten stanowi jeden z trzech transbłonowych superkompleksów białkowych biorących udział w liniowym i nielinowym transporcie elektronów [6]. Kompleks cytochromów *b₆f* to ostatni w kolejności (po fotosystemie I oraz II) fotosyntetyczny kompleks białkowy, dla którego zbadano struktury krystaliczne. W tylakoidach roślin wyższych i sinic tworzy funkcjonalny dimer, a poprawne wbudowanie w błonę i połączenie jego podjednostek determinuje aktywność i prawidłowe funkcjonowanie samego kompleksu, jak i fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów.

KOMPLEKS CYTOCHROMÓW *b₆f*

W skład kompleksu cytochromów *b₆f* wchodzi cztery polipeptydy o masach cząsteczkowych powyżej 17 kDa, powiązane stosunkiem stechiometrycznym 1:1:1:1. Są to białka hemowe – cytochrom *f* oraz cytochrom *b₆*, białko Rieskego zawierające centrum żelazowo-siarkowe 2Fe-2S i podjednostka IV będąca strukturalnym i funkcjonalnym analogiem C-końcowego rejonu cytochromu *b* z mitochondriów i fotosyntetycznych bakterii [1-6]. Skład ten jest uniwersalny zarówno dla kompleksów wyizolowanych z roślin wyższych, glonów, jak i sinic. Cztery główne polipeptydy – cytochrom *f*, cytochrom *b₆*, białko Rieskego oraz podjednostka IV są kodowane odpowiednio przez geny *PETA*, *PETB*, *PETC* i *PETD*. Cytochrom *b₆* oraz podjednostka IV to białka błonowe, posiadające odpowiednio cztery i trzy transbłonowe odcinki helikalne. Geny kodujące wymienione białka są zlokalizowane w jednym operonie DNA chloroplastów. Białko Rieskego, kodowane przez geny zlokalizowane w DNA jądrowym oraz cytochrom *f*, kodowany przez gen *PETA* zlokalizowany w DNA chloroplastów, posiadają duże domeny globularne i są zakotwiczone w błonie przez jedną transbłonową α -helisę [1].

Wszystkie białka kompleksu cytochromów *b₆f*, poza białkiem Rieskego, kodowane są przez pojedyncze geny. W przypadku białka Rieskego pochodzącego z *Synechocystis* PCC 6803 wykazano obecność trzech genów kodujących to białko (geny *PETC1*, *PETC2*, *PETC3*) [7]. Wzrost fotoautotroficzny mutantów delecyjnych pojedynczych genów *petC* jest możliwy, nie mniej tempo wzrostu mutantów delecyjnego *petC1* jest najwolniejsze. Jednoczesna delecja genów *petC1* i *petC2* powoduje zahamowanie działania kompleksu cytochromów *b₆f*. Co ciekawe mutanty delecyjne *petC1/petC3* (jak również *petC2/petC3*) wykazują obniżoną aktywność kompleksu jednakże nie wpływają na całkowity brak przeżywalności sinicy (między innymi w warunkach wzrostu fotoautotroficznego) [7]. Wyni-

Katarzyna A. Hombek-Urban¹*

Jarosław Króliczewski²

Andrzej Szczepaniak²

¹Katedra i Zakład Higieny Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wrocław
²Zakład Biofizyki, Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław

*Katedra i Zakład Higieny Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Mikulicza-Radeckiego 7, 50-345 Wrocław; tel.: (071) 784 15 08, e-mail: kasiahombekurban@hyg.am.wroc.pl

Artykuł otrzymano 4 stycznia 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 29 marca 2009 r.

Słowa kluczowe: kompleks cytochromów *b₆f*, cytochrom *b₆*, hem, białko Rieskego, cytochrom *f*, reduktaza ferredoksyny

Wykaz skrótów: CEF – cykliczny transport elektronów; CES – epistatyczna kontrola syntezy; *C. reinhardtii* – *Chlamydomonas reinhardtii*; DDM – dodecylo- β -maltozyd; DOPC – dioleilo-fosfatydylocholina; *E. coli* – *Escherichia coli*; FNR – reduktaza ferredoksyny (oksydoreduktaza ferredoksyna-NADP⁺); FNR-A, FNR-B – izoformy A oraz B reduktazy ferredoksyny z liści pszenicy; LEF – niecykliczny (liniowy) transport elektronów; LFNR1, LFNR2, LFNR3 – izoformy reduktazy ferredoksyny z liści kukurydzy o numerach 1, 2, 3; *M. lamosus* – *Mastigocladus lamosus*; *N. tabacum* – *Nicotiana tabacum*; PetA – cytochrom *f*; PetB – cytochrom *b₆*; PetC – białko Rieskego; PetD – podjednostka IV; *P. lamosus* – *Phormidium lamosus*; *S. oleracea* – *Spinacia oleracea*

Podziękowanie: Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego N301464434 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

ki wskazują, że gen *petC2* jest zdolny do częściowego zastąpienia *petC1* natomiast *petC3* nie ma takiej możliwości [7,8]. Interesującym jest także fakt detekcji kilku izoform białka Rieskego (izoforma PetC1, kodowana przez gen *PETC1*); w szpinaku zidentyfikowano obecność dwóch izoform PetC1 [8,9]. Występowanie izoform białka PetC1, posiadających identyczną masę a różniących się ładunkiem powierzchniowym, może być wynikiem modyfikacji kowalencyjnych powodujących oksydacyjne uszkodzenie białka lub modyfikacjami potranslacyjnymi, np. fosforylacja. Rola takiej modyfikacji może wynikać z udziału białka Rieskego w przekazywaniu sygnałów biochemicznych [8].

W skład wyizolowanego, aktywnego kompleksu cytochromów *b₆f* ze szpinaku wchodzi także oksydoreduktaza ferredoksyna-NADP⁺ (FNR). FNR katalizuje redukcję NADP⁺ w liniowym transporcie elektronów (LEF), przy czym jest w wysokim stopniu prawdopodobne, że pośredniczy również w cyklicznym transporcie elektronów (CEF) przenosząc elektrony ze zredukowanej ferredoksyny na kompleks cytochromów *b₆f* [10-12]. W roślinach wyższych FNR jest trwale zasocjowana z kompleksem cytochromów *b₆f* poprzez hydrofobowy kanał w domenie wiążącej NADP⁺ i możliwe jest, że kompleksy cytochromów *b₆f* pośredniczące w LEF, bądź CEF, są rozdzielone przestrzennie [11,13]. Dotychczas nie wykazano obecności oksydoreduktazy ferredoksyna-NADP⁺ w izolowanych tą samą metodą kompleksach cytochromu *b₆f* z *M. laminosus* [13,14]. Z kolei w liściach kukurydzy zidentyfikowano trzy izoformy FNR (LFNR1, LFNR2 i LFNR3). Izoformy reduktazy ferredoksyny mogą różnić się lokalizacją w chloroplastach oraz powinowactwem do substratów [12,15]. Izoforma LFNR1 kukurydzy jest ściśle związana z błoną tylakoidową, LFNR2 jest zasocjowana z błoną tylakoidów w około 60%, natomiast LFNR3 obecna jest jedynie w stromie chloroplastów [12]. Dwie izoformy reduktazy ferredoksyny, LFNR1 i LFNR2, prawdopodobnie oddziałują między innymi z kompleksami cytochromów *b₆f* [12]. W liściach pszenicy zidentyfikowano dwie izoformy reduktazy ferredoksyny (FNR-A i FNR-B) o zbliżonych wartościach punktu izoelektrycznego [15]. Ich struktura pierwszorzędowa jest bardzo podobna do struktury FNR szpinaku, a sugerowana rola fizjologiczna może mieć związek z regulacją niektórych procesów zachodzących w chloroplastach [15].

Poza głównymi polipeptydami (PetA, PetB, PetC oraz PetD), w skład kompleksu cytochromów *b₆f* wchodzi podjednostki o mniejszej masie molekularnej (mieszczącej się w przedziale od 3,2 kDa do 4,2 kDa), których rozmieszczenie w kompleksie jest bardziej peryferyjne [14]. Podjednostka PetM kodowana jest przez gen *PETM* zlokalizowany w DNA jądrowym komórek roślin wyższych, jak i w komórkach zielonych glonów *C. reinhardtii*. Pozostałe małe podjednostki kompleksu cytochromów *b₆f* (PetG, PetL, PetN) kodowane są przez geny *PETG*, *PETL* i *PETN* zlokalizowane w DNA chloroplastów [14,16]. W komórkach glonów *Porphyrura purpurea* i *Guillardia theta* gen *PETM* znajduje się w plastydach i wraz z genem *PETN* zlokalizowany jest w jednym operonie, co umożliwia ściśle skoordynowaną ekspresję [17]. Dodatkową podjednostką kompleksu cytochromów *b₆f* zidentyfikowaną do tej pory tylko u *Chlamydomonas* metodami biochemicznymi i ulegającą odwracalnej fosforylacji

jest PetO. Obecność jej nie została jednak potwierdzona w wyniku analizy struktury krystalicznej [18,19]. W powstaniu funkcjonalnego kompleksu cytochromów *b₆f* niezbędne są białka kodowane przez geny znajdujące się zarówno w genomie chloroplastowym, jak i jądrowym, co wskazuje na złożoność i wieloetapowość całego procesu.

STRUKTURA BIAŁEK KOMPLEKSU CYTOCHROMOWEGO *b₆f*

Pierwszą analizę trójwymiarowych kryształów kompleksu cytochromów *b₆f* (przedstawiono model strukturalny o rozdzielczości 8 Å) przeprowadzono w 1997 roku (kompleks z *C. reinhardtii*) [20]. Rok później opisano aktywne i stabilne struktury krystaliczne kompleksu z termofilnej sinicy *M. laminosus*; ich analiza pozwoliła na rozróżnienie elementów z rozdzielczością 9 Å [21]. W tym samym roku opisano struktury krystaliczne kompleksu cytochromów *b₆f* ze szpinaku (o podobnej rozdzielczości) oraz z *C. reinhardtii* [22,23]. Przełom dotyczący struktury kompleksu cytochromów *b₆f* z obu organizmów nastąpił w 2003 roku. Otrzymało wówczas struktury krystaliczne kompleksu, a ich analiza pozwoliła na stworzenie modelu o rozdzielczości 3 Å oraz 3,1 Å [19,24,25]. Kompleksy z *M. laminosus* i *C. reinhardtii* mają taką samą liczbę polipeptydów, a ich struktura jest bardzo podobna pomimo tego, że glony zielone są młodsze ewolucyjnie o miliard lat [26]. Jednakże w sekwencji aminokwasowej białek PetA, PetB, PetC i PetD pomiędzy *C. reinhardtii* a *M. laminosus* są wyraźne różnice; stopień podobieństwa wynosi odpowiednio 58%, 80%, 80% i 58% [27].

Monomer kompleksu cytochromów *b₆f* *M. laminosus* (Ryc. 1) zawiera cztery hemy, jedno centrum żelazowo-siarkowe 2Fe-2S, jedną cząsteczkę chlorofilu *a*, jeden β-karoten, jeden plastochinon oraz (wprowadzony na potrzeby krystalizacji) jedną cząsteczkę inhibitora (analog chinonu) oraz dwie cząsteczki DOPC [24,25]. Jeden monomer kompleksu cytochromów *b₆f* zbudowany jest z 13 transbłonowych α-helis, a globularne domeny białka Rieskego oraz cytochromu *f* zlokalizowane są po stronie światła tylakoidów (strona *p*, pozytywna) [24]. Struktury kompleksu cytochromów *b₆f* utworzono na podstawie danych PDB dostępnych pod adresem: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1VF5>. Struktura kompleksu cytochromów *b₆f* dla *C. reinhardtii* dostępna jest pod adresem: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/inages.do?structureId=1Q90>. Najnowsza struktura krystaliczna została opublikowana dla holo-kompleksu *b₆f* z *Nostoc* PCC 7120 i znaleźć ją można pod adresem: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2ZT9> (Cramer et al., praca w druku).

CYTOCHROM *b₆* ORAZ PODJEDNOSTKA IV

Analiza struktur krystalicznych kompleksu cytochromów *b₆f* z *M. laminosus* oraz *C. reinhardtii* wykazała istnienie, do tej pory nie zidentyfikowanego, trzeciego hemu w obrębie cytochromu *b₆* [19, 24]. Hemy *b₆* oraz *b₆'* wchodzące w skład cytochromu *b₆*, nie są związane kowalencyjnie a tylko koordynacyjnie przez dwie pary histydynowych ligandów, ułożonych liniowo względem atomu żelaza [6]. Hem *x* (określany również jako hem *c*) jest związany kowalencyjnie z cytochromem za pośrednictwem pojedynczego wiązania

toieterynowej grupy winylowej protoporfiryny IX z Cys-35 (reszta aminokwasowa zlokalizowana w obrębie pierwszej transbłonowej α -helisy) [19,24]. Atom żelaza hemu x koordynowany jest przez cząsteczkę wody, która jest związana wiązaniem wodorowym z łańcuchem propionowym hemu b_n oraz z resztą Gly-38. Wykazano również, że reszty aminokwasowe zlokalizowane w sąsiedztwie hemu x , są zachowane w ewolucji w obrębie kompleksu cytochromów b_f . Są to następujące reszty: Tyr-33, Cys-35, Gly-38, Phe-203, Ile-206 cytochromu b_c oraz Phe-40, Ile-44 podjednostki IV *M. laminosus* [24]. Wykazano, że u *C. reinhardtii* zastąpienie reszty cysteiny wiążącej hem x resztą waliny powoduje drastyczny spadek liczby kompleksów cytochromów b_f w błonie, zaburzając tym samym możliwość fotoautotroficznego wzrostu mutantów [28].

Podjednostka IV kompleksu cytochromów b_f nie posiada grupy redoks, ale jej obecność jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania kompleksu [29]. W pętli pomiędzy pierwszą i drugą transbłonową α -helisą (E i F) znajduje się zachowana w ewolucji sekwencja aminokwasów (PEWY), wspólna dla podjednostki IV i cytochromu b łańcucha oddechowego. Zamiana tej na PWEY zaburza zarówno mechanizm przyłączania plastochinolu/plastochinonu, jak i mechanizm aktywacji kinazy LHCI [30]. W miejscu Q_p podjednostki IV sinicy *Synechococcus* PCC 7002 istotną rolę odgrywa reszta Leu-81. W roślinach wyższych oraz zielonych glonach na powyższej pozycji znajduje się reszta fenylalaniny [29].

BIĄŁKO RIESKEGO

Białko Rieskego wiąże centrum żelazowo-siarkowe 2Fe-2S. Globularna domena białka Rieskego znajduje się w świetle tylakoidów. Białko zakotwiczone jest w błonie jedną transbłonową α -helisą, a N-koniec białka eksponowany jest do stromy chloroplastów [1,3]. Ligandami grupy redoks 2Fe-2S są dwie reszty histydynowe oraz dwie reszty cysteinowe zlokalizowane w pętłach β_4 - β_5 oraz β_6 - β_7 [31]. Cysteiny te (Cys-107 i Cys-125, numeracja reszt aminokwasowych łańcucha polipeptydowego białka Rieskego szpinaku) są ligandami atomu żelaza zlokalizowanego bliżej środka globularnej domeny białka Rieskego, natomiast reszty histydyny (His-109 oraz His-128, numeracja jak wyżej) są ligandami atomu żelaza znajdującego się bliżej zewnętrznej krawędzi domeny [31]. Powyższą strukturę stabilizuje cząsteczka wody, która połączona jest wiązaniami wodorowymi z tlenem grupy karbonylowej wiązania *cis*-peptydowego reszty Pro-142 (zlokalizowanej w sekwencji aminokwasowej Gly-141-Pro-142-Ala-143-Pro-144) i z resztami His-128 i Arg-140 (*S. oleacea* [31]).

CYTOCHROM f

Kolejnym białkiem kompleksu cytochromów b_f , dla którego zbadano struktury krystaliczne o dużej rozdzielczości, jest cytochrom f [32-34]. Zawiera on wysokopotencjałowy hem typu c [1,3]. Charakterystyczną cechą cytochromu f jest motyw Cys-X-X-Cys-His, którego funkcją jest wiązanie hemu [1,3]. Globularna domena cytochromu f kompleksu cytochromów b_f liczy około 250 reszt aminokwasowych i jest zlokalizowana po stronie lumenalnej (strona p) [3]. Cy-

tochrom f jest zakotwiczony w błonie przez jedną transbłonową α -helisę, a C-koniec białka skierowany jest do stromy chloroplastów. Cechą charakterystyczną tego białka jest to, że szóstym ligandem hemu jest grupa α -aminowa N-końcowej aminokwasowej reszty białka [32]. Na pozycji tej znajduje się reszta aromatyczna, przy czym w 20-tu sekwencjach aminokwasowych (na 23 sekwencje przeanalizowane) na pozycji 1 jest reszta tyrozyny [3]. Dostępne struktury krystaliczne cytochromu f z sinicy *P. laminosum* [35], *C. reinhardtii* [34] i rzepy (*Brassica rapa*) [32], potwierdziły obecność tzw. „łańcucha wodnego” czyli pięciu cząsteczek wody zlokalizowanych w pobliżu hemu. Reszty aminokwasów, które tworzą wiązania wodorowe z cząsteczkami wody „łańcucha wodnego” są zachowane w ewolucji, podobnie jak te, które oddziałują z hemem [2,34,35]. W obrębie 10 reszt aminokwasowych tworzących opisane wiązania, 7 (na 22 zbadane sekwencje aminokwasowe cytochromu f), jest identycznych. Mutacje tych reszt zaburzają funkcjonowanie kompleksu cytochromów b_f [35].

MAŁE PODJEDNOSTKI

Funkcja małych podjednostek kompleksu cytochromów b_f mimo wielu badań nie jest do końca poznana i jednoznacznie zdefiniowana. Każda z małych podjednostek posiada jedną transbłonową α -helisę odpowiedzialną za zakotwiczenie białka w błonie tylakoidowej. Wszystkie małe hydrofobowe podjednostki mają 1-2 dodatnie ładunki po stronie n (stromalnej) błony. Kierunek wbudowania tych białek w błonie jest zgodny z *cis*-pozytywną zasadą wbudowania białek błonowych [36].

Jak już wspomniano, podjednostka PetM jest kodowana przez gen jądrowy. Produktem translacji jest białko prekursorowe, które następnie jest transportowane do chloroplastu [16]. Sekwencja sygnałna (sekwencja tranzytowa) tego polipeptydu jest typową sekwencją białek stromalnych. Położenie N-końca po stronie lumenalnej wskazuje, że PetM przenoszony jest przez błonę tylakoidową. Podobne położenie N-końca wykazuje pozbawiony sekwencji tranzytowej PetG [37]. N-końce tych białek są bardzo krótkie i ubogie w naładowane dodatnio reszty aminokwasowe. Poprzez analogię do bakteryjnych systemów transportowych sugeruje się, że ich wbudowywanie w błonę jest niezależne od systemu transportowego SEC, a zależy jedynie od potencjału błonowego [16,38]. Kolejną małą podjednostką, występującą zarówno u roślin wyższych, jak i sinic, a wykazującą najmniejsze (wynoszące około 29%) podobieństwo struktury pierwszorzędowej, jest PetL. Podobieństwo w obrębie podjednostki PetG wynosi 73% a w przypadku PetN 59% [39]. Zaburzenie ekspresji genu *PETL*, kodującego podjednostkę PetL, powoduje zahamowanie fotoautotroficznego wzrostu, redukuje transport elektronów oraz zawartość kompleksu cytochromowego b_f u *Chlamydomonas*, ale nie u *Synechocystis* [40,41]. Podobna delecja w przypadku tytoniu objawia się zmniejszeniem stabilności dimeru b_f , zwłaszcza w starszych liściach, jednakże nie wpływa na przemiany fotoautotroficzne [42,43]. Gen *PETN* koduje podjednostkę PetN i zwykle zlokalizowany jest w genomie chloroplastowym (np. w komórkach tytoniu), gdzie ma miejsce jego ekspresja. W *C. reinhardtii* *PETN* znajduje się jest w genomie jądrowym. Zlokalizowano również ramkę odczytu *ycf6*

(PETN) w DNA tytoniu, lecz nie stwierdzono, czy białko ulega syntezy i jest funkcjonalne [17].

STRUKTURA HOLOKOMPLEKSU *b₆f*

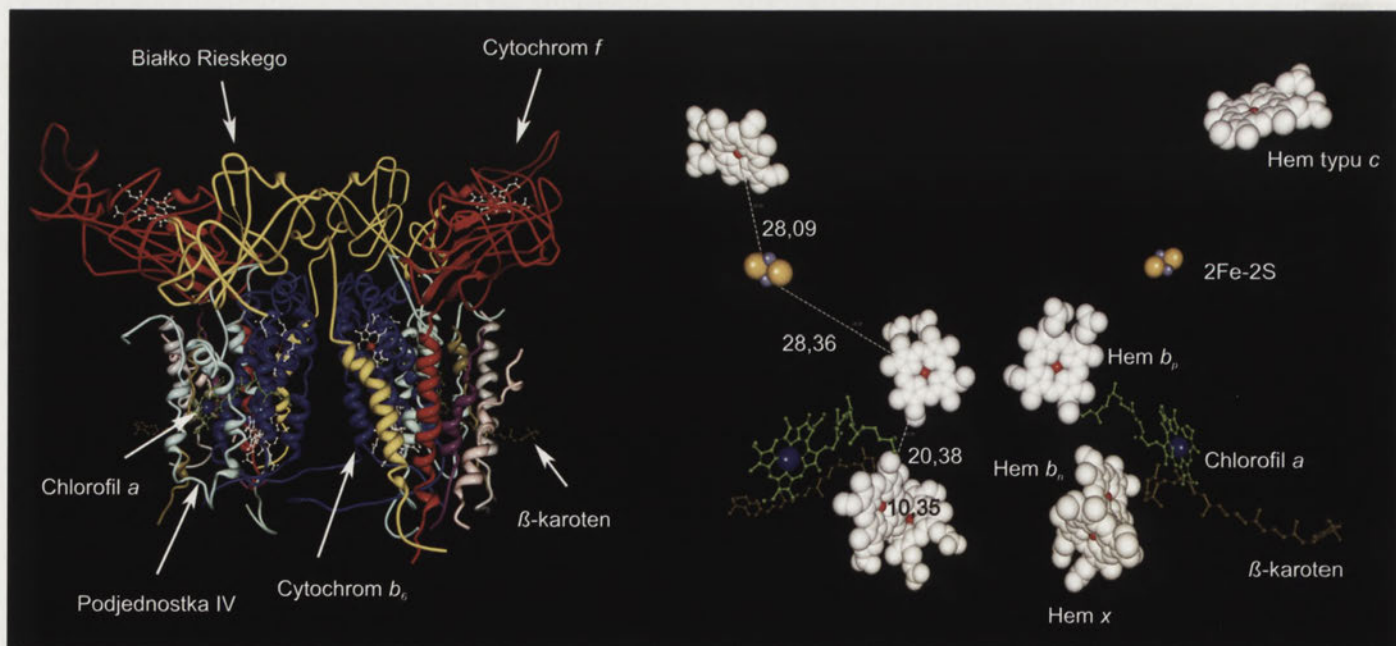
Kompleks cytochromów *b₆f* występuje w błonie tylakoidowej w formie dimeru i tylko dimer jest w stanie pełnić funkcję biologiczną. Dimer jest stabilizowany przez kontakt transbłonowych helis cytochromów *b₆* i transbłonowych helis białek Rieskego, których rozpuszczalna domena i transbłonowa domena znajdują się w różnych monomerach. To wyjaśnia konieczność istnienia kompleksu cytochromów *b₆f* w formie dimeru. Kolejne uzasadnienie istnienia dimeru jako jednostki funkcjonalnej wynika z obecności dwóch szczelin, przez które następuje wymiana chinonów. Podobne szczeliny występują w kompleksie cytochromów *bc₁* [3,44,45]. Szczeliny te tworzą powierzchnie dwóch monomerów; miejsca *Q_n* i *Q_p*, wiążące chinon/chinol, znajdują się na dwóch różnych monomerach wewnątrz tej samej szczeliny [24]. Dwa monomery tworzą wolną od białek szczelinę o wymiarach 30 Å (wysokość) na 15 Å (głębokość) na 25 Å (szerokość) [46]. Ściany szczeliny tworzą helisy C, D (cytochromu *b₆*) i F (podjednostki IV) jednego monomeru oraz helisy A (cytochromu *b₆*) i E (podjednostki IV) oraz helisa transbłonowa białka Rieskego drugiego monomeru. Dwie cząsteczki lipidu (DOPC) pełnią rolę strukturalną, podpierając szczelinę [24]. Procedura oczyszczania kompleksu cytochromów *b₆f* z *M. lamosus* usuwa te lipidy i utrudnia krystalizację kompleksu [25]. Dopiero dodanie lipidów do preparatu stabilizuje strukturę i jest koniecznym warunkiem uzyskania wysokiej jakości kryształów [25]. Procedura oczyszczania kompleksu cytochromów *b₆f* z *C. reinhardtii*, w połączeniu z zastosowaniem niskich stężeń niejonowego detergentu, sprawia, że syntetyczny lipid nie musi być stosowany [19]. W wyniku zastosowania tej procedury, lipidy

występujące *in vivo* w kompleksie cytochromów *b₆f* pozostają w nim [19].

W skład każdego monomeru kompleksu cytochromów *b₆f* wchodzi także chlorofil *a* i β-karoten. W monomerach kompleksów cytochromów *b₆f* roślin wyższych, glonów i sinic zarówno hem *x*, chlorofil *a*, jak i β-karoten, występują w stosunku molowym 1:1:1 [47-50]. Chlorofil *a* zlokalizowany jest między drugą (F) a trzecią (G) transbłonową α-helisy podjednostki IV i lokuje się niemal równolegle do płaszczyzny hemu *b_n* w obrębie tego samego monomeru *b₆f* (Ryc. 1) [24]. Przepuszczalnie w kompleksie cytochromów *b₆f* odgrywa rolę strukturalną oraz uczestniczy w aktywacji kinazy LHCII [24,51]. Jego lokalizacja w dimerze jest ściśle określona, niemniej możliwa jest wymiana cząsteczek chlorofilu *a* na cząsteczki chlorofilu znakowane radioaktywnie (³H)Chl*a*) w wyizolowanych kompleksach cytochromów *b₆f* *C. reinhardtii* [49]. Cząsteczka β-karotenu zlokalizowana jest w centrum transbłonowego rejonu monomeru *b₆f*. Usytuowana jest między podjednostkami PetL, PetM, w pobliżu drugiej (B) transbłonowej α-helisy cytochromu *b₆*, pierwszej (E) transbłonowej α-helisy podjednostki IV, a także podjednostki PetG [24]. Na podstawie widm absorpcji β-karotenu ekstrahowanego z kompleksu *b₆f* ze szpinaku ustalono, że w kompleksie cytochromów *b₆f* występuje on w konformacji *cis* (9-*cis*-β-karoten charakteryzuje maksimum absorpcji w 341 nm oraz dwa sygnały absorpcji w 444 nm i 471 nm) [52].

PORÓWNANIE KOMPLEKSÓW CYTOCHROMÓW *b₆f* ORAZ *bc₁*

Struktura pierwszorzędowa trzech z czterech głównych polipeptydów kompleksu cytochromów *b₆f* jest zachowana w ewolucji i występuje we wszystkich poznanych kompleksach cytochromów *bc₁*. Cytochrom *b₆*, podjednostka IV



Rycina 1. Schemat dimeru kompleksu cytochromowego *b₆f* z *M. lamosus* opracowany na podstawie danych uzyskanych z analizy struktury krystalicznej (dane PDB pod adresem: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1VF5>). Po prawej przestrzennie rozmieszczone grupy prostetyczne kompleksu oraz odległości między środkami grup prostetycznych (Å). Po lewej graficzny obraz składu polipeptydowego dimeru *b₆f*. Na jasnoróżowo oznaczono podjednostkę PetN, na fioletowo podjednostkę PetG, na szaro podjednostkę PetM, a na zielono podjednostkę PetL. Lokalizację czterech głównych podjednostek kompleksu cytochrom *b₆f* oraz przestrzenną lokalizację grup prostetycznych opisano i zaznaczono strzałkami.

i białko Riesego są homologami składników kompleksu cytochromów bc_1 . Cytochrom b_6 jest homologiem N-końcowego fragmentu cytochromu b [1-5,19,53]. Podjednostka IV wykazuje homologię z C-końcową częścią cytochromu b ; jej dodatkową funkcją jest wiązanie chlorofilu a [54]. Struktury trzeciorzędowe białek Riesego wchodzących w skład kompleksów cytochromów b_6f oraz bc_1 wykazują duże podobieństwo w obrębie domen wiążących 2Fe-2S lecz różnią się w domenie oddalanej (dystalnej) od błony. Porównanie struktury pierwszorzędowej białek Riesego zwierząt, roślin wyższych, glonów, sinic i bakterii purpurowych, pozwoliło na stwierdzenie homologii w obrębie sekwencji aminokwasów łańcucha polipeptydowego domen wiążących 2Fe-2S [31]. Badania z zastosowaniem mutacji punktowych wskazują, że ruch wymagany przy transporcie elektronów rozpuszczalnej domeny białka Riesego sinicy *Synechococcus* PCC 7002 [24,55] jest znacznie mniejszy niż w kompleksie cytochromów bc_1 [56,57]. W białku Riesego kompleksu cytochromów b_6f reszta Gly-141 jest połączona z resztą Pro-142 wiązaniem *cis*-peptydowym (numeracja dla szpinaku). Wiązanie *trans*-peptydowe reszty glicyny z resztą proliny w białku Riesego mitochondriów jest ważnym elementem stabilizującym to białko dzięki wiązaniom wodorowym z resztą Arg-128, nie mającej swojego odpowiednika w sekwencji aminokwasowej białka chloroplastów [31]. Cytochrom f pełni analogiczną funkcję jak cytochrom c_1 , jednakże nie wykazuje homologii w sekwencji aminokwasowej z wyjątkiem pięciu reszt wiążących hem typu c . Również nie stwierdzono podobieństw w strukturze. Jego struktura, składająca się z pasm β oraz z dużej i małej domeny, jest unikalna dla cytochromów typu c [32]. Większa stabilność kompleksu cytochromów bc_1 wynika między innymi z kontaktu pomiędzy dwoma cytochromami c_1 . Brak jest takiego kontaktu pomiędzy cytochromami f ; hemy typu c w kompleksie cytochromów b_6f są położone o 25 Å dalej w porównaniu z kompleksem cytochromów bc_1 [51]. Orientacja płaszczyzny hemu w cytochromie c_1 jest niemal prostopadła w stosunku do powierzchni błony, czym również różni się od ułożenia hemu cytochromu f [1,24].

Nie ma analogów małych podjednostek (PetG, PetM, PetN i PetL), które są rozmieszczone peryferyjnie i wiążą β -karoten. Kompleks cytochromów b_6f w miejscu Q_n wiąże dodatkowy hem. Liczbę polipeptydów tworzących kompleks cytochromów bc_1 charakteryzuje duże, powstałe w wyniku ewolucji, zróżnicowanie. Kompleks cytochromów bc_1 z purpurowej bakterii fotosyntetycznej *Rhodobacter capsulatus* składa się z 3 polipeptydów [58], drożdży z 9 [59], a ptaków z 11 [60]. Zarówno hem x cytochromu b_6 , jak i cząsteczki chlorofilu a i β -karotenu, nie mają swoich odpowiedników w kompleksie cytochromów bc_1 łańcucha oddechowego [2].

SKŁADANIE HOLOKOMPLEKSU b_6f

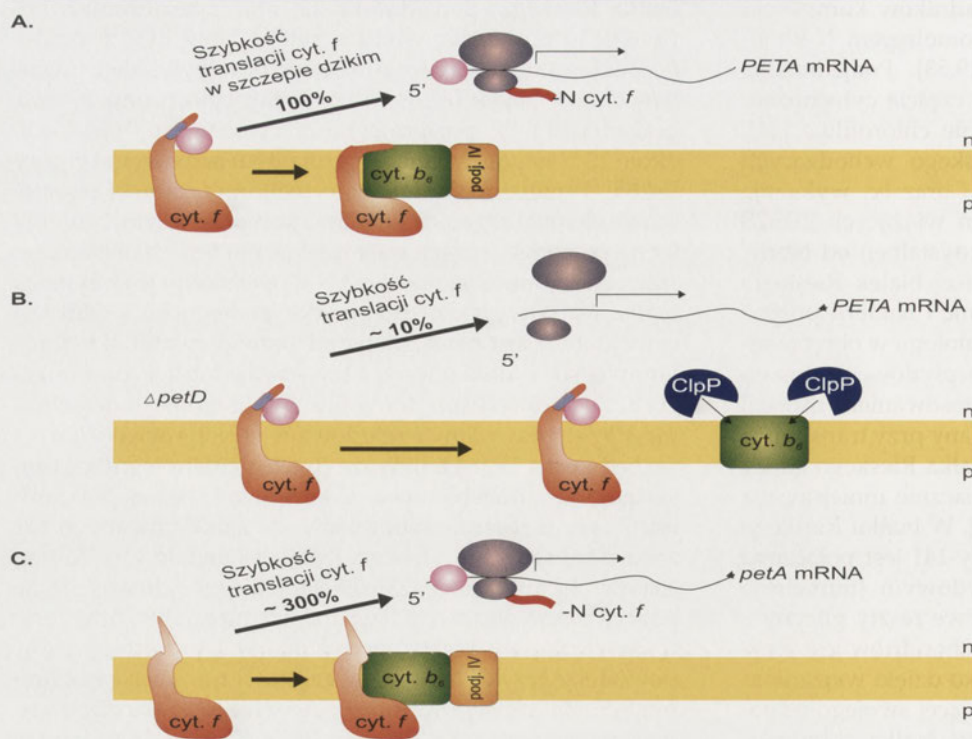
Sekwencyjny mechanizm tworzenia kompleksu cytochromów b_6f jest nadal przedmiotem intensywnych badań. W komórkach *C. reinhardtii* stabilność podjednostek holo-kompleksu b_6f jest uzależniona między innymi od obecności prawidłowo funkcjonującego enzymu proteolitycznego ClpP [61]. Kluczową rolę w poprawnym składaniu holo-kompleksu odgrywa prawidłowe wbudowanie w błonę tylakoidów białek stanowiących jego rdzeń: cytochromu b_6 ,

białka Riesego, podjednostki IV oraz cytochromu f . Poprawne i prawidłowe wbudowanie w błonę cytochromów b_6 i f determinuje włączenie hemów, co odbywa się z udziałem innych białek [62,63]. Przy braku cytochromu b_6 oraz podjednostki IV, poziom syntezy cytochromu f spada do około 10% w porównaniu z normalnym poziomem syntezy [64,65]. Wynika to z faktu, że cytochrom f stanowi podstawowy element regulacji składania kompleksu cytochromów b_6f na poziomie inicjacji translacji; jest to tzw. zjawisko epistatycznej kontroli syntezy (CES, *C. reinhardtii*) [64]. Synteza białka (w powyższym przypadku podjednostką CES jest cytochrom f) jest uzależniona od prawidłowości składania kompleksu, a dokładnie od tzw. podjednostek dominujących. Podjednostkami dominującymi kompleksu cytochromów b_6f są prawidłowo wbudowane w błonę cytochrom b_6 i podjednostka IV [64,65]. Ważnym elementem regulacji tego systemu jest transbłonowa, C-końcowa α -helisa cytochromu f oraz 8 reszt aminokwasowych zlokalizowanych tuż za tą α -helisą (reszty Lys-Lys-Lys-Gln-Phe-Glu-Lys-Val) od stromy chloroplastów [65]. Zastąpienie, znajdującej się na pozycji pierwszej, reszty lizyny resztą metioniny, oraz reszty fenyloalaniny resztą seryny, hamowało autoregulację, powodując trzykrotny wzrost częstości translacji cytochromu [65]. Za inicjację translacji powyższego białka odpowiedzialny jest region 5'UTR genu *PETA*. Gdy podstawiono w jego miejsce inny, niezwiązany z powyższą regulacją 5'UTR (sekwencja nukleotydowa kodująca pierwsze 25 reszt aminokwasowych podjednostki α syntazy ATP), nastąpiło zablokowanie kontroli CES [64].

Wspomniany motyw 8 reszt aminokwasowych cytochromu f oraz reszta Gln-297 (zlokalizowana w transbłonowej helisie kotwiczącej białko), pośrednio oddziałuje z 5'UTR *petA* mRNA. W oddziaływaniach pośredniczy białko TCA, czynnik jądrowy zaangażowany w inicjację translacji [62,66,67]. C-końcowy rejon cytochromu f oddziałuje z czynnikiem TCA. Związanie cytochromu f z cytochromem b_6 oraz podjednostką IV w błonie tylakoidów powoduje uwolnienie TCA od C-końcowego fragmentu cytochromu i TCA (poprzez oddziaływanie z 5'UTR mRNA genu *PETA*) promuje translację tej podjednostki kompleksu cytochromów b_6f . W komórkach zawierających zablokowany gen *petD* brak wyprodukowanej i wbudowanej w błonę podjednostki IV wywołuje proteolityczną degradację cytochromu b_6 . Czynnikiem TCA pozostaje połączony z C-końcowym rejonem cytochromu f , nie stymulując tym samym translacji (spadek liczby translacji do 10%). Mutacje w obrębie domeny wiążącej TCA w cytochromie f blokowały przyłączanie tego czynnika do białka zlokalizowanego w błonie, stymulując tym samym jego translację [62,67]. Mechanizm oddziaływań czynnika TCA z cytochromem f , w kontekście mechanizmu CES oraz regulacji składania kompleksu cytochromów b_6f przedstawia Ryc. 2. Białkiem kodowanym przez genom jądrowy, zaangażowanym w stabilizację transkryptu mRNA genu *PETA*, jest białko MCA1 [66,68]. Obniżony poziom białka MCA1 i TCA zaburza ekspresję genu *PETA* [68].

CZYNNIKI POWODUJĄCE NIESTABILNOŚĆ STRUKTURALNĄ HOLOKOMPLEKSU b_6f

Delecja chloroplastowego genu *PETG* *C. reinhardtii* lub *Synechocystis* PCC 6803 powoduje znaczny spadek liczby kompleksów cytochromów b_6f w błonach tylakoidów. Brak



Rycina 2. Graficzny model ekspresji genu cytochromu *f* w komórkach *C. reinhardtii*; model regulacji CES. **A.** Ekspresja genu cytochromu *f* w szczepie dzikim. **B.** Ekspresja genu cytochromu *f* w komórkach z zablockowanym genem *petD*. Brak elementu dominującego (podjednostki IV) powoduje degradację cytochromu *b₆*. Czynniki TCA nie jest uwalniany z cytochromu *f*, tym samym nie stymuluje translacji kolejnych białek [62,65]. **C.** Ekspresja genu cytochromu *f* w komórkach ze zmutowanym odcinkiem 8 reszt aminokwasowych oddziałujących z czynnikiem TCA. Na różowo oznaczano czynnik TCA, na czerwono cytochrom *f*, na zielono cytochrom *b₆*, na pomarańczowo podjednostkę IV, na niebiesko enzym proteolityczny ClpP (dane dla *C. reinhardtii* [61]), na żółto w tle dwuwarstwę lipidową; n – określenie stromalnej powierzchni błony tylakoidów; p – określenie lumenalnej powierzchni błony tylakoidów (na podstawie [62,65]).

podjednostki PetG ujemnie wpływa na składanie holokompleksu białkowego w *C. reinhardtii* (rezultatem mutacji delecyjnej genu *petG* *C. reinhardtii* jest zahamowanie wzrostu fotoautotroficznego) oraz *Synechocystis* PCC 6803 [40,69]. Podobne wyniki uzyskano dla mutantów delecyjnego genu *petN* tytoniu (*N. tabacum*), jak i *Synechocystis* PCC 6803 [17,39,40]. Mutacje zaburzenia ramki odczytu genu *PETN* tytoniu skutkuje zmniejszeniem liczby i stabilności kompleksów w błonie [17]. Całkowite zablockowanie ekspresji tego genu powoduje obumieranie pędów tytoniu w ciągu kilku dni [17]. Wydaje się także, że wpływ na syntezę kompleksu posiada podjednostka PetG, której brak uwidacznia się już na początkowym etapie składania kompleksu cytochromów *b₆f* [39]. Jest to zaskakujące biorąc pod uwagę, że podjednostki te są położone peryferyjnie w kompleksie. Z drugiej strony, podobną rolę pełnią małe podjednostki (PsbE, PsbF, PsbL oraz PsbJ) w fotosyntetycznym kompleksie PSII tytoniu [70,71]. W porównaniu do pozostałych małych podjednostek kompleksu, podjednostka PetM nie wpływa na stabilność i składanie kompleksu cytochromów *b₆f* [40,72]. Brak podjednostki PetL powoduje utratę białka Rieskego z monomerycznych form kompleksu cytochromów *b₆f* [39]. Warto zwrócić uwagę na fakt, że funkcja małych podjednostek w stabilizowaniu kompleksu cytochromów *b₆f* może zależeć od ich lokalizacji w dimerze. Jak już wspomniano, destabilizację holokompleksu *b₆f* powoduje brak podjednostki IV, cytochromu *b₆*, białka Rieskego, podjednostki PetG i cytochromu *f* [53,61,63,64,69]. W cytochromie *b₆*

punktowa mutacja reszty leucyny na pozycji 204 (numeracja dla *C. reinhardtii*) na resztę proliny, całkowicie hamuje proces fotosyntezy. Następuje zablokowanie transportu elektronów i brak jest kompleksów *b₆f*, co wynika z braku prawidłowo wbudowanych hemów w cytochromie *b₆* [73].

PODSUMOWANIE

Znane obecnie struktury kompleksu cytochromów *b₆f* dostarczyły nowych informacji w odniesieniu do struktury i funkcji składowych kompleksu (hem α cytochromu *b₆*). Mechanizm biogenezy kompleksu cytochromów *b₆f*, dzięki prowadzonym obecnie badaniom jest coraz bardziej czytelny, zrozumiały, wskazując na precyzję, złożoność i wieloaspektowość całego procesu.

PIŚMIENNICTWO

- Darrouzet E, Cooley JW, Daldal F (2004) The cytochrome bc (1) complex and its homologue the b (6) f complex: similarities and differences. *Photosynth Res* 79: 25-44
- Smith JL, Zhang H, Yan J, Kurisu G, Cramer WA (2004) Cytochrome bc complexes: a common core of structure and function surrounded by diversity in the outlying provinces. *Curr Opin Struct Biol* 14: 432-439
- Soriano GM, Ponamarev MV, Carrell CJ, Xia D, Smith JL, Cramer WA (1999) Comparison of the cytochrome bc1 complex with the anticipated structure of the cytochrome *b₆f* complex: Le plus ca change le plus c'est la meme chose. *J Bioenerg Biomembr* 31: 201-213
- Romanowska E (1994) Kompleks cytochromów *b₆f* z błon chloroplastów. *Postepy Biochem* 40: 59-62
- Szczepaniak A (1994) Cytochrome *b₆f* complex – structure and function. *Post Biol Kom* 21: 375-389
- Allen JF (2004) Cytochrome *b₆f*: structure for signalling and vectorial metabolism. *Trends Plant Sci* 9: 130-137
- Schneider D, Berry S, Volkmer T, Seidler A, Rogner M (2004) PetC1 is the major Rieske iron-sulfur protein in the cytochrome *b₆f* complex of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 279: 39383-39388
- Schettle S (2007) Rieske iron-sulfur protein isoforms in a unicellular *Cyanobacterium*. *Oshkosh Scholar* II: 81-89
- Yu SG, Romanowska E, Xue Z, Albertsson PA (1994) Evidence for two different Rieske iron-sulfur proteins in the cytochrome *b₆f* complex of spinach chloroplast. *Biochim Biophys Acta* 1185: 239-242
- Clark RD, Hawkesford MJ, Coughlan SJ, Bennett J, Hind G (1984) Association of ferredoxin-NADP+ oxidoreductase with the chloroplast cytochrome *b₆f* complex. *FEBS Lett* 174: 137-142
- Garstka M (2007) Strukturalne podstawy reakcji świetlnych fotosyntezy. *Post Biol Kom* 34: 445-476
- Okutani S, Hanke GT, Satomi Y, Takao T, Kurisu G, Suzuki A, Hase T (2005) Three maize leaf ferredoxin:NADPH oxidoreductases vary in subchloroplast location, expression, and interaction with ferredoxin. *Plant Physiol* 139: 1451-1459

13. Zhang H, Whitelegge JP, Cramer WA (2001) Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome b₆f complex. *J Biol Chem* 276: 38159-38165
14. Whitelegge JP, Zhang H, Aguilera R, Taylor RM, Cramer WA (2002) Full subunit coverage liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LCMS+) of an oligomeric membrane protein: cytochrome b(6)f complex from spinach and the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Mol Cell Proteomics* 1: 816-827
15. Grzyb J, Malec P, Rumak I, Garstka M, Strzalka K (2008) Two isoforms of ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase from wheat leaves: purification and initial biochemical characterization. *Photosynth Res* 96: 99-112
16. de Vitry C, Breyton C, Pierre Y, Popot JL (1996) The 4-kDa nuclear-encoded PetM polypeptide of the chloroplast cytochrome b₆f – Complex nucleic acid and protein sequences, targeting signals, transmembrane topology. *J Biol Chem* 271: 10667-10671
17. Hager M, Biehler K, Illerhaus J, Ruf S, Bock R (1999) Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome b(6)f complex. *EMBO J* 18: 5834-5842
18. Hamel P, Olive J, Pierre Y, Wollman FA, de Vitry C (2000) A new subunit of cytochrome b₆f complex undergoes reversible phosphorylation upon state transition. *J Biol Chem* 275: 17072-17079
19. Stroebel D, Choquet Y, Popot JL, Picot D (2003) An atypical haem in the cytochrome b₆f complex. *Nature* 426: 413-418
20. Mosser G, Breyton C, Olofsson A, Popot JL, Rigaud JL (1997) Projection map of cytochrome b₆f complex at 8 angstrom resolution. *J Biol Chem* 272: 20263-20268
21. Huang D, Zhang H, Soriano GM, Dahms TES, Krahn JM, Smith JL, Cramer WA (1998) Characterization and crystallization of a highly active cytochrome b₆f complex from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*, w: Garab G (red) Photosynthesis: Mechanism and Effects. Proceedings of the XIth International Congress of Photosynthesis, Kluwer Academic Publishers, Budapest, Hungary, str. 1577-1581
22. Dietrich J, Kuhlbrandt W (1999) Purification and two-dimensional crystallization of highly active cytochrome b(6)f complex from spinach. *FEBS Lett* 463: 97-102
23. Bron P, Lacapere JJ, Breyton C, Mosser G (1999) The 9 Å projection structure of cytochrome b₆f complex determined by electron crystallography. *J Mol Biol* 287: 117-126
24. Kurisu G, Zhang H, Smith JL, Cramer WA (2003) Structure of the cytochrome b₆f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* 302: 1009-1014
25. Zhang H, Kurisu G, Smith JL, Cramer WA (2003) A defined protein-detergent-lipid complex for crystallization of integral membrane proteins: The cytochrome b₆f complex of oxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5160-5163
26. Knoll AH (2004) Life on a Young Planet: The First Three Billion Years of Evolution on Earth, Princeton University Press, New York
27. Cramer WA, Zhang H, Yan J, Kurisu G, Smith JL (2006) Transmembrane traffic in the cytochrome b₆f complex. *Annu Rev Biochem* 75: 769-790
28. de Vitry C, Desbois A, Redeker V, Zito F, Wollman FA (2004) Biochemical and spectroscopic characterization of the covalent binding of heme to cytochrome b₆. *Biochemistry* 43: 3956-3968
29. Yan J, Cramer WA (2004) Molecular control of a bimodal distribution of quinone-analogue inhibitor binding sites in the cytochrome b₆f complex. *J Mol Biol* 344: 481-493
30. Zito F, Finazzi G, Delosme R, Nitschke W, Picot D, Wollman FA (1999) The Qo site of cytochrome b₆f complexes controls the activation of the LHClI kinase. *EMBO J* 18: 2961-2969
31. Carrell CJ, Zhang H, Cramer WA, Smith JL (1997) Biological identity and diversity in photosynthesis and respiration: structure of the lumen-side domain of the chloroplast Rieske protein. *Structure* 5: 1613-1625
32. Martinez SE, Huang D, Szczepaniak A, Cramer WA, Smith JL (1994) Crystal structure of chloroplast cytochrome f reveals a novel cytochrome fold and unexpected heme ligation. *Structure* 2: 95-105
33. Chi YL, Huang LS, Zhang Z, Fernandez-Velasco JG, Berry EA (2000) X-ray structure of a truncated form of cytochrome f from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry* 39: 7689-7701
34. Sainz G, Carrell CJ, Ponamarev MV, Soriano GM, Cramer WA, Smith JL (2000) Interruption of the internal water chain of cytochrome f impairs photosynthetic function. *Biochemistry* 39: 9164-9173
35. Carrell CJ, Schlarb BG, Bendall DS, Howe CJ, Cramer WA, Smith JL (1999) Structure of the soluble domain of cytochrome f from the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Biochemistry* 38: 9590-9599
36. von Heijne G (1994) Membrane proteins: From sequence to structure. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23: 167-192
37. Haley J, Bogorad L (1989) A 4-kDa maize chloroplast polypeptide associated with the cytochrome b₆f complex: subunit 5, encoded by the chloroplast *petE* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1534-1538
38. Dalbey RE, Robinson C (1999) Protein translocation into and across the bacterial plasma membrane and the plant thylakoid membrane. *Trends Biochem Sci* 24: 17-22
39. Schwenkert S, Legen J, Takami T, Shikanai T, Herrmann RG, Meurer J (2007) Role of the low-molecular-weight subunits PetL, PetG, and PetN in assembly, stability, and dimerization of the cytochrome b₆f complex in tobacco. *Plant Physiol* 144: 1924-1935
40. Schneider D, Volkmer T, Rogner M (2007) PetG and PetN, but not PetL, are essential subunits of the cytochrome b₆f complex from *Synechocystis* PCC 6803. *Res Microbiol* 158: 45-50
41. Takahashi Y, Rahire M, Breyton C, Popot JL, Joliot P, Rochaix JD (1996) The chloroplast *ycf7* (*petL*) open reading frame of *C. reinhardtii* encodes a small functionally important subunit of the Cyt b₆f complex. *EMBO J* 15
42. Fiebig A, Stegemann S, Bock R (2004) Rapid evolution of RNA editing sites in a small non-essential plastid gene. *Nucleic Acids Res* 32: 3615-3622
43. Schottler MA, Flugel C, Thiele W, Bock R (2007) Knock-out of the plastid-encoded PetL subunit results in reduced stability and accelerated leaf age-dependent loss of the cytochrome b₆f complex. *J Biol Chem* 282: 976-985
44. Xia D, Kim H, Yu CA, Yu L, Kachurin A, Zhang L, Deisenhofer J (1998) A novel electron transfer mechanism suggested by crystallographic studies of mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Biochem Cell Biol* 76: 673-679
45. Yu CA, Xia D, Kim H, Deisenhofer J, Zhang L, Kachurin AM, Yu L (1998) Structural basis of functions of the mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1365: 151-158
46. Cramer WA, Zhang H, Yan J, Kurisu G, Smith JL (2004) Evolution of photosynthesis: time-independent structure of the cytochrome b₆f complex. *Biochemistry* 43: 5921-5929
47. Huang D, Everly RM, Cheng RH, Heymann JB, Schagger H, Sled V, Ohnishi T, Baker TS, Cramer WA (1994) Characterization of the chloroplast cytochrome b₆f complex as a structural and functional dimer. *Biochemistry* 33: 4401-4409
48. Peterman EJG, Wenk SO, Pullerits T, Palsson LO, vanGrondelle R, Dekker JP, Rogner M, vanAmerongen H (1998) Fluorescence and absorption spectroscopy of the weakly fluorescent chlorophyll a in cytochrome b(6)f of *Synechocystis* PCC 6803. *Biophys J* 75: 389-398
49. Pierre Y, Breyton C, Lemoine Y, Robert B, Vernotte C, Popot JL (1997) On the presence and role of a molecule of chlorophyll a in the cytochrome b₆f complex. *J Biol Chem* 272: 21901-21908
50. Zhang H, Huang D, Cramer WA (1999) Stoichiometrically bound b-carotene in the cytochrome b₆f complex of oxygenic photosynthesis protects against oxygen damage. *J Biol Chem* 274: 1581-1587
51. Cramer WA, Yan J, Zhang H, Kurisu G, Smith JL (2005) Structure of the cytochrome b₆f complex: new prosthetic groups, Q-space, and the 'hors d'oeuvres hypothesis' for assembly of the complex. *Photosynth Res* 85: 133-143

52. Yan J, Liu Y, Mao D, Li L, Kuang T (2001) The presence of 9-cis-beta-carotene in cytochrome b_6/f complex from spinach. *Biochim Biophys Acta* 1506: 182-188
53. Monde RA, Zito F, Olive J, Wollman FA, Stern DB (2000) Post-transcriptional defects in tobacco chloroplast mutants lacking the cytochrome b_6/f complex. *Plant J* 21: 61-72
54. Widger WR, Cramer WA, Herrmann RG, Trebst A (1984) Sequence homology and structural similarity between cytochrome b of mitochondrial complex III and the chloroplast b_6/f complex: position of the cytochrome b hemes in the membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 674-678
55. Yan J, Cramer WA (2003) Functional insensitivity of the cytochrome b_6/f complex to structure changes in the hinge region of the Rieske iron-sulfur protein. *J Biol Chem* 278: 20925-20933
56. Darrouzet E, Valkova-Valchanova M, Daldal F (2000) Probing the role of the Fe-S subunit hinge region during Q(o) site catalysis in *Rhodobacter capsulatus* bc(1) complex. *Biochemistry* 39: 15475-15483
57. Darrouzet E, Valkova-Valchanova M, Moser CC, Dutton PL, Daldal F (2000) Uncovering the 2Fe-2S domain movement in cytochrome bc1 and its implications for energy conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4567-4572
58. Berry EA, Huang LS, Saechao LK, Pon NG, Valkova-Valchanova M, Daldal F (2004) X-Ray Structure of *Rhodobacter capsulatus* cytochrome bc (1): Comparison with its mitochondrial and chloroplast Counterparts. *Photosynth Res* 81: 251-275
59. Hunte C, Koepke J, Lange C, Rossmanith T, Michel H (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* 8: 669-684
60. Zhang ZL, Huang LS, Shulmeister VM, Chi YI, Kim KK, Hung LW, Crofts AR, Berry EA, Kim SH (1998) Electron transfer by domain movement in stockbroker bc(1). *Nature* 392: 677-684
61. Majeran W, Wollman F A, Vallon O (2000) Evidence for a role of ClpP in the degradation of the chloroplast cytochrome b_6/f complex. *Plant Cell* 12: 137-149
62. Hippler M, Rimbault B, Takahashi Y (2002) Photosynthetic complex assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist* 153: 197-220
63. Wollman FA, Minai L, Nechushtai R (1999) The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1411: 21-85
64. Choquet Y, Stern DB, Wostrikoff K, Kuras R, Girard-Bascou J, Wollman FA (1998) Translation of cytochrome f is autoregulated through the 5' untranslated region of petA mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4380-4385
65. Choquet Y, Vallon O (2000) Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. *Biochimie* 82: 615-634
66. Choquet Y, Wollman FA (2002) Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression *FEBS Lett* 529: 39-42
67. Wostrikoff K, Choquet Y, Wollman FA, Girard-Bascou J (2001) TCA1, a single nuclear-encoded translational activator specific for petA mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Genetics* 159: 119-132
68. Raynaud C, Loiselay C, Wostrikoff K, Kuras R, Girard-Bascou J, Wollman FA, Choquet Y (2007) Evidence for regulatory function of nucleus-encoded factors on mRNA stabilization and translation in the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 9093-9098
69. Berthold DA, Schmidt CL, Malkin R (1995) The deletion of petG in *Chlamydomonas reinhardtii* disrupts the cytochrome bf complex. *J Biol Chem* 270: 29293-29298
70. Ohad I, Dal Bosco C, Herrmann RG, Meurer J (2004) Photosystem II proteins PsbL and PsbJ regulate electron flow to the plastoquinone pool. *Biochemistry* 43: 2297-2308
71. Swiatek M, Regel RE, Meurer J, Wanner G, Pakrasi HB, Ohad I, Herrmann RG (2003) Effects of selective inactivation of individual genes for low-molecular-mass subunits on the assembly of photosystem II, as revealed by chloroplast transformation: the psbEFLJoperon in *Nicotiana tabacum*. *Mol Genet Genomics* 268: 699-710
72. Schneider D, Berry S, Rich P, Seidler A, Rogner M (2001) A regulatory role of the PetM subunit in a cyanobacterial cytochrome b_6/f complex. *J Biol Chem* 276: 16780-16785
73. Zito F, Kuras R, Choquet Y, Kossel H, Wollman FA (1997) Mutations of cytochrome b(6) in *Chlamydomonas reinhardtii* disclose the functional significance for a proline to leucine conversion by petB editing in maize and tobacco. *Plant Mol Biol* 33: 79-86

Structure and biogenesis of cytochrome b_6/f complex

Katarzyna Hombek-Urban^{1,✉}, Jarosław Króliczewski², Andrzej Szczepaniak²

¹Department of Hygiene, Wrocław Medical University, 7 Mikulicza-Radeckiego St., 50-345 Wrocław, Poland

²Institute of Biophysics, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, 63/77 S. Przybyszewskiego St., 51-148 Wrocław, Poland

✉ e-mail: kasiahombekurban@hyg.am.wroc.pl

Key words: cytochrome b_6/f complex, cytochrome b_6 haem, Rieske protein, cytochrome f , ferredoxin reductase

ABSTRACT

Both photosynthetic cytochrome b_6/f complex, and respiratory cytochrome bc_1 belong to the family of cytochrome bc complexes. Both protein supercomplexes participate in the transport of electrons, proton translocation through the biological membrane, and they catalyze chinon oxidation as well. The function, composition, spatial organization and biosynthesis of cytochrome b_6/f complex has been being the subject of research for years. The obtained crystal structures revealed the presence of the third haem in the cytochrome b_6 , whereas mutagenic experiments indicated the participation of the additional protein factor (TCA) engaged in the regulation of b_6/f cytochrome complex synthesis through the interaction between TCA and 5' UTR of the *PETA* transcript. The following compendium is the collection of the current data and knowledge with reference to the structure and biogenesis of the above mentioned protein complex.

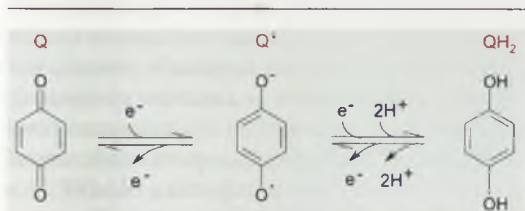
STRESZCZENIE

Chinony prenylowe stanowią grupę związków obecnych we wszystkich organizmach. Zbudowane są z polarnego pierścienia ulegającego reakcjom redoks oraz długiego, hydrofobowego łańcucha bocznego. Ze względu na amfifilową strukturę, występują głównie w błonach biologicznych, pełniąc tam przede wszystkim rolę przenośników elektronów i protonów w fotosyntetycznym i oddechowym łańcuchu transportu elektronów. Są również wydajnymi antyutleniaczami. Mogą także pełnić bardziej specyficzne funkcje np. jako kofaktory enzymów. Wśród chinonów prenylowych, ze względu na strukturę pierścienia, wyróżnia się menachinony (witamina K₁), filochinon (witamina K₂), ubichinony oraz plastochinony, choć znane są także inne rodzaje, np. tokoferyllochinony. Często różne grupy organizmów są zdolne do biosyntezy tylko niektórych rodzajów chinonów prenylowych. W niniejszej pracy przedstawiono syntetyczny przegląd informacji dotyczący najważniejszych grup chinonów prenylowych, ich budowy, funkcji, biosyntezy oraz występowania.

WPROWADZENIE

Większość związków zawierających układy chinonowe, wykrywanych w organizmach, to metabolity wtórne roślin, grzybów, porostów i bakterii. Do tej pory opisano ponad 2400 naturalnie występujących chinonów [1,2]. Wśród tej licznej grupy związków na szczególną uwagę zasługują chinony prenylowe, zwane także, ze względu na pełnione przez nie podstawowe funkcje w metabolizmie, biochinonami. O ich znaczeniu najlepiej świadczy fakt, że występują we wszystkich grupach organizmów [3]. Pełnią tam różnorodne funkcje, z których najważniejsza to udział w fotosyntetycznym i oddechowym łańcuchu transportu elektronów. Cząsteczki chinonów prenylowych mają charakter amfifilowy. Zbudowane są z polarnego pierścienia chinonowego zawierającego różne podstawniki (najczęściej metylowe lub metoksyłowe) oraz hydrofobowego łańcucha izoprenoidowego o różnej długości. Łańcuch ten zbudowany jest z 5-węglowych jednostek i zawiera zwykle wiązania podwójne w konfiguracji *trans* w każdej jednostce. Łańcuch boczny zapewnia cząsteczkom chinonów prenylowych rozpuszczalność w tłuszczach, a także „kotwiczony” je w dwuwarstwach lipidowych i w hydrofobowych rejonach białek. Hydrofilowy pierścień chinonów prenylowych jest zazwyczaj eksponowany do środowiska wodnego lub oddziałuje z polarnymi rejonami białek. Układ chinonowy może ulegać odwracalnej, dwustopniowej redukcji prowadzącej do powstania chinolu (hydrochinonu) (Ryc. 1).

Lokalizacja i dynamika molekularna chinonów prenylowych w błonach biologicznych jest ściśle związana ze strukturą ich cząsteczek (długość łańcucha bocznego, liczba i rodzaj podstawników w pierścieniu, jego stan redoks) i ma kluczowe znaczenie dla pełnienia odpowiednich funkcji biologicznych tych związków. Zagadnienia te omówiono szerzej we wcześniejszych pracach [4,5]. Zdolność odwracalnej redukcji połączona z hydrofobowym charakterem cząsteczek umożliwia chinonom prenylowym pełnienie funkcji przenośników elektronów i protonów pomiędzy kompleksami białkowymi w błonach. Stąd chinony prenylowe stanowią



Rycina 1. Reakcje redoks pierścienia benzochinonów. Q – forma utleniona, Q^{•-} – anionorodnikowa, semichinonowa forma pośrednia; niestabilna i reaktywna, może być stabilizowana poprzez oddziaływanie z białkiem, QH₂ – obojętna elektrycznie, trwała forma chinolowa (hydrochinonowa).

element fotosyntetycznych i oddechowych łańcuchów transportu elektronów i to zarówno w postaci ruchomych przenośników wodoru w błonach, jak i kofaktorów trwale związanych z białkami, uczestniczących w transporcie elektronów w obrębie kompleksów białkowych [3]. Formy chinolowe (hydrochinonowe), powstające w wy-

Beatrycze Nowicka

Renata Szymańska

Jerzy Kruk ✉

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii,
Uniwersytet Jagielloński

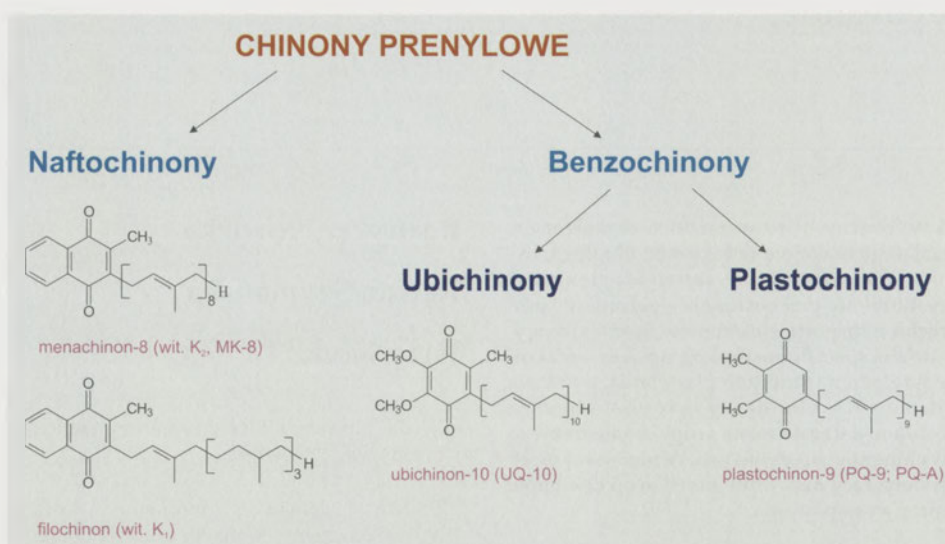
Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin,
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii,
Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7,
30-387 Kraków, e-mail: jerzy.kruk@uj.edu.pl

Artykuł otrzymano 26 marca 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 23 maja 2009 r.

Słowa kluczowe: antyutleniacze, benzochinony, łańcuch transportu elektronów, menachinon, naftochinony, plastochinon, chinony prenylowe, ubichinon

Wykaz skrótów: DMK – demetyl-menachinon; MK – menachinon; PQ – plastochinon; PSI – fotosystem I; PSII – fotosystem II; ROS – reaktywne formy tlenu; UQ – ubichinon

Podziękowanie: Artykuł powstał w trakcie realizacji projektu badawczego N302 049 32 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego



Rycina 2. Struktura powszechnie występujących chinonów prenylowych.

niku redukcji, posiadają także zdolności antyutleniające, umożliwiające im między innymi ochronę błon biologicznych przed peroksydacją lipidów. Niektóre chinony prenylowe są także kofaktorami enzymów. Postuluje się także udział tych związków w regulacji ekspresji genów [6].

Naturalnie występujące chinony prenylowe są pochodnymi benzochinonu lub naftochinonu (Ryc. 2). Szczególnie duża różnorodność tych związków występuje w organizmach prokariotycznych, stąd można wykorzystywać analizę składu chinonów prenylowych u tych organizmów jako narzędzie taksonomiczne [7].

NAFTOCHINONY

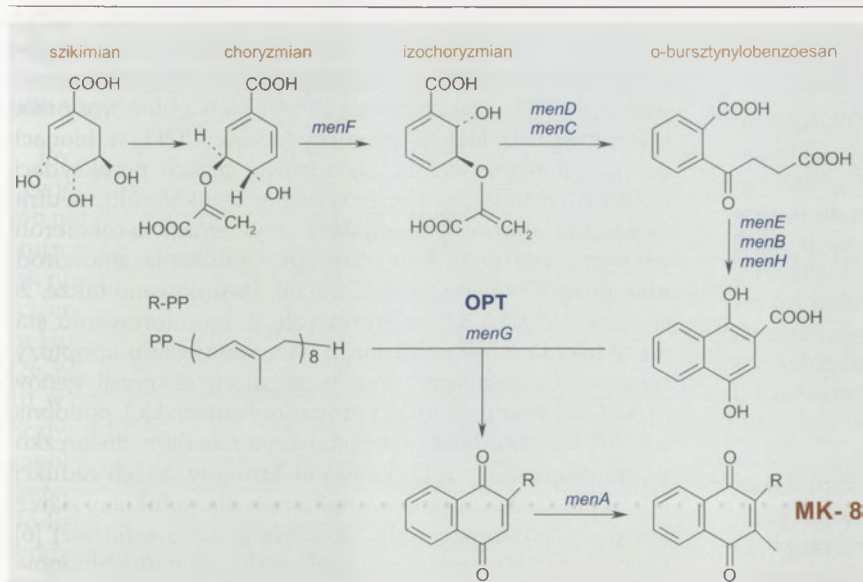
WYSTĘPOWANIE I FUNKCJE NAFTOCHINONÓW

Naftochinony są grupą związków „ewolucyjnie starszych” od benzochinonów [8]. Ich główną funkcją jest udział w transporcie elektronów i protonów w łańcuchu oddechowym wielu grup bakterii (np. bakterii gramodatnich) [8]. Najpowszechniej występującymi przedstawicielami naftochinonów organizmów prokariotycznych są menachinony (MK) o różnej długości łańcucha bocznego, choć często występują także demetylomenachinony (DMK) [3]. Przenoszą one elektrony pomiędzy kompleksami dehydrogenaz a cytochromem *bc*₁ [3,8]. Ponadto uczestniczą w fotosyntezie bakteryjnej, gdzie występują w centrach reakcji typu PSII oraz w błonach zielonych bakterii nitkowatych i niektórych bakterii purpurowych [9]. Menachinony pełnią także funkcje przenośnika elektronów między pierwotnym donorem elektronów a centrum żelazo-siarkowym Fe₄S₄ w centrach reakcji typu PSI zielonych bakterii siarkowych i heliobakterii [9]. U proteobakterii zdolnych także do syntezy ubichinonów (UQ), wykorzystanie chinonów prenylowych zależy od typu przeprowadzanego przez nie metabolizmu. Obligatoryjne aeroby wykorzystują UQ, zaś MK jest wykorzystywany przez obligatoryjne anaeroby posiadające oddechowy łańcuch transportu elektronów z końcowym akceptorem innym niż tlen (np. azotan) [3]. Fakultatywne beztlenowce, takie jak *E. coli*, syntetyzują zarówno UQ, jak i MK [3], przy czym ich wzajemny stosunek zależy od zaw-

rości tlenu w otoczeniu. U *E. coli* hodowanej w warunkach tlenowych poziom UQ jest 4-5 razy wyższy niż poziom MK+DMK, podczas gdy w warunkach beztlenowych poziom UQ jest 3-razy niższy od poziomu MK+DMK [10]. Uważa się, że menachinony posiadające niższy potencjał redoks niż UQ lepiej spełniają swoją funkcję w łańcuchu oddechowym zawierającym akceptory elektronów o niskim potencjale [3,8]. Wykazano, że u mutantów *E. coli* zawierających tylko UQ albo MK, dochodzi do funkcjonalnego zastępowania brakującego chinonu prenylowego, choć nie dla wszystkich donorów elektronów, gdyż niektóre dehydrogenazy wykazują specyficzność substratową. Menachinony są obecne także u archebakterii (*Archaea*), gdzie zawierają często nasy-

czone łańcuchy izoprenoidowe [7]. U organizmów prokariotycznych menachinony uczestniczą również w biosyntezie zasad pirymidynowych w warunkach beztlenowych [11].

Filochinon, zwany też witaminą K₁, jest syntezowany przez wszystkie organizmy zdolne do oksygenicznej (wytwarzającej tlen) fotosyntezy, czyli przez rośliny i sinice. Jego łańcuch boczny stanowi reszta fitolu. Filochinon funkcjonuje jako kofaktor A₁ w PSI, przenosząc elektrony pomiędzy przenośnikami A₀ (chlorofil *a* związany poprzez reszty metioniny z heterodimerem białek PsaA/B) a centrami żelazo-siarkowymi typu Fe₄S₄ [9,12]. W PSI występują 2 cząsteczki filochinonu na jedno centrum reakcji, pełniące identyczne funkcje przenośników elektronów w dwóch równoległych gałęziach, jednak szybkość transportu elektronów w jednej z nich jest około 10 razy większa niż w drugiej. Różnice te wynikają z nieco odmiennego otoczenia aminokwasowego obu cząsteczek filochinonu [13]. Wyniki doświadczeń z wykorzystaniem mutantu *Synechocystis* sp. pozbawionego filochinonu wykazały, że może on być zastępowany w PSI przez PQ, chociaż szybkość transportu elektronów jest w tym przypadku mniejsza [14]. W liściach *Arabidopsis thaliana* filochinon występuje prawie wyłącznie w chloroplastach, z czego około 50% zlokalizowane jest poza PSI, głównie w plastoglobulach [15]. Niewielka frakcja filochinonu była również wykrywana w otoczce chloroplastu, miejscu syntezy filochinonu i innych chinonów prenylowych u roślin [16]. Filochinon występuje u roślin wyższych głównie w liściach w postaci utlenionej oraz w mniejszej ilości w formie zredukowanej, natomiast w innych organach (owoce, korzenie, bulwy) wykryto ten związek w znacznie mniejszych ilościach i tylko w postaci utlenionej [15]. Postulowano również udział filochinonu w łańcuchu transportu elektronów w błonie komórkowej między dehydrogenazą NAD(P)H a cytochromem typu *b*, który ma służyć do produkcji anionorodnika ponadtlenkowego w odpowiedzi na atak patogenu [17]. W badaniach *in vitro* wykazano aktywność reduktazy chinonowej zależnej od NAD(P)H na izolowanych preparatach błon [17]. Aktywność ta była stymulowana przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej filochinonu. Poparciem hipotezy



Rycina 3. Szlak biosyntezy MK-8. OPT – oktaprenylotransferaza 1,4-dihydroksi-2-naftanowa, R-PP – difosforan oktaprenyłu syntetyzowany w serii reakcji kondensacji katalizowanej przez syntazy difosforanów prenylowych, R – łańcuch oktaprenylowy.

o udziale filochinonu w wyżej wymienionych reakcjach *in vivo* było jego wykrycie w błonie komórkowej kukurydzy. [17].

ZNACZENIE W METABOLIZMIE CZŁOWIEKA

Naftochinony prenylowe przyjęło się potocznie nazywać witaminami K, ze względu na ich niezbędność w metabolizmie człowieka, a których organizm nie jest sam w stanie syntetyzować. Do grupy związków określanych mianem witaminy K należą: witamina K₁ (filochinon; pochodzenia roślinnego), witamina K₂ (menachinon; pochodzenia bakteryjnego) oraz witamina K₃ (menadion; syntetyczny odpowiednik witaminy K). Litera „K” wywodzi się od niemieckiego słowa „koagulation”. Witamina K została odkryta w roku 1929 przez Dama, natomiast po raz pierwszy oczyszczono ją i wyizolowano z liści lucerny dziesięć lat później [18]. Witamina K jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania niektórych białek zaangażowanych w krzepnięcie krwi. Działa jako kofaktor enzymu katalizującego przemianę kwasu glutaminowego w kwas γ -karboksylglutaminowy, który ułatwia białkom wiązanie jonów wapnia, co z kolei wpływa na aktywację siedmiu czynników krzepnięcia krwi niezbędnych w tym procesie [18]. Oprócz udziału w procesie koagulacji, dobrze udokumentowany jest także udział witaminy K w mineralizacji kości [19] oraz w regulacji aktywności wielu enzymów zaangażowanych w metabolizm sfingolipidów mózgu [20]. Rezultatem niedoboru witaminy K są nieprawidłowości w procesie krzepnięcia krwi (wydłużenie czasu krzepnięcia krwi oznaczanego w testach laboratoryjnych), samoistne krwawienia z nosa, dziąseł, obecność krwi w moczu i kale oraz bardzo obfite krwawienia miesięczne u kobiet [18]. U niemowląt może dochodzić do wewnętrznych krwotoków w obrębie czaszki [18]. Niektóre dane sugerują związek niedoboru witaminy K z występowaniem dziecięcej białaczki i innych typów raka [21]. Ponadto niedobór witaminy K zwiększa ryzyko osteoporozy [19].

Pomimo tego, że witamina K jest syntetyzowana przez symbiotyczne mikroorganizmy występujące w jelitach, dla zapewnienia ilości wymaganej przez organizm konieczne jest dostarczanie jej wraz z pożywieniem. Dobrym źródłem witaminy K są olej rzepakowy, olej sojowy, oliwa z oliwek oraz zielone części roślin (brokuły, jarmuż, szpinak, sałata, botwinka, rzeżucha, pietruszka) [18].

BIOSYNTEZA NAFTOCHINONÓW

Prekursory polarnego pierścienia i izoprenoidowego łańcucha bocznego są syntetyzowane w oddzielnych szlakach. Pierwotnymi prekursorami biosyntezy łańcucha prenylowego są difosforan dimetyloallilu i izopentenylu (IPP), które u archebakterii, nielicznych gatunków bakterii należących do różnych grup systematycznych (np. *Chloroflexus aurantiacus*, *Borrelia burgdorferi*, *Myxococcus fulvus*), pierwotniaków, grzybów, roślin i zwierząt są syntetyzowane w szeregu reakcji szlaku mewalonowego, natomiast u większości bakterii i w chloroplastach roślin powstają na drodze reakcji szlaku 1-deoksi-D-ksylulozo fosforanowego (DXP) [22]. W reakcji dobudowywania kolejnych reszt IPP do difosforanu dimetyloallilu przez specyficzną dla różnych grup organizmów syntazę difosforanu poliprenyłu, powstaje coraz dłuższy łańcuch. Długość tego łańcucha jest determinowana przez strukturę centrum aktywnego odpowiedniej syntazy. W związku z tym, liczba jednostek prenylowych różni się często u różnych gatunków, szczególnie u organizmów prokariotycznych. Przykładowo MK u *E. coli* posiada osiem jednostek prenylowych (MK-8), u *Helicobacter pylori* występuje MK-4 oraz MK-6, natomiast u *Bacillus firmus* MK-7 [3]. Prekursor układu naftochinonowego pochodzi ze szlaku kwasu szikimowego [23]. W szeregu reakcji z szikimianu powstaje 1,4-dihydroksi-2-naftan (Ryc. 3). Następnie prenylotransferaza 1,4-dihydroksi-2-naftanowa katalizuje reakcję kondensacji 1,4-dihydroksi-2-naftanu z prekursorem łańcucha, difosforanem poliprenyłu. Ostatnią reakcją jest metylacja w obrębie pierścienia zawierającego układ chinonowy.

Biosynteza filochinonu przebiega w podobny sposób, a główna różnica polega na tym, że prenylotransferaza przeprowadzająca kondensację wykorzystuje jako substrat difosforan fitylu [12]. Reakcja ta zachodzi w otoczkach chloroplastów [24]. Doświadczenia na mutantach *Arabidopsis* z upośredzoną biosyntezą filochinonu wykazały udział produktu genu *PHYLLLO*, występującego w genomie jądrowym w biosyntezie filochinonu. Gen *PHYLLLO* wykazuje homologię z czterema genami bakteryjnymi *menF*, *menD*, *menC* i *menH*, katalizującymi odpowiednie reakcje biosyntezy MK u eubakterii (Ryc. 3) i filochinonu u sinic [25]. Fakt ten sugeruje, że geny kodujące białka, które biorą udział w biosyntezie filochinonu, pochodzą z prokariotycznego endosymbionta.

UQ-10 (koenzym Q-10, Q₁₀, ubichinon-10, CoQ) został odkryty w 1957 roku, przez F. Cranea [26]. Nazwa „ubichinon” wywodzi się od łacińskiego słowa *ubitarius*, oznaczającego wszechobecny (ang. *ubiquitous*), co wiąże się z jego występowaniem w mitochondriach wszystkich grup organizmów, gdzie jest przenośnikiem elektronów w łańcuchu oddechowym [27]. Ponadto u organizmów eukariotycznych, UQ został zidentyfikowany nie tylko w wewnętrznej błonie mitochondriów, ale także w siateczce śródplazmatycznej, aparacie Golgiego, lizosomach, peroksysomach i błonach komórkowych [3,27,28].

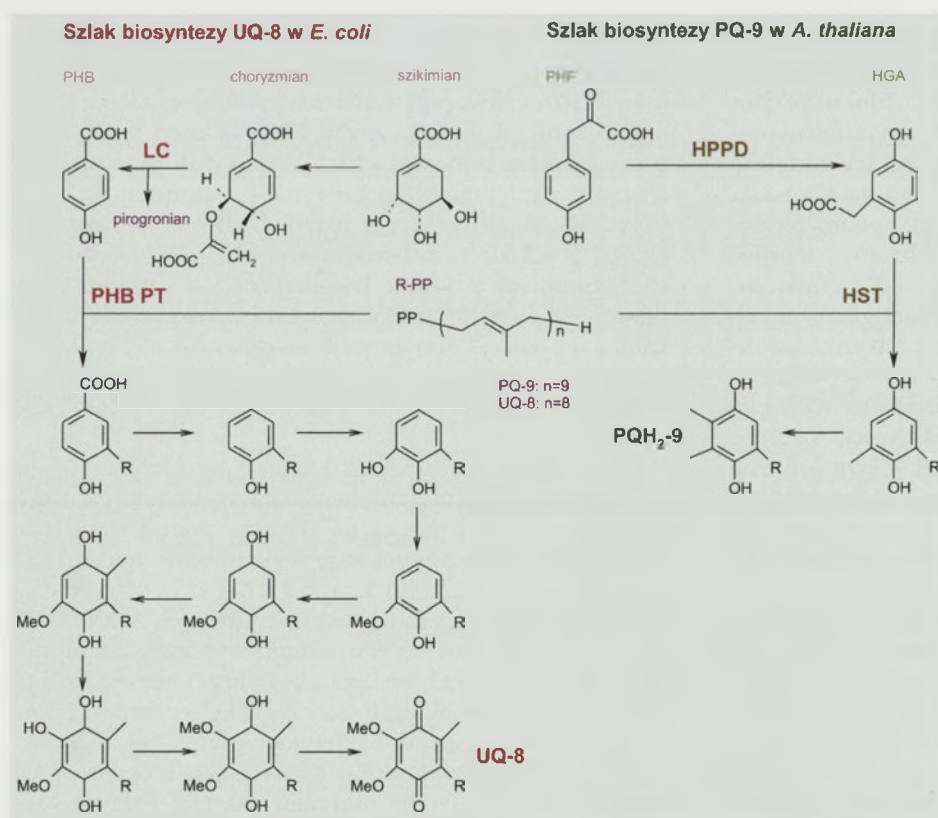
UQ w mitochondriach przenosi elektrony z kompleksu dehydrogenazy NADH oraz dehydrogenazy bursztynianowej na cytochrom *bc₁*. Transport elektronów przez UQ pomiędzy wspomnianymi kompleksami oraz w tzw. cyklu Q jest sprzężony z transportem protonów w poprzek błony mitochondrialnej [3]. UQ występuje w łańcuchu oddechowym wielu mikroorganizmów, gdzie bierze udział zarówno w oddychaniu tlenowym oraz w mniejszym stopniu w oddychaniu beztlenowym, w którym końcowym akceptorem elektronów jest azotan [3]. U purpurowych bakterii fotosyntetyzujących UQ uczestniczy także w fotosyntetycznym łańcuchu transportu elektronów jako kofaktor w centrach reakcji typu PSII oraz jako ruchoma pula występująca w błonie [9]. Dobrze poznano także antyutleniające właści-

wości zredukowanej formy ubichinonu (ubichinol, UQH₂). Wiadomo m.in., że zapobiega ona peroksydacji lipidów błonowych oraz lipidów zasocjowanych z lipoproteinami o małej gęstości, a także chroni DNA i białka błonowe przed utlenianiem. Działanie antyoksydacyjne UQH₂ w błonach polega na przerywaniu łańcuchowej reakcji peroksydacji lipidów, podobnie jak w przypadku α-tokoferolu, neutralizacji inicjatorów peroksydacji, regeneracji α-tokoferolu oraz gaszenia tlenu singletowego i zmiatania anionorodnika ponadtlenkowego [6,27,29-33]. Postulowano także, że stosunek UQ/UQH₂ odgrywa rolę w monitorowaniu stanu redoks komórki, zmiataniu NO, hamowaniu apoptozy, regulacji termogenezy oraz w regulacji ekspresji genów [3,6,34,35]. W organizmach prokariotycznych UQ, podobnie jak MK, bierze udział w powstawaniu mostków disiarczkowych, odgrywając rolę donora elektronów do ich redukcji [6]. UQ może być również kofaktorem dla reduktazy siarczko-ubichinonowej (ang. *sulfide-ubiquinone reductase*) [6]. Ubichinony są ewolucyjnie „młodsze” od naftochinonów, stąd występują tylko u niektórych bakterii, a mianowicie u α-β- i γ-proteobakterii [8]. Uważa się, że endosymbiotyczne proteobakterie dały początek mitochondriom.

BIOSYNTETA UBICHINONÓW

Szlak biosyntezy UQ (Ryc. 4) u *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae* został stosunkowo dobrze poznany [36-38]. Istnieją pewne różnice pomiędzy szlakami biosyntezy pierścienia u tych organizmów, lecz ogólny schemat jest wspólny dla organizmów pro- i eukariotycznych. Prekursorem

pierścienia jest *p*-hydroksybenzoesan (PHB), który u *E. coli* i drożdży może być syntetyzowany z choryzmienu pochodzącego ze szlaku przemiany kwasu szikimowego, podczas gdy u wyższych organizmów eukariotycznych jest on syntetyzowany z tyrozyny [36]. Kondensacja PHB z prekursorem łańcucha bocznego jest katalizowana przez prenylotransferazy PHB. Po niej następuje szereg reakcji modyfikujących pierścień: dekarboksylacja, metylacje i hydroksylacje, których kolejność jest różna u organizmów pro- i eukariotycznych. Długość łańcucha izoprenoidowego może różnić się między gatunkami lub jednostkami taksonomicznymi wyższego rzędu. Czasami u danego gatunku spotykany jest więcej niż jeden homolog UQ. U ludzi i *Schistosaccharomyces pombe* występuje UQ-10, u myszy UQ-9, u *E. coli* głównie UQ-8, natomiast u *S. cerevisiae* UQ-6 [6]. W mitochondriach roślin wyższych dominuje zwykle UQ-10 lub rzadziej UQ-9. U roślin niższych spotykane są dodatkowo UQ-7 oraz UQ-8. Wyjątkowy przypadek stanowi owoc papyryki, u którego występuje UQ-11 [5]. W mikroorganizmach przeważa zwykle



Rycina 4. Szlak biosyntezy benzochinonów. HGA – homogentyzynian, HPPD – dioksygenaza *p*-hydroksyfenylopirogronianu, HST – solanazylotransferaza homogentyzynianu, LC – liaza choryzmienu, PHB – *p*-hydroksybenzoesan (u roślin i zwierząt pochodzi z tyrozyny), PHB PT – PHB-oktaprenylotransferaza, PHF – *p*-hydroksyfenylopirogronian (syntetyzowany z tyrozyny) R-PP – pirofosforan poliprenylny, w przypadku biosyntezy UQ u *E. coli* n = 8, PQ u *A. thaliana* n = 9.

UQ-8, UQ-9 lub UQ-10, natomiast w mniejszych ilościach mogą występować homologi UQ-1-UQ-7 [5].

WPLYW UQ-10 NA ZDROWIE CZŁOWIEKA

Prowadzone od pół wieku prace nad terapeutycznymi i żywieniowym znaczeniem UQ-10 wykazały, że wiele chorób ma swoje podłoże w jego niedoborze. Kuracja wykorzystująca UQ-10 jest stosowana w przypadku takich chorób jak niedokrwienność niewydolność serca, niedobór odporności, encefalomiopatia, ataksja, choroba Parkinsona, płasawica Huntingtona, różne typy nowotworów, a także cukrzyca [26,39]. Ponadto dane literaturowe wskazują na udział UQ-10 w aktywacji sygnałowych kinaz białkowych, regulacji liczby β 2-integrin na powierzchni monocytów krwi oraz w zapobieganiu dysfunkcji nabłonka (poprzez podwyższanie stężenia NO) [40]. Pomimo tego, że próby włączenia UQ-10 do listy witamin (jako witaminy Q) zakończyły się niepowodzeniem [26], dietetycy zalecają spożywanie od 10 do 30 mg UQ-10 dziennie, a w ciężkich schorzeniach zwiększenie tej dawki nawet do 400 mg/dzień [40]. Pomimo tego, że komórki ludzkie są zdolne do biosyntezy UQ, endogenna pula jest uzupełniana przez UQ-10 dostarczany wraz z pożywieniem. Szczególnie bogatym źródłem UQ-10 jest mięso, olej rzepakowy i ryby [40]. UQ-10 jest produkowany na skalę przemysłową przez liczne firmy chemiczne, np. Merck czy La Roche [26,41] do celów laboratoryjnych, jak również komercyjnych, jako suplement diety. Czynnione są także wysiłki zmierzające do otrzymania transgenicznych mikroorganizmów o zwiększonej produkcji UQ. Pewne sukcesy na tym polu zanotowano już w przypadku *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Rhodobacter spheroides* [3].

Należy również zwrócić uwagę na to, że w pewnych sytuacjach UQ-10 wykazuje niepożądane właściwości prooksydacyjne. Wykazano, że w reakcji z tlenem atmosferycznym UQ-10 generuje anionorodnik ponadtlenkowy, który w wyniku reakcji dysmutacji daje nadtlenek wodoru, a ten z kolei w szeregu dalszych przemian może tworzyć bardzo reaktywne rodniki hydroksylowy [42].

WYSTĘPOWANIE I FUNKCJE PLASTOCHINONU

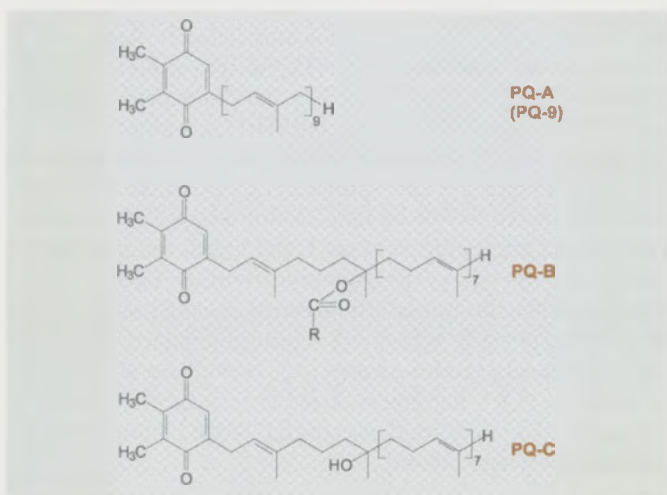
Plastochinon (PQ) został „wynaleziony” przez sinice i niejako „odziedziczony” przez rośliny. Najbardziej znaną funkcją PQ jest udział w fotosyntetycznym łańcuchu transportu elektronów [9,12]. Cząsteczka PQ trwale związana z PSII (nazwana Q_A) pośredniczy w przenoszeniu elektronów z feofityny na luźno związaną cząsteczkę PQ (Q_B), która po redukcji następnie opuszcza PSII i staje się częścią puli PQ w błonie tylakoidów. Zredukowany PQ utleniany jest następnie przez cytochromem *b_f* po przeciwnej stronie błony. PQ w tylakoidach, podobnie jak UQ w błonie mitochondrialnej, jest mobilnym przenośnikiem elektronów pomiędzy kompleksami białkowymi jak również przenośnikiem protonów w poprzek błony. W tylakoidach stwierdzono również szereg innych miejsc redukcji/utleniania PQ [5]. W cyklicznym transporcie elektronów PQ jest redukowany przez oksydoreduktazę ferredoksyna-NADP⁺ (FNR) związaną z kompleksem cytochromem *b_f* bądź przez hipotetyczną reduktazę ferredoksyna-chinon (FQR). Podczas tzw. chlororespiracji, szlaku niezależnym od światła, PQ utlenia NAD(P)H

przy udziale odpowiednich oksydoreduktaz i przekazuje elektrony na tlen przy udziale odpowiednich oksydaz. Postulowane enzymy redukujące PQ w tym szlaku to NDH (dehydrogenaza NAD(P)H kodowana przez geny *ndh*) oraz NDH-2 (oksydoreduktaza NAD(P)H-PQ), natomiast enzymy utleniające PQ to PTOX (terminalna oksydaza plastydowa), peroksydaza wykorzystująca H₂O₂ do utleniania PQH₂ oraz cytochrom *b-559* będący składnikiem PSII. U sinic, które nie są zdolne do syntezy UQ, PQ jest przenośnikiem elektronów nie tylko w fotosyntetycznym, ale także w oddechowym łańcuchu transportu elektronów w tej samej błonie [43]. PQH₂ posiada właściwości antyutleniające, podobnie jak α -tokoferol i zredukowany UQ. Wykazano w wielu badaniach, że PQH₂ hamuje reakcję peroksydacji lipidów, jest wydajnym zmiataczem tlenu singletowego i anionorodnika ponadtlenkowego [44-46].

Postuluje się, że stan redoks puli PQ pełni rolę głównego czujnika redoks w chloroplastach, który inicjuje szereg odpowiedzi na poziomie komórkowym na zmiany w środowisku, szczególnie dotyczące jakości i intensywności światła. Wykazano, że stan redoks puli PQ reguluje fosforylację anten LHCIi poprzez aktywację kinazy zależnej od cytochromu *b_f*, fosforylację białka D1 w PSII, ekspresję genów chloroplastowych kodujących podjednostki PSI i PSII, ekspresję genów peroksydaz askorbinianowych kodowanych w jądrze (APX1 i APX2), dysmutazy ponadtlenkowej i innych enzymów [47-49]. W szeregu badań przeprowadzonych w ostatnich latach wykorzystano technikę mikromacierzy cDNA do badania wpływu stanu redoks puli plastochinonu na ekspresję tysięcy genów [50-52]. W niektórych z tych eksperymentów [51] oraz innych [53] wykazano wpływ stresu świetlnego na ekspresję genów rodziny *lhcb* odpowiedzialnych za syntezę białek antenowych LHCIi, co jest jednym z mechanizmów aklimatyzacyjnych roślin. Natomiast wyniki innych tego typu badań [50-52] zaprzeczają wcześniejszym doniesieniom. Wydaje się, że udział stanu redoks PQ w regulacji syntezy białek chloroplastowych jest odpowiedzią złożoną, działającą raczej w dłuższej skali czasowej, która może być związana również z regulacją posttranskrypcyjną [51]. Ponadto, również inne chloroplastowe systemy redoks, takie jak glutation czy układ ferredoksyna-tio-redoksyna, mogą być zaangażowane w procesy regulacyjne. Ze względu na kluczową rolę PQ w fotosyntezie, występuje on we wszystkich zielonych tkankach roślin. Stwierdzono obecność PQ także w niefotosyntetyzujących organach roślin takich jak korzenie, bulwy, cebule, owoce, kwiaty [54], co jest prawdopodobnie związane z jego udziałem w biosyntezie karotenoidów. Wykazano bowiem, że PQ jest niezbędnym kofaktorem w tym procesie, gdzie jest akceptorem elektronów w reakcji dehydrogenacji fitoenu [55].

BIOSYNTeza PLASTOCHINONU

W biosyntezie PQ prekursorem polarnego pierścienia jest pochodzący z tyrozyny homogentyzynian (HGA) (Ryc. 4) [12]. Reakcję kondensacji katalizuje solanezylotransferaza homogentyzynianowa. Po niej następują dwie reakcje metylacji, prowadzące do powstania końcowego produktu [12]. Uważa się powszechnie, że biosynteza PQ zachodzi w chloroplastach, choć istnieją również doniesienia o jego biosyntezie w innych przedziałach komórkowych. W obrębie chloroplastu PQ jest głównie zlokalizowany w błonach tylakoidów, gdzie pełni



Rycina 5. Struktura plastochinonów.

funkcję przenośnika elektronów, w otocze chloroplastów, gdzie zachodzi jego biosynteza oraz szczególnie w starszych liściach, w tzw. plastoglobulach, które są miejscem przechowywania nadmiaru utlenionej i zredukowanej formy PQ [56,57]. Najbardziej rozpowszechnionym homologiem PQ jest PQ-9 (zwany także PQ-A) posiadający łańcuch boczny zbudowany z 9-ciu reszt izoprenoidowych. W nielicznych przypadkach odnotowano homologi PQ o krótszym łańcuchu bocznym, np. PQ-8 u *Ficus elastica* i *Aesculus hippocastanum* czy PQ-3 u *Spinacia oleracea* [5], jednak wyniki te wymagają potwierdzenia. U wielu roślin, szczególnie w starszych tkankach, zidentyfikowano pochodne PQ posiadające modyfikacje w łańcuchu izoprenoidowym (Ryc. 5): tzw. PQ-C, zawierający grupę hydroksylową w „ogonie” oraz PQ-B – ester PQ-C i kwasu tłuszczowego (głównie palmitynowego, ale także mirystynowego i laurynowego) [58]. Przykładowo, w liściach szpinaku ilość PQ-C wynosi około 30% ilości PQ-A, natomiast u klonu sięga

ona 18% [59]. Ze względu na możliwość przyłączenia grupy -OH (lub grupy -OH zestyfikowanej kwasem tłuszczowym) do różnych jednostek izoprenoidowych, wyróżniono sześć izomerów PQ-C₁₋₆ i PQ-B₁₋₆. Zarówno biosynteza i funkcja tych pochodnych jest obecnie słabo poznana.

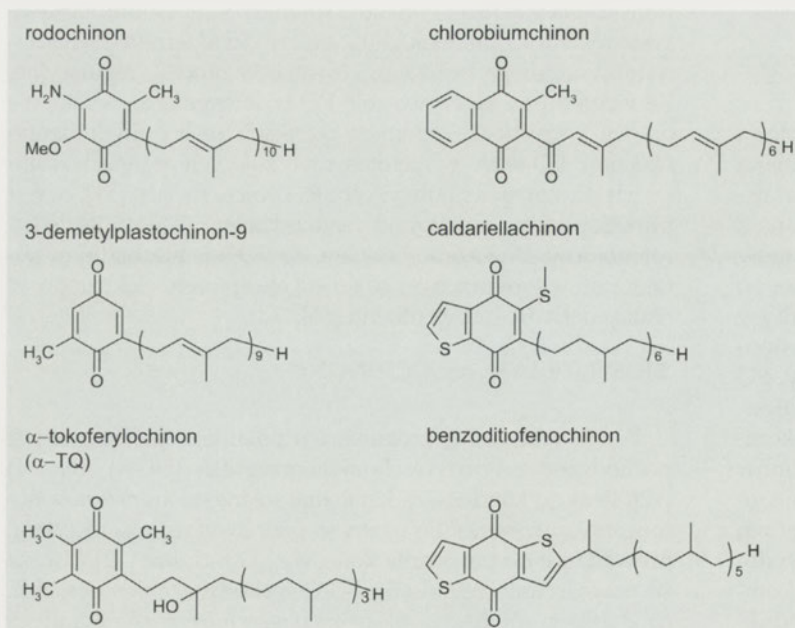
Doświadczenia prowadzone na *Synechocystis* sp. 6803 wykazały, że mutant dioksygenazy *p*-hydroksybenzoesowej, dzięki której powstaje HGA, wykazuje normalny wzrost i syntetyzuje PQ [60]. Analogiczny mutant *A. thaliana* nie wytwarza PQ i jest niezdolny do przeprowadzania fotosyntezy [55]. Oznacza to, że u sinici musi występować inny niż u roślin szlak biosyntezy PQ nie wykorzystujący HGA.

INNE CHINONY PRENYLOWE

Znanych jest szereg chinonów prenylowych nie należących do wcześniej wspomnianych grup, są one jednak przeważnie związkami mniej rozpowszechnionymi (Ryc. 6). Ich funkcja i biosynteza jest zwykle słabo poznana. Stosunkowo najczęściej występującym przedstawicielem tej grupy chinonów prenylowych jest α -tokoferyllochinon (α -TQ) zidentyfikowany zarówno w tkankach roślinnych i zwierzęcych, gdzie uważa się go za produkt utlenienia α -tokoferolu [61]. α -TQ wykryto również u wielu mikroorganizmów zarówno w postaci utlenionej i zredukowanej [62]. Jednak wyniki te nie zostały później potwierdzone.

W szeregu badań wykazano, że zredukowany α -TQ (α -TQH₂) posiada własności antyutleniające, może zmiatać wolne rodniki [32,63], regenerować α -tokoferol [30] i zapobiegać peroksydacji lipidów [44,64]. Postulowano także oddziaływanie α -TQ z niektórymi oksydoreduktazami [65] i interakcję z mitochondrialnym łańcuchem transportu elektronów, gdzie miałyby on pełnić funkcję regulacyjną [66]. Sugerowano ponadto udział α -TQH₂ i deoksy- α -TQH₂ w reakcjach biohydrogenacji nienasyconych kwasów tłuszczowych u bakterii *Butyrivibrio fibrisolvens* [67]. Postulowano również udział α -TQ jako kofaktora enzymu przeprowadzających reakcję prowadzącą do wytworzenia wiązań nienasyconych w kwasach tłuszczowych u człowieka [68]. Istnieją dane wskazujące, że γ -TQ działa cytotoksycznie oraz poprzez aktywację kaspazy-9, indukuje apoptozę komórek rakowych (białaczka limfoblastyczna, rak piersi) [69]. Ponadto γ -TQ oraz δ -TQ są wykorzystywane jako środki chemoterapeutyczne w terapii antynowotworowej oraz leczeniu przeciwbakteryjnym [69].

Do innych nietypowych chinonów prenylowych (Ryc. 6) należy także rodochinon, pochodna UQ, w którym jedna z grup metoksylowych jest zastąpiona grupą aminową. Związek ten został wyizolowany z bakterii purpurowej *Rhodospirillum rubrum* [70], gdzie wykazano jego udział w redukcji fumaranu do bursztynianu w warunkach beztlenowych. Później okazało się, że rodochinon występuje także u niektórych bezkręgowców, np. niektórych nicieni i mięczaków, zdolnych do redukcji fumaranu w warunkach anoksji [71]. Zielone bakterie fotosyntetyzujące – *Chlorobium* sp., oprócz MK, zawierają unikalny naftochinon



Rycina 6. Przykłady mniej rozpowszechnionych chinonów.

nazwany chlorobiumchinonem [7]. Z kolei u termofilnej archebakterii *Sulfolobus solfataricus* odkryto zawierające siarkę caldariellachinon, stanowiący główny chinon tego mikroorganizmu, oraz benzoditiofenochinon [7]. Jako przykład nietypowych plastochinonów, można wymienić 3-demetylo-plastochinon-9, który został odkryty w cebulkach *Iris hollandica* [72].

PIŚMIENNICTWO

- Thomson RH (1987) Naturally occurring quinones. III. London; Chapman and Hall
- Thomson RH (1997) Naturally occurring quinones. IV. Recent advances. London; Chapman and Hall
- Soballe B, Poole RK (1999) Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiology* 145: 1817-1830
- Kruk J, Strzałka K (1995) Funkcja i mechanizm działania plastochinonu. *Post Biol Kom* 22 (supl. 5): 89-98
- Jemiola-Rzemińska M, Strzałka K (2005) Significance of prenylquinones for living organisms. W: Koroniak H, Barciszewski J (red.) *Na Pograniczu Chemii i Biologii*, tom 12, str. 395-428, Wydawnictwo Uniwersytetu Adama Mickiewicza, Poznań
- Kawamukai M (2002) Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. *J Biosci Bioeng* 94: 511-517
- Collins MD, Jones D (1981) Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol Rev* 45: 316-354
- Nitschke W, Kramer DM, Riedel A, Liebl U (1995) From naphto- to benzoquinones – (r)evolutionary reorganisations for electron transfer chain, W: Mathis P (red) *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, tom 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 945-950
- Ke B (2001) *Advances of Photosynthesis Tom 10, Photosynthesis: Photobiochemistry and Photobiophysics*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Wissenbach U, Kroger A, Uden G (1990) The specific functions of menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic respiration with fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate by *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 154: 60-66
- Gibson F, Cox GB (1973) The use of mutants of *Escherichia coli* K12 in studying electron transport and oxidative phosphorylation. *Essays Biochem* 9: 1-29
- Bouvier F, Rahier A, Camara B (2005) Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res* 44: 357-429
- Guergova-Kuras M, Boudreaux B, Joliot A, Joliot P, Redding K (2001) Evidence for two active branches for electron transfer in photosystem I. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4437-4442
- Johnson TW, Shen G, Zybailov B, Kolling D, Reategui R, Beauparlant S, Vassiliev IR, Bryant DA, Jones D, Golbeck JH, Chitnis PR (2000) Recruitment of a foreign quinone into the A₁ site of photosystem II. Genetic and physiological characterization of phyloquinone biosynthetic pathway mutants in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 275: 8523-8530
- Oostende C, Widhalm JR, Basset GJ (2008) Detection and quantification of vitamin K₁ quinol in leaf tissues. *Phytochemistry* 69: 2457-2462
- Lichtenthaler HK, Prenzel U, Douce R, Joyard J (1981) Localization of prenylquinones in the envelope of spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 641: 99-105
- Lochner K, Döring O, Böttger M (2003) Phyloquinone, what can we learn from plants? *Biofactors* 18: 73-78
- Olson RE (1999) Vitamin K. W: Shils M, Olson JA, Shike M, Ross AC (red.), *Modern Nutrition in Health and Disease*. Wydanie 9-te. Baltimore, Williams & Wilkins, str. 363-380
- Shearer MJ (1997) The roles of vitamins D and K in bone health and osteoporosis prevention. *Proc Nutr Soc* 56: 915-937
- Denisova NA, Booth SL (2005) Vitamin K and sphingolipid metabolism: Evidence to date. *Nutr Rev* 63: 111-121
- Roman E, Fear NT, Ansell P (2002) Vitamin K and childhood cancer: analysis of individual patient data from six case-control studies. *Br J Cancer* 86: 63-69
- Lange BM, Rujan T, Martin W, Croteau R (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13172-13177
- Bentley R, Meganathan R (1982) Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 46: 241-280
- Schultz G, Ellerbrock, Soll J (1981) Site of prenylation reaction in synthesis of phyloquinone (vitamin K₁) by spinach chloroplasts. *Eur J Biochem* 117: 329-332
- Gross J, Cho WK, Lezhneva L, Falk J, Krupinska K, Shinozaki K, Seki M, Herrmann RG, Meurer J (2006) A plant locus essential for phyloquinone (vitamin K₁) biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes. *J Biol Chem* 281: 17189-17196
- Crane FL (2007) Discovery of ubiquinone (coenzyme Q) and an overview of function. *Mitochondrion* 7: 2-7
- Ernster L, Dallner G (1995) Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* 1271: 195-204
- Świeżewska E (2004) Ubiquinone and plastoquinone metabolism in plants. *Methods Enzymol* 378: 124-131.
- Frei B, Kim MC, Ames BN (1990) Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentration. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4879-4883
- Shi HL, Noguchi N, Niki E (1999) Comparative study on dynamics of antioxidative action of α -tocopherol hydroquinone, ubiquinol, and α -tocopherol against lipid peroxidation. *Free Radical Bio Med* 27: 334-346
- Kontush A, Hubner C, Finckh B, Kohlschutter A, Beisiegel U (1995) Antioxidative activity of ubiquinol-10 at physiologic concentrations in human low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1258: 177-187
- Gruszka J, Pawlak A, Kruk J (2008) Tocochromanols, plastoquinol, and other biological prenyllipids as singlet oxygen quenchers-determination of singlet oxygen quenching rate constants and oxidation products. *Free Radical Bio Med* 45: 920-928
- Maroz A, Anderson RF, Smith RAJ, Murphy MP (2009) Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: implications for in vivo antioxidant activity. *Free Radical Bio Med* 46: 105-109
- Alleva R, Tomasetti M, Andera L, Gellert N, Borghi B, Weber C, Murphy MP, Neuzil J (2001) Coenzyme Q blocks biochemical but not receptor-mediated apoptosis by increasing mitochondrial antioxidant protection. *FEBS Lett* 503: 46-50
- Echtay KS, Winkler E, Klingenberg M (2000) Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature* 408: 609-613
- Clarke CF (2000) New advance in coenzyme Q biosynthesis. *Protoplasma* 213: 134-147
- Tran UPC, Clarke CF (2007) Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion* 7: 62-71
- Szkopińska A (2000) Ubiquinone. Biosynthesis of quinone ring and its isoprenoid side chain. Intracellular localization. *Acta Biochim Pol* 47: 469-480
- Muralikrishnan D, Jun R (2005) The emerging role of coenzyme Q-10 in aging, neurodegeneration, cardiovascular disease, cancer and diabetes mellitus. *Cur Neurovascular Res* 2: 447-459
- Siemieniuk E, Skrzydlewska E (2005) Koenzym Q10 – biosynteza i znaczenie biologiczne w organizmach zwierząt i człowieka. *Postępy Hig Med Dośw* 59: 150-159
- Yoshida H, Kotani Y, Ochiai K, Araki K (1998) Production of ubiquinone-10 using bacteria. *J Gen Appl Microbiol* 44: 19-26
- Bentinger M, Brismar K, Dallner G (2007) The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion* 7: 41-50
- Hirano M, Satoh K, Katoh S (1980) Plastoquinone as a common link between photosynthesis and respiration in a blue-green alga. *Photosynth Res* 1:149-162

44. Kruk J, Jemiola-Rzemińska M, Strzałka K (1997) Plastoquinol and α -tocopherol quinol are more active than ubiquinol and α -tocopherol in inhibition of lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 87: 73-80
45. Kruk J, Jemiola-Rzemińska M, Burda K, Schmid GH, Strzałka K (2003) Scavenging of superoxide generated in photosystem I by plastoquinol and other prenyllipids in thylakoid membranes. *Biochemistry* 42: 8501-8505
46. Kruk J, Trebst A (2008) Plastoquinol as a singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1777: 154-162
47. Allen JF, Bennett J, Steinback KE, Arntzen CJ (1981) Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature* 291: 25-29
48. Pfanschmidt T, Nilsson A, Allen JF (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397: 625-628
49. Karpiński S, Escobar C, Karpińska B, Creissen G, Mullineaux PM, (1997) Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell* 9: 627-640
50. Piippo M, Allahverdiyeva Y, Paakkarinen V, Suoranta UM, Battchikova N, Aro EM (2006) Chloroplast-mediated regulation of nuclear genes in *Arabidopsis thaliana* in the absence of light stress. *Physiol Genomics* 25: 142-152
51. Figerio S, Campoli C, Zorzan S, Fantoni LI, Crosatti C, Drepper F, Haehnel W, Cattivelli L, Morosinotto T, Bassi R (2007) Photosynthetic antenna size in higher plants is controlled by the plastoquinone redox state at the post-transcriptional rather than transcriptional level. *J Biol Chem* 282: 29457-29469
52. Adamiec M, Drath M, Jackowski G (2008) Redox state of plastoquinone pool regulates expression of *Arabidopsis thaliana* genes in response to elevated irradiance. *Acta Biochim Pol* 55: 161-173
53. Chen YB, Durnford DG, Koblizek M, Falkowski PG (2004) Plastid regulation of *Lhcb1* transcription in the chlorophyte alga *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol* 136: 3737-3750
54. Lichtenthaler HK (1968) Die Verbreitung der lipophilen Plastidenchlorophyllen in nicht-grünen Pflanzengewebe. *Z Pflanzenphysiol* 59: 195-210
55. Norris SR, Barrette TR, DellaPenna D (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* 7: 2139-2149
56. Kruk J, Karpiński S (2006) An HPLC-based method of estimation of the total redox state of plastoquinone in chloroplasts, the size of the photochemically active plastoquinone-pool and its redox state in thylakoids of *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta* 1757: 1669-1675
57. Lichtenthaler HK (2007) Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, α -tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance *Photosynth Res* 92: 163-179
58. Kruk J, Burda K, Schmid GH, Radunz A, Strzałka K (1998) Function of plastoquinones B and C as electron acceptors in photosystem II. Fatty acid analysis of plastoquinone B. *Photosynth Res* 58: 203-209
59. Kruk J, Strzałka K (1998) Identification of plastoquinone-C in spinach and maple leaves by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochemistry* 49: 2267-2271
60. Dahnhardt D, Falk J, Appel J, van der Kooij TAW, Schulz-Friedrich R, Krupinska K (2002) The hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 is not required for plastoquinone biosynthesis. *FEBS Lett* 523: 177-181
61. Kruk J, Strzałka K (1995) Occurrence and function of α -tocopherol quinone in plants. *J Plant Physiol* 145: 405-409
62. Hughes PE, Tove SB (1982) Occurrence of α -tocopherolquinone and α -tocopherolquinol in microorganisms. *J Bacteriol* 151: 1397-1402
63. Niki E (2007) Tocopherylquinone and tocopherylhydroquinone. *Redox Rep* 12: 204-210
64. Bindoli A, Valente M, Cavallini L (1985) Inhibition of lipid peroxidation by α -tocopherolquinone and α -tocopherol hydroquinone. *Biochem Int* 10: 753-761
65. Siegel D, Bolton EM, Burr JA, Liebler DC, Ross D (1997) The reduction of α -tocopherylquinone by human NAD(P)H quinone oxidoreductase: The role of α -tocopheryl hydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol Pharmacol* 52: 300-305
66. Gille L, Gregor W, Staniek K, Nohl H (2004) Redox-interaction of α -tocopheryl quinone with isolated mitochondrial cytochrome *bc₁* complex. *Biochem Pharmacol* 68: 373-381
67. Hughes PE, Tove SB (1980) Identification of an endogenous electron donor for biohydrogenation as α -tocopherolquinol. *J Biol Chem* 255: 4447-4452
68. Infante JP (1999) A function for the vitamin E metabolite α -tocopherol quinone as an essential enzyme cofactor for the mitochondrial fatty acid desaturases. *FEBS Lett* 446: 1-5
69. Calviello G, DiNicuolo F, Piccioni E, Marocchi E, Serini S, Maggiano N, Jones KH, Cornwell DG, Palozza P (2003) γ -Tocopheryl quinone induces apoptosis in cancer cells via caspase-9 activation and cytochrome *c* release. *Carcinogenesis* 24: 427-433
70. Glover J, Threlfall DR (1962) A new quinone (rhodoquinone) related to ubiquinone in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem J* 85: 14P-15P
71. Van Hellemond JJ, Klockiewicz M, Gaasenbeek CP, Roos MH, Tielens AG (1995) Rhodoquinone and complex II of the electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *J Biol Chem* 270: 31065-31070
72. Etman-Gervais C, Tendille C, Polonsky J (1977) 3-demethylplastoquinone-9 et 3-demethylplastoquinone-8 isolees des bulbes d'Iris Hollandica. *New J Chem* 1: 323-325

Prenylquinones – occurrence, biosynthesis and functions

Beatrycze Nowicka, Renata Szymańska, Jerzy Kruk 

Department of Plant Physiology and Biochemistry, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Gronostajowa 7, 30-387 Kraków, Poland

 e-mail: jerzy.kruk@uj.edu.pl

Key words: antioxidant; electron transport chain; prenylquinones; menaquinone; plastoquinone; ubiquinone

ABSTRACT

Prenylquinones are a group of compounds occurring in all living cells. In their structure a polar head group undergoing redox reactions and a long, hydrophobic side-chain can be found. Due to their amphiphilic character, these compounds are mainly located in biological membranes where they function as electron and proton carriers in the photosynthetic and respiratory electron transport chains. Prenylquinones play also additional roles such as antioxidants, and other more specific functions such as enzyme cofactors. Based on the ring structure, different groups of prenylquinones are distinguished: menaquinones, phyloquinone, ubiquinones and plastoquinones, although also other representatives of this group are known, e.g. tocopherolquinones. Frequently, biosynthesis ability of a given kind of prenylquinones is limited to a certain group of organisms. This review describes the structure, function and biosynthesis of most common prenylquinones.

Rola apolipoprotein A-I i A-II w przemianach HDL w osoczu

STRESZCZENIE

Apolipoproteina (apo) A-I jest kluczowym białkiem HDL uczestniczącym w procesie zwrotnego transportu cholesterolu. Niewielka część apo A-I występuje w osoczu jako wolne białko, z którego mogą powstawać prekursorowe cząstki HDL o dyskowym kształcie, zawierające niewielkie ilości fosfolipidów i cholesterolu niezestryfikowanego. Krążenie apo A-I pomiędzy prekursorowymi i dojrzałymi formami HDL jest zasadniczym elementem przemian HDL zachodzących w krążeniu. Drugim pod względem zawartości białkiem wchodzącym w skład cząstek HDL człowieka jest apo A-II. Występuje ona jednak tylko w około połowie cząstek HDL w osoczu. Mechanizm prowadzący do powstawania HDL zawierających zarówno apo A-I, jak i apo A-II jest nieznan. Także rola apo A-II w zwrotnym transporcie cholesterolu budzi kontrowersje. Różne obserwacje wskazują albo na promiażdżycowe albo na antymiażdżycowe właściwości apo A-II. Udział apo A-II w przemianach HDL w osoczu pozostaje niewyjaśniony. Apo A-II może być czynnikiem stabilizującym cząstki HDL. Apolipoproteina ta może też brać udział w regulacji metabolizmu VLDL. W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat udziału apo A-I i apo A-II w przemianach HDL w osoczu.

ROZKŁAD APO A-I I APO A-II W CZĄSTKACH HDL

Lipoproteiny wysokiej gęstości (ang. *high density lipoproteins*, HDL) klasycznie definiuje się jako frakcję lipoproteinową o gęstości od 1,063 do 1,210 g/ml. Około 70% białek HDL stanowi apolipoproteina (apo) A-I. Stężenia apo A-I i cholesterolu we frakcji HDL ujemnie korelują z ryzykiem niedokrwiennej choroby serca (NChS) [1,2]. Przeciwmiażdżycowe działanie HDL polega przede wszystkim na udziale w transporcie zwrotnym cholesterolu [3]. Ten skomplikowany, złożony z wielu reakcji proces, można podzielić na trzy zasadnicze etapy: 1) przekazanie cholesterolu niezestryfikowanego (CH) i fosfolipidów (FL) z błon komórkowych do HDL, 2) estryfikacja cholesterolu katalizowana przez acylotransferazę lecytyna: cholesterol (ang. *lecithin: cholesterol acyltransferase*, LCAT), 3) przekazanie estrów cholesterolu (CHE) z HDL do hepatocytów, gdzie cholesterol jest przekształcany w kwasy żółciowe i wydzielany do żółci. Kardioprotekcyjne właściwości HDL wynikają również ze zdolności hamowania procesów oksydacji cząstek lipoprotein niskiej gęstości (*low density lipoproteins*, LDL). Działanie antyoksydacyjne wykazuje sama apo A-I oraz transportowana przez HDL enzymy, takie jak paraoksonaza 1 (PON 1) i peroksydaza glutationowa [3]. W rzeczywistości HDL stanowią populację cząstek różniących się składem białkowym i lipidowym, wielkością i gęstością, kształtem i ruchliwością w polu elektrycznym. Strukturalne zróżnicowanie cząstek HDL może odzwierciedlać ich odmienne znaczenie w przeciwdziałaniu rozwojowi miażdżycy.

Podczas rozdzielania elektroforetycznego HDL w żelu agarozowym, od głównej masy cząstek HDL wędrujących z ruchliwością α (α -HDL) oddziela się niewielka podfrakcja cząstek o większym ujemnym ładunku powierzchniowym, migrujących z ruchliwością pre- β (pre- β HDL) [4]. W podfrakcji tej znajdują się pojedyncze cząsteczki apo A-I, które mogą być związane ze śladową ilością fosfolipidów oraz cząstki prekursorowych HDL, zbudowane z kilku (3–4) cząsteczek apo A-I związanych z fosfolipidami i cholesterolem niezestryfikowanym [4,5]. Brak niepolarnych lipidów (estrów cholesterolu i triacylogliceroli) sprawia, że prekursorowe HDL przybierają kształt dyskowy [4,5]. Ocenia się, że w pre- β HDL znajduje się od 2 do 14% całej zawartości apo A-I osocza [4]. W latach 80-tych XX stulecia odkryto, że cholesterol z błon komórkowych przekazywany jest do cząstek pre- β HDL [6]. We frakcji α -HDL znajdują się sferyczne cząstki HDL, które mają hydrofobowy rdzeń [4,5]. Te tak zwane „dojrzałe” cząstki HDL są jednak zróżnicowane pod względem zawartości dwóch głównych białek – apolipoprotein A-I i A-II [3,5,7]. Apo A-I jest obecna we wszystkich cząstkach sferycznych HDL. Natomiast apo A-II, chociaż stanowi aż 20% białek we frakcji HDL, występuje tylko w około połowie cząstek α -HDL. Stosując metodę immunochromatografii na kolumnach z immobilizowanymi przeciwciałami anty

Małgorzata Wróblewska[✉]

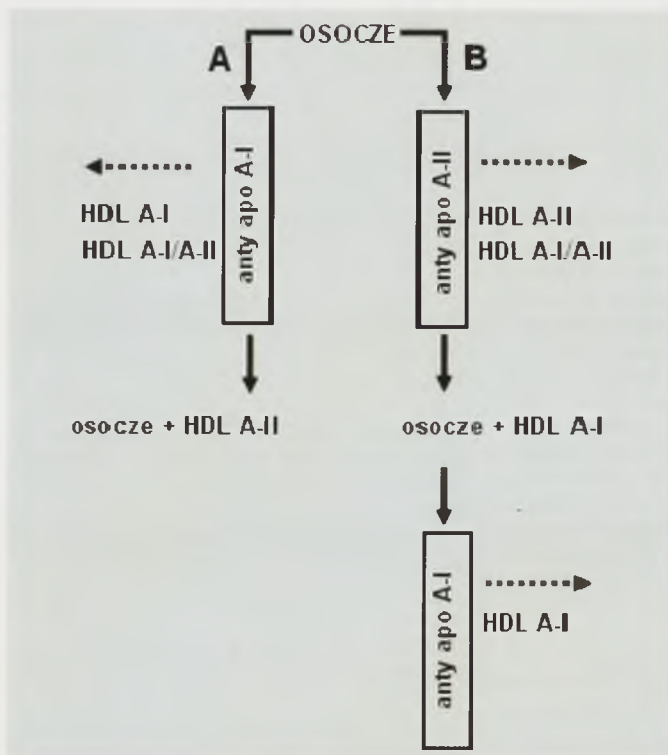
Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Katedra Biochemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

[✉]Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Katedra Biochemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk, e-mail: wroblew@amg.gda.pl

Artykuł otrzymano 28 stycznia 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 8 maja 2009 r.

Słowa kluczowe: HDL, apolipoproteina A-I, apolipoproteina A-II, przemiany HDL, pre-beta HDL

Wykaz skrótów: ABC (ang. *ATP binding cassette transporter*) – transporter błonowy zawierający domenę wiążącą ATP; apo (A-I, A-II, C, E) – apolipoproteina; CETP (ang. *cholesteryl ester transfer protein*) – białko osocza przenoszące estry cholesterolu; HDL (ang. *high density lipoproteins*) – lipoproteiny wysokiej gęstości; HDL A-I – cząstki HDL zawierające apo A-I ale nie zawierające apo A-II; HDL A-I/A-II – cząstki HDL zawierające apo A-I i apo A-II; LCAT (ang. *lecithin: cholesterol acyltransferase*) – acylotransferaza lecytyna: cholesterol; PLTP (ang. *phospholipid transfer protein*) – białko osocza przenoszące fosfolipidy; rHDL – rekonstruowane HDL; SR-BI (ang. *scavenger receptor BI*) – receptor zmiatający klasy BI



Rycina 1. Schemat izolacji subpopulacji HDL A-I i HDL A-I/A-II z wykorzystaniem metody immunochromatografii na kolumnach z immobilizowanymi przeciwciałami anty apo A-I lub anty apo A-II (wg [7], zmodyfikowane). Prostokąty obrazują kolumny z odpowiednimi rodzajami przeciwciał. A. Izolacja HDL A-II jest możliwa po nałożeniu osocza na kolumnę z przeciwciałami anty apo A-I, do której wiążą się cząstki HDL A-I i HDL A-I/A-II. W eluacji z kolumny mogą znajdować się HDL A-II. B. W celu rozdzielania cząstek HDL A-I i HDL A-I/A-II, osocze nakłada się najpierw na kolumnę z przeciwciałami anty apo A-II, na której wiążane są HDL A-I/A-II (i ewentualne HDL A-II). W eluacji pozostają HDL A-I, które można następnie związać na kolumnie z przeciwciałami anty apo A-I.

apo A-I lub anty apo A-II można wyodrębnić cząstki HDL zawierające jednocześnie apo A-I i apo A-II (HDL A-I/A-II) oraz cząstki HDL zawierające apo A-I, lecz nie zawierające apo A-II (HDL A-I) (Ryc. 1) [7]. Do tych ostatnich należą również pre- β HDL. W osoczu zdrowych osób wykazano też obecność sferycznych cząstek HDL zawierających apo A-II, bez apo A-I (HDL A-II). Ulokowane jest w nich od 5 do 20% całej puli apo A-II osocza [8].

POWSTAWANIE HDL

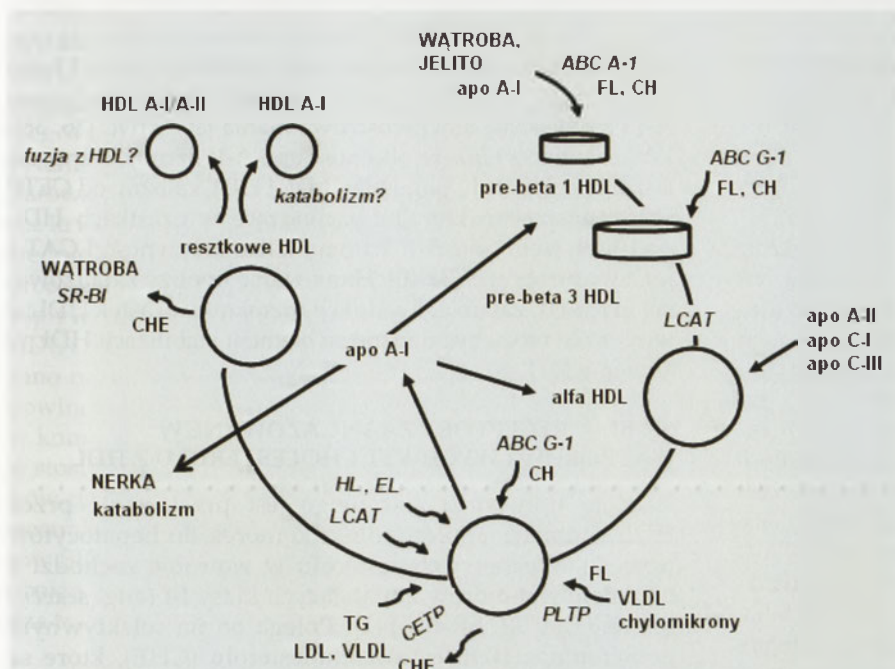
Apo A-I jest syntetyzowana w komórkach wątroby i jelita. Część apo A-I już wewnątrz komórek tworzy prekursorowe HDL, większość jest jednak wydzielana w postaci wolnej apo A-I [9]. Cząsteczki apo A-I są uwalniane do krążenia także z lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (ang. *very low density lipoproteins*, VLDL) i chylomikronów podczas lipolizy katalizowanej przez lipazę lipoproteinową oraz z dojrzałych HDL w trakcie ich przemian w osoczu [3,5]. Wolna apo A-I posiada zdolność do wiązania się z transporterem ABC A-1 (ang. *ATP binding cassette transporter A-1*) [10,11]. Uruchamia to wewnątrzkomórkową kaskadę sygnałów prowadzących do uwolnienia z błony komórkowej fosfolipidów i cholesterolu niezestryfikowanego [11]. Molekularny mechanizm oddziaływania pomiędzy apo A-I i transporterem ABC A-1 nie jest jeszcze w pełni znany. Według niedawno zaproponowanego modelu [12] apo A-I powoduje transfor-

mację ABC A-1 w formę aktywną, zdolną do przemieszczenia fosfolipidów z wewnętrznego do zewnętrznego listka błony komórkowej. Koncentracja fosfolipidów sprawia, że w zewnętrznym listku błony tworzą się uwypuklenia pozbawione białek. Ulokowane w nich fosfolipidy, a wraz z nimi także i cholesterol niezestryfikowany, spontanicznie łączą się z apo A-I i tworzą prekursorowe HDL, zawierające od 2 do 4 cząsteczek apo A-I. Proces ten określa się mianem mikrosolubilizacji błon. Reakcja pomiędzy wolną apo A-I i transporterem ABC A-1 jest zatem podstawowym warunkiem syntezy prekursorowych HDL. Uważa się, że stężenie cząstek HDL krążących we krwi zależy od aktywności ABC A-1 w błonach komórek jelita i wątroby. Transportery ABC A-1 znajdujące się w błonach komórkowych makrofagów chronią je przed transformacją w komórki piankowe [12].

PRZEMIANY HDLW OSOCZU

Od chwili powstania, HDL ulegają nieustannym przemianom, którym towarzyszy przemieszczanie się apo A-I pomiędzy cząstkami tworzącymi podfrakcje pre- β i α HDL (Ryc. 2) [3,5,13,14]. Pierwszą generację prekursorowych HDL (pre- β 1 HDL) tworzą małe struktury o masie cząsteczkowej około 61-71 kDa [5]. Ich obecność indukuje dalsze uwalnianie fosfolipidów i cholesterolu z komórek, które w tym wypadku następuje przy współudziale transportera ABC G-1 [15]. Powoduje to stopniowy wzrost masy cząsteczkowej pre- β HDL do ponad 300 kDa (pre- β 2 HDL, pre- β 3 HDL). Krytycznym etapem w tworzeniu dojrzałych HDL jest estryfikacja cholesterolu katalizowana przez LCAT, której aktywatorem jest apo A-I [16]. Estry cholesterolu przemieszczają się do środka cząstek HDL tworząc hydrofobowy rdzeń. Generuje to gradient cholesterolu niezestryfikowanego pomiędzy powierzchniową warstwą HDL a błonami komórkowymi. Ma on istotne znaczenie dla wychwytu cholesterolu przez sferyczne cząstki HDL. LCAT jest także niezbędna do włączania do cząstek HDL innych apolipoprotein (apo A-II, apo C-I i apo C-III) [16]. Dojrzałe HDL również włączają w swój skład cholesterol z błon komórkowych, współdziałając przy tym z transporterami ABC G-1 [17,18]. Ponieważ α HDL stanowią przeważającą część puli krążących HDL, to aktywność ABC G-1 może mieć decydujące znaczenie w regulacji zawartości cholesterolu wewnątrz komórek, w tym także w makrofagach. Mechanizm działania ABC G-1 jest nieznan. Istnieją poszlaki sugerujące, że białko to powoduje przesunięcie cholesterolu z wnętrza komórki do specyficznych domen błony komórkowej, odrębnych od domen tworzonych przez ABC A-1. Cholesterol ulega tam enzymatycznej oksydacji i jest usuwany przez cząstki HDL [18].

Cholesterol trafiający do HDL jest estryfikowany przez LCAT. Estry cholesterolu są wyprowadzane z HDL do VLDL i LDL przez białko przenoszące estry cholesterolu (ang. *cholesteryl ester transfer protein*, CETP), przy czym jednocześnie do HDL transportowane są triacyloglicerole (TG) z VLDL [19]. HDL są też zmiataczami fosfolipidów uwalnianych podczas lipolizy z chylomikronów i VLDL. Fosfolipidy są transportowane do HDL przez białko przenoszące fosfolipidy (ang. *phospholipid transfer protein*, PLTP) [20]. HDL wzbogacone w tłuszcze mają większe rozmiary i stosunkowo małą gęstość. Takie cząstki są preferencyjnymi



Rycina 2. Schemat przemian HDL zachodzących w osoczu. Oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami apolipoprotein (apo) A-I i transporterem ABC A-1 powoduje przekazywanie z błony komórkowej do apo A-I fosfolipidów (FL) i cholesterolu niezestryfikowanego (CH). W ten sposób powstają małe, dyskowe pre- β 1 HDL. Akceptują one kolejne cząsteczki FL i CH współdziałając z transporterami ABC G-1 i w ten sposób ulegają przemianom w większe pre- β 3 HDL. Po estryfikacji cholesterolu, katalizowanej przez acylotransferazę lecytyna:cholesterol (LCAT), prekursorowe, dyskowe HDL przekształcają się w dojrzałe, sferyczne HDL. One również oddziałują z transporterami ABC G-1 i włączają w swój skład CH i FL z błony komórkowej. Białko przenoszące estry cholesterolu (CETP) umożliwia transport dwukierunkowy estrów cholesterolu (CHE) i triacylogliceroli (TG) pomiędzy HDL i LDL oraz VLDL. Białko przenoszące fosfolipidy (PLTP) pośredniczy w transporcie FL do HDL. Lipaza wątrobowe (HL) i lipaza nabłonkowa (EL) katalizują hydrolizę TG i FL w cząstkach HDL. Podczas tych procesów z dojrzałych HDL uwalniają się cząsteczki wolnej apo A-I. Mogą one brać udział w powstawaniu nowych prekursorowych HDL, wbudowywać się do dojrzałych HDL lub ulegać degradacji w nerkach. CHE są przekazywane od HDL do hepatocytów za pośrednictwem wątrobowych receptorów zmiatających SR-BI. Generuje to resztkowe HDL A-I, które są katabolizowane w nerkach i resztkowe HDL A-I/A-II, które ulegają fuzji z cząstkami krążących HDL.

substratami dla lipazy wątrobowej (ang. *hepatic lipase*, HL) i lipazy endotelialnej (ang. *endothelial lipase*, EL), które hydrolizują triacyloglicerole i fosfolipidy, redukując tym samym rozmiary HDL [21,22]. Procesy zachodzące podczas przemian HDL w osoczu powodują uwalnianie z dojrzałych HDL cząsteczek wolnej apo A-I. Może ona oddziaływać z ABC A-1 i brać udział w generowaniu nowych prekursorowych HDL albo być włączana ponownie do cząstek dojrzałych HDL [5,12,13]. Krążenie apo A-I pomiędzy prekursorowymi i dojrzałymi formami HDL uważane jest za zasadniczy element metabolizmu HDL w osoczu. Istnieją jednak dowody, że wolna apo A-I, generowana w wyniku działania lipaz na HDL wzbogacone w triacyloglicerole, może być preferencyjnie kierowana na drogę katabolizmu, którego głównym miejscem są komórki kanalików proksymalnych nerek [23,24].

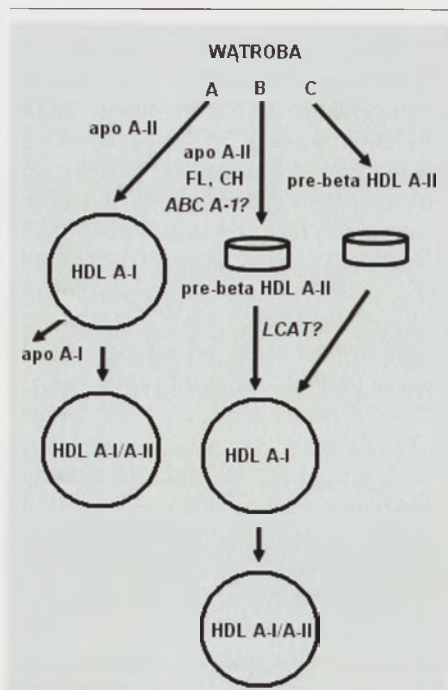
JAK POWSTAJĄ CZĄSTKI HDL A-I/ A-II?

Tworzenie w osoczu cząstek HDL A-I/A-II to jedna z największych zagadek w przemianach HDL. Teorie na temat powstawania HDL A-I/A-II oparte są w większości na obserwacjach, w których używane są syntetyzowane w warunkach *in vitro* struktury przypominające prekursorowe lub sferyczne HDL, zawierające apo A-I i/lub apo A-II. Określa się je jako rekonstruowane HDL (rHDL). Miejscem syntezy

apo A-II jest głównie wątroba. Cała apo A-II obecna w osoczu jest związana z lipoproteinami, głównie z HDL; tylko kilka procent apo A-II występuje w VLDL i chylomikronach [25]. Wskazuje to na bardzo szybkie włączanie cząsteczek apo A-II do lipoprotein. Zdaniem niektórych badaczy, przynajmniej część apo A-II jest wydzielana z hepatocytów jako wolne białko, które natychmiast wbudowuje się do cząstek HDL (Ryc. 3, szlak A) [14]. Przypuszczenie to oparte jest na obserwacjach, w których apo A-II inkubowana z rHDL A-I błyskawicznie i nieodwracalnie wnika do tych cząstek, wyrzucając z nich apo A-I [26]. Wynika to z bardzo wysokiego powinowactwa apo A-II do fosfolipidów, znacznie wyższego od tego, którym cechuje się apo A-I. Zdolność do wypierania apo A-I z HDL przez apo A-II miałyby więc warunkować generowanie HDL A-I/A-II w osoczu. Taki pogląd potwierdzają wyniki badań, które wykazały, że u ludzi szybkość syntezy apo A-II jest czynnikiem regulującym dystrybucję apo A-I pomiędzy populacjami HDL A-I i HDL A-I/A-II [27]. Tym również tłumaczy się fakt, że u transgenicznych myszy z wbudowanym genem apo A-II człowieka obserwuje się powstawanie HDL, w których proporcja apo A-I do apo A-II zmniejsza się równolegle ze wzrostem ekspresji genu apo A-II [28].

Bardzo wysoka hydrofobowość apo A-II sugeruje, że nie może ona występować jako wolne białko w osoczu, a więc natychmiast po wydzieleniu musiałaby wiązać fosfolipidy pochodzące z innych lipoprotein lub błon komórkowych i tworzyć dyskowe HDL A-II (Ryc. 3, szlak B). Podstawą takich przypuszczeń jest zjawisko spontanicznego powstawania dyskowych kompleksów białkowo-fosfolipidowo-cholesterolowych podczas inkubacji apo A-II z komórkami [29]. Niewykluczone, że przyłączanie fosfolipidów do apo A-II może następować z udziałem białek ABCA-1. W badaniach *in vitro* wykazano, że wszystkie apolipoproteiny posiadające w swojej budowie amfipatyczne α -helisy, a więc również apo A-II, apo C-I, apo C-II, apo C-III i apo E, wiążą się z transporterami ABC A-1. Stwierdzono też, że powinowactwo apo A-I i apo A-II do ABC A-1 jest podobne i że obie apolipoproteiny są w stanie konkurować o wiązanie z ABC A-1 [30]. Możliwe jest też, że już wewnątrz hepatocytów część produkowanej apo A-II wiąże się z niewielką ilością fosfolipidów i jest wydzielana w postaci dyskowych HDL A-II (Ryc. 3, szlak C) [13,31].

Dyskowe pre- β HDL A-II nie są jednak substratem dla LCAT i w związku z tym nie mogą ulegać przekształceniu w sferyczne cząstki [29]. Powstawanie HDL A-I/A-II musiałoby więc następować poprzez fuzję dyskowych HDL A-II i jakiejś subpopulacji cząstek HDL A-I. W warunkach *in vitro* spontaniczne łączenie się syntetycznych dyskowych rHDL



Rycina 3. Trzy potencjalne szlaki prowadzące do powstawania HDL A-I/A-II w osoczu. Szlak A: apo A-II jest wydzielana z hepatocytów jako wolne białko, które natychmiast wbudowuje się do cząstek sferycznych HDL A-I wypierając z nich apo A-I. Szlak B: apo A-II jest wydzielana z hepatocytów jako wolne białko, ale natychmiast wiąże fosfolipidy (FL) i cholesterol niezestryfikowany (CH), które mogą pochodzić z błon komórkowych lub lipoprotein. W ten sposób powstają prekursorowe dyskowe pre- β HDL A-II. Szlak C: hepatocyty wydzielają prekursorowe dyskowe pre- β HDL A-II. Szlak B i C: we włączeniu dyskowych HDL A-II do sferycznych HDL A-I biorą udział czynniki obecne w osoczu, w tym LCAT.

jest wyłącznie rezultatem fizyko-chemicznego oddziaływania pomiędzy apo A-II i HDL A-I (Ryc. 3 szlak A), czy też jest to proces łączenia się prekursorowych HDL A-II i dojrzałych cząstek HDL A-I, zależny od czynników obecnych w osoczu do których należą LCAT (Ryc. 3, szlaki B i C)?

JAKIE ZNACZENIE MA OBECNOŚĆ APO A-II W HDL?

Stężenia apo A-II we krwi u ludzi wahają się w granicach 30–35 mg/dl [25]. Nie wykazano zależności pomiędzy stężeniem cholesterolu HDL i apo A-II. Opisano przypadek rodzinnego deficytu apo A-II u dwóch sióstr, które jednak miały normalne stężenia cholesterolu HDL [35]. U wielu zwierząt (psów, świń, kur i królików) apo A-II nie występuje wcale, lub jest obecna jedynie w śladowych ilościach. Zróżnicowana jest także sama postać apo A-II. U ludzi jest ona homodimerem dwóch łańcuchów polipeptydowych zbudowanych z 77 reszt aminokwasowych (m cz 17,2 kDa), u zwierząt (myszy, szczury, ryby, małpki) apo A-II ma postać monomeru [25].

Wyniki badań *in vitro* wskazują, że obecność apo A-II stabilizuje cząstki HDL i hamuje procesy przemian HDL. I tak np. apo A-I łatwo dysocjuje z rHDL A-I pod wpływem CETP, ale dysocjacja taka nie zachodzi kiedy działaniu CETP poddawane są cząstki rHDL A-I/A-II [36]. Wzrost zawartości apo A-II w HDL hamuje też powstawanie pre- β

A-II i rHDL A-I praktycznie nie zachodzi [32], do pewnego stopnia jest natomiast możliwe w obecności LCAT [33]. Sugeruje to, że fuzja jest poprzedzana powstawaniem sferycznych rHDL A-I, zawierających estry cholesterolu. W doświadczeniach *in vivo* cała apo A-II wprowadzona do krążenia królika, zarówno w postaci wolnego białka jak i dyskowych rHDL A-II, błyskawicznie wbudowuje się do HDL A-I [34]. Nie znamy na razie odpowiedzi na pytanie, czy powstawanie HDL A-I/A-II

HDL podczas transportu fosfolipidów do HDL zachodzącego z udziałem PLTP [37]. Tak rozumianą stabilizację cząstek HDL tłumaczy się tworzeniem pomiędzy apo A-I i apo A-II wiązań jonowych, które zmieniają konformację apo A-I i zmniejszają możliwość uwalniania jej z HDL [36, 38]. Wykazano również, że obecność apo A-II hamuje transport estrów cholesterolu pomiędzy LDL i HDL zależny od CETP [39]. Zmiany strukturalne zachodzące w cząstkach HDL pod wpływem apo A-II hamują także aktywność LCAT i lipazy wątrobowej [38,40]. Hamowanie lipolizy katalizowanej przez HL zapobiega redukcji rozmiarów cząstek HDL, a więc także może być uznane za element stabilizacji HDL w krążeniu [41].

SR-BI – RECEPTORY ZAANGAŻOWANE W WĄTROBOWY WYCHWYT CHOLESTEROLU Z HDL

Istotą transportu zwrotnego jest przekazanie przez HDL nadmiaru cholesterolu z komórek do hepatocytów (Ryc. 2). Wychwyt cholesterolu w wątrobie zachodzi z udziałem receptorów zmiatających klasy BI (ang. *scavenger receptors BI*, SR-BI) [42]. Polega on na selektywnym pobieraniu z HDL estrów cholesterolu (CHE), które są następnie preferencyjnie kierowane na drogę syntezy kwasów żółciowych. Cząstki lipoproteinowe nie ulegają przy tym endocytozie i lizosomalnej degradacji, jak ma to miejsce w przypadku transportu cholesterolu do komórek przez LDL. SR-BI to powierzchniowe glikoproteiny (o masie cząsteczkowej 82 kDa) występujące w domenach komórkowych bogatych w sfingolipidy i cholesterol, zwanych tratwami lipidowymi. Najwięcej receptorów SR-BI znajduje się w wątrobie oraz w komórkach produkujących hormony sterydowe. SR-BI mają postać dużych zewnątrzkomórkowych pętli zakotwiczonych w błonie za pomocą dwóch domen transbłonowych zakończonych krótkimi N- i C-końcowymi domenami wewnątrzkomórkowymi. Określenie receptory zmiatające oznacza, że są to receptory zdolne do wiązania zmodyfikowanych chemicznie lipoprotein oraz szeregu innych polianionowych ligandów (np. zmodyfikowanych białek, polinukleotydów, siarczanów polisacharydów). SR-BI zdolne są także do wiązania lipoprotein (HDL, LDL, VLDL), wolnych apolipoprotein oraz rekonstruowanych HDL zawierających różne apolipoproteiny. Na zewnątrzkomórkowych pętlach receptorów SR-BI znajduje się wiele miejsc wiążących specyficznie różne ligandy. W procesie selektywnego wychwytu CHE rozpoznawanym elementem są najprawdopodobniej amfipatyczne helisy apolipoprotein. Dokładny mechanizm przekazywania CHE od HDL do SR-BI nie jest znany. Uważa się, że jest to dwuetapowy proces, w którym najpierw HDL są wiązane przez receptory SR-BI, a następnie estry cholesterolu wraz z pewną ilością fosfolipidów i cholesterolu niezestryfikowanego są przenoszone z cząstek lipoprotein do błony komórkowej. Funkcja receptorów SR-BI ma polegać na tworzeniu w błonie komórkowej hydrofobowego tunelu, przez który lipidy są transportowane w kierunku przeciwnym do gradientu ich stężenia. Co ciekawe, kiedy ten gradient ulega odwróceniu, wówczas SR-BI są zdolne do pośredniczenia w przekazywaniu cholesterolu z błony do HDL (np. w makrofagach).

Najprawdopodobniej najlepszymi substratami dla SR-BI są duże cząstki HDL bogate w estry cholesterolu, o stosunkowo niskiej gęstości [43]. Czy zróżnicowanie HDL pod względem zawartości apo A-I i apo A-II wpływa na przebieg wychwytu CHE przez receptory SR-BI? Także i na to pytanie w obecnej chwili nie można udzielić odpowiedzi. Zarówno HDL A-I, jak i HDL A-I/A-II wyizolowane z osocza krwi człowieka przekazują CHE do hepatocytów za pośrednictwem receptorów SR-BI, chociaż efektywność tego procesu wydaje się być wyższa w przypadku HDL A-I [44]. Wpływ obecności apo A-II na oddziaływanie pomiędzy HDL i SR-IB może zależeć od lokalizacji receptorów. Wykazano na przykład, że wzrost zawartości apo A-II zwiększa powinowactwo HDL do receptorów SR-BI znajdujących się w komórkach ludzkich nadnerczy (działanie agonistyczne w stosunku do apo A-I) hamując jednocześnie transport estrów cholesterolu do komórek (działanie antagonistyczne w stosunku do apo A-I) [45]. Natomiast w wypadku receptorów SR-BI znajdujących się w komórkach jajnika, apo A-II obniża powinowactwo rHDLA-I/A-II do SR-BI ale pobudza transport CHE do komórek [46].

Kolejne pytanie dotyczy losów HDL po reakcji z receptorami SR-BI. Nie wiadomo, jaki sygnał uwalnia HDL od receptorów. Oddziaływanie pomiędzy HDL a SR-BI nie generuje cząstek pre- β HDL, co jest charakterystyczne dla przemian HDL w osoczu, ale prowadzi do powstania tak zwanych resztkowych HDL [47] (Ryc. 2). Stanowią one zbiór niejednorodnych cząstek, o różnej wielkości, gęstości i zawartości apolipoprotein. Według niedawno przedstawionego modelu selektywny wychwyt estrów cholesterolu powoduje odrywanie się od HDL małych, gęstych, sferycznych cząstek, zawierających tylko apo A-I, które są szybko wychwytywane przez wątrobę (być może w wyniku aktywności specyficznych receptorów) lub degradowane w nerce. Pozostałe resztkowe HDL mają większe rozmiary i są stosunkowo bogate w apo A-II, co czyni je bardziej stabilnymi. Ulegają one szybkiej fuzji z krążącymi HDL [47]. W tym wypadku obecność apo A-II stanowiłaby więc czynnik zapobiegający utracie resztkowych HDL.

CZY ZRÓŻNICOWANIE HDL POD WZGLĘDEM ZAWARTOŚCI APO A-I I APO A-II WPŁYWA NA PRZECIWMIAŻDŻYCOWE WŁAŚCIWOŚCI HDL?

Wielu badaczy uważa, że apo A-II, w przeciwieństwie do apo A-I, może odgrywać rolę promiażdżycową i prozapalną. Poglądy te oparte są w dużym stopniu na wynikach badań nad transgenicznymi myszami z wbudowanym genem ludzkiej apo A-II. Samo tylko zastąpienie w cząstkach HDL białka zwierzęcego przez jego ludzki odpowiednik, przy zachowaniu stężeń zarówno HDL-cholesterolu, jak i apo A-II w zakresie wartości prawidłowych, powoduje kilkukrotny wzrost podatności myszy na rozwój zmian miażdżycowych indukowanych dietą [48]. Nadekspresji genu kodującego ludzką izoformę apo A-II u myszy towarzyszy obniżenie poziomu HDL-cholesterolu [49] i zmniejszenie aktywności paraoksonazy 1 [50]. Zmiany te są rezultatem wypierania apo A-I i PON 1 z cząstek HDL przez nadmiar apo A-II [26,27,50]. Takie HDL nie tylko tracą swój antyoksydacyjny potencjał, ale wręcz stymulują oksydację LDL i pobudzają

procesy zapalne [51]. Myszy z wbudowanymi genami ludzkich apo A-I i apo A-II cechuje 15-krotnie większa podatność na miażdżycę niż myszy z wbudowanym genem samej tylko apo A-I, co wskazuje, że apo A-II może upośledzać procesy transportu zwrotnego cholesterolu [52]. U transgenicznych myszy cząstki HDL, w których dominuje apo A-I, są znacznie bardziej efektywne zarówno w odbieraniu cholesterolu z komórek, jak i w jego estryfikacji, a przekształcanie się pre- β HDL w cząstki dojrzałych HDL następuje szybciej [53]. Można to tłumaczyć hamującym wpływem apo A-II na aktywność LCAT.

Przedstawione powyżej dane wskazują, że apo A-II może odgrywać rolę antagonistyczną w stosunku do apo A-I i w związku z tym podfrakcja HDL A-I może mieć większe oddziaływanie przeciwmiażdżycowe niż podfrakcja HDL A-I/A-II. Należy jednakże odnieść się do wyników tych doświadczeń z pewną rezerwą. Przynajmniej częściowo mogą być one skutkiem różnic gatunkowych w zakresie budowy i funkcji apo A-II. Poza tym, że mysia apo A-II występuje wyłącznie w postaci monomeru, jej sekwencja aminokwasowa różni się od ludzkiej w około 40% [25]. U myszy zależności pomiędzy ilością apo A-II i stężeniem HDL są zupełnie inne niż u ludzi. Pozbawienie tych zwierząt genu apo A-II prowadzi do redukcji poziomu HDL o ponad połowę [54], a nadekspresja tego genu powoduje wzrost stężenia HDL [55]. Pomimo niewątpliwie ujemnego wpływu ludzkiej apo A-II na profil lipoprotein u transgenicznych myszy, istnieją dowody, że może brać ona udział w wychwycie cholesterolu z mysich makrofagów [56,57]. Kontrowersje budzą również wyniki eksperymentów, w których badano wyizolowane z ludzkiej surowicy podfrakcje HDL A-I i HDL A-I/A-II. Niektóre z doświadczeń potwierdzają, że cząstki HDL A-I cechuje większa niż cząstki HDL A-I/A-II zdolność do wychwytywania cholesterolu z błon komórkowych i jego estryfikacji [58], ale przedstawiono też doniesienia negujące istnienie takich różnic [59]. Opublikowane ostatnio wyniki badań epidemiologicznych nie tylko nie wykazują związku pomiędzy zachorowalnością na niedokrwinną chorobą serca a stężeniami podfrakcji HDL A-I oraz HDL A-I/A-II [2,60], ale wręcz wskazują, że stężenie apo A-II stanowi ujemny czynnik ryzyka NChS [61,62].

REGULACJA METABOLIZMU LIPOPROTEIN TRANSPORTUJĄCYCH TRIACYLOGLICEROLE – NOWA ROLA APO A-II?

Promiażdżycowe właściwości apo A-II mogą być związane z udziałem tej apolipoproteiny w hamowaniu katabolizmu lipoprotein transportujących triacyloglicerole. Nadprodukcja apo A-II u myszy prowadzi do wzrostu stężenia VLDL i wolnych kwasów tłuszczowych, otyłości i insulinooporności [63]. Także podanie apo A-II do krążenia królika powoduje bardzo szybki wzrost poziomu TG [35], będący najprawdopodobniej rezultatem hamowania przez apo A-II aktywność lipazy lipoproteinowej i lipazy wątrobowej [38,63-66]. Obniżone tempo katabolizmu chylomikronów i VLDL prowadzi do zmniejszenia podaży fosfolipidów i cholesterolu niezestryfikowanego do cząstek HDL i w konsekwencji obniża stężenie HDL. Hipotezę o istnieniu związku pomiędzy apo A-II i wysokim stężeniem VLDL potwierdza wyższa zawartość apo A-II w cząstkach HDL u osób

z rodzinną złożoną hiperlipidemią [66]. Według niektórych badaczy [65], zadaniem apo A-II jest regulacja metabolizmu lipoprotein transportujących triacyloglicerole, a cząstki HDL są rezerwuarem apo A-II, która przemieszcza się do VLDL i chylomikronów podobnie jak apolipoproteiny C.

CZY APO A-II MOŻE KRĄŻYĆ POMIĘDZY LIPOPROTEINAMI?

Nie przedstawiono dotychczas jednoznacznych dowodów na to, że apo A-II może opuszczać cząstki HDL, pomimo istotnych zmian strukturalnych jakie towarzyszą ich przemianom w osoczu. Z drugiej strony już dość dawno temu zaobserwowano przemieszczanie się małych ilości apo A-II z HDL do lipoprotein transportujących triacyloglicerole, podczas lipolizy katalizowanej przez lipazę lipoproteinową [67], a ostatnio wykazano nawet zdolność do spontanicznego przechodzenia A-II z HDL do VLDL *in vitro* [65]. Według Rye i wsp. [13], w trakcie procesów przemian HDL w osoczu, apo A-II może oddzielać się od cząstek HDL, ale jako bardzo hydrofobowe białko błyskawicznie wiąże się ponownie z lipoproteinami. Mało prawdopodobna wydaje się jednak dysocjacja cząsteczek apo A-II od HDL. Bardziej realne jest odrywanie się apo A-II związanej z pewną ilością fosfolipidów. Taką możliwość potwierdziły nasze badania nad przemianami HDL zachodzącymi pod wpływem fosfolipidów [68]. Wykazaliśmy, że wzrostowi zawartości fosfolipidów w HDL towarzyszy powstawanie dwóch odrębnych populacji cząstek lipoproteinowych wędrujących z ruchliwością pre- β w żelu agarozowym, zawierających albo apo A-I, albo apo A-II. Ruchliwość pre- β i brak estrów cholesterolu pozwalają na przypuszczenie, że są to struktury mające dyskowy kształt. Większość cząstek zawierających apo A-II miała średnice typowe dla małych białkowo-fosfolipidowo-cholesterolowych kompleksów powstających podczas inkubacji apo A-II z komórkami [29]. Gdyby w warunkach fizjologicznych apo A-II znajdująca się w dojrzałych, sferycznych HDL była zdolna do tworzenia cząstek podobnych do prekursorowych, dyskowych HDL zawierających apo A-I, mogłyby to mieć istotny wpływ na metabolizm lipoprotein. Prekursorowe HDL A-II mogłyby oddziaływać z transporterem ABC A-1 i brać udział w odbieraniu cholesterolu z komórek [30,56,57]. Mogłyby wbudowywać się w cząstki HDL A-I i brać udział w tworzeniu nowych generacji HDL A-I/A-II [26,27,34] lub wiązać się z cząstkami VLDL i LDL i hamować procesy lipolizy [25,35,65,67,69]. Generowanie małych dyskowych HDL A-II mogłoby też poprzedzać katabolizm apo A-II w nerce [70].

Krążenie apo A-I pomiędzy prekursorowymi i dojrzałymi formami HDL jest obecnie uważane za podstawowy czynnik warunkujący zwrotny transport cholesterolu [5,13,14]. Natomiast wiedza na temat udziału apo A-II w przemianach HDL w osoczu jest wciąż bardzo skąpa. Wyniki ostatnio prowadzonych badań epidemiologicznych, wskazujące na potencjalne działanie przeciwmiażdżycowe apo A-II, potwierdzają konieczność dalszych badań nad rolą apo A-II w transporcie zwrotnym cholesterolu.

PIŚMIENNICTWO

1. Waldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E (2001) High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in

the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *Lancet* 358: 2026-2033

2. Luc G, Bard JM, Ferrières J, Evans A, Amouyel P, Arveiler D, Fruchart JC, Ducimetiere P (2002) Value of HDL cholesterol, apolipoprotein A-I, lipoprotein A-II, and lipoprotein A-I/A-II in prediction of coronary heart disease. The PRIME study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1155-1161
3. Assmann G, Nofer JR (2003) Atheroprotective effects of high density lipoproteins. *Annu Rev Med* 54: 321-341
4. Barrans A, Jaspard B, Barbaras R, Chap H, Berret B, Collet X (1996) Pre- β HDL: structure and metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1300: 73-85
5. Rye KA, Barter PJ (2004) Formation and metabolism of pre-beta migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1-8
6. Castro GR, Fielding CJ (1988) Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- β -migrating high density lipoprotein. *Biochemistry* 27: 25-29
7. Cheung MC, Segrest JP, Albers JJ, Cone JT, Brouillette CC, Chung BH, Kashyap M, Glasscock AM, Anantharamaiah GM (1987) Characterization of high density lipoprotein subspecies: structural studies by single vertical spin ultracentrifugation and immunaffinity chromatography. *J Lipid Res* 28: 913-929
8. Bekaert ED, Alaupovic P, Knight-Gibson C, Norum RA, Laux MJ, Ayrault-Jarrier M (1992) Isolation and partial characterization of lipoprotein A-II (LP-A-II) particles of human plasma. *Biochim Biophys Acta* 1126: 105-113
9. Chisholm JW, Burleson ER, Shelness GS, Parks JS (2002) ApoA-I secretion from HepG2 cells: evidence for the secretion of both lipid-poor and apoA-I and intracellularly assembled nascent HDL. *J Lipid Res* 43: 36-44
10. Oram JF, Heinecke JW (2005) ATP-binding cassette transporter A1: cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Phys Rev* 85: 1343-1372
11. Nofer JR, Remaley AT, Feuerborn R, Wolińska I, Engel T, von Eckardstein A, Assmann G (2006) Apolipoprotein A-I activates Cdc42 signaling through the ABCA1 transporter. *J Lipid Res* 47: 794-803
12. Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M, Nguyen D, Dhanasekaran P, Saito H, Rothblat GH, Lund-Katz S, Phillips MC (2007) Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 282: 25123-25130
13. Rye KA, Clay MA, Barter PJ (1999) Remodeling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 145: 227-238
14. Barter PJ (2002) Hugh Sinclair lecture: The regulation and remodeling of HDL by plasma factors. *Atherosclerosis suppl* 3: 39-47
15. Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, Cartland S, Packianathan M, Kritharides L, Jessup W (2006) ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 534-540
16. Asztalos BF, Schaefer EJ, Horvath KV, Yamashita S, Miller M, Franceschini G, Calabresi L (2007) Role of LCAT in HDL remodeling: investigation of LCAT deficiency states. *J Lipid Res* 48: 592-599
17. Charvet LY, Ranalletta M, Wang N, Han S, Terasaka N, Li R, Welch C, Tall AR (2007) Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 117: 3900-3908
18. Vaughan AM, Oram JF (2005) ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J Biol Chem* 280: 30150-30157
19. De Grooth GJ, Klerkx AHM, Stroes ESG, Stalenhoef AFH, Kastelein JJP, Kuivenhoven JA (2004) A review of CETP and its relation to atherosclerosis. *J Lipid Res* 45: 1967-1974
20. Huuskonen J, Oikkonen VM, Jauhainen M, Ehnholm C (2001) The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 155: 269-281
21. Connelly PW (1999) The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism. *Clin Chim Acta* 286: 243-255

22. Choi SY, Hirata K, Ishida T, Quertermous T, Cooper AD (2002) Endothelial lipase: a new lipase on the block. *J Lipid Res* 43: 1763-1769
23. Lamarche B, Uffelman KD, Carpentier A, Cohn JS, Steiner G, barrett PH, Lewis GF (1999) Triglyceride enrichment of HDL enhances *in vivo* metabolic clearance of HDL apo A-I in healthy men. *J Clin Invest* 103: 1191-1199
24. Maugeais C, Tietge UJF, Broedl UC, Marchadier D, Cain W, McCoy MG, Lund-Katz S, Glick JM, Rader DJ (2003) Dose-dependent acceleration of high-density lipoprotein catabolism by endothelial lipase. *Circ Res* 108: 2121-2126
25. Blanco-Vaca F, Escolà-Gil JC, Martín-Campos JM, Julve J (2001) Role of apoA-II in lipid metabolism and atherosclerosis: advances in the study of an enigmatic protein. *J Lipid Res* 42: 1727-1739
26. Durbin DM, Jonas A (1997) The effect of apolipoprotein A-II on the structure and function of apolipoprotein A-I in a homogeneous reconstituted high density lipoprotein particle. *J Biol Chem* 272: 31333-31339
27. Ikewaki K, Zech LA, Kindt M, Brewer HB Jr, Rader DJ (1995) Apolipoprotein A-II production rate is a major factor regulating the distribution of apolipoprotein A-I among HDL subclasses LpA-I and LpA-I: A-II in normolipidemic humans. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 15: 306-312
28. Pastier D, Dugué S, Boisfer E, Atger V, Tran NQ, van Tol A, Chapman MJ, Chambaz J, Laplaud PM, Kalopissis AD (2001) Apolipoprotein A-II/A-I ratio is a key determinant *in vivo* of HDL concentration and formation of pre- β HDL containing apolipoprotein A-II. *Biochemistry* 40: 12243-12253
29. Forte TM, Bielicki JK, Goth-Goldstein R, Selmek J, McCall MR (1995) Recruitment of cell phospholipids and cholesterol by apolipoproteins A-II and A-I: formation of nascent apolipoprotein-specific HDL that differ in size, phospholipid composition, and reactivity with LCAT. *J Lipid Res* 36: 148-157
30. Fitzgerald ML, Morris AL, Chroni A, Mendez AJ, Zannis VI, Freeman MW (2004) ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J Lipid Res* 45: 287-294.
31. Forte TM, McCall MR, Knowles BB, Shore VG (1989) Isolation and characterization of lipoproteins produced by human hepatoma-derived cell lines other than HepG2. *J Lipid Res* 30: 817-829
32. Swaney JB, Palmieri E (1984) Hybrid association between human apolipoproteins A-I and A-II in aqueous solution and in phospholipid recombinants. *Biochim Biophys Acta* 792: 164-171
33. Clay MA, Pyle DH, Rye KA, Barter PJ (2000) Formation of spherical, reconstituted high density lipoproteins containing both apolipoproteins A-I and A-II is mediated by lecithin: cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem* 275: 9019-9025
34. Hime NJ, Drew KJ, Wee K, Barter PJ, Rye KA (2006) Formation of high density lipoproteins containing both apolipoprotein A-I and A-II in the rabbit. *J Lipid Res* 47: 115-122
35. Deeb SS, Takata K, Peng R, Kaiyama G, Albers JJ (1990) A splice-junction mutation responsible for familial apolipoprotein A-II deficiency. *Am J Hum Genet* 46: 822-827
36. Rye KA, Wee K, Curtiss LK, Bonnet DJ, Barter PJ (2003) Apolipoprotein A-II inhibits high density lipoprotein remodeling and lipid-poor apolipoprotein A-I formation. *J Biol Chem* 278: 22530-22536
37. Pussinen PJ, Jauhiainen M, Ehnholm C (1997) Apo A-II/apo A-I molar ratio in the HDL particle influences phospholipid transfer protein-mediated HDL interconversion. *J Lipid Res* 38: 12-21
38. Boucher J, Ramsamy TA, Braschi S, Sahoo D, Neville TAM, Sparks DL (2004) Apolipoprotein A-II regulates HDL stability and affects hepatic lipase association and activity. *J Lipid Res* 45: 849-858
39. Lagrost L, Perségol L, Lallemand C, Gambert P (1994) Influence of apolipoprotein composition of high density lipoprotein particles on cholesteryl ester transfer protein activity. Particles containing various proportions of apolipoproteins A-I and A-II. *J Biol Chem* 269: 3189-3197
40. Durbin DM, Jonas A (1999) Lipid-free apolipoproteins A-I and A-II promote remodeling of reconstituted high density lipoproteins and alter their reactivity with lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res* 40: 2293-2302
41. Weng W, Brandenburg NA, Zhong S, Halkias J, Wu L, Jiang X, Tall A, Breslow JL (1999) ApoA-II maintains HDL levels in part by inhibition of hepatic lipase: studies in apoA-II and hepatic lipase double knockout mice. *J Lipid Res* 40: 1064-1070.
42. Krieger M (1999) Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem* 68: 523-558
43. Liadaki KN, Liu T, Xu S, Ishida BY, Duchateau PN, Krieger JP, Kane J, Krieger M, Zannis VI (2000) Binding the high density lipoprotein (HDL) and discoidal reconstituted HDL to the HDL receptor scavenger receptor class B type I. Effect of lipid association and apoA-I mutations on receptor binding. *J Biol Chem* 275: 21262-21271
44. Rinninger F, Kaiser T, Windler E, Greten H, Fruchart JC, Castro G (1998) Selective uptake of cholesteryl esters from high-density lipoprotein-derived LpA-I and LpA-I:A-II particles by hepatic cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 1939: 277-291
45. Pilon A, Briand O, Lestavel S, Copin C, Majd Z, Fruchart JC, Castro G, Clavey V (2000) Apolipoprotein AII enrichment of HDL enhances their affinity for class B type I scavenger receptor but inhibits specific cholesteryl ester uptake. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 20: 1074-1081
46. De Beer MC, Durbin DM, Cai L, Mirocha N, Jonas A, Webb NR, de Beer FC, van der Westhuyzen DR (2001) Apolipoprotein A-II modulates the binding and selective lipid uptake of reconstituted high density lipoprotein by scavenger receptor BI. *J Biol Chem* 276: 15832-15839
47. De Beer MC, van der Westhuyzen DR, Whitaker NL, Webb NR, de Beer FC (2005) SR-BI-mediated selective lipid uptake segregates apoA-I and apoA-II catabolism. *J Lipid Res* 46: 2143-2150
48. Escolà-Gil JC, Marzal-Casacuberta A, Julve-Gil J, Ishida BY, Ordóñez-Llanos J, Chan L, González-Sastre F, Blanco-Vaca F (1998) Human apolipoprotein A-II is pro-atherogenic molecule when it is expressed in transgenic mice at a level similar to that in humans: evidence of a potentially relevant species-specific interaction with diet. *J Lipid Res* 39: 457-462
49. Julve J, Escolà-Gil JC, Ribas V, González-Sastre F, Ordóñez-Llanos J, Sánchez-Quesada JL, Blanco-Vaca F (2002) Mechanisms of HDL deficiency in mice overexpressing human apoA-II. *J Lipid Res* 43: 1734-1742
50. Ribas V, Sánchez-Quesada JL, Antón R, Camacho M, Julve J, Escolà-Gil JC, Vila L, Ordóñez-Llanos J, Blanco-Vaca F (2004) Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circ Res* 95: 789-797
51. Castellani LW, Navab M, Van Lenten BJ, Herdick CC, Hama SY, Goto AM, Fogelman AM, Lusis AJ (1997) Overexpression of apolipoprotein AII in transgenic mice converts high density lipoproteins to proinflammatory particles. *J Clin Invest* 100: 464-474
52. Schultz JR, Verstuyft JG, Gong EL, Nichols AV, Rubin EM (1993) Protein composition determines the anti-atherogenic properties of HDL transgenic mice. *Nature* 365: 762-764
53. Castro G, Nihoul PL, Dengremont C, de Geitère C, Delfly B, Tailleux A, Fievet C, Duverger N, Denefle P, Fruchart JC, Rubin EM (1997) Cholesterol efflux, lecithin-cholesterol acyltransferase activity, and pre- β particle formation by serum from human apolipoprotein A-I and apolipoprotein A-I/apolipoprotein A-II transgenic mice consistent with the latter being less effective for reverse cholesterol transport. *Biochemistry* 36: 2243-2249
54. Weng W, Breslow JL (1996) Dramatically decreased high density lipoprotein cholesterol, increased remnant clearance, and insulin hypersensitivity in apolipoprotein A-II knockout mice suggest a complex role for apolipoprotein A-II in atherosclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14788-14794
55. Hedrick CC, Castellani LW, Warden CH, Puppione DL, Lusis AJ (1993) Influence of mouse apolipoprotein A-II on plasma lipoproteins in transgenic mice. *J Biol Chem* 268: 20676-20682
56. Rotllan N, Ribas V, Calpe-Berdiel L, Martín-Campos JM, Blanco-Vaca F, Escolà-Gil JC (2005) Overexpression of human apolipoprotein A-II

- in transgenic mice does not impair macrophage-specific reverse cholesterol transport *in vivo*. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 25: 128-132
57. Fournier N, Cogny A, Atger V, Pastier D, Goudouneche D, Nicoletti A, Moatti N, Chambaz J, Paul JL, Kalopissis AD (2002) Opposite effects of plasma from human apolipoprotein A-II transgenic mice on cholesterol efflux from J774 macrophages and Fu5AH hepatoma cells. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 22: 638-643
 58. Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, Assmann G (1995) Cholesterol efflux, cholesterol esterification, and cholesteryl ester transfer by LpA-I and LpA-I/A-II in native plasma. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 15: 1412-1418
 59. Johnson WJ, Kilsdonk EPC, van Tol A, Philips MC, Rothblat GH (1991) Cholesterol efflux from cells to immunopurified subfractions of human high density lipoprotein: Lp-AI and LP-AI/AII. *J Lipid Res* 32: 1993-2000
 60. Asztalos BF, Demissie S, Cupples LA, Collins D, Cox CE, Horvath KV, Bloomfield HE, Robins SJ, Schaefer EJ (2006) LpA-I, LpA-I:A-II HDL and CHD-risk: the Framingham Offspring Study and the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Atherosclerosis* 188: 59-67
 61. Birjmohun RS, Dallinga-Thie GM, Kuivenhoven JA, Stroes ESG, Otvos JD, Wareham NJ, Luben R, Kastelein JJP, Khaw KT, Boekholdt SM (2007) Apolipoprotein A-II is inversely associated with risk of future coronary artery disease. *Circulation* 116: 2029-2035
 62. Winkler K, Hoffman MM, Seelhorst U, Wellnitz B, Boehm BO, Winkelmann BR, März W, Scharnagl H (2008) Apolipoprotein A-II is a negative risk indicator for cardiovascular and total mortality: findings from the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Clin Chem* 54: 1405-1406
 63. Castellani LW, Gargalovic P, Febbraio M, Charugundla S, Jien ML, Lusis AJ (2004) Mechanisms mediating insulin resistance in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A-II. *J Lipid Res* 45: 2377-2387
 64. Boisfer E, Lambert G, Atger V, Tran NQ, Pastier D, Benetollo C, Trotter JF, Beaucampst I, Antonucci M, Laplaud M, Griglio S, Chambaz J, Kalopissis AD (1999) Overexpression of human apolipoprotein A-II in mice induces hypertriglyceridemia due to defective very low density lipoprotein hydrolysis. *J Biol Chem* 274: 11564-11572
 65. Castellani LW, Nguyen CN, Charugundla S, Weinstein MM, Doan CX, Blamer WS, Wongsiriroj N, Lusis AJ (2008) Apolipoprotein A-II is a regulator of VLDL metabolism and insulin resistance. *J Biol Chem* 283: 11633-11644
 66. Allayee H, Castellani LW, Cantor RM, de Bruin TWA, Lusis AJ (2003) Biochemical and genetic association of plasma apolipoprotein A-II levels with familial combined hyperlipidemia. *Circ Res* 92: 1262-1267
 67. Musliner T, Michenfelder HJ, Krauss RM (1988) Interactions of high density lipoproteins with very low and low density lipoproteins during lipolysis. *J Lipid Res* 29: 349-361
 68. Wróblewska M, Kortas-Stempak B, Szutowicz A, Badzio T (2009) Phospholipids mediated conversion of high density lipoproteins generates specific apo A-II pre-beta mobility particles. *J Lipid Res* 50: 667-675
 69. Dugué-Pujol S, Rousset X, Pastier DF, Quang NT, Pautre V, Chambaz J, Chabert M, Kalopissis AD (2006) Human apolipoprotein A-II associates with triglyceride-rich lipoproteins and impairs their catabolism. *J Lipid Res* 47: 2631-2639
 70. Dugué-Pujol S, Rousset X, Château D, Pastier DF, Klein C, Demeurie J, Cywiner-Golenzer C, Chabert M, Verroust P, Chambaz J, Châtelet FP, Kalopissis AD (2007) Apolipoprotein A-II is catabolized in the kidney as a function of its plasma concentration. *J Lipid Res* 48: 2151-2158

The role of apolipoproteins A-I and A-II in plasma HDL remodeling

Małgorzata Wróblewska 

Department of Laboratory Medicine, Medical University of Gdańsk, 7 Dębinki St., 80-211 Gdańsk, Poland

 e-mail: wroblew@amg.gda.pl

Key words: HDL, apolipoprotein A-I, apolipoprotein A-II, HDL remodeling, pre-beta HDL

ABSTRACT

Apolipoprotein (apo) A-I is a key HDL protein participating in the process of reverse cholesterol transport. A small part of plasma apo A-I exists as free protein which is a substrate for generation of discoid HDL precursors, containing small amounts of phospholipids and free cholesterol. The cycling of apo A-I between precursor and mature forms of HDL is an essential element of HDL remodeling in plasma. The second most abundant protein of human HDL is apo A-II, nevertheless, it is present only in about half of the HDL particles in plasma. The mechanism mediating the formation of HDL containing apo A-I and apo A-II is unknown. The role of apo A-II in reverse cholesterol transport generates controversy. Different observations indicate either proatherogenic or proinflammatory properties of apo A-II. Also the participation of apo A-II in plasma HDL remodeling remains unclear. Apo A-II maybe a factor stabilizing HDL particles. This protein may also take part in regulation of VLDL metabolism. The review presents current knowledge concerning participation of apo A-I and apo A-II in plasma HDL remodeling.

Zmiany równowagi redukcyjno- oksydacyjnej u ciężarnych przeżuwaczy

STRESZCZENIE

Produktem ubocznym przemian tlenu w organizmie są reaktywne formy tego pierwiastka i ich pochodne. Reaktywne formy tlenu (RFT), a zwłaszcza wolne rodniki tlenowe (WRT) charakteryzują się dużą aktywnością chemiczną. Bardzo łatwo mogą wchodzić w reakcje z komórkowymi makrocząsteczkami (lipidami, białkami i DNA), prowadząc do zmian ich struktury i funkcji, a w konsekwencji nawet do śmierci komórek i uszkodzeń tkanek. W obronie przed RFT, organizmy wykształciły wielostopniowy system antyoksydacyjny, z wieloma wzajemnie uzupełniającymi się elementami. System ten tworzą enzymy, białka wiążące jony metali przejściowych oraz przeciwutleniacze drobnocząsteczkowe. Konsekwencją zaburzenia równowagi między wytwarzaniem RFT a sprawnością układu antyoksydacyjnego jest stres oksydacyjny. Stanem fizjologicznym, w którym dochodzi do znacznego wzrostu wytwarzania reaktywnych form tlenu jest ciąża, a zwłaszcza jej ostatni trymestr oraz początkowy okres laktacji. W pracy przedstawiono zmiany całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS) osocza krwi i jego wybranych składowych u domowych mlecznych przeżuwaczy. Dane literaturowe dowodzą jednoznacznie, że w okresie późnej ciąży i wczesnej laktacji obciążenie czynnościowe mechanizmów kontroli równowagi prooksydanty/antyoksydanty znacznie wzrasta.

WPROWADZENIE

Powstawanie reaktywnych form tlenu, RFT (ang. *reactive oxygen species*), a wśród nich wolnych rodników tlenowych, WRT (ang. *free oxygen radicals*), jest naturalną konsekwencją metabolizmu tlenowego. Są to cząsteczki o dużej aktywności chemicznej i w warunkach fizjologicznych są wręcz konieczne dla prawidłowego przebiegu wielu procesów życiowych, m.in. biosyntezy kwasów nukleinowych i niektórych hormonów tkankowych, regulacji wzrostu i różnicowania komórek, sygnalizacji między- i wewnątrzkomórkowej oraz obrony organizmu przed patogenami [1,2]. Toksyczne działanie RFT objawia się w warunkach zaburzonej równowagi między ich wytwarzaniem, a sprawnością układu antyoksydacyjnego [1,3,4]. RFT z powodu swej wysokiej aktywności chemicznej bardzo łatwo reagują z makrocząsteczkami komórkowymi: lipidami, białkami i DNA. Następstwami tych reakcji mogą być uszkodzenia błony komórkowej, zaburzenia aktywności białek (w tym enzymów) oraz mutacje genetyczne, a w konsekwencji zaburzenia czynności i śmierć komórek na drodze apoptozy [5-8].

GŁÓWNE ŹRÓDŁA REAKTYWNYCH FORM TLENU

Reaktywne formy tlenu w organizmie mogą pochodzić ze źródeł endogennych i egzogennych. Głównymi endogennymi źródłami RFT są przede wszystkim mitochondrialny łańcuch oddechowy, peroksyzomy, kompleks enzymatyczny w błonie komórkowej (oksydaza NADPH) oraz fagocytoza prowadzona przez mikro- i makrofagi [9,10]. Podczas oksydacyjnej fosforylacji zachodzącej w mitochondriach, tlen ulega stopniowej czteroelektronowej redukcji do wody. Przepływ elektronów przez składowe mitochondrialnego łańcucha oddechowego nie jest jednak szczelny. Około 2-5% elektronów może opuścić łańcuch oddechowy wchodząc w jednoelektronowe, nieenzymatyczne reakcje z tlenem [11,12]. W wyniku przyłączenia jednego elektronu do cząsteczki tlenu powstaje anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$). Przyłączenie drugiego elektronu powoduje powstanie nadtlenu wodoru (H_2O_2), a kolejnego rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$). Rodnik hydroksylowy po przyłączeniu czwartego elektronu przekształca się w cząsteczkę wody (H_2O) (Ryc. 1) [8,12,13]. Głównym źródłem nadtlenu wodoru w komórce, tworzonego m.in. przez oksydazy uczestniczące w β -oksydacji kwasów tłuszczowych, są peroksyzomy. Wytwarzany jest w nich także anionorodnik ponadtlenkowy, generowany przez oksydazę ksantynową i błonowy łańcuch transportu elektronów [1,14,15]. W błonie komórkowej fagocytów zlokalizowana jest oksydaza NADPH. Ma ona zdolność redukowania tlenu cząsteczkowego do anionorodnika ponadtlenkowego, przekształcanego następnie w nadtlenek wodoru, łatwo przechodzący przez

Joanna Kowalska

Dorota Jankowiak✉

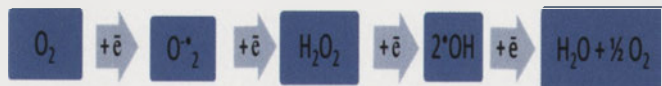
Katedra Fizjologii Zwierząt i Cytobiologii,
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt,
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Katedra Fizjologii Zwierząt i Cytobiologii,
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt,
ul. Doktora Judyma 6, 71-466 Szczecin; tel.:
(091) 449 67 96, e-mail: dorota.jankowiak@zut.edu.pl

Artykuł otrzymano 19 grudnia 2008 r.
Artykuł zaakceptowano 20 marca 2009 r.

Słowa kluczowe: reaktywne formy tlenu, stres oksydacyjny, antyoksydanty, całkowity status antyoksydacyjny, przeżuwacze, ciąża

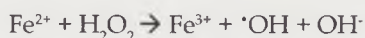
Wykaz skrótów: CAT (ang. *catalase*) – katalaza; GSH-Px (ang. *glutathione peroxidase*) – peroksydaza glutationowa; MDA (ang. *malonyldialdehyde*) – malonyldialdehyd; SOD (ang. *superoxide dismutase*) – dysmutaza ponadtlenkowa; RFT (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu; WRT (ang. *free oxygen radicals*) – wolne rodniki tlenowe; TAS (ang. *total antioxidant status*) – całkowity status antyoksydacyjny



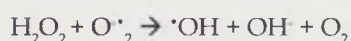
Rycina 1. Schemat tworzenia RFT w łańcuchu mitochondrialnym. O₂ – tlen; O₂^{•-} – anionorodnik nadadtlenkowy; H₂O₂ – nadtlenek wodoru; [•]OH – rodnik hydroksylowy.

blony komórkowe i wykorzystywany do walki z patogenami [16]. Zużycie tlenu przez fagocyty spoczynkowe jest niewielkie, jednakże wzrasta gwałtownie po pochłonięciu drobnoustrojów (i innych patogenów pochodzenia zewnętrznego lub wewnętrznego), co nazywane jest „wybuchem oddechowym” (ang. *respiratory burst*). Na skutek wzrostu przemian glukozy w cyklu pentozowym powstają nadtlenek wodoru, anionorodnik nadadtlenkowy oraz pewne ilości tlenu azotu mające działanie bakteriobójcze. Te reaktywne formy tlenu nie tylko niszczą patogeny, ale generowane w dużej ilości mogą uszkadzać komórki otaczających tkanek [9,15,17].

Najbardziej reaktywnym i niebezpiecznym wolnym rodnikiem tlenowym jest rodnik hydroksylowy, bardzo silny utleniacz jednoelektronowy, reagujący natychmiast z wieloma substancjami organicznymi [18]. Głównym jego źródłem w organizmie jest reakcja Fentona:



Katalizatorami tej reakcji mogą być nie tylko jony żelaza, ale zachodzi ona również przy udziale jonów miedzi (Cu⁺/Cu²⁺), a także innych metali przejściowych (Co, Mn, Cr) [19-21]. Drugim ważnym źródłem rodników hydroksylowych jest reakcja Habera-Weissa [22]:



SYSTEMY ANTYOKSYDACYJNE

W odpowiedzi na powstawanie reaktywnych form tlenu i w obronie przed ich wpływem, organizmy wykształciły złożony trójstopniowy system antyoksydacyjny: 1) pierwsza linia obrony – prewencja – niedopuszczenie do reakcji RFT ze związkami biologicznie czynnymi; 2) druga linia obrony – interwencja – przerwanie (zakończenie) łańcucha reakcji wolnorodnikowych; 3) trzecia linia obrony – eliminacja i/lub naprawa skutków reakcji RFT z cząsteczkami biologicznymi [1]. System antyoksydacyjny obecny jest zarówno w komórkach, jak i w przestrzeniach zewnątrzkomórko-

wych. Ze względu na mechanizm działania, składowe tego systemu dzieli się na enzymatyczne i nieenzymatyczne, a ze względu na pochodzenie na endogenne i egzogenne (Tabela 1) [1,15,23,24].

Enzymatyczną barierę antyoksydacyjną tworzą wyspecjalizowane enzymy tzw. triady enzymatycznej, tj. dysmutaza nadadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) i peroksydaza glutationowa (GSH-Px) (Ryc. 2) [25,26]. Dysmutaza nadadtlenkowa występuje u ssaków w postaci trzech izoenzymów: Cu-, ZnSOD (SOD-1), MnSOD (SOD-2), EC-SOD (ang. *extracellular SOD*). Pierwszy zlokalizowany jest w jądrze komórki i w cytoplazmie, drugi głównie w macierzy mitochondrialnej, a trzeci na powierzchni komórek w tkankach oraz w płynie zewnątrzkomórkowym. SOD katalizuje reakcję dysmutacji, przekształcając anionorodnik nadadtlenkowy do nadttlenku wodoru. Katalaza zlokalizowana jest głównie w peroksysomach, gdzie uczestniczy w unieczynnieniu nadttlenku wodoru. Przekształca ona H₂O₂ do tlenu cząsteczkowego i wody, bez wytwarzania wolnych rodników. Odgrywa szczególną rolę w metabolizmie erytrocytów, które są wystawione na działanie dużych stężeń tlenu [27]. Peroksydaza glutationowa znajduje się w mitochondriach i w cytoplazmie komórek. Uczestniczy w przemianie nadttlenku wodoru do wody, kosztem utleniania innego zredukowanego substratu, np. kwasu askorbinowego lub glutationu. Katalizuje redukcję nadttlenków lipidowych zapobiegając peroksydacji błonowych lipidów [1,28].

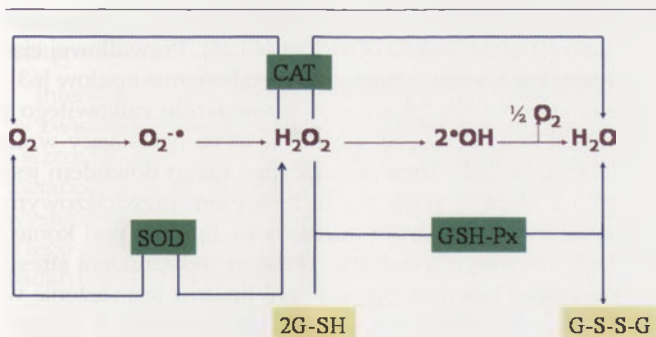
Białkowymi antyoksydantami o działaniu nieenzymatycznym są białka wiążące (i transportujące) jony metali przejściowych, uniemożliwiając w ten sposób zajście reakcji Fentona i Habera-Weissa, a więc generowanie bardzo reaktywnego rodnika hydroksylowego [22]. Główna rola w tym zakresie przypada białkom obecnym w komórkach, m.in. ferrytynie i metalotioneinom, oraz białkom osocza krwi transferynie, ceruloplazminie i albuminom [23].

Wśród substancji drobnocząsteczkowych kluczową rolę odgrywają glutation, kwas moczowy, witaminy A, E i C oraz β-karoten. Glutation występuje we wszystkich komórkach, zarówno organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Jego główną rolą jest utrzymywanie grup sulfhydrylowych białek (-SH) w stanie zredukowanym. Glutation redukuje reaktywne formy tlenu, regeneruje inne drobnocząsteczkowe antyoksydanty, uczestniczy w naprawie cząsteczek białek, kwasów nukleinowych i lipidów uszkodzonych w procesach wolnorodnikowych [29,30]. Witamina A może wychwytywać rodniki peroksydowe oraz reagować z

Tabela 1. Główne składowe systemu antyoksydacyjnego i ich lokalizacja.

		Lokalizacja			
		wewnątrzkomórkowa		pozakomórkowa	
		Mechanizm działania			
Enzymatyczny		nieenzymatyczny		nieenzymatyczny	
Cu,Zn-SOD	metaloproteiny	substancje drobnocząsteczkowe	EC-SOD	metaloproteiny	substancje drobnocząsteczkowe
CAT		glutation		transferyna	kwas moczowy
GSH-Px	ferrytyna metalotioneiny	kwas moczowy witaminy C, E i A β-karoten		ceruloplazmina albuminy	bilirubina witaminy C, E i A β-karoten

Objaśnienia: SOD – dysmutaza nadadtlenkowa; CAT – katalaza; GSH-Px – peroksydaza glutationowa.



Rycina 2. Usuwanie reaktywnych form tlenu z udziałem triady enzymatycznej. CAT – katalaza; SOD – dysmutaza ponadtlenkowa; GSH-Px – peroksydaza glutationowa; G-SH – glutation zredukowany; G-S-S-G – glutation utleniony.

rodnikami nadtlenkowymi, ale to karotenoidy są związkami o silniejszych właściwościach antyoksydacyjnych. Karotenoidy (zwłaszcza β -karoten) są silnymi wygaszczami tlenu singletowego i hamują peroksydację lipidów [31-33]. Najsilniejszym antyoksydantem obecnym w błonach komórkowych i lipoproteinach osocza krwi jest witamina E, inhibitor łańcuchowych reakcji utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [33]. Tokoferole reagują z generowanymi w dwuwarstwie lipidowej rodnikami ponadtlenkowymi i hydroksylowymi, wytwarzając mało reaktywne i stabilne rodniki tokoferylowe. Rodniki te ulegają redukcji do tokoferolu w reakcji z witaminą C i glutationem [4,31,32]. Witamina C (kwas askorbinowy) to jeden z głównych antyoksydantów hydrofilowych znajdujący się w przestrzeni zarówno wewnątrz-, jak i pozakomórkowej [32,33]. Występując w formach zredukowanej (kwas askorbinowy) i utlenionej (kwas dehydroaskorbinowy), pełni ważną funkcję w utrzymaniu odpowiedniego potencjału osydo-redukcyjnego, a przede wszystkim w neutralizacji reaktywnych form tlenu i azotu powstających w toku komórkowych przemian metabolicznych [4,34]. Kwas moczowy, a w zasadzie anion moczanowy, jest antyoksydantem działającym w komórce i pozakomórkowo. Reaguje on z utleniaczami, a także wiąże jony żelaza. Wykazuje dużą reaktywność zwłaszcza wobec produkowanego przez zaktywowane fagocyty podchlorynu. Obecny jest w dużych stężeniach w tkankach i komórkach narażonych na duże stężenia oksydantów [1,35].

CIAŻA I STRES OKSYDACYJNY

Terminem „stres oksydacyjny” określa się zaburzenie równowagi między produkcją reaktywnych form tlenu, a zdolnością mechanizmów antyoksydacyjnych do ich nieszkodliwiania. Może być on wynikiem wzrostu generowania RFT lub/i osłabieniem obrony antyoksydacyjnej [25,36-41]. W czasie ciąży w organizmie matki następują liczne dynamiczne zmiany adaptacyjne (anatomiczne, fizjologiczne i metaboliczne) [42,43]. Zmiany te, jak uważa wielu autorów, sprzyjają jednak także procesom wytwarzania RFT (zwłaszcza w drugiej połowie ciąży) [44]. Składa się na to kilka zasadniczych przyczyn. Najważniejsze z nich to wzrost podstawowej przemiany materii i „konsumpcji” tlenu oraz „przestawienie” większości tkanek pozałożyskowych matki na wykorzystywanie kwasów tłuszczowych jako podstawowego źródła energii [2,45]. Ostatni trymestr ciąży to okres zmniejszania wrażliwości tkanek docelowych

na działanie insuliny (insulinooporność), katabolizmu tkanki tłuszczowej i uwalniania z adypocytów WKT (wolnych kwasów tłuszczowych) [2]. W procesie ich β -oksydacji powstaje duża ilość nadtlenu wodoru [46].

Jednym z głównych źródeł prooksydantów jest łożysko [47]. Wraz z postępowaniem ciąży następuje wzrost jego rozmiarów i unaczynienia. Wzrost rozmiarów łożyska bogatego w mitochondria powoduje, że staje się ono „fabryką” RFT. Wytwarzany w dużej ilości anionorodnik ponadtlenkowy jest źródłem tworzenia kolejnych aktywnych form tlenu, tj. nadtlenu wodoru i rodnika hydroksylowego [39]. Wzrost wytwarzania RFT nasila się wraz z rozwojem ciąży [44,48], zwłaszcza mnogiej (większa masa łożyska) [49]. łożysko jest także miejscem lokalnej syntezy tlenu azotu. W organie tym są obecne duże ilości makrofagów, produkujących w obecności jonów metali przejściowych tlenek azotu (NO) i inne formy RFT [25,39,44]. W czasie ciąży układ odpornościowy samicy jest osłabiony, co jest powodem częstszych stanów zapalnych, prowadzących do aktywacji makro i mikrofagów, które zwalczając patogeny produkują duże ilości reaktywnych form tlenu [39,44,50]. Zwiększa się obrót metaboliczny żelaza [51,52]. Wzrasta erytropoeza, skraca się czas życia erytrocytów, nasila się dostawa tego mikroelementu do rozwijającego się płodu [53,54]. Zwiększa się więc dostępność wolnego żelaza, a tym samym możliwość katalizowania reakcji Fentona i wzrostu generowania bardzo reaktywnych rodników hydroksylowych [25,55].

Liczne badania dowodzą bezwzględnie, że nadmierna produkcja RFT (stres oksydacyjny) ma bardzo niekorzystny wpływ na przebieg ciąży, zdrowie samicy i rozwój płodu (płodów). Jest przyczyną m.in. zamierania zarodków i ich resorpcji, poronień, przedwczesnych porodów, wydawania na świat potomstwa o niskiej masie urodzeniowej, z wadami rozwojowymi narządów i układów, osłabioną odpornością i tempem pourodzeniowych zmian adaptacyjnych [4,30,41]. Podstawową przyczyną tych zaburzeń jest niewystarczające zaopatrzenie płodu w substancje odżywcze i tlen spowodowane niedorozwojem i nieprawidłową czynnością łożyska, w następstwie uszkodzenia lipidów, białek i DNA jego komórek [56-58].

CIAŻA I OBRONA ANTYOKSYDACYJNA

System obrony antyoksydacyjnej jest wieloskładnikowy. W obrębie każdej z trzech grup antyoksydantów: enzymatycznych, nieenzymatycznych białkowych i drobnocząsteczkowych wchodzi wiele składników [1]. Wykonanie pomiarów każdego z nich jest trudne do zrealizowania. Nasilenie stresu oksydacyjnego i stopień aktywacji obrony antyoksydacyjnej poszczególnych elementów są zmienne i zależą w znacznym stopniu od tkanki, narządu i układu. Mogą zmieniać się także w obrębie tego samego organu, np. w zależności od występującej danej części izoformy enzymu antyoksydacyjnego, czego dobrym przykładem jest łożysko i dysmutaza ponadtlenkowa. Dysmutazy cynkowo-miedziowa (SOD-1) i manganowa (SOD-2) wykazują w łożysku różną lokalizację i zdają się pełnić odmienne funkcje. SOD-1 jest zlokalizowana głównie w tkance zrębu kosmków, gdzie pełni funkcję ochronną przeciw anionorodnikowi ponadtlenkowemu wytwarzanemu przez makrofagi płodowe i pochodzącemu z innych źródeł. SOD-2

natomiast, zlokalizowana jest głównie w śródbłonku naczyniowym, gdzie odgrywa rolę wmiatacza anionorodnika ponadtlenkowego i wpływa na okres półtrwania tlenu azotu i stopień rozkurczu naczyń krwionośnych. Obydwie formy SOD obecne są w syncytiotrofoblastie, jednak w ilości nieporównywalnie mniejszej niż w śródbłonku naczyniowym i zrębie kosmków [10]. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, mierzona w homogenatach całego łożyska, wzrasta wraz z przebiegiem ciąży, zarówno fizjologicznej, jak i patologicznej. Ogólnie przejawia się to zmniejszeniem peroksydacji lipidów. W zależności jednak od zmian objętości kosmków, powierzchni trofoblastu i stopnia unaczynienia łożyska, może zmieniać się aktywność jednej lub drugiej izoformy. Tak więc pomiary ogólnej aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w homogenatach całego łożyska nie pozwalają na ocenę prawidłowości jego rozwoju i przebiegu ciąży [59].

Ocena statusu antyoksydacyjnego *in vivo*, na podstawie pomiarów wszystkich komponentów obrony antyoksydacyjnej, jest obecnie niemożliwa. Najmniej inwazyjnym sposobem oceny w organizmie stanu dynamicznej równowagi między oksydantami i antyoksydantami wydaje się być oznaczenie całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS) osocza oraz stężenia w nim malonyldialdehydu (MDA), wskaźnika stopnia peroksydacji lipidów. Całkowity status antyoksydacyjny osocza opisuje zdolność ochrony układów biologicznych przed uszkodzeniami wywołanymi przez reaktywne formy tlenu i ich pochodne [10,26,60]. Na całkowity status antyoksydacyjny osocza składa się aktywność antyutleniających enzymatycznych (głównie EC-SOD), białkowych nieenzymatycznych (m.in. albumin, ceruloplazminy, transferyny) oraz drobnocząsteczkowych (m.in. stężenia kwasu moczowego, bilirubiny, glutationu, witamin A, E i C oraz karotenoidów).

Stres metaboliczny towarzyszący ciąży i laktacji powoduje wzmożone wytwarzanie reaktywnych form tlenu, prowadząc często do zachwiania równowagi między pro- i antyoksydantami w organizmie [10,26,61,62]. Badania z zakresu sprawności systemu antyoksydacyjnego były prowadzone głównie u ciężarnych kobiet i krów mlecznych. Koncentrowały się one głównie na okresie przejściowym, tj. między późną ciążą a wczesną laktacją. Badania porównawcze ciężarnych i nieciężarnych kobiet wykazały, że całkowity status antyoksydacyjny osocza w pierwszym trymestrze ciąży jest statystycznie niższy niż u kobiet nieciężarnych [63]. Badacze stwierdzili, że wartość tego wskaźnika zależała od stężenia kwasu moczowego. Wzrostowi nerkowego wydalania kwasu moczowego i spadkowi jego stężenia w osoczu towarzyszyło zmniejszenie całkowitej pojemności antyoksydacyjnej. W drugim i trzecim trymestrze ciąży całkowita pojemność antyoksydacyjna osocza wzrastała, osiągając w ostatnim tygodniu ciąży wartości zbliżone do obserwowanych u kobiet nieciężarnych. Po porodzie wskaźnik ten do ósmego tygodnia laktacji ulegał dalszemu wzrostowi. Zmiany te także były proporcjonalne w stosunku do zmian stężenia kwasu moczowego w osoczu. Uwzględniając zmiany stężenia kwasu moczowego w osoczu, autorzy wyliczyli tzw. „skorygowaną TAC” (ang. *total antioxidant capacity*) i stwierdzili, że wartość ta nie zmieniała się w całym badanym okresie. Inne badania [45] potwierdzają mniejsze stężenia kwasu moczowego u ciężarnych kobiet, jednakże wskazują, że przyczyną niższych wartości TAS są również zmniejszenie stężenia albumin, bilirubiny oraz witaminy E w osoczu. Inni autorzy

stwierdzają, że podczas ciąży zmniejsza się też aktywność dysmutazy ponadtlenkowej osocza [40,48]. Prawidłowej ciąży towarzyszą wyraźne zmiany w metabolizmie lipidów [63]. Wzrasta stężenie triacylogliceroli, cholesterolu całkowitego i jego frakcji LDL w osoczu. Wskazuje to na narastający wraz z przebiegiem ciąży stres oksydacyjny, czego dowodem jest znacznie wyższa w porównaniu z okresem przedciążowym i poporodowym, zawartość nadtlenków lipidów pod koniec drugiego i trzeciego trymestru. Dobrym wskaźnikiem stresu oksydacyjnego i stopnia peroksydacji lipidów jest stężenie w osoczu malonyldialdehydu, wzrastające u kobiet w okresie ciąży [45,48].

Badania mlecznych krów dowodzą jednoznacznie, że największa produkcja wolnych rodników ma miejsce w okresie przejściowym. Niektórzy badacze [26] uważają, że w znacznym stopniu przyczyniają się do tego zachodzące w tym okresie intensywne zmiany hormonalne, immunologiczne i metaboliczne. Porównanie wyników badań przeprowadzonych w okresie okołoporodowym u krów nastęrcza wiele trudności. W badaniach tych krew do analiz pobierana była w różnym czasie, brano pod uwagę różne wskaźniki i na dodatek często stosowano inne metody ich oznaczeń. Np. stwierdzono [61], że stopień peroksydacji lipidów istotnie wzrasta od 10. dnia przed porodem do 30. dnia laktacji. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w osoczu zwiększa się progresywnie w ostatnich trzech tygodniach ciąży i osiąga maksimum w czwartym dniu przed porodem. Po porodzie aktywność tego enzymu szybko obniża się. Podobne tendencje obserwowali inni badacze [64]. Jeszcze inni badacze wykazali [26], że stężenie MDA w ostatnim tygodniu przed porodem obniża się, a następnie stopniowo wzrasta od 4. do 8. tygodnia laktacji. Nie zmienia się natomiast w tym czasie aktywność dysmutazy ponadtlenkowej. Badacze zaobserwowali, że w okresie od 2. tygodnia przed porodem do 4. tygodnia laktacji obniża się całkowity status antyoksydacyjny osocza (parametr ten wzrasta dopiero w 8. tygodniu laktacji), co wskazuje na osłabienie obrony antyoksydacyjnej i narastający stres oksydacyjny. Nie stwierdzono istnienia zależności pomiędzy natężeniem TAS, a zmianami stężeń kwasu moczowego, bilirubiny i albumin, co sugerowało, że o wartości TAS decydują głównie zmiany stężenia witamin E, A i C oraz glutationu. Odmienne tendencje zmian całkowitego statusu antyoksydacyjnego osocza w okresie przedporodowym zaobserwowano u krów, których dietę uzupełniono witaminą E [65]. Stwierdzono wzrost wartości wskaźnika TAS w miarę zbliżania się terminu porodu. Wykazano także [62], że od 2. tygodnia przed porodem wzrasta u krów zarówno stężenie MDA, jak i całkowity status antyoksydacyjny osocza. Osiągają one maksymalne wartości w 1. tygodniu laktacji, po czym już w 2. tygodniu znacząco maleją. Stwierdzono znaczący wpływ uzupełnienia diety witaminami i składnikami mineralnymi na wartość całkowitego statusu antyoksydacyjnego. Tuż przed porodem stężenie niektórych antyoksydantów, np. witaminy E, zmniejsza się do poziomu, który u osobników nie będących w ciąży mógłby wskazywać na stan jej chronicznego niedoboru. Tak więc obserwowany w pierwszym tygodniu po wycieleniu, „szczyt” stężenia MDA, i najwyższą wartość wskaźnika TAS mogą dowodzić, że endogenne system antyoksydacyjny wspomagany przez egzogenne antyoksydanty może skutecznie kompensować nadmierne w okresie okołoporodowym wy-

tworzenie nadtlenków lipidów i skutecznie chronić przed następstwami stresu oksydacyjnego [62,65-67].

Intensyfikacja utrzymania kóz, to jest m.in. zwiększenie liczby zwierząt w stadzie, dążenie do wydłużenia okresu laktacji i wzrostu wydajności mlecznej spowodowały, że zaburzenia metaboliczne (w tym równowagi oksydanty/antyoksydanty), występują w okresie okołoporodowym coraz częściej również u tego gatunku przezuwaczy. Potwierdzeniem tego są wyniki badań [68], które dowodzą występowania w okresie przejściowym u wysokomlecznych kóz umiarkowanego stresu oksydacyjnego. Nie zaobserwowano co prawda w tym okresie znaczących zmian stężenia w osoczu reaktywnych metabolitów tlenu (ROMs, ang. *reactive oxygen metabolites*) i aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (EC-SOD), ale wykazano znaczący spadek aktywności peroksydazy glutationowej (GSH-Px) i stężenia albumin. Aktywność GSH-Px uznawana jest za wskaźnik stresu oksydacyjnego i wykazuje ścisły związek z zawartością nadtlenku w osoczu. Albuminy są natomiast głównym pozakomórkowym źródłem grup tiolowych, będących wymiataczami wolnych rodników [1,68]. Wysłunięto przypuszczenie [68], że uszczuplenie zawartości antyoksydantów w osoczu jest konsekwencją, a nie przyczyną stresu oksydacyjnego. Wiele cząsteczek antyoksydantów jest bowiem zaangażowanych w utrzymanie stałego, prawidłowego poziomu reaktywnych metabolitów tlenu, a spadek zawartości jednego z nich jest zwykle kompensowany wzrostem innych.

Wyniki badań dowodzą więc jednoznacznie, że u domowych mlecznych przezuwaczy ostatnie tygodnie ciąży i początek laktacji to okres zwiększonego narażenia na stres oksydacyjny i powodowane przez niego zaburzenia, a więc wymagający dużej sprawności (aktywności) systemu antyoksydacyjnego.

PIŚMIENNICTWO

1. Bartosz G (2006) Druga twarz tlenu, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
2. Winkler K, Wetzka B, Hoffman MM, Friedrich I, Kinner M, Baumstark MW, Wieland H, Marz W, Zahradnik HP (2000) Low density lipoprotein (LDL) subfractions during pregnancy: accumulation of buoyant LDL with advancing gestation. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4543-4550
3. Tiidus PM (1998) Radical species in inflammation and overtraining. *Can J Physiol Pharmacol* 76: 533-538
4. Ziemiński S, Wartanowicz M (1999) Rola antyoksydantów żywieniowych w stanie zdrowia i choroby. *Pediatrics Współczesna. Gastroenterologia, hepatologia i żywienie dziecka* 1: 97-105
5. Farbiszewski R, Skrzydlewska E (1996) Mechanizmy adaptacyjne komórki i usuwanie uszkodzeń wywołanych stresem oksydacyjnym. *Post Hig Med Dosw* 50: 613-620
6. Łuczaj W, Skrzydlewska E (2006) Współczesne spojrzenie na peroksydację lipidów. *Postepy Biochem* 52:173-179
7. Rybczyńska M (1994) Biochemiczne podstawy wolnorodnikowego uszkodzenia białek. *Post Hig Med Dosw* 48: 419-442
8. Skrzydlewska E, Farbiszewski R (1995) Interakcje wolnych rodników z białkami. *Post Hig Med Dosw* 49: 747-766
9. Kleczkowski M, Kluciński W, Sitarska E, Sikora J (1998) Stres oksydacyjny i wybrane wskaźniki stanu antyoksydacyjnego zwierząt. *Medycyna Wet* 54: 166-171
10. Myatt L, Eis ALW, Brockman DE, Kossenjans W, Greer IA, Lyall F (1997) Differential localization of superoxide dismutase isoforms in placental villous tissue of normotensive, pre-eclamptic and intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Histochem Cytochem* 45: 1433-1438

11. Camougrand N, Rigoulet M (2001) Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. *Respir Physiol* 128: 393-401
12. Potargowicz E, Szerszenowicz E, Staniszewska E, Nowak D (2005) Mitochondria jako źródło reaktywnych form tlenu. *Post Hig Med Dosw* 59: 259-266
13. Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552.2: 335-344
14. Del Rio LA, Corpas JF, Sandalio LM, Palma JM, Gomez M, Barroso JB (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* 53: 1255-1272
15. Thomas MJ (2000) The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 16: 716-718
16. Nidl G (2004) Hydrogen peroxide – from oxidative stressor to redox regulator. *Cell Sci Rev* 1: 1-12
17. Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54: 469-487
18. Andrzejak R, Goch JH, Jurga M (1995) Wolne rodniki i ich znaczenie w medycynie. *Post Hig Med Dosw* 49: 531-549
19. Bergend L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65: 1865-1999
20. Hensley K, Floyd RA (2002) Reactive Oxygen Species and protein oxidation in ageing: a look back, a look ahead. *Arch Biochem Biophys* 397: 377-383
21. Matyska-Piekarska E, Łuszczewski A, Łacki J, Wawer I (2006) Rola stresu oksydacyjnego w etiopatogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. *Post Hig Med Dosw* 60: 617-623
22. Halliwell B, Gutteridge JMC (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14
23. Augustyniak A, Skrzydlewska E (2004) Zdolności antyoksydacyjne w starzejącym się organizmie. *Post Hig Med Dosw* 58: 194-201
24. Zabłocka A, Janusz M (2008) Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. *Post Hig Med Dosw* 62: 118-124
25. Devrim E, Tarhan J, Erguder JB, Durak J (2006) Oxidant/antioxidant status of placenta, blood and cord blood samples from pregnant women supplemented with iron. *J Soc Gynecol Invest* 13: 502-505
26. Markiewicz H, Gehrke M, Malinowski E, Kaczmarowski M (2005) Ocena potencjału antyoksydacyjnego krwi krów w okresie okołoporodowym. *Medycyna Wet* 61: 1382-1384
27. Ścibior D, Czeczot H (2006) Katalaza – budowa, właściwości, funkcje. *Post Hig Med Dosw* 60: 170-180
28. Małecka A, Tomaszewska B (2005) Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych I enzymatyczne systemy obronne. *Post Biol Kom* 32: 311-325
29. Biłska A, Kryczyk A, Włodek L (2007) Różne oblicza biologicznej roli glutationu. *Post Hig Med Dosw* 61: 438-453
30. Prokopenko VM, Partsalis GK, Burmistrov SO (2006) The glutathione-dependent system of placenta antioxidant defense in miscarriage. *Hum Physiol* 32: 197-199
31. Duell BP (1996) Prevention of atherosclerosis with dietary antioxidant: fact or fiction? *J Nutr* 1996: 1067-1071
32. Guz J, Dziaman T, Szpila A (2007) Czy witaminy antyoksydacyjne mają wpływ na proces kancerogenezy. *Post Hig Med Dosw* 61: 185-198
33. Sroka Z, Gamian A, Cisowski W (2005) Niskocząsteczkowe związki pochodzenia naturalnego. *Post Hig Med Dosw* 59: 34-41
34. Baydas G, Karatas F, Gursu MF, Bozkurt HA, Ilhan N, Yasa A, Canatan H (2002) Antioxidant vitamins levels in term and preterm infants and their relations to maternal vitamin status. *Arch Med Res* 33: 276-280
35. Imada I, Sato EF, Miyamoto M, Ischimori Y, Minamiyama Y, Konaka R, Inoue M (1999) Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012. *Anal Biochem* 271: 53-58

36. Buhimschi JA, Buhimschi CS, Pupkin M, Weiner CP (2003) Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol* 189: 181-188
37. Chen X, Scholl TO (2005) Oxidative stress: changes in pregnancy and with gestational diabetes melitus. *Curr Diab Rep* 5: 282-288
38. Granot E, Kohen R (2004) Oxidative stress in childhood – in healthy and disease states. *Clin Nutr* 23: 3-11
39. Myatt L, Cui X (2004) Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 122: 369-382
40. Peuchant E, Brun JL, Rigalleau V, Dubourg L, Thomas MJ, Daniel YL, Leng JJ, Gin H (2004) Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin Biochem* 37: 293-298
41. Poston L, Rajmakers MTM (2004) Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome – a review. *Placenta Suppl* 18: 72-78
42. Jankowiak D, Kruglak M, Dzieńska M (2006) Zmiany koncentracji lipidów całkowitych i ich wybranych frakcji w osoczu krwi ciężarnych kóz. *Folia Univ Agric Stetin* 250: 175-186
43. Lurie S, Mamet Y (2000) Red blood cell survival and kinetics during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 93: 185-192
44. Casanueva E, Viteri FE (2003) Iron and oxidative stress in pregnancy. *J Nutr* 133: 1700-1708
45. Sarandol E, Dirican M, Serdar Z (2004) Oxidizability of apolipoprotein B-containing lipoproteins, levels of lipid peroxidation products and antioxidants in normal pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 270: 157-160
46. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2005) *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
47. Scholl TO, Leskiw M, Chen X, Sims M, Stein PT (2005) Oxidative stress, diet and the etiology of preeclampsia. *Am J Clin Nutr* 81: 1390-1396
48. Patil SB, Kodliwadmath MV, Kodliwadmath SM (2007) Study of oxidative stress and enzymatic antioxidants in normal pregnancy. *Ind J Clin Biochem* 22: 135-137
49. Grazul-Bilska AT, Pant D, Luther JS, Borowicz PP, Navanukraw C, Caton JS, Ward MA, Redmer DA, Reynolds LP (2006) Pregnancy rates and gravid uterine parameters in single, twin and triplet pregnancies in naturally bred ewes and ewes after transfer of in vitro produced embryos. *Animal Rep Sci* 92: 268-283
50. Cooper D, Stokes KY, Tailor A, Granger DN (2002) Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc Toxicol* 2: 165-180
51. Bothwell TH (2000) Iron requirements in pregnancy and strategies to meet them. *Am J Clin Nutr* 72: 257-264
52. Choi JW, Pai S (2001) Change in erythropoiesis with gestational age during pregnancy. *Ann Hematol* 80: 26-31
53. Milman N, Byg KE, Berghold T, Eriksen L, Hvas AM (2006) Body iron and individual iron prophylaxis in pregnancy – should the iron dose be adjusted according to serum ferritin? *Ann Hematol* 85: 567-573
54. Scholl TO (2005) Iron status during pregnancy: setting the stage for mother and infant. *Am J Clin Nutr* 81: 1218S-1222S
55. Hubel CA (1999) Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 222-235
56. Jauniaux E, Poston L, Burton GJ (2006) Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* 12: 747-755
57. Prokopenko VM, Arutyunyan AV, Frolova EV, Kuz'minykh TU, Ailamazyan EK (1997) Free radical oxidation and antioxidant activity in placental tissue in preterm labor. *Exp Biol Med* 12: 1182-1184
58. Saugstad OD (1998) Oxygen radical disease in neonatology. *Semin Neonatal* 3: 229-238
59. Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YJW, Marsh JP, Mossman BT (1991) Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem* 266: 24398-24403
60. Kim YJ, Hong YC, Lee KH, Park HJ, Park EA, Moon HS, Ha EH (2005) Oxidative stress in pregnant women and birth weight reduction. *Reprod Toxicol* 19: 487-492
61. Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A (2005) Influence of body condition score on relationship between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 88: 2017-2026
62. Castillo C, Hernandez J, Bravo A, Lopez-Alonso M, Pereira V, Benedito JL (2005) Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet J* 169: 286-292
63. Toescu V, Nuttal SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F (2002) Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol* 57: 609-613
64. Gaal T, Ribiczeyne – Szabo P, Stadler K, Jakus J, Reiczigel J, Kover P, Mezes M, Sumeghy L (2006) Free radical, lipid peroxidation and the antioxidant system in the blood of cows and newborn calves around calving. *Comp Biochem Physiol* 143: 391-396
65. Miller JK, Brzezińska-Slebodzińska E (1993) Oxidative stress, antioxidants and Animals function. *J Dairy Sci* 76: 2812-2823
66. Brzezińska-Slebodzińska E, Miller JK, Qougley JD, Moore JR (1994) Antioxidant status of dairy cows supplemented prepartum with vitamin E and selenium. *J Dairy Sci* 77: 3087-3095
67. Paula-Lopes FF, Al-Katanani YM, Majewski AC, McDowell LR, Hansen PJ (2003) Manipulation of antioxidant status fails to improve fertility of lactating cows or survival of heat-shocked embryos. *J Dairy Sci* 86: 2343-2351
68. Celi P, Di Trana A, Quaranta A (2008) Metabolic profile and oxidative status in goats during the peripartum period. *Aust J Exp Agric* 48: 1004-1008

Changes of reduction-oxidation balance in pregnant ruminants

Joanna Kowalska, Dorota Jankowiak

Department of Animal Physiology and Cytobiology, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, Westpomeranian University of Technology, 6 Doktora Judyka St., 71-466 Szczecin, Poland

e-mail: dorota.jankowiak@zut.edu.pl

Key words: reactive oxygen species, oxidative stress, antioxidants, total antioxidant status, ruminants, pregnancy

ABSTRACT

By-products of oxygen metabolism are the element's reactive species and their derivatives. Reactive oxygen species (ROS) and particularly free oxygen radicals (FOR) are characterized by high chemical activity. They can easily react with cell macromolecules (lipids, protein and DNA), leading to change of their structure and function and finally to the cell death and tissue damage. In defense against ROS, organism formed an antioxidative system of several stages with many completing each other reciprocally. The system is made by enzymatic antioxidants, non-enzymatic proteins binding ions of transition metals, and low molecular antioxidants. Oxidative stress is a consequence of disorder between ROS generation and efficiency of the antioxidant system. Pregnancy is a physiological state characterized by increased ROS generation especially in the last trimester of the gestation and at the beginning of lactation. In this paper we have presented changes in total antioxidant status (TAS) of plasma and its chosen components in domestic milking ruminants in transition period. Literature data prove explicitly that during late pregnancy and early lactation period, functional burden of balance control mechanism pro/antioxidants increases significantly.

Ewolucja poglądów na temat insulinopodobnych czynników wzrostu

STRESZCZENIE

Niniejszy artykuł przeglądowy jest próbą zwięzłego podsumowania obecnego stanu wiedzy na temat insulinopodobnych czynników wzrostu, dawniej zwanych somatomedynami. Autorzy opisują strukturę układu IGF, wyjaśniając podstawowe mechanizmy jego funkcjonowania. Celem artykułu jest również przedstawienie najnowszych wyników badań dotyczących wpływu insulinopodobnych czynników wzrostu na pre-, około- i postnatalny wzrost i rozwój organizmów. Rola IGF-I wydaje się być bardziej istotna w tym procesie niż sądzono 50 lat temu, kiedy to narodziła się hipoteza występowania somatomedyn, przy czym od tego czasu dokonano kilku poważnych zmian jej treści. Szczególną uwagę zwrócono na rolę układu IGF w stanach patologicznych, reprodukcji, laktacji, żywieniu i układzie immunologicznym zarówno ludzi, gryzoni, jak i przeżuwaczy. Podkreślono również związek pomiędzy IGF-I a procesem nowotworzenia.

WPROWADZENIE

Wzrost jest to szereg zmian, które zachodzą u wszystkich organizmów żywych, w okresie płodowym i po urodzeniu polegający na zwiększaniu się liczby oraz wymiarów komórek z jednoczesnym procesem ich różnicowania. Proces ten regulowany jest przez szereg czynników wewnętrznych (integracja szlaków sygnałowych) i środowiskowych (przede wszystkim dostarczanych z pożywieniem). U osobników dojrzałych oparty jest na naturalnej regeneracji tkanek, odpowiedzi na uszkodzenia, jak również na zachowaniu bilansu metabolicznego i integralności komórek. Głównym regulatorem procesu wzrastania w okresie płodowym jest układ insulinopodobnych czynników wzrostu. Wzrost w okresie pourodzeniowym skorelowany jest przede wszystkim z poziomem w osoczu hormonu wzrostu i jego mediatora – IGF-I [1]. Nieprawidłowości związane z zaburzeniami wzrastania w sposób znaczący wpływają na metabolizm organizmu i przyczyniają się do wystąpienia wielu chorób [2].

EWOLUCJA POGLĄDÓW

ZAŁOŻENIA HIPOTEZY WYSTĘPOWANIA SOMATOMEDYN

Hipoteza dotycząca występowania w organizmach żywych somatomedyn narodziła się w momencie próby poznania, w jaki sposób wzrost somatyczny komórek zależy od czynników uwalnianych z przysadki mózgowej. Evans i wsp. [3] po raz pierwszy zademonstrowali, że bliżej niesprecyzowana substancja, zawarta w przednim płacie przysadki mózgowej, zwiększa tempo wzrostu szczurów. Lee i Schaffer [4], wstrzykując szczurom wyciąg z bydłowej przysadki, zaobserwowali, że badane zwierzęta, w porównaniu z grupą kontrolną, nie tylko rosną szybciej, ale także zawierają proporcjonalnie więcej mięśni i mniej tłuszczu. Te spostrzeżenia doprowadziły badaczy do wniosku, że substancja obecna w przysadce mózgowej stymuluje wzrost i wpływa znacząco na jakość tuszy. Taką hipotetyczną substancję z wyciągu z przysadki nazwano hormonem wzrostu (GH, ang. *growth hormone*), jednakże po raz pierwszy wyizolowano i w dostatecznym stopniu oczyszczono ten hormon z bydłowej przysadki dopiero w 1945 roku [5]. Udowodniono następnie, że oczyszczony GH naśladował działanie wyciągu z przysadki mózgowej, zmniejszając otluszczenie szczurów o 47% [6]. Jest to białko o masie cząsteczkowej 22 kDa, składające się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, zbudowanego ze 191 reszt aminokwasów, w obrębie którego tworzą się dwa mostki disiarczkowe i cztery helisy α (odpowiednio 1. reszty 9–34, 2. reszty 72–92, 3. reszty 106–128 oraz 4. reszty 155–184), połączone krótkimi pętlami [7]. Już pół wieku temu dowiedziano, że hormon wzrostu, syntetyzowany przez komórki kwasochłonne przedniego płata przysadki mózgowej, nie działa wprost na tkanki docelowe. W trakcie badań wykonywanych *in vivo* i *in vitro* na szczurach, śledzono stopień wiązania znakowanego $^{35}\text{SO}_4$ w komórkach tkanki chrzęstnej (w postaci siarczanu chondroityny) [8,9]. Szczury z uszkodzoną lub wyciętą przysadką

Małgorzata Szewczuk^{1,✉}

Sławomir Zych²

Ewa Czerniawska-Piątkowska¹

¹Pracownia Doskonalenia Przeżuwaczy, Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających, ul. Judyma 10, 71-460 Szczecin

²Pracownia Serologii i Biochemii, Weterynaryjne Laboratorium Diagnostyczne „Labo-Wet”, ul. Targowa 4, 70-634 Szczecin

✉Pracownia Doskonalenia Przeżuwaczy, Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających, ul. Judyma 10, 71-460 Szczecin, Polska, e-mail: malgorzata.szewczuk@zut.edu.pl

Artykuł otrzymano 19 grudnia 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 19 czerwca 2009 r.

Słowa kluczowe: hormon wzrostu, insulinopodobny czynnik wzrostu, oś somatotropowa

Wykaz najczęściej stosowanych skrótów: GH – hormon wzrostu; GHR – receptor hormonu wzrostu; IGF-I – insulinopodobny czynnik wzrostu I

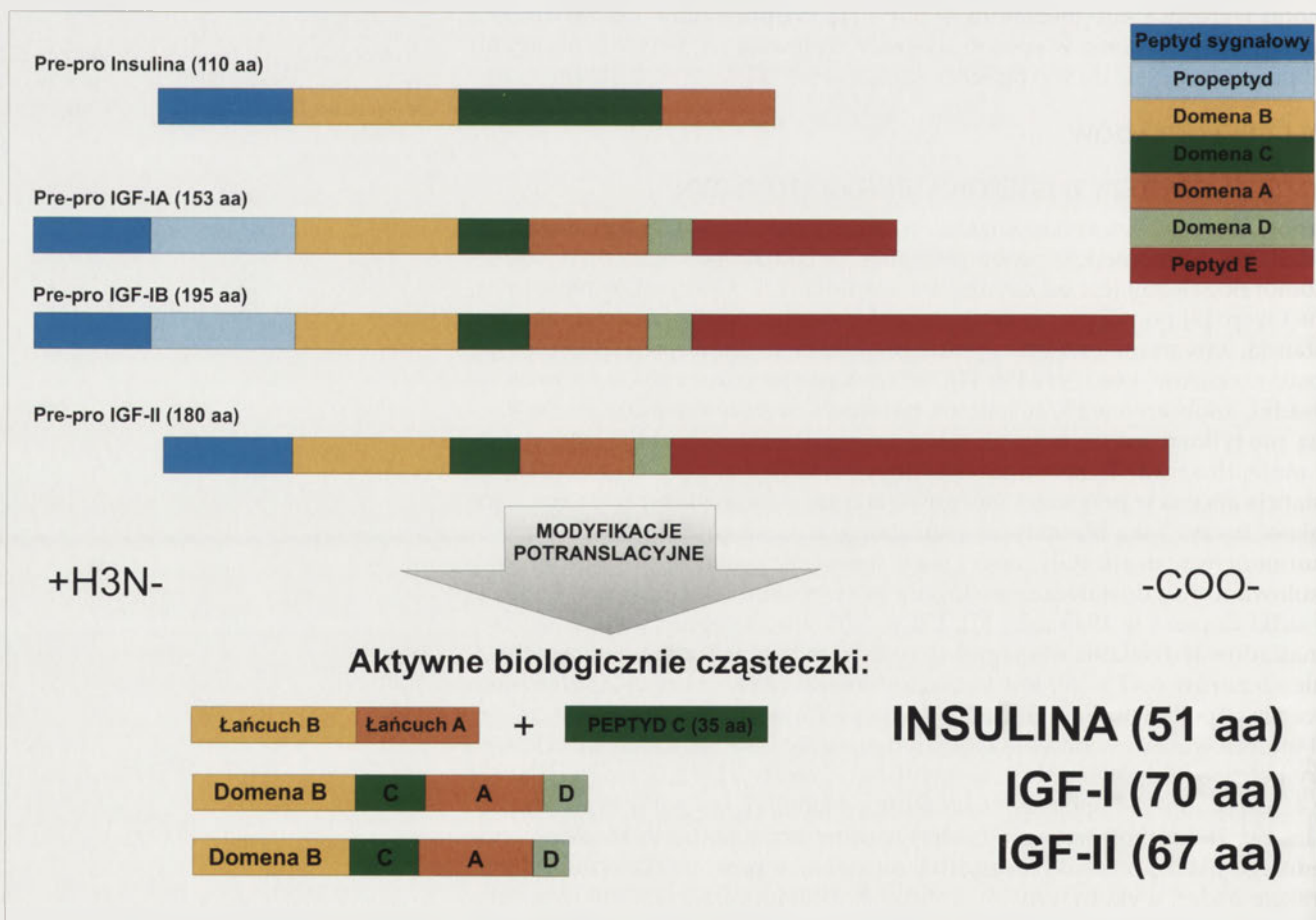
mózgową miały znacząco niższy poziom wbudowanego $^{35}\text{SO}_4$. Jakkolwiek wstrzykiwanie oczyszczonego bydłęcego GH efektywnie przywracało cały proces, to w badaniach *in vitro* w hodowlach wycinków badanej tkanki chrzęstnej podawanie GH nie przyniosło spodziewanego efektu. Obserwacje te doprowadziły do wniosku, że wpływ hormonu wzrostu nie jest bezpośredni, a do swojego działania wykorzystuje inne czynniki wzrostu.

W 1972 r. na łamach *Nature* postawiono hipotezę [10], w myśl której to jeszcze nie wyizolowane czynniki wzrostu, nazwane somatomedynami, pośredniczą w przenoszeniu informacji zainicjowanej przez przysadkowy hormon wzrostu. Termin „somatomedyna” miał odzwierciedlać zdolność takiego czynnika do przekazywania sygnału „somatotropiny”, jak coraz częściej nazywano hormon wzrostu. Termin somatotropina (ST) okazał się jednak niepoprawny i obecnie rzadko stosowany, ponieważ hormon wzrostu nie jest *stricte* hormonem tropowym. Dodatkowo somatomedyny podzielono na podtypy, oznaczane kolejno dużymi literami alfabetu, przy czym takim czynnikiem w odpowiedzi na GH miała być somatomedyna C (Sm-C).

Jednocześnie rozwinął się odmienny kierunek badań, oparty na innym biologicznym systemie, choć dotyczący tej samej rodziny hormonów, a mianowicie insuliny. Froesch i wsp. [11], mierząc aktywność tego hormonu z udziałem surowicy z przeciwciałami przeciwko insulinie spostrzegli, że znaczna część insulinopodobnej aktywności nie ulega

wyłączeniu, mimo bezpośredniej supresji cząsteczki insuliny. Taką aktywność nazwano insulinopodobną, nie ulegającą zahamowaniu (NSILA, ang. *nonsuppressible insulin-like activity*) i podjęto badania mające na celu zidentyfikowanie jej źródła. Stwierdzono, że NSILA stanowią dwie frakcje białkowe; w 90% to frakcja o wysokiej masie cząsteczkowej (100–150 kDa) nie rozpuszczalna w kwasie, którą nazwano NSILA-P (ang. *purified/precipitate NSILA*), zaś pozostałą frakcję stanowią małe cząsteczki (6–10 kDa), rozpuszczalne w kwasie [12]. Te ostatnie, nazwane NSILA-S (ang. *short/soluble NSILA*), stały się przedmiotem szerszego zainteresowania. Kwestią do rozstrzygnięcia stało się zagadnienie, czy NSILA to jedna cząsteczka białkowa, zdolna do tworzenia polimerów lub agregatów z innymi cząsteczkami białkowymi, czy też NSILA to nic innego, jak kilka chemicznie odmiennych cząsteczek białkowych. Na rozstrzygnięcie tej kwestii trzeba było poczekać kolejną dekadę.

Zwieńczeniem wieloletnich badań nad aktywnością insuliny stało się wyizolowanie i scharakteryzowanie dwóch odrębnych form NSILA-S, których masę cząsteczkową oszacowano na 5-8 kDa. Nazwano je NSILA I i NSILA II, jednocześnie wstępnie wykazując ich insulinopodobną aktywność biologiczną [13]. Sześć lat po hipotetycznym ogłoszeniu istnienia somatomedyn Rinderknecht i Humbel [14,15] opisali strukturę łańcucha aminokwasowego cząsteczek NSILA I i II. Pierwszą z nich, o masie cząsteczkowej 7649 Da, nazwano insulinopodobnym czynnikiem wzrostu-I (IGF-I, ang. *insulin-like growth factor-I*). Jest to



Rycina 1. Porównanie prekursorowych i dojrzałych form insuliny, IGF-I i IGF-II człowieka. Objasnienie skrótów: „aa” liczba reszt aminokwasów.

pojedynczy łańcuch polipeptydowy, składający się z 70 reszt aminokwasów, zawartych w czterech domenach: B (reszty 1–20), C (reszty 30–41), A (reszty 42–62) i D (reszty 63–70). Dodatkową domenę E spotyka się tylko w prekursorze peptydu [16]. Zbliżoną budową cechuje się druga cząsteczka NSILA-S, insulinopodobny czynnik wzrostu-II (IGF-II, ang. *insulin-like growth factor-II*). Jest to również pojedynczy łańcuch polipeptydowy, składający się z 67 reszt aminokwasów o masie cząsteczkowej 7471 Da. Nazewnictwo obu cząsteczek wywodzi się od niezwykle podobieństwa pierwszorzędowej struktury IGF-I/II do insuliny. Insulinę różni przede wszystkim dłuższa i odmienna w budowie domena C (35 reszt aminokwasów) i brak domeny D na C-końcu łańcucha (Ryc. 1).

W tym samym czasie, gdy trwały badania nad izolacją i określeniem struktury NSILA-S, wykonano szereg badań dotyczących ich aktywności biologicznej. Wykazano m.in., że oczyszczone ekstrakty NSILA-S wywoływały wzrost liczby i metabolizmu fibroblastów w embrionach, jak również znacząco zwiększały stopień wiązania znakowanego $^{35}\text{SO}_4$ w komórkach tkanki chrzęstnej kur [17] i szczurów; wzrost aktywności towarzyszył akromegalii, a spadek karłowatości [18]. Uzależnienie aktywności od poziomu cyrkulującego hormonu wzrostu, jak również niektóre biologiczne podobieństwa między NSILA-S/IGF-I/IGF-II a odrębnie badanymi somatomedynami sprawiły, że zaczęto rozważać możliwość pokrewieństwa tych czynników. Pierwsze wątpliwości rozwiązała praca Van Wyk i wsp. [19]. IGF-I i somatomedynę C w tych badaniach cechowały identyczne wyniki testu wykorzystującego technikę radioimmunologiczną (RIA) oraz testu wiązania somatomedyny C z receptorem. IGF-II i somatomedyna A (Sm-A) wykazały odpowiednio 5% i 50% efektywności w wymienionych testach. IGF-II charakteryzował się znacznie wyższym powinowactwem w stosunku do receptora insuliny. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenia, że IGF-I i somatomedyna C to dwie identyczne biologicznie substancje, co w późniejszych latach zostało jednoznacznie potwierdzone na podstawie sekwencji reszt aminokwasów somatomedyny C [20]. Niejasności towarzyszące nazewnictwu odkrywanych czynników zakończyło przyjęcie jednolitej nomenklatury [21], w której upowszechniono określenia IGF-I i IGF-II, w miejsce odpowiednio Sm-C i Sm-A. W ten sposób skrzyżowały się dwa szlaki oparte na różnych biologicznie przesłankach - hipotezy występowania somatomedyn oraz insulinopodobnej aktywności białek IGF. Wielokrotnie zaobserwowano, że mRNA *IGF-I* osiąga największe stężenie w wątrobie i dlatego organ ten uważany jest za główne źródło tego hormonu [22]. Krążący w krwi IGF-I działa również na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego wewnątrz osi somatotropowej, gdzie jego wysoki poziom hamuje dalsze uwalnianie GH z przysadki mózgowej [23]. W ten sposób narodził się pierwotny model osi somatotropowej, składający się z podwzgórze-przysadki mózgowej-wątroby. Było to wówczas szeroko i powszechnie akceptowane założenie, według którego przysadkowy GH „drażni” wątrobę, która uwalnia w następstwie do krwi somatomedyny, a te działają na odległe tkanki docelowe i inicjują podziały komórek, zwiększając ich tempo wzrostu.

Kolejne doświadczenia i spostrzeżenia dostarczały jednak dowodów na to, że zarówno hormon wzrostu, jak i IGF-I, mogą ulegać lokalnej syntezie w wielu tkankach i narządach, przy czym ich funkcja jest często regulowana przez dodatkowe czynniki specyficzne dla określonej tkanki.

W badaniach z wykorzystaniem różnych eksplantatów komórkowych płodów szczura (11–17 dnia ciąży) [24] stwierdzono, że oprócz komórek zawiązków wątroby, również komórki, z których powstają jelito, serce, mózg, nerki i płuca są zdolne do syntezy IGF-I (detekcja z wykorzystaniem techniki RIA). Był to pierwszy dowód na to, że IGF-I może być produkowany lokalnie i może mieć działanie autokrynne/parakrynne. Analogiczne badania przeprowadzono na szczurach pozbawionych przysadki mózgowej (pomiar w 50. dniu życia; wycięcie przysadki w wieku 30 dni). Średnia waga takich szczurów wyniosła 100–107 g, przy 250–260 g w grupie kontrolnej (szczury normalne). Było to swoiste potwierdzenie udziału osobniczego GH, jak i roli osi somatotropowej w procesie wzrostu i rozwoju osobniczego. Podawanie szczurom owczego hormonu wzrostu (GH) umożliwiło wykrycie procesu syntezy IGF-I nie tylko w wątrobie, ale również w nerce, płucach, sercu i jądrach [25]. Kolejne doświadczenia przeprowadzone w krótkim czasie po udostępnieniu pierwszych sekwencji cDNA dla genu *IGF-I*, miały na celu identyfikację mRNA *IGF-I* w różnych tkankach. Gen *IGF-I* ulegał ekspresji w wielu tkankach, zarówno na etapie embrionalnym (m.in. w zawiązkach ludzkich i szczurzych jelit, mięśni, nerki, łożyska, żołądka, serca, skóry, trzustki, podwzgórze i mózgu [26,27]), pourodzeniowym, jak w życiu osobniczym [28–31]. W badaniach tych dowiedziono, że po podaniu GH ekspresja genu *IGF-I* w wyżej wymienionych narządach i tkankach wzrastała kilkukrotnie.

Na tej podstawie wysunęto alternatywną hipotezę, w której to zarówno krążąca w krwi endokrynną formą IGF-I pochodząca z wątroby, jak również ta produkowana lokalnie w tkankach, reagują na sygnał pochodzący od hormonu wzrostu i są jego „wykonawcami”. Nie wykluczano wtedy działania somatotropiny niezależnego od IGF-I. Dwie możliwe drogi sygnału hormonu wzrostu określono mianem „teorii podwójnego efektoru” (ang. *dual effector theory*) [32]. Hipotezę poparto wynikami badań, z których wynikało, że GH stymuluje jedynie różnicowanie się preadipocytów w adipocyty, natomiast układ GH/IGF-I stymuluje podziały adipocytów i ich ekspansję klonalną. Analogiczne wyniki uzyskano dla chondrocytów [33]. Hormon wzrostu również wpływał na różnicowanie się komórek prekursorowych, jednocześnie indukował lokalną syntezę IGF-I, przez którą to stymulował ekspansję klonalną całych kolumn chondrocytów. Jednak kolejne obserwacje kwestionowały „teorię podwójnego efektoru”. Dyskutowano bowiem o zależności również od IGF-I aktywacji różnicowania się chondrocytów [34], mioblastów [35] i adipocytów [36] oraz o sytuacjach odwrotnych, o udziale GH w proliferacji wspomnianych komórek.

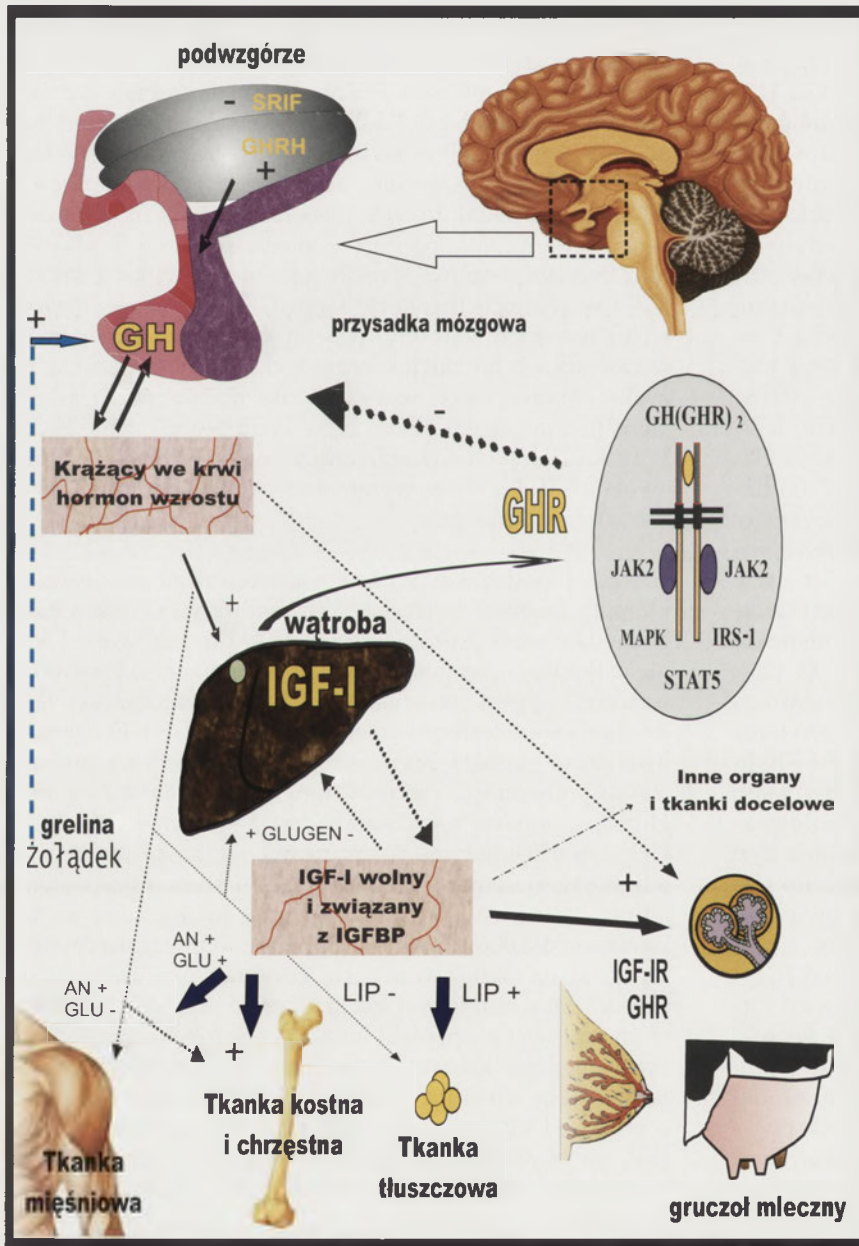
Odrębnym przedmiotem badań była próba odpowiedzi na pytanie, czy szeroko pojęty proces wzrostu organizmu

stymulowany jest przez mechanizm endokrywny klasycznej osi somatotropowej (w tym krążący we krwi IGF-I wywodzący się z wątroby). Wykazano [37], że systematyczne podawanie rekombinowanego IGF-I szczurom pozbawionym przysadki zwiększyło ich tempo wzrostu, jakkolwiek efekt ten był znacznie słabszy w porównaniu do efektu wywołanego przez hormon wzrostu. Stosując GH uzyskiwano lepsze rezultaty nawet w dawkach 50-krotnie niższych niż IGF-I. Należy przy tym pamiętać, że ponad 95% krążącego w osoczu IGF-I związane i transportowane jest przez rodzinę białek wiążących IGF (IGFBP, ang. *IGF-binding protein*), które decydują o dystrybucji IGF-I do poszczególnych tkanek i narządów [38]. Co więcej, lokalne wstrzykiwanie przeciwciał anti-IGF-I powodowało niemal całkowite zablokowanie działania GH [39]. Wysznuo więc koncepcję, według której GH stymuluje wzrost kości na długość poprzez stymulowa-

nie lokalnej syntezy IGF-I, IGF-I zaś w sposób auto/parakrywny stymuluje podziały komórkowe.

Jaka jest więc rola krążącego IGF-I? Mutacje w genie *IGF-I* są przyczyną karłowatości m.in. u myszy i człowieka. Myszy-homozygoty z uszkodzonymi genami kodującymi IGF-I i jego receptor w momencie urodzenia wykazują jedynie 45-60% normalnej wagi i rozmiaru, przy czym zdecydowana większość (>95%) umiera w krótkim czasie po narodzinach [40,41]. Główną przyczyną śmierci był przede wszystkim słabo wykształcony układ oddechowy. Natomiast w doświadczeniu, w którym specyficznym wyłączono gen *IGF-I* jedynie w wątrobie badanych myszy [42], nie odnotowano różnicy we wzroście postnatalnym zwierząt w porównaniu z grupą kontrolną, mimo że poziom krążącego IGF-I zredukowano w ten sposób aż o 75%. Może to sugerować, że IGF-I wywodzący się z wątroby nie jest niezbędny w procesie wzrostu organizmu w okresie życia osobniczego, raczej główną rolę przejmuje lokalnie syntetyzowany IGF-I. Dodatkowo udowodniono, że wątroba jest głównym źródłem endokrynnego IGF-I. Nieznane jest jeszcze źródło takiego lokalnego IGF-I; być może wystarczające są tempo lokalnej syntezy i wydzielania IGF-I w części peryostrium, perychondrium, w mięśniach i w tkance tłuszczowej, jak i poziom IGF-I pochodzącego z wątroby. Udokumentowano już autokrynnne/parakrynnne działanie IGF-I na obszarze mięśni szkieletowych [43].

Linearny wzrost kości długich zależy od płytki wzrostu, zbudowanej z chrząstki nasadowej znajdującej się w pobliżu zakończeń rosnącej kości. Chondrocyty zorganizowane są tu w kilku warstwach, z najważniejszą z nich, warstwą proliferacyjną. Nowopowstałe komórki chrząstki przesuwały się w kierunku trzonu kości, tworząc kolejne punkty kostnienia. We wcześniejszych badaniach na szczurach [44] i na myszach [45], nie wykryto obecności mRNA *IGF-I* w płytce wzrostu, natomiast obficie występowało mRNA *IGF-II*. Obecność *IGF-II* nie jest niczym szczególnym, gdyż to właśnie *IGF-II* uważa się za główny efektor sygnału hormonu wzrostu w strefie proliferacyjnej wzrostu kości na długość. U przeżuwaczy również nie wykryto w płytce wzrostu syntezy receptora hormonu wzrostu i *IGF-I*, co może sugerować brak bezpośredniego udziału GH, a tym samym potwierdzałoby udział endokrynnego IGF-I w proliferacji chondrocytów [46]. Wysoki poziom syntezy IGF-I i jego receptora stwierdzono w osteoblastach, co sugeruje udział tego czynnika w osteogenezie. Rolę aktywatora tego procesu przypisuje się m.in. szlakowi sygnałowemu cAMP i kinazy białkowej A (PKA) [47]. Kwestią sporną pozostaje udział najobficiej występującego w tkance kostnej białka wiążącego IGF - *IGFBP-5*. Część badaczy przypisuje temu białku rolę



Rycina 2. Oś somatotropowa: elementy składowe i ich lokalizacja w organizmie. Objasnienie skrótów: LIP, lipogeneza; AN, wpływ anaboliczny; GLU, wykorzystanie glukozy w mięśniach; GLUGEN, glukoneogeneza; „+” efekt stymulujący; „-” efekt hamujący.

„wzmacniacza” w procesie formowania kości i różnicowania osteoblastów, natomiast inni badacze uważają, że jest on inhibitorem, blokującym działanie IGF-I i IGF-II, prawdopodobnie poprzez utrudnianie wiązania tych cząsteczek ze swoistymi receptorami [48].

Opierając się na odstępstwach od oryginalnej i alternatywnej hipotezy, Le Roith i wsp. [49] zaproponowali „poprawioną” hipotezę występowania somatomedyn. Według jej założeń działanie GH/IGF-I jest bardziej kompleksowe niż dotąd sądzono. Nie ma wątpliwości, że somatotropina stymuluje syntezę wątrobowego IGF-I. Jednocześnie aktywuje syntezę elementów kompleksu białek wiążących IGF (IGFBP), które stabilizują cząsteczkę IGF-I w osoczu. Trzecim kierunkiem działania hormonu wzrostu jest pobudzanie lokalnej autokrynej/parakrynej syntezy IGF-I na obszarze niektórych tkanek i narządów. W ostateczności może być uaktywniony czwarty szlak, w którym GH działa bezpośrednio na tkanki docelowe z pominięciem IGF-I. Pewną innowacją było również założenie, że IGF-I może działać samodzielnie, a nie tylko jako odpowiedź na sygnał przysadkowego GH. Takie autokryjne/ parakryjne działanie IGF-I wiąże się głównie ze wzrostem embrionalnym, z wczesnym wzrostem pourodzeniowym oraz funkcjami reprodukcyjnymi. Obecnie przyjmuje się, że 83% szeroko rozumianego wzrostu organizmu jest wynikiem działania osi somatotropowej. Udział poszczególnych komponentów tej osi jest różny, w zależności od stadium rozwojowego. Działanie IGF-II ogranicza się przede wszystkim do okresu życia płodowego, po którym jego rolę stopniowo przejmują IGF-I [50]. Czyni to insulinopodobny czynnik wzrostu I bardziej istotnym w procesie wzrostu i rozwoju całego organizmu [38].

Tę ostatnią myśl rozwinęli Kaplan i Cohen [51]. W swojej pracy przeglądowej, podsumowując ostatnie 50 lat badań z tego zakresu, zaproponowali nowy mechanizm działania GH/IGF-I, który oparto na pewnych przesłankach współzawodniczenia tych cząsteczek w niektórych procesach. Nazwano go układem wzmacniająco-przeciwdziałającym (ang. *augmentative/counteractive system*). W tym układzie IGF-I bez wątpienia jest głównym efektem anabolicznego oddziaływania GH, choć nie jedynym. Dodatkowo IGF-I wzmacnia ten proces poprzez mechanizmy niezależne od GH, czyli stymulację syntezy białka i hamowanie proteolizy. W przeciwieństwie natomiast do GH, ujawniając swoją insulinopodobną naturę, IGF-I przeciwdziała lipolizie (wzmacnia lipogenezę), reguluje transportem i wykorzystaniem glukozy w mięśniach oraz hamuje proces glukoneogenezy w wątrobie (Ryc. 2).

WSZECHSTRONNOŚĆ OSI SOMATOTROPOWEJ

Hormon wzrostu, jak również IGF-I, cechują się działaniem plejotropowym. Poza szerzej opisanym w niniejszej pracy udziałem we wzroście kości na długość, mięśni oraz gospodarce cukrowo-lipidowej, warto wymienić także ich udział w szeregu ważnych nie tyle dla wzrostu, co dla rozwoju organizmu procesach.

APOPTOZA I NOWOTWORY

Szlak sygnałowy IGF-I stymuluje proliferację komórek (szlak kinaz MAPK) i hamuje apoptozę (szlak kinazy 3'-

fosfatydyloinozytolu (3'-PI)) [52]. Kinaza 3'-PI bierze udział m.in. w aktywacji takich procesów, jak stymulowany przez insulinę transport glukozy, synteza DNA i białek (proces różnicowania komórek), aktywacja kinaz A i C [53]. Aktywacja kinazy 3'-PI wyjaśnić może w pewnym stopniu udział IGF-I w procesie apoptozy, co ma związek z aktywacją kinaz serynowo-treoninowych AKT. Te natomiast fosforylują białko BAD, które traci zdolność hamowania antyapoptotycznych białek BCL-2 i BCL-X. Białko BAD, w formie ufosforylowanej, wiąże się natomiast jako heterodimer z białkiem BAX, które ma właściwości promujące śmierć komórki (uwalnia cytochrom C z mitochondriów, jeżeli zostanie zaktywowane przez kluczowe w wielu procesach białko p53). Uwolniony cytochrom C daje sygnał dla kaskady kaspaz, a te degradują cząsteczki białek i DNA komórki [54]. Silnym działaniem mitotycznym i hamowaniem apoptozy można tłumaczyć związek rozwoju nowotworów z nadekspresją *IGF-I*. Wysoki poziom IGF-I w osoczu wiąże się z ryzykiem rozwoju nowotworu, zaś wysoki poziom IGFBP (zwłaszcza IGFBP-3) zmniejsza ryzyko zmian nowotworowych, zwłaszcza raka piersi [55]. Promieniowanie jonizujące (IR) stosowane w terapii wielu nowotworów stymuluje syntezę IGF-I. Ten natomiast poprzez szlak IGF-IR-*Src*-*Mek*-*Erk*-*Egr1* indukuje ekspresję genu *CLU* (ang. *clusterin*), którego produkt w formie glikozylowanej (sCLU) uważa się za jeden z głównych czynników chroniących komórki nowotworu przed dotychczas stosowanymi środkami do walki z nim [56]. Docelowo w leczeniu zaczyna się więc stosować najnowsze metody blokowania receptora dla IGF typu I, szczególnie w tych rejonach, które są zmienione, m.in. w przypadku raka piersi [57], raka jelita grubego [58] i mięsaków [59].

FUNKCJE REPRODUKCYJNE I LAKTACJA

Parakryny/autokryny udział hormonu wzrostu w kształtowaniu układu rozrodczego dobrze udokumentowano zarówno u samców [60,61], jak i samic [60,62]. Wyniki licznych badań wskazują na udział endokrynych form GH/IGF-I w kontroli neuroendokrynnego uwalniania hormonu luteinizującego (LH) i hormonu folikulotropowego (FSH) przez gonadoliberynę (GnRH) [63]. Udział IGF-I, zarówno endokryny jak i auto/parakryny, nie został jeszcze do końca poznany. Myszy z IGF-I^{-/-} są bezpłodne. Samce cechował niski poziom testosteronu (18 % normalnego poziomu) i znacząco opóźniony rozwój komórek Leydiga [64]. Samice natomiast charakteryzowały się brakiem owulacji i niedostatecznie rozwiniętą macicą [64]. W przypadku ludzi nie odnotowano aż tak drastycznych zmian. Pacjent (55 lat) z nieaktywnym genem *IGF1* cechował się zaburzoną spermatogenezą, upośledzeniem funkcji komórek Sertoliego oraz niewielką objętością jąder [65]. Istnieją jednak doniesienia o wielu pacjentach, którzy mimo delecji lub mutacji w genach *IGF1* i *IGF1R* byli płodni [66]. Badania z tego zakresu są jednak ograniczone ze względu na wysoką śmiertelność mutantów IGF-I^{-/-} i IGF1R^{-/-}.

Insulinopodobne czynniki wzrostu mogą być także ważnymi determinantami wzrostu i rozwoju płodu, co udowodniono m.in. u przeżuwaczy. Błona śluzowa jajowodu jest zdolna do syntezy IGF-I, który następnie wydzielany jest do światła jajowodu i tam bezpośrednio wiąże się z re-

ceptorem IGF typu 1 embrionu. Stwierdzono także syntezę kilku komponentów układu IGF w macicy i łożysku. W macicy mRNA *IGF-I* zlokalizowany jest głównie w zrębie otaczającym błonę śluzową macicy, który charakteryzuje się wysokim stężeniem receptora IGF typu 1. Poziom IGF-I syntetyzowanego lokalnie w macicy spada podczas ciąży, dlatego też w okresie tym główną rolę pełni IGF-I uwalniany z wątroby. Natomiast w łożysku stwierdza się obecność mRNA *IGF-II*. Aktywność IGF-I i IGF-II w błonie śluzowej macicy i łożysku regulowana jest przez IGFBP, które utrudniają przejście IGF przez barierę płodowo-łożyskową [67]. Wewnątrzmaciczny wzrost płodu uwarunkowany jest czynnikami genetycznymi oraz środowiskowymi. Jest on ściśle uzależniony od poziomu insuliny oraz IGF-I we krwi płodu. Płód potrafi dostosować dynamikę swojego wzrostu do warunków środowiska zewnętrznego poprzez zmniejszenie wydzielania IGF-I w okresach niedostatecznego pokrycia potrzeb żywieniowych. Niedożywienie matki jest związane z obniżeniem zawartości mRNA niezbędnego w syntezie IGF-I w wątrobie płodu [68].

W wyniku głodzenia u przeżuwaczy stwierdzono, że poziom IGF-I w osoczu drastycznie spada, a po zadaniu paszy wraca do stanu wyjściowego. Podobnej zależności nie zauważono w przypadku IGF-II [69]. Udowodniono również, że brak cynku w pokarmie zwierząt, a także w diecie ludzi prowadzi do zaburzeń wzrostu i opóźnienia dojrzewania płciowego. Ma to związek z istotną funkcją cynku jako składnika przeszło 300 metaloenzymów, jak również białek regulatorowych (m.in. czynników transkrypcyjnych) zawierających tzw. palce cynkowe. Te ostatnie mają zdolność do wiązania się z DNA, a co za tym idzie, biorą udział w regulacji ekspresji genów. W ten oto sposób elementy osi somatotropowej, zwłaszcza IGF-I i IGFBP, pośrednio reagują na brak cynku w pokarmie [68].

W ostatnich latach prowadzono wiele badań, których celem była odpowiedź na pytanie, czy hormon wzrostu działa bezpośrednio, czy też pośrednio w gruczole mlecznym krów. Badania nad poziomem syntezy receptora GH wykazały, że mRNA dla GHR jest obecny w komórkach czynnościowych gruczołu mlecznego jałówek [70] i krów w trakcie laktacji [71]. Wykryto [72] obecność mRNA *bGHR* w nabłonku wydzielniczym i nabłonku przewodów wyprowadzających gruczołu mlecznego. W badaniach [73] poziomu ekspresji *GHR*, *IGF-I*, *IGF-IR* oraz genów kodujących białka wiążące IGF-I w bydlęcym gruczole mlecznym w różnych stadiach mammogenezy, laktogenezy, laktopoezy i inwolucji, najwyższe stężenie mRNA *IGF-I* wykryto podczas późnej ciąży, a znacząco niską ekspresję odnotowano podczas laktogenezy i laktopoezy. Większość mRNA *IGF-I* pochodziła z adipocytów. Na stosunkowo wysokim poziomie wykryto mRNA *IGFR* typu I, przy czym najwyższy poziom odnotowano podczas późnej laktacji i przez cały czas trwania inwolucji. Natomiast niski poziom ekspresji tego genu odnotowano podczas mammogenezy. mRNA *GHR* obecne było podczas wszystkich badanych stadiów i nie wykazywało znaczących zmian.

UKŁAD IMMUNOLOGICZNY

Coraz częściej opisuje się również udział osi somatotropowej w kształtowaniu systemu immunologicznego. Hor-

mon wzrostu traktuje się jako dobry immunomodulator. Egzogeny hormon wzrostu znacząco polepsza bowiem przeżywalność szczurów i myszy zainfekowanych *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli* [74]. Odnotowano kilka przypadków u myszy i ludzi, w których mutacja genu *STAT5a^{-/-}*, potencjalnego aktywatora transkrypcji genu *IGF1*, była przyczyną poważnych zaburzeń dotyczących przeważnie dróg oddechowych i biosyntezy cytokin [66]. Komórki systemu immunologicznego, takie jak tymocyty, limfocyty i neutrofile, wykazują zdolność do syntezy GH, zaś grasicę uważa się za jeden z organów docelowych dla somatotropiny [74]. Co więcej, odnotowano dość znaczną zawartość mRNA IGF-I w makrofagach, przy czym była ona regulowana przez cytokiny inne niż GH, a mianowicie: czynnik martwicy nowotworu α (TNF α), prostaglandynę E₂ (PGE₂) oraz czynniki stymulujące tworzenie kolonii (CFS) [75]. Badając poziom mRNA receptora IGF typu I w różnych subpopulacjach jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka (PMBC, ang. *peripheral blood mononuclear cell*) wykazano wysoki poziom w monocytach, w komórkach NK, w limfocytach pomocniczych T CD4⁺, umiarkowany poziom w limfocytach supresorowych/cytotoksycznych T CD8⁺ oraz stosunkowo niski w limfocytach B [36,76]. Odnotowano również dodatni wpływ IGF-I na cytotoksyczność komórek NK. IGF-I uważany jest za kofaktora IL-3 i IL-7 w procesie proliferacji i dojrzewania limfocytów B w szpiku kostnym [75]. Wyniki badań *in vitro* przeprowadzone na myszach wykazały, że podawanie IGF-I znacząco zwiększa liczbę limfocytów B, a co za tym idzie, niemal dwukrotnie syntezę przeciwciał IgG [77].

PODSUMOWANIE

Insulinopodobny czynnik wzrostu I uważany jest za jeden z głównych czynników wpływających na wzrost i rozwój organizmu. Zaburzenia jego funkcjonowania często przyczyniają się do powstawania chorób nowotworowych oraz prowadzą do anomalii rozwojowych. Celowe wydaje się być kontynuowanie badań w kierunku głębszego poznania osi somatotropowej, ze szczególnym uwzględnieniem IGF-I. Nie ulega zatem wątpliwości, że badania nad budową, funkcją oraz syntezą IGF-I oraz białek mających wpływ na regulację jego aktywności, syntezy oraz krążenia w organizmie mogą przynieść jeszcze wiele bardzo ważnych i ciekawych odkryć o znaczeniu praktycznym.

PIŚMIENNICTWO

1. Frago LM, Chowen JA (2005) Basic physiology of the growth hormone/insulin-like growth factor (IGF) – axis, W: Varela-Nieto I, Chowen JA (red) The Growth Hormone/insulin-like Growth Factor Axis During Development. Birkhäuser, 1-25
2. Kopchick JJ, Andry JM (2000) Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. Mol Genet Metab 71: 293-314
3. Evans HM, Long A (1922) Characteristic effects upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. Proc Natl Acad Sci USA 8: 38-39
4. Lee MO, Schaffer NK (1934) Anterior pituitary growth hormone and the composition of growth. J Nutr 7: 337-363
5. Li CH, Evans HM, Simpson ME (1945) Isolation and properties of the anterior hypophyseal growth hormone. J Biol Chem 159: 353-366

6. Li CH, Simpson ME, Evans HM (1948) The gigantism produced in normal rats by injection of the pituitary growth hormone. III. Main chemical components of the body. *Growth* 12: 39-42
7. Kopchick JJ, Parkinson C, Stevens EC, Trainer PL (2002) Growth hormone receptor antagonists: discovery, development, and use in patients with acromegaly. *Endocrine Rev* 23: 623-646
8. Murphy WR, Daughaday WH, Hartnett C (1956) The effect of hypophysectomy and growth hormone on the incorporation of labeled sulfate into tibial epiphyseal and nasal cartilage of the rat. *J Lab Clin Med* 47: 715-722
9. Salmon WD Jr, Daughaday WH (1957) A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *J Lab Clin Med* 49: 825-836
10. Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD Jr, Van den Brande JL, Van Wyk JJ (1972) Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235: 107
11. Froesch ER, Burgi H, Ramsier EB, Bally P, Labhart A (1963) Antibody suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J Clin Invest* 42: 1816-1834
12. Jakob A, Hauri C, Froesch ER (1968) Nonsuppressible insulin-like activity in human serum. III. Differentiation of two distinct molecules with nonsuppressible ILA. *J Clin Invest* 47: 2678-2688
13. Rinderknecht E, Humber RE (1976) Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: Isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 2365-2369
14. Rinderknecht E, Humbel RE (1978) The amino acid sequences of human insulin-like growth factor I and its structural homology with pro-insulin. *J Biol Chem* 253: 2769-2776
15. Rinderknecht E, Humbel RE (1978) Primary structure of insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 89: 283-286
16. Rose MT (2002) The somatotrophic axis of the dairy cow revisited. *Anim Sci J* 73: 13-19
17. Zingg AE, Froesch ER (1973) Effects of partially purified preparations with nonsuppressible insulin-like activity (NSILA-S) on sulfate incorporation into rat and chicken cartilage. *Diabetologia* 9: 472-476
18. Schlumpf U, Heimann R, Zapf J, Froesch ER (1976) Non-suppressible insulin-like activity and sulphatone activity in serum extracts of normal subjects, acromegalics and pituitary dwarfs. *Acta Endocrinol* 81: 28-42
19. Van Wyk JJ, Svoboda ME, Underwood LE (1980) Evidence from radioligand assays that Somatomedin-C and insulin-like growth factor I are similar to each other and different from other somatomedins. *J Clin Endocrinol Metab* 50: 206-208
20. Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyk JJ (1983) Sequence analysis of somatomedin-C: Confirmation of identity with insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 112: 2215-2217
21. Daughaday WH, Hall K, Salmon WD Jr, Van den Brande J, Van Wyk JJ (1987) On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 1075-1076
22. Hornick JL, Van Eenaeme C, Gerard O, Dufresne I, Istasse L (2000) Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domest Anim Endocrinol* 19(2): 121-132
23. Berelowitz M, Szabo M, Frohman LA, Firestone S, Chu L, Hintz RL (1981) Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effect on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 212: 1279-1281
24. D'Ercole AJ, Appelwhite GT, Underwood LE (1980) Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Develop Biol* 75: 315-328
25. D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE (1984) Tissue concentration of somatomedin C: Further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 935-939
26. Han VK, Lund PK, Lee DC, D'Ercole AJ (1988) Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution. *J Clin Endocrinol Metab*. Endocrine Society 66: 422-429
27. Lund PK, Moats-Staats BM, Hynes MA, Simmons JG, Jansen M, D'Ercole AJ, Van Wyk JJ (1986) Somatomedin-C/Insulin-like Growth Factor I and Insulin-like Growth Factor-II mRNAs in Rat Fetal and Adult Tissues. *J Biol Chem* 261: 14539-14544
28. Lowe WL, Roberts CT, Lasky SR, Leroith D (1987) Differential expression of alternative 5' untranslated regions in mRNAs encoding rat insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8946-8950
29. Murphy LJ, Bell GL, Duckworth ML, Friesen HG (1987) Identification, characterization, and regulation of a rat complementary deoxyribonucleic acid which encodes insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 121: 684-91
30. Roberts CT Jr, Lasky SR, Lowe WL, Seaman WT, Le Roith D (1987) Molecular cloning of rat IGF-I cDNAs: Differential mRNA processing and regulation by growth hormone in extrahepatic tissues. *Mol Endocrinol* 1: 243-248
31. Turner JD, Rotwein P, Novakofski J, Bechtel PJ (1988) Induction of mRNA for IGF-I and -II during growth hormone-stimulated muscle hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 255: 513-517
32. Green H, Morikawa M, Nixon T (1985) A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation* 29: 195-198
33. Isaksson OG, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J (1987) Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocr Rev* 8: 426-438
34. Hunziker EB, Wagner J, Zapf J (1994) Differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes *in vivo*. *J Clin Invest* 93: 1078-1086
35. Florini JR, Ewton EZ, Coolican SA (1996) Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 17: 481-517
36. Waters MJ, Shang CA, Behncken SN, Tam SP, Li H, Shen B, Lobie PE (1999) Growth hormone as a cytokine. *Clin Exp Pharmacol* 26: 760-764
37. Skottner A, Clark RG, Robinson IC, Fryklund L (1987) Recombinant human insulin-like growth factor: testing the somatomedin hypothesis in hypophysectomized rats. *J Endocrinol* 112: 123-132
38. Etherton TD (2004) Somatotrophic function. The somatomedin hypothesis revisited. *J Anim Sci* 82: 239-244
39. Schlechter NL, Russell SM, Spencer EM, Nicoll CS (1986) Evidence suggesting that the direct growth-promoting effect of growth hormone on cartilage *in vitro* is mediated by local production of somatomedin. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7932-7934
40. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75: 59-72
41. Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillett N, Stewart TA (1993) IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev* 7: 2609-2617
42. Yakar S, Liu J, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D (1999) Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7324-7329
43. Sadowski CL, Wheeler TT, Wang LH, Sadowski HB (2001) GH: regulation of IGF-I and Suppressor of Cytokine Signalling gene expression in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrinology* 142: 3890-3900
44. Shinar DM, Endo N, Halperin D, Rodan GA, Weinreb M (1993) Differential expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II messenger ribonucleic acid in growing rat bone. *Endocrinology* 132: 1158-1167
45. Wang E, Wang J, Chin E, Zhou J, Bondy CA (1995) Cellular patterns of insulin-like growth factor system gene expression in murine chondrogenesis and osteogenesis. *Endocrinology* 136: 2741-2751
46. Hutchison MR, Bassett MH, White PC (2007) Insulin-like growth factor-I and fibroblast growth factor, but not growth hormone affect

- growth plate chondrocyte proliferation. *Endocrinology* 148(7): 3122-3130
47. Siddappa R, Martens A, Doorn J, Leusink A, Olivo C, Licht R, Van Rijn L, Gaspar C, Fodde R, Janssen F, Van Blitterswijk C, De Boer J (2008) cAMP/PKA pathway activation in human mesenchymal stem cells *in vitro* results in robust bone formation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 7281-7286
 48. Mukherjee A, Rotwein P (2007) Insulin-like growth factor binding protein-5 in osteogenesis: Facilitator or Inhibitor? *Growth Horm IGF Res* 17: 179-185
 49. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A (2001) The Somatomedin hypothesis. *Endocrine Rev* 22: 53-74.
 50. Butler AA, Yakar S, LeRoith D (2002) Insulin-like growth factor-I: compartmentalization within the somatotrophic axis? *News Physiol Sci* 17: 82-85
 51. Kaplan SA, Cohen P (2007) The somatomedin hypothesis 2007: fifty years later. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 4529-4535
 52. Allen GW, Saba C, Armstrong EA, Huang SM, Benavente S, Ludwig DL, Hicklin DJ, Harari PM (2007) Insulin-like growth factor-I receptor signaling blockade combined with radiation. *Cancer Res* 67: 1155-1162
 53. Schonherr E, Sunderkotter C, Iozzo RV, Schaefer L (2005) Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system. *J Biol Chem* 280: 15767-15772
 54. Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW (2006) Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim Biophys Acta* 1762: 191-201
 55. Fletcher O, Gibson L, Johnson N, Altmann DR, Holly JMP (2005) Polymorphisms and circulating levels in the insulin-like growth factor system and risk of breast cancer: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 2-19
 56. Criswell T, Beman M, Araki S, Leskov K, Cataldo E, Mayo LD, Boothman DA (2005) Delayed activation of igf-1r/src/mapk/egr-1 signaling regulates clusterin expression, a prosurvival factor. *J Biol Chem* 14: 14212-14221
 57. Blecha JE, Anderson MO, Chow JM, Guevarra CC, Pender C, Penaranda C, Zavadovskaya M, Youngren JF, Berkman CE (2007) Inhibition of IGF-1R and lipoxygenase by nordihydroguaiaretic acid (NDGA) analogs. *Bioorg Med Chem. Lett* 17: 4026-4029
 58. Donovan EA, Kummar S (2008) Role of Insulin-like Growth Factor-1R System in Colorectal Carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 66: 91-98
 59. Scotlandi K, Picci P (2008) Targeting insulin-like growth factor 1 receptor in sarcomas. *Curr Opin Oncol* 20: 419-427
 60. Hull K, Harvey S (2000) Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator? *Rev Reprod* 5: 175-182
 61. Machnik G, Lechniak D (2000) Funkcje hormonu wzrostu (GH) w męskich procesach rozrodczych. *Med Wet* 56: 218-221
 62. Lechniak D (1998) Hormon wzrostu (GH) – polimorfizm i wpływ na żeńskie cechy reprodukcyjne. *Med Wet* 54: 383-385
 63. Chandrashekar V, Bartke A (2003) The role of insulin-like growth factor-I in neuroendocrine function and the consequent effects on sexual maturation: inferences from animal models. *Reprod Biol* 3: 7-28
 64. Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR, Efstratiadis A (1996) Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 10: 903-918
 65. Walenkamp MJ, Karperien M, Pereira AM, Hilhorst-Hofstee Y, Van Doorn J, Chen JW, Mohan S, Denley A, Forbes B, Van Duyvenvoorde HA, Van Thiel SW, Sluimers CA, Bax JJ, De Laat JA, Breuning MB, Romijn JA, Wit JM (2005) Homozygous and heterozygous expression of a novel insulin-like growth factor-I mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 2855-2864
 66. Walenkamp MJE, Wit JM (2007) Genetic disorders in the GH-IGF-I axis in mouse and man. *Eur J Endocrinol* 157: 15-26
 67. Wathes DC, Reynolds TS, Robinson RS, Stevenson KR (1998) Role of the Insulin-Like Growth Factor System in Uterine Function and Placental Development in Ruminants. *J Dairy Sci* 81: 1778-1789
 68. MacDonald RS (2004) Regulation of growth and the insulin growth factor system by zinc. W: Houston MS, Holly JMP, Feldman EL (red) IGF and nutrition in health and disease. Humana Press, 107-117
 69. McGuire MA, Vicini JL, Bauman DE, Veenhuizen JJ (1992) Insulin-like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation. *J Anim Sci* 70: 2901-2910
 70. Hauser SD, McGrath MF, Collier RJ, Krivi GG (1990) Cloning and *in vivo* expression of bovine growth hormone receptor mRNA. *Mol Cell Endocrinol* 72: 187-200
 71. Glimm DR, Barucos VE, Kennelly JJ (1990) Molecular evidence for the presence of growth hormone receptors in the bovine mammary gland. *J Endocrinol* 126: 5-8
 72. Sinowatz F, Schams D, Kollé S, Plath A, Lincoln D (2000) Cellular localisation of GH receptor in the bovine mammary gland during mammarygenesis, lactation and involution. *J Endocrinol* 166: 503-510
 73. Plath-Gabler A, Gabler C, Sinowatz F, Beriska B, Schams D (2001) The expression of the IGF family and GH receptor in the bovine mammary gland. *J Endocrinol* 168: 39-48
 74. Savino W, Postel-Vinay MC, Smaniotto S, Dardenne M (2002) The thymus gland: a target organ for growth hormone. *Scand J Immunol* 55(5): 442-52
 75. Clark R (1997) The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocr Rev* 18: 157-179
 76. Heijnen CJ, Zegers BJ (1992) Expression of type I insulin-like growth factor receptors on human peripheral blood mononuclear cells. *Endocrinology* 131(5): 2244-2250
 77. Clark R, Strasser J, McCabe S, Robbins K, Jardieu P (1993) Insulinlike growth factor-1 stimulation of lymphopoiesis. *J Clin Invest* 92: 540-548

An evolutionary outlook on insulin-like growth factors

Małgorzata Szewczuk[✉], Sławomir Zych, Ewa Czerniawska-Piątkowska

Laboratory of Ruminant Improvement, Department of Ruminant Science, West Pomeranian University of Technology, Judyma 10, 71-460 Szczecin, Poland

✉ e-mail: malgorzata.szewczuk@zut.edu.pl

Key words: growth hormone, insulin-like growth factor – IGF-I, somatotrophic axis

ABSTRACT

The present review is an attempt to brief summary of the current state of knowledge about insulin like growth factors (IGFs), formerly called somatomedins. The authors describe the fundamentals of the IGF system, explain its basic mechanisms of action. The purpose of this review is to presentation latest findings regarding effect of IGFs on pre-, neo- and postnatal growth and development of organisms. However, a role of IGF-I seems to be more crucial than thought 50 years ago, when the original somatomedin hypothesis was first put forward. Since then, several major revisions have been made. Special attention is given to role of IGF system in pathological states, reproduction, lactation, nutrition and immune system of human, rodents and ruminants. The link between normal and abnormal cellular growth resulting in tumor formation is also highlighted.

Szlak sygnałowy kwasu jasmonowego

– nowe informacje

STRESZCZENIE

Znaczący postęp w badaniach szlaku sygnałowego kwasu jasmonowego, jaki dokonał się na przełomie ostatnich kilku lat, przyniósł zaskakujące informacje na temat chemicznej formy cząsteczki sygnałowej tego hormonu, którą okazał się jego koniugat z izoleucyną. Funkcję receptora kwasu jasmonowego przypisuje się coraz częściej białku COI1, wykazującemu strukturalne i funkcjonalne podobieństwo do receptora auksyn TIR1. Percepcja sygnału ma miejsce na terenie jądra komórkowego i prowadzi do aktywacji ligazy ubikwityny E3 typu SCF^{COI1}, a w konsekwencji do proteolitycznej degradacji represorów transkrypcji, białek JAZ. Obniżenie puli białek hamujących transkrypcję umożliwia aktywację czynników transkrypcyjnych (m. in. ERF1, WRKY70, MYC2) i ekspresję genów zaangażowanych w reakcje obronne roślin (np. *PDF1.2*, *VSP1*, *CHI-B*). Dla funkcjonowania szlaku sygnałowego tego fitohormonu ważne są również złożone mechanizmy regulacyjne oparte zarówno o dodatnie, jak i ujemne sprzężenia zwrotne, umożliwiające utrzymanie reakcji rośliny na odpowiednim poziomie.

WPROWADZENIE

Kwas jasmonowy (JA) jest hormonem roślinnym odgrywającym ważną rolę w procesach wzrostu i rozwoju roślin, jak np. wzrost korzenia i dojrzewanie owoców. Pośredniczy on również w powstawaniu reakcji rośliny zarówno na biotyczne (np. patogeny), jak i abiotyczne (np. stres oksydacyjny, zranienie) czynniki stresowe [1-6]. Aktywacja szlaku sygnałowego JA prowadzi do ekspresji licznych genów zaangażowanych w reakcje obronne roślin, m. in. *VSP1* (ang. *vegetative storage protein*), *PDF1.2* (ang. *plant defensin*), *Thi2.1* (ang. *thionin*), *CHI-B* (ang. *chitinase B*) [7,8]. Białkowe produkty tych genów indukują powstanie odpowiedzi zarówno lokalnych, jak i systemowych, co ułatwia roślinom adaptację do niekorzystnych warunków środowiska [9].

Obecność jasmonianów wykazano u różnych grup systematycznych roślin wyższych. W organach roślinnych występują one w małych ilościach, jednakże ich poziom zmienia się w zależności od typu, funkcji oraz fazy rozwoju tkanki. Bezpośrednim prekursorem kwasu jasmonowego jest kwas 12-oksofitodienowy (OPDA), który powstaje w chloroplastach w wyniku oksydacji kwasu linolenowego (18:3) [10]. Ten etap biosyntezy JA jest katalizowany przez 3 enzymy: lipoksygenazę (LOX, ang. *linoleate oxygen oxidoreductase*), syntazę wodoronadtlenkową (AOS, ang. *allene oxide synthase*) oraz cyklazę wodoronadtlenkową (AOC, ang. *allene oxide cyclase*) [11-13]. OPDA jest następnie transportowany do peroksysomów, gdzie przy udziale reduktazy OPDA (OPDR, ang. *OPDA reductase*) ulega redukcji, a następnie trój etapowej β -oksydacji do JA [14]. Kwas jasmonowy występuje u roślin w formie niezwiązanej, ale podobnie jak inne fitohormony może tworzyć zarówno aktywne, jak i nieaktywne fizjologicznie połączenia z innymi związkami (aminokwasami, cukrami), czy też pochodne (JA-Me – ester metylowy kwasu jasmonowego). Zastosowanie technik badawczych z zakresu biochemii, genetyki i biologii molekularnej w dużym stopniu umożliwiło poznanie szlaku przekazywania sygnału kwasu jasmonowego. Niniejsza praca jest podsumowaniem najnowszych osiągnięć w tej dziedzinie, jakich dokonano na przestrzeni ostatnich kilku lat, ze szczególnym uwzględnieniem roli niedawno scharakteryzowanych białek JAZ oraz białka COI1.

BIAŁKO COI1 I BIAŁKA JAZ JAKO KLUCZOWE ELEMENTY SZLAKU SYGNAŁOWEGO KWASU JASMONOWEGO

BIAŁKO COI1

Gen *COI1* zidentyfikowano 10 lat temu, dzięki wyselekcjonowaniu niewrażliwego na koronatynę mutantu *Arabidopsis thaliana coi1* (ang. *coronatine-insensitive1*) [15,16]. Koronatyna jest fitotoksyną produkowaną przez *Pseudomonas syringae*; wykazuje strukturalne podobieństwo do JA-Me oraz JA-Ile i wywołuje podobne efekty fizjologiczne [16-18]. Dodatkowo, mutant *coi1* charakteryzował

Kamil Frankowski[✉]

Brygida Świeżawska

Emilia Wilmowicz

Jacek Kęsy

Jan Kopcewicz

Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; e-mail: Kamil.Frankowski@uni.torun.pl

[✉]Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; e-mail: Kamil.Frankowski@uni.torun.pl

Artykuł otrzymano 30 stycznia 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 8 maja 2009 r.

Słowa kluczowe: hormony roślinne, kwas jasmonowy, przekazywanie sygnału, białka JAZ

Wykaz skrótów: białka JAZ (ang. *jasmonate ZIM-domain proteins*) – białka z domeną ZIM, będące białkami hamującymi ekspresję docelowych genów kwasu jasmonowego; COI1 (ang. *coronatine-insensitive1*) – białko z domeną F-box, będące składnikiem kompleksu ligazy E3 typu SCF; ERF1 (ang. *ethylene response factor1*) – białko z rodziny EREBP (ang. *ethylene response element binding protein*) wiążące się do promotorów genów regulowanych przez etylen; JA (ang. *jasmonic acid*) – kwas jasmonowy; JA-Ile – koniugat kwasu jasmonowego z izoleucyną; JA-Me (ang. *jasmonic acid methyl ester*) – ester metylowy kwasu jasmonowego; MYC2 – czynnik transkrypcyjny zawierający domenę zamka leucynowego, wiążący się z promotorami genów zależnych od kwasu jasmonowego

Podziękowania: Praca częściowo sfinansowana z grantu MSWiN złożonego pod nr N303321637

się zahamowaną biosynteza kwasu jasmonowego oraz brakiem reakcji na ten hormon [1,15,16,19]. Ortologi genu *COI1* zidentyfikowano również u innych gatunków roślin, m.in. u pomidora, tytoniu, soi [1,20,21].

Gen *COI1* koduje białko o masie cząsteczkowej 66 kDa zawierające na końcu N motyw F-box oraz domenę z powtórzeniami bogatymi w reszty leucyny [15]. Białko *COI1* wykazuje strukturalne i funkcjonalne podobieństwo do receptora auksyn TIR1 (ang. *transport inhibitor response1*), zatem mechanizmy przekazywania sygnałów obu fitohormonów mogą być również podobne [22,23]. W szlaku przekazywania sygnału auksynowego białko TIR1 wspólnie z *CUL1* (ang. *cullin1*), *RBX1* (ang. *ring box protein1*) oraz *Skp1/ASK1* (ang. *S-phase kinase-associated protein1/Arabidopsis Skp1-like protein*) tworzy ligazę ubikwityny E3 znaną jako kompleks *SCF^{TIR1}* [24-27]. Jego funkcja polega na wyznakowaniu białek *AUX/IAA* do degradacji zależnej od ubikwityny w proteasomie 26S. Na podstawie licznych badań stwierdzono, że również białko *COI1* funkcjonuje jako składnik ligazy E3 typu *SCF* [15,23,28]. Substratem ligazy ubikwityny *SCF^{COI1}* są niedawno zidentyfikowane białka *JAZ* (ang. *jasmonate ZIM-domain*), będące represorami transkrypcji genów aktywowanych przez *JA* [23,29]. Dodatkowo, w strukturze 1-rzędowej białka *COI1* występują charakterystyczne reszty hydrofobowych aminokwasów, które prawdopodobnie tworzą kieszeń wiążącą białka *JAZ*, a być może również hormon [30,31]. Obecność takiej kieszeni stwierdzono w przypadku receptora auksyn – *TIR1* [25,27,30]. Mimo że, struktury przestrzenne *COI1* i *TIR1* wydają się być zbliżone, to jednak nie ma jednoznacznych dowodów, że *COI1* jest receptorem kwasu jasmonowego. Nie wiadomo również czy do związania hormonu wymagana jest obecność kofaktora, jakim w przypadku *TIR1* jest *IP6* (sześcioposforan inozytolu) [27,30]. Pomimo tego, białko *COI1* wydaje się być doskonałym kandydatem do miana receptora kwasu jasmonowego [23,30,31].

BIAŁKA JAZ

Białka *JAZ* zostały odkryte w 2007 r. przez 3 niezależne grupy badawcze [23,29,32]. Wchodzi one w skład większej grupy białek zawierających w swej strukturze 28 aminokwasową domenę *ZIM* (ang. *zinc-finger inflorescence meristem*), którą pierwotnie zidentyfikowano jako sekwencję wiążącą DNA typu palca cynkowego [33]. Z uwagi na to, że wszystkie białka *ZIM* w obrębie swojej charakterystycznej domeny posiadają zachowywaną w ewolucji sekwencję *TIF[F/Y]XG*, a tylko niektóre z nich mają zdolność wiązania DNA, stąd zmieniono nazwę rodziny tych białek na *TIFY* [34,35]. Białka *JAZ*, poza domeną *ZIM*, posiadają również zbudowany z 26 reszt aminokwasowych motyw *Jas* zlokalizowany w C-końcowej części peptydu (Ryc. 1) [29,31,32]. Niemniej jednak, nie stwierdzono w ich budowie obecności domeny wiążącej DNA typu palca cynkowego.

U *A. thaliana* dotychczas zidentyfikowano 12 białek *JAZ*, których sekwencje mają długość od 131 do 352 reszt aminokwasów [23]. Wydaje się, że białka te funkcjonują na terenie jądra komórkowego, chociaż taką lokalizację potwierdzono jedynie w przypadku kilku z nich (*JAZ1*, *JAZ3*, *JAZ6* i *JAZ10*) [23,29,32]. U tego gatunku stwierdzono również, że



Rycina 1. Schemat budowy białek z rodziny *JAZ* (wg [58] zmodyfikowane).

wszystkie białka *JAZ*, za wyjątkiem *JAZ9* i *JAZ10*, są syntetyzowane parami (1 i 2, 3 i 4, itd.), co jest prawdopodobnie konsekwencją duplikacji genów kodujących poszczególne pary peptydów [34]. Prawdopodobnie białka *JAZ* uzupełniają się wzajemnie, gdyż zarówno nadekspresja, jak i eliminacja niektórych z genów je kodujących nie zmienia wrażliwości roślin na kwas jasmonowy.

W badaniach prowadzonych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* z zastosowaniem konstruktów *JAZ-GUS* oraz *JAZ-GFP*, jak również mutantów i roślin transgenicznych wykazano, że pod wpływem kwasu jasmonowego białka *JAZ* zostają wyznakowane przez ligazę ubikwityny E3 *SCF^{COI1}* do degradacji w proteasomie 26S [1,23,29]. Dodatkowo stwierdzono, że obecność funkcjonalnej domeny *Jas* jest niezbędna dla oddziaływania białek *JAZ* i *COI1*, gdyż mutacje w obrębie tego motywu hamują proteolityczną degradację białek *JAZ* i prowadzą do ich nadmiernej akumulacji [23,29]. Co ciekawe, w przypadku *JAZ3* wykazano, że za oddziaływania z *COI1* odpowiada koniec N, a nie koniec C, białka *JAZ3* [29,31]. Przez analogię, mechanizm ten przypuszczalnie dotyczy także pozostałych białek należących do tej rodziny. Ten zaskakujący fakt może świadczyć o regulatorowej funkcji motywu *Jas* w oddziaływaniach *COI1-JAZ*, gdyż mutacje w jego obrębie stabilizują białko *JAZ* [23,29,32]. Za taką rolę domeny *Jas* przemawiają również badania, których wyniki wskazują, że w naturalnych warunkach powstają dwa różniące się długością transkrypty genu *JAZ10* [29,32]. Jeden z nich koduje białko nieposiadające 12 ostatnich reszt aminokwasów na swym końcu C, z których 7 stanowi integralną część motywu *Jas*. Nadekspresja tej formy *JAZ10* skutkuje uzyskaniem roślin niewrażliwych na kwas jasmonowy. Z kolei wyciszenie genu *JAZ10* prowadzi do podwyższenia wrażliwości na ten hormon. Wydaje się więc, że oddziaływanie między białkami *JAZ* i *COI1* są dużo bardziej skomplikowane i wymagają dalszych badań. Niemniej jednak, z uwagi na brak domeny wiążącej DNA zakłada się, że białka *JAZ* wpływają na ekspresję docelowych genów kwasu jasmonowego w sposób pośredni, tj. poprzez zahamowanie aktywności czynników transkrypcyjnych [29].

REGULACJA SZLAKU SYGNAŁOWEGO *JA*

Regulacja ekspresji genów zależnych od kwasu jasmonowego następuje wskutek degradacji białkowych represorów transkrypcji, białek *JAZ*. Proteoliza tych białek prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych, jak np. *ERF1*, *WRKY70*, *ORA47*, *ARA59*, *WRKY18* i *MYC2*, które bezpośrednio kontrolują aktywność swych genów docelowych [36,37]. Jak dotąd, najlepiej poznano i opisano oddziaływanie pomiędzy białkami *JAZ1*, *JAZ3*, *JAZ9* a *MYC2* [29]. *MYC2* jest czynnikiem transkrypcyjnym zawierającym domenę zamka leucynowego, który wpływa stymulująco na aktywność transkrypcyjną genów indukowanych przez zranienia, a hamuje ekspresję genów związanych z odpowiedziami obronnymi roślin [38,39]. Przeciwną rolę w re-

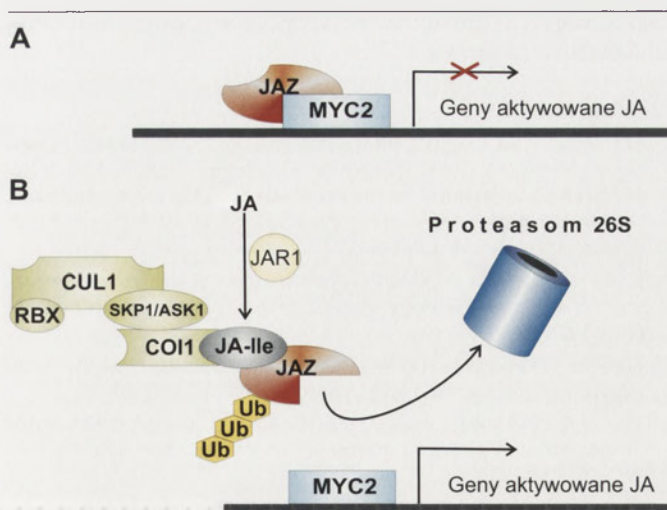
gulacji tych procesów odgrywa białko ERF1, które stanowi zarazem istotny element integrujący szlaki sygnałowe etylenu i kwasu jasmonowego [40,41]. W powstawaniu odpowiedzi rośliny na czynniki stresowe istotną rolę odgrywają również powiązania szlaków sygnałowych kwasu jasmonowego i kwasu salicylowego (SA). Fizjologiczny efekt wywołany przez te substancje uzależniony jest od ich stężenia [8,42-45]. Wykazano bowiem, że wzrost poziomu SA hamuje ekspresję genów indukowanych przez JA, a podwyższone stężenie JA hamuje aktywność transkrypcyjną genów zależnych od SA. Natomiast, w przypadku niskiego poziomu obu substancji aktywnych ich działanie ma charakter synergistyczny (jak ma to miejsce w powstawaniu odpowiedzi rośliny na stres oksydacyjny) [45,46].

W badaniach z zastosowaniem drożdżowego systemu dwuhybrydowego wykazano, że C-końcowa domena białek JAZ oddziałuje z końcem N białka MYC2, co bezpośrednio blokuje jego działanie i indukuje powstanie reakcji fizjologicznej (Ryc. 2A) [29]. MYC2 po uwolnieniu z kompleksu JAZ-MYC2 wiąże się z domeną G-box, zlokalizowaną w promotorach licznych genów odpowiedzi na JA, inicjując ich ekspresję (Ryc. 2B) [39,47-49]. Co ciekawe, motyw G-box występuje również w sekwencjach regulatorowych genów MYC2 i ERF1 [39,40]. Ponadto, MYC2 reguluje także ekspresję niektórych genów JAZ, jak np. JAZ3 [29]. Wykazano, że białko JAZ3 oddziałując z MYC2 hamuje aktywność transkrypcyjną genu JAZ3. Natomiast, pojawienie się cząsteczki sygnałowej (JA) prowadzi do proteolitycznej degradacji białka JAZ3 i aktywacji transkrypcji genu JAZ3. Taki mechanizm regulacyjny, działający na zasadzie pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego, pozwala roślinom kontrolować pulę regulatorów szlaku sygnałowego JA i zapewnia im kontrolę nad reakcjami fizjologicznymi powstającymi wskutek działania bodźca stresowego [23,29,50]. Należy także zaznaczyć, że produkcja większości represorowych białek JAZ podnosi się znacząco w obecności JA, co może świadczyć o zaangażowaniu innych (poza MYC2) czynników transkrypcyjnych lub o istnieniu innego mechanizmu regulacyjnego.

Utrzymanie reakcji rośliny na odpowiednim poziomie umożliwiają również mechanizmy modulujące funkcjonowanie szlaku przekazywania sygnału kwasu jasmonowego funkcjonujące w oparciu o pętlę dodatniego sprzężenia zwrotnego. Zauważono, że JA zwiększa aktywność transkrypcyjną genów kodujących enzymy zaangażowane w proces jego biosyntezy [50]. Mechanizm ten zapewnia utrzymanie właściwego poziomu hormonu, który jest istotny dla wywołania odpowiedniej reakcji fizjologicznej. W aktywacji niektórych z tych genów uczestniczy wspomniane już białko MYC2.

NATURA CZĄSTECZKI SYGNAŁOWEJ

Natura chemiczna cząsteczki sygnałowej promującej interakcje domnianego receptora kwasu jasmonowego, białka COI1, z białkami represorowymi JAZ stanowiła istotną kwestię w badaniach mechanizmów odbioru i przekazywania sygnału JA. Początkowo zakładano, że bioaktywną cząsteczką jest sam kwas jasmonowy lub jego ester metylowy [51]. Obecnie przyjmuje się, że aktywną biologicznie cząsteczką jest koniugat JA z izoleucyną (JA-Ile) [23,31,52].



Rycina 2. Schemat szlaku sygnalizacyjnego kwasu jasmonowego u *Arabidopsis thaliana*. CUL1, RBX1, Skp1/ASK1, COI1 – składniki ligazy ubikwityny E3 typu SCF^{COI1}. A. MYC2 wiąże się do motywu G-box w sekwencjach promotorowych genów regulowanych przez JA. Białka JAZ hamując aktywność czynnika transkrypcyjnego MYC2 powodują represję genów aktywowanych przez JA. B. Powstanie cząsteczki sygnałowej JA-Ile katalizowane jest przez enzym JAR1. JA-Ile promuje oddziaływanie białek JAZ z SCF^{COI1}, prowadząc do ich poliubikwitylacji (Ub) i degradacji w proteasomie 26S. Degradacja białek JAZ, będących represorami czynnika transkrypcyjnego MYC2, prowadzi do odblokowania transkrypcji genów zależnych od JA. Szczegółowy opis w tekście (wg [58,59] zmodyfikowane).

Reakcja syntezy JA-Ile jest katalizowana przez enzym JAR1 (ang. *jasmonate-resistant1*) [53-55]. Mimo, że koniugaty są powszechnie uważane za formę magazynowania lub transportowania hormonu, dzięki której roślina utrzymuje hormonalną homeostazę, to jednak JA-Ile pełni rolę aktywnej i specyficznej cząsteczki sygnałowej, promującej oddziaływanie białek COI1 i JAZ [23,29,31]. Co ciekawe, JA-Ile zwiększa oddziaływanie COI1-JAZ 50-krotnie silniej niż JA-Leu, podczas gdy JA, JA-Me, OPDA, JA-Phe czy też JA-Trp są związkami nieaktywnymi [23]. Dane te wzbudzają liczne kontrowersje, gdyż od dziesięcioleci w badaniach nad rolą kwasu jasmonowego w regulacji wzrostu i rozwoju roślin do wywołania odpowiedniej reakcji fizjologicznej wykorzystuje się niektóre z tych związków (np. JA, Me-JA, OPDA) [51,56-57]. Możliwe jest, że substancje te inicjują oddziaływanie białka COI1 z innymi, dotąd niezidentyfikowanymi, substratami prowadząc do ich degradacji w proteasomie 26S, bądź też zostają metabolizowane w komórce do bioaktywnej formy, JA-Ile [23,53]. Szczegółowe wyjaśnienie roli tych związków wymaga dalszych badań.

PODSUMOWANIE

Odkrycie nowych elementów szlaku przekazywania sygnału kwasu jasmonowego, a także ustalenie potencjalnego receptora tego hormonu oraz miejsca jego wiązania uzupełniają wiedzę na temat mechanizmu działania kwasu jasmonowego w regulacji wielu procesów wzrostowo-rozwojowych u roślin. Liczne powiązania szlaku sygnałowego kwasu jasmonowego ze szlakami sygnałowymi innych hormonów sprawiają, że dokładne wyjaśnienie mechanizmów regulujących kaskadę przekazywania sygnału JA wymaga dalszych badań. Nie wiadomo na przykład, jak wiele ligandów czy też pochodnych JA promuje oddziaływanie COI1 i białek JAZ. Ciekawe jest również, czy poza białkami JAZ istnieją jeszcze inne substraty dla ligazy ubikwityny SCF^{COI1}

oraz z iloma czynnikami transkrypcyjnymi mogą oddziaływać białka z rodziny JAZ?

PIŚMIENICTWO

- Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, Picher-sky E, Howe GA (2004) The tomato homolog of CORONATINE-IN-SENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* 16: 126-143
- Król P, Kępczyńska E (2008) Rola jasmonianów w indukowanej systemicznej odporności roślin przeciwko patogenom. *Biotechnol* 1: 122-135
- Białecka B, Kępczyński J (1998) Rola kwasu jasmonowego i jego estru metylowego we wzroście i rozwoju roślin. *Wiad Bot* 42: 61-78
- Vijayan P, Shockey J, Levesque CA, Cook RJ, Browse JA (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7209-7214
- Saniewski M, Urbanek H (2001) Jasmoniany i ich rola środowiskowa. W: Oleszek W, Głowniak K, Leszczyński B (red.), *Biochemiczne oddziaływanie środowiskowe*. Akademia Medyczna Lublin, str. 181-198
- Saniewski M, Ueda J, Miyamoto K, Urbanek H (2002) Relationship between jasmonate and ethylene in regulation of some physiological processes in plant under stress conditions. *Zesz Probl Post Nauk Roln* 481: 99-112
- Anderson JP, Badruzaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3460-3479
- Balbi V, Devoto A (2008) Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol* 177: 301-318
- Wasternack C (2006) The wound response in tomato – role of jasmonic acid. *J Plant Physiol* 163: 297-306
- Wasternack C (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot (Lond)* 100: 681-697
- Bell E, Creelman RA, Mullet JE (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8675- 8679
- Laudert D, Pfannschmidt U, Lottspeich F, Holländer-Czytko H, Weiler EW (1996) Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol Biol* 31: 323-335
- Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kramell R, Kurz T, Maucher H, Weichert H, Ziegler J, Feussner I, Wasternack C (2003) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 51: 895-911
- Schaller F, Biesgen C, Müssing C, Altmann T, Weiler EW (2000) 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* 210: 979-984
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG (1998) COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280: 1091-1094
- Feys B, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG (1994) *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine and male sterile, insensitive to methyl jasmonate and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* 6: 751-759
- Koda Y, Takahashi K, Kikuta Y, Greulich F, Toshima H, Ichihara A (1996) Similarities of the biological activities of coronatine and coronafacic acid to those of jasmonic acid. *Phytochemistry* 41: 93-96
- Uppalapati SR, Ayoubi P, Weng H, Palmer DA, Mitchell RE, Jones W, Bender CL (2005) The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. *Plant J* 42: 201-217
- Farmer EE, Ryan CA (1990) Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7713-7716
- Paschold A, Halitschke R, Baldwin IT (2007) Co(i)-ordinating defenses: NaCOI1 mediates herbivore-induced resistance in *Nicotiana attenuata* and reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses. *Plant J* 51: 79-91
- Wang Z, Dai L, Jiang Z, Peng W, Zhang L, Wang G, Xie D (2005) Gm-COI1, a soybean F-box protein gene, shows ability to mediate jasmonate-regulated plant defense and fertility in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 1285-1295
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jurgens G, Estelle M (2005) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* 9: 109-119
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature* 448: 661-665
- Zielińska E, Kowalczyk S (2000) Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego. *Post Biol Kom* 27: 155-184
- Ostrowski M, Jakubowska A (2008) Receptory auksyn. *Post Biol Kom* 35: 79-95
- Gray WM, Del Pozo JC, Walker L, Hoobie L, Risseuw E, Banks T, Crosby WL, Yang M, Estelle M (1999) Identification of a SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 13: 1678-1691
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005) The F-box protein is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445
- Xu L, Liu F, Lechner E, Genschik P, Crosby WL, Ma H, Peng W, Huang D, Xie D (2002) The SCF^{COI1} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 1919-1935
- Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, Garcia-Casado G, Lopez-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448: 666-671
- Tan X, Calderon-Villalobos LI, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, Zheng N (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446: 640-645
- Katsir L, Schilmiller AL, Staswick PE, He SY, Howe GA (2008) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and bacterial virulence factor coronatine. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 7100-7105
- Yan Y, Stolz S, Chetelat A, Reymond P, Pagni M, Dubugnon L, Farmer EE (2007) A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* 19: 2470-2483
- Nishii A, Takemura M, Fujita H, Shikata M, Yokota A, Kohchi T (2000) Characterization of a novel gene encoding a putative single zinc-finger protein, ZIM, expressed during the reproductive phase in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 1402-1409
- Vanholme B, Grunewald W, Bateman A, Kohchi T, Gheysen G (2007) The tify family previously known as ZIM. *Trends Plant Sci* 12: 239-244
- Shikata M, Takemura M, Yokota A, Kohchi T (2003) *Arabidopsis* ZIM, a plant-specific GATA factor, can function as a transcriptional activator. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 2495-2497
- Wang Z, Cao G, Wang X, Miao J, Liu X, Chen Z, Qu LJ, Gu H (2008) Identification and characterization of COI1-dependent transcription factor genes involved in JA-mediated response to wounding in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Rep* 27: 125-135
- Xu L, Chen C, Fan B, Chen Z (2006) Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell* 18: 1310-1326
- Lorenzo O, Chico JM, Sanchez-Serrano JJ, Solano R (2004) JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 1938-1950
- Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ, Kirkegaard JA, Ross JJ, Reid JB, Fitt GP, Sewelam N, Schenk PM, Manners JM (2007) MYC2 differentially

- modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 2225-2245
40. Frankowski K, Kęsy J, Kopcewicz J (2007) Regulacja biosyntezy etyleny u roślin. *Post Biochem* 53: 66-73
 41. Frankowski K, Kęsy J, Kotarba W, Kopcewicz J (2008) Szlaki przekazywania sygnałów indukowane przez etylen. *Post Biochem* 54: 99-106
 42. Spoel SH, Johnson JS, Dong X (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18842-18847
 43. Kazan K, Manners JM (2008) Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiol* 146: 1459-1468
 44. Kunkel BN, Brooks DM (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* 5: 325-331
 45. Mur LA, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling, include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* 140: 249-262
 46. Mao P, Duan M, Wei C, Li Y (2007) WRKY62 transcription factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate-responsive gene expression. *Plant and Cell Physiol* 48: 833-842
 47. Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9: 1859-1868
 48. de Pater S, Pham K, Memelink J, Kijne J (1997) RAP-1 is an *Arabidopsis* MYC-like R protein homologue that binds G-box sequence motifs. *Plant Mol Biol* 34: 169-174
 49. Yadav V, Mallappa C, Gangappa SN, Bhatia S, Chattopadhyay S (2005) A basic helix-loop-helix transcription factor in *Arabidopsis*, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *Plant Cell* 17: 1953-1966
 50. Chung HS, Koo AJK, Gao X, Jayanty S, Thines B, Jones AD, Howe GA (2008) Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol* 146: 952-964
 51. Mandaokar A, Thines B, Shin B, Lange BM, Choi G, Koo YJ, Yoo YJ, Choi YD, Choi G, Browse J (2006) Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *Plant J* 46: 984-1008
 52. Staswick PE, Su W, Howell SH (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6837-6840
 53. Staswick PE, Tiryaki I (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2117-2127
 54. Suza WP, Staswick PE (2008) The role of JAR1 in jasmonoyl-L-isoleucine production in *Arabidopsis* wound response. *Planta* 227: 1221-1232
 55. Wang L, Halitschke R, Kang J-H, Berg A, Harnisch F, Baldwin I (2007) Independently silencing two JAR family members impairs levels of trypsin proteinase inhibitors but not nicotine. *Planta* 226: 159-167
 56. Maciejewska BD, Kęsy J, Zielińska M, Kopcewicz J (2004) Jasmonates inhibit flowering in short-day plant *Pharbitis nil*. *J Plant Growth Regul* 43: 1-8
 57. Kępczyński J, Bialecka B (1994) Stymulacyjny efekt ethephon, ACC, gibberellin A₁ i A₄₊₇ na germinację metyl jasmonatem zahamowaną *Amaranthus caudatus* nasionami. *J Plant Growth Regul* 14: 211-216
 58. Staswick PE (2007) JAZing up jasmonate signaling. *Trends Plant Sci* 13: 66-71
 59. Santner A, Estelle M (2007) The JAZ proteins link jasmonate perception with transcriptional changes. *Plant Cell* 19: 3839-3842

Jasmonate signaling pathway – new insight

Kamil Frankowski[✉], Brygida Świeżawska, Emilia Wilmowicz, Jacek Kęsy, Jan Kopcewicz

Department of Physiology and Molecular Biology of Plants, Institute of General and Molecular Biology, Nicolaus Copernicus University, 9 Gagarina St, 87-100 Toruń, Poland

✉ e-mail: Kamil.Frankowski@uni.torun.pl

Key words: plant hormones, jasmonic acid, signal transduction, JAZ proteins

ABSTRACT

Significant progress which was made during last few years in research of jasmonic acid signaling pathway yielded surprising information about chemical form of a signaling molecule of the hormone, which turned out to be its conjugate with amino acid isoleucine. Function of jasmonic acid receptor is more and more frequently attributed to COI1 protein which is structurally and functionally similar to the auxin receptor TIR1. Signal perception takes place in the nucleus and leads to the activation of SCF^{COI1} ubiquitin ligase and consequently to proteolysis of transcription repressors, the JAZ proteins. Reduced pool of these negative regulators enables to activate the transcription factors (i. e. ERF1, WRKY70, MYC2), as well as expression of genes involved in defense responses of plants (i. e. PDF1.2, VSP1, CHI-B). Jasmonic acid signal transduction pathway, is also subjected to complicated regulations, including both positive, and negative feedbacks, which enable plants react adequately to variable environmental conditions.

Marta M. Gabryelska

Maciej Szymański

Jan Barciszewski

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, (e-mail: Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl)

Artykuł otrzymano i zaakceptowano 13 marca 2009 r.

Słowa kluczowe: DNA, odkrycie, struktura, gen, sekwencjonowanie, inżynieria genetyczna

Wykaz skrótów: ENCODE (ang. *Encyclopedia of DNA elements*) – encyklopedia DNA; HEP (ang. *human epigenome project*) – projekt epigenomu człowieka; PCR (ang. *polymerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy

STRESZCZENIE

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA), jedna z najważniejszych i najbardziej znanych cząsteczek biologicznych, obchodzi w tym roku 140 urodziny. Historia DNA to doświadczenia z przełomów XIX, XX i XXI wieku, rozpoczęte wyodrębnieniem nukleiny, a zwieńczone poznaniem sekwencji genomu człowieka. Za przełomowe wydarzenie, nie tylko dla poznania DNA, ale i całej biologii, uznaje się zaproponowanie przez Jamesa Watsona i Francis Cricka w 1953 roku modelu struktury przestrzennej DNA. Jednakże u podstaw tego osiągnięcia leżą wczesne doświadczenia Friedricha Mieschera, który w 1869 roku po raz pierwszy wyizolował DNA. Od tamtego czasu zgromadzono ogromną ilość informacji o funkcjach i strukturze DNA, które dały fundament współczesnej biologii molekularnej, biologii chemicznej i biotechnologii. Artykuł ten przybliży wydarzenia i okoliczności najważniejszych odkryć związanych z DNA, począwszy od jego pierwszej izolacji, aż do ukończenia projektu poznania genomu człowieka i zastosowania metod głębokiego sekwencjonowania.

WPROWADZENIE

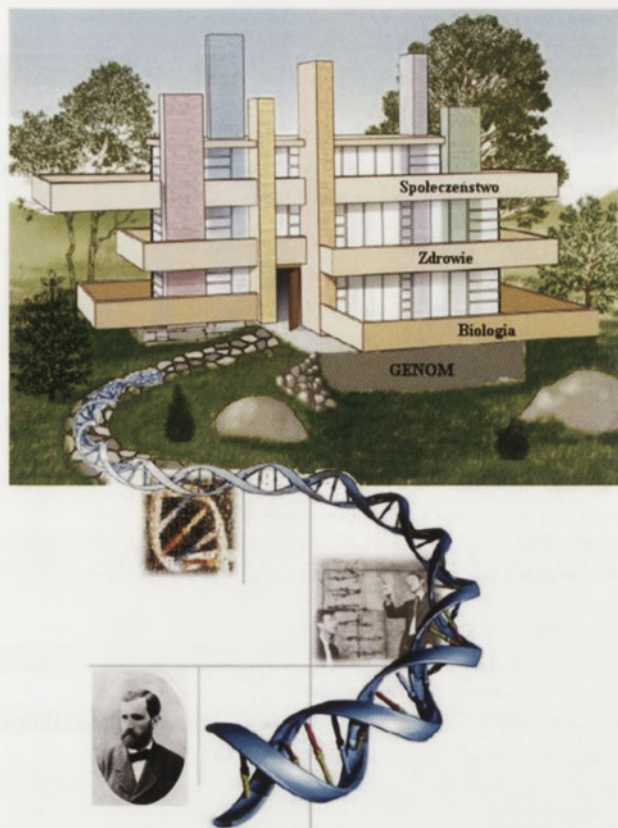
Jedną z największych tajemnic życia, która nurtowała ludzkość od zarania, jest wzrost i rozwój organizmów oraz przekazywanie cech z pokolenia na pokolenia. Starożytni filozofowie sądzili, że dziedziczenie następuje pod wpływem boskiego lub naturalnego pierwiastka, wynikiem czego jest dostosowanie do harmonii natury (Arystoteles, 384–322 p.n.e.). Inni nie dostrzegali żadnego celu ani porządku w rzeczywistości i twierdzili, że żyjące organizmy rosną i zmieniają się według praw deterministycznych [1]. Impulsem dla refleksji i poszukiwaniem naukowej odpowiedzi na pytania dotyczące mechanizmów zmienności organizmów i dziedziczenia było opublikowanie 150 lat temu przez Charlesa Darwina dzieła „*O powstawaniu gatunków*”, będącego fundamentem teorii ewolucji, dla której podstawą są właśnie dziedziczność i zmienność cech [2].

Za ojca genetyki uznaje się Gregora Mendla, augustiańskiego zakonnika i naukowca, który w latach 60-tych XIX wieku przeprowadził doświadczenia nad dziedziczeniem cech u grochu zwyczajnego (*Pisum sativum*). Wyniki tych badań doprowadziły do określenia podstawowych praw genetyki nazwanych później „prawami Mendla” [3]. Zrozumienie prawidłowości zaobserwowanych przez Mendla wymagało wprowadzenia pojęcia nowych jednostek dziedziczenia dla których w 1909 roku zaproponowano termin „gen”. Zapomniane przez wiele lat prawa Mendla zostały ponownie odkryte niezależnie w 1990 roku przez Carla Corrensa [4], Hugo de Vriesa [5] i Ericha von Tschermaka [6]. Te przełomowe koncepcje stanowiły podstawę rozwoju współczesnej genetyki (Ryc. 1, Ryc. 2, Tabela 1). Kluczowe znaczenie dla zrozumienia funkcjonowania komórek miał też rozwój mikroskopii, który pozwolił na odkrycie w 1866 roku jądra komórkowego i zrozumienie jego roli w procesach dziedziczenia [8].

PIERWSZA IZOLACJA DNA

Friedrich Miescher urodził się w 1844 roku w Szwajcarii [9]. Jego ojciec, Johann Friedrich Miescher i wuj, Wilhelm His, byli znanymi lekarzami i profesorami anatomii i fizjologii na Uniwersytecie w Bazylei [10]. Miescher studiował medycynę w Bazylei, ale nie był szczególnie zainteresowany jej praktykowaniem ze względu na problemy ze słuchem, które utrudniały badanie pacjentów [9]. Koncentrował się głównie na „teoretycznych podstawach życia” i karierze naukowej. Po ukończeniu Uniwersytetu przeniósł się do Tübingen w Niemczech, gdzie studiował chemię w laboratorium Adolpha Streckera, a następnie histochemię pod kierunkiem Felixa Hoppe-Seylera [10].

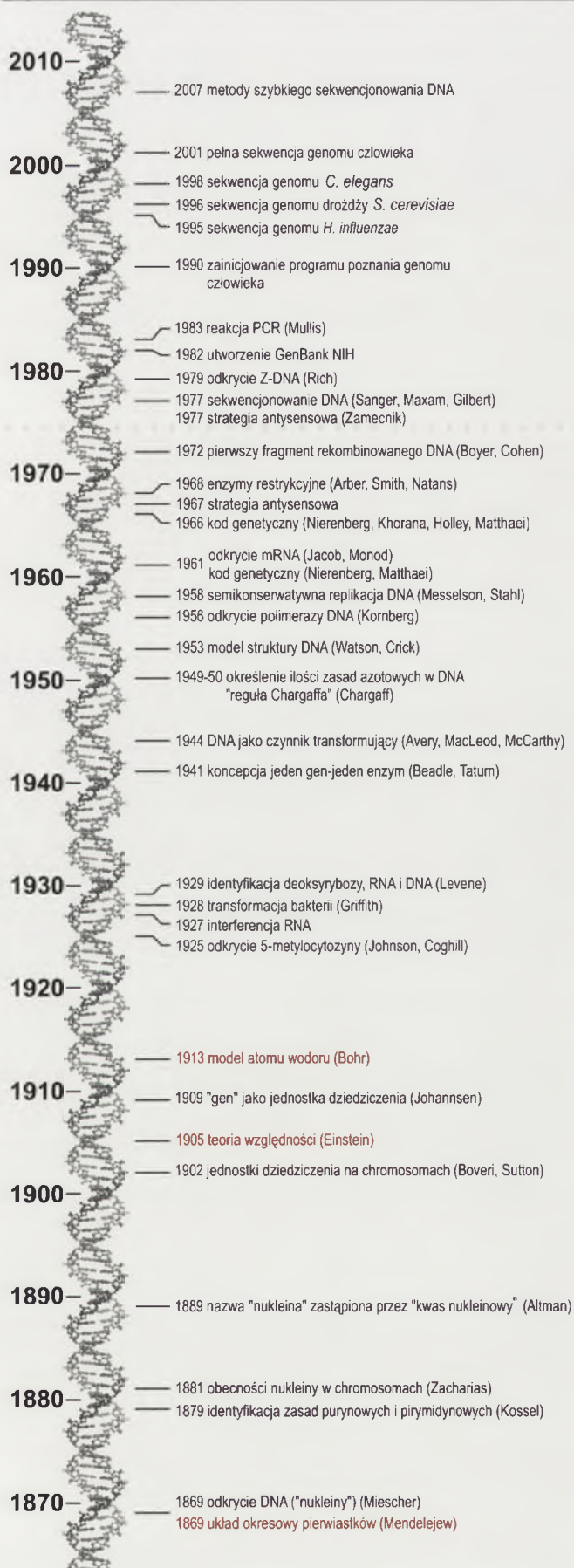
Miescher interesował się limfocytami, które chciał wykorzystać jako swój model badawczy. Problemy z ich pozyskaniem spowodowały, że zainteresował się leukocytami, które łatwo można było wówczas uzyskać z ropy zebranej



Rycina 1. Rozwój badań DNA i ich wpływ na społeczeństwo [7].

ze świeżych bandaży pochodzących z kliniki w Tübingen. Początkowo Miescher interesował się białkami, które uznawane były za najważniejsze składniki komórki. Ostatecznie z jąder komórkowych wyodrębnił substancję, która ulegała wytrąceniu w środowisku kwaśnym, nie rozpuszczała się w wodzie i w roztworze chlorku sodu, ale rozpuszczała się w wodorotlenku sodu i wodorofosforanie sodu [11]. W tym celu opracował własną metodę izolacji jąder komórkowych (Ryc. 3), pozwalającą uzyskać w dużych ilościach nieznaną substancję, którą nazwał „nukleina”. Zmodyfikowana procedura izolacji nukleiny z wykorzystaniem kwaśnego ekstraktu z żołądka świni (pepsyny) potwierdziła, że nukleina nie jest białkiem. Zawierała około 14% azotu i 3% fosforu. Plemniki łosia zawierały nawet 9% fosforu. Czysta nukleina łosia uzyskana przez Mieschera zawierała 22,5% P_2O_5 . Za pomocą nowoczesnych technik można uzyskać wynik 22,9%. Miescher przyjął założenie, że cały fosfor wchodzący w skład nukleiny występuje w postaci kwasu fosforowego. Zasugerował, że nukleina może być kwasem, występującym także w innych tkankach [10].

Publikacja o izolacji nukleiny przygotowana była już w 1869 roku, ale ukazała się dopiero w 1871 roku ze względu na sceptyczny stosunek Hoppe-Seylera, który sam chciał powtórzyć eksperymenty. W swojej publikacji, Miescher napisał: „Wierzę, że uzyskane wyniki, mimo że fragmentaryczne, są na tyle znaczące, że zachęcą innych, w szczególności chemików, do głębszego zbadania tych kwestii. Wiadza o relacji pomiędzy substancjami jądrowymi, białkami

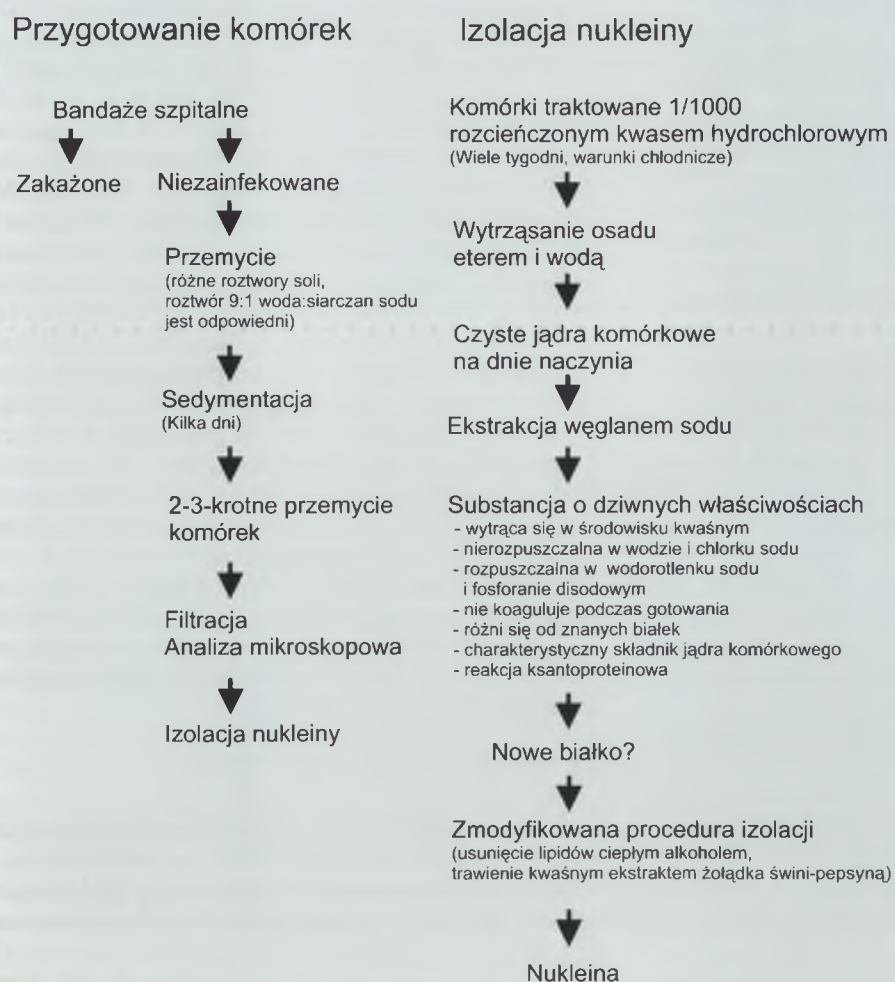


Rycina 2. Krótka historia DNA.

Tabela 1. Kamienie milowe w historii badań nad DNA.

Data	Naukowcy	Odkrycie
1859	Ch. Darwin	Selekcja naturalna i ewolucja
1865	G. Mendel	Cechy dziedziczone są według określonych zasad ("praw Mendla")
1866	E. Haeckel	Jądro komórkowe posiada czynniki odpowiedzialne za przekazywanie cech dziedzicznych
1869	F. Miescher	Pierwsza izolacja DNA
1871	F. Miescher, F. Hoppe-Seyler, P. Plósz	Pierwsza publikacja opisująca DNA („nukleinę“)
1879	A. Kossel	Identyfikacja puryn i pirymidyn
1881	E. Zacharias	„Nukleina” jest obecna w wydłużonych strukturach (nazwanych później chromosomami) w jądrze komórkowym roślin w trakcie podziału
1882	W. Flemming	Chromosomy i ich zmienne zachowanie podczas podziału komórkowego
1884-5	O. Hertwig, A. von Kölliker, E. Strasburger, A. Weismann	Jądro komórkowe zawiera podstawowy materiał dziedziczności
1889	R. Altman	„Nukleina” zmienia nazwę na „kwas nukleinowy”
1900	C. Correns, H. de Vries, E. von Tschermak	Ponowne odkrycie „praw Mendla”
1902	T. Boveri, W. Sutton	Jednostki dziedziczności są zlokalizowane na chromosomach
1902-9	A. Garrod	Dziedziczne choroby metaboliczne są wynikiem defektów genetycznych powodujących utratę enzymu
1909	P. Levene W. Johannsen	Odkrycie rybozy „Gen” – jednostka dziedziczenia
1910	T.H. Morgan	<i>Drosophila</i> modelem do badania dziedziczenia
1913	A. Sturtevant, T.H. Morgan	Pierwsza mapa sprzężenia genetycznego (dla <i>Drosophila</i>)
1928	F. Griffith	„Czynnik transformujący” umożliwia przeniesienie właściwości jednej bakterii do drugiej
1929	P. Levene	Identyfikacja deoksyrybozy i nukleotydów; rozróżnienie RNA i DNA
1939	C. Waddington	Epigenetyka
1941	G. Beadle, E. Tatum	Koncepcja „Jeden gen – jeden enzym”
1944	O.T. Avery, C. MacLeod, M. McCarty	DNA jako materiał genetyczny i „czynnik transformujący” Griffith’a
1949	C. Vendrely, R. Vendrely, A. Boivin	Jądro komórkowe zawiera połowę ilości DNA w porównaniu do komórek somatycznych
1949-50	E. Chargaff	Skład zasad azotowych w DNA i „reguła Chargaff’a”
1952	A. Hershey, M. Chase	Podczas infekcji wirusowej, DNA zostaje wprowadzony do bakterii, a białka wirusa zostają na zewnątrz. DNA znajdujący jest w potomnych cząstkach wirusowych.
1953	R. Franklin, M. Wilkins J. Watson, F. Crick	Analiza rentgenowska kryształu DNA, DNA ma regularną powtarzającą się strukturę; molekularna struktura DNA
1956	A. Kornberg	DNA polimeraza
1957	F. Crick	Centralny dogmat biologii molekularnej
1958	M. Meselson, F. Stahl	Semikonserwatywna replikacja DNA
1961-6	R.W. Holley, H.G. Khorana, H. Matthaei, M.W. Nirenberg	Kod genetyczny
1967	N. Grineva	Zaproponowanie strategii antysensu
1968-70	W. Arber, H. Smith, D. Nathans	Pierwsze wykorzystanie enzymów restrykcyjnych do hydrolizy DNA w specyficznych miejscach
1972	G. Khorana P. Berg	Synteza pierwszego genu <i>in vitro</i> Pierwszy rekombinowany fragment DNA
1973	S. Cohen, H. Boyer	Konstrukcja funkcjonalnego plazmidu <i>in vitro</i> (inżynieria genetyczna)
1977	F. Sanger, A. Maxam, W. Gilbert, E.L. Kuff	Sekwencjonowanie DNA Strategia antysensu
1979	A. Wang	Struktura Z-DNA
1983	K. Mullis	Reakcja łańcuchowa polimerazy
1990	The International Human Genome Sequencing Consortium	Początek projektu poznania genomu człowieka
1995	C. Venter	Sekwencja nukleotydoma wolnożyjącego organizmu (<i>Haemophilus influenzae</i>)
1996	A. Goffeau	Sekwencja nukleotydoma pierwszego eukarionta (<i>S. cerevisiae</i>)
1998	The <i>C. elegans</i> Sequencing Consortium	Sekwencja nukleotydoma pierwszego organizmu wielokomórkowego (<i>C. elegans</i>)
1999	K.P. O'Brien	Sekwencja nukleotydoma chromosomu ludzkiego 22
2000	Arabidopsis Genome Initiative	Sekwencja nukleotydoma genomu <i>Drosophila</i> i <i>Arabidopsis</i>
2001	Celera, NIH (C. Venter, F. Collins)	Sekwencja nukleotydoma genomu człowieka
2002	Mouse Genome Sequencing Consortium	Sekwencja nukleotydoma genomu myszy
2005	American Association for Cancer Research	Warsztaty na temat epigenomu człowieka
2007	J. Rothberg, K. McKernan, J. West	Metody głębokiego sekwencjonowania

Procedura izolacji nukleiny opracowana przez Mieschera



Rycina 3. Procedura izolacji nukleiny opracowana przez Mieschera. Można wyróżnić dwa etapy: przygotowanie komórek oraz izolację nukleiny poprzedzoną uzyskaniem jąder komórkowych. Ze względu na brak odpowiedniego sprzętu, procedura wymagała wiele pracy i czasu.

i najbliższymi produktami przemian, stopniowo pomoże zdjąć zasłonę przysłaniającą wewnętrzny proces wzrostu komórki” [11]. Dzisiaj wiadomo, że były to prorocze słowa, ale w czasach Mieschera nikt nie potrafił uchwycić znaczenia tego odkrycia.

DNA MATERIAŁEM GENETYCZNYM

Wiele naukowych odkryć dokonano spontanicznie, tak jak w przypadku Fredericka Griffitha i transformacji genetycznej. Był on brytyjskim lekarzem wojskowym, który poszukiwał szczepionki na zapalenie płuc w okresie pandemii grypy Hiszpanki, która zabiła blisko 50 milionów ludzi pod koniec I Wojny Światowej [12]. Pracował z dwoma szczepami *Streptococcus pneumoniae*: niewirulentnym szczepem R (ang. *rough*), nie posiadającym otoczki polisacharydowej oraz chorobotwórczym szczepem S (ang. *smooth*), który ją posiadał [13]. Wprowadzenie do myszy szczepu S powodowało zapalenie płuc i śmierć w ciągu kilku dni, podczas

gdy myszy infekowane szczepem R pozostawały zdrowe. Wiadomo było, że wysoka temperatura powoduje inaktywację bakterii. Jednakże podanie mieszaniny inaktywowanego szczepu S i normalnego szczepu R także powodowało śmierć myszy. Griffith stwierdził, że tylko bakterie szczepu S były chorobotwórcze i postulował istnienie „czynnika transformującego” (ang. *transforming principle*) o nieznanym pochodzeniu z inaktywowanych bakterii S, dzięki któremu niewirulentne bakterie szczepu R nabierały właściwości chorobotwórczych. Ponieważ ekstrakt inaktywowanych termicznie bakterii szczepu S zawierał niemal czysty DNA, a jego zdolność do transformacji zanikała po traktowaniu DNazą, Oswald Avery wykazał, że „czynnikiem transformującym” Griffitha był DNA [14]. Dla większości biochemików trudnym do zaakceptowania był pogląd, że cząsteczka o tak prostej strukturze jak DNA może stanowić materiał genetyczny. Powszechny był bowiem pogląd, że geny zbudowane są z białek [15]. Przełomowe znaczenie odkryć Griffitha i Avery’ego potwierdza fakt, że zjawisko transformacji przy pomocy dostarczonego z zewnątrz materiału genetycznego stanowi podstawę współczesnej biologii molekularnej, inżynierii genetycznej i biotechnologii.

Kluczową rolę dla rozwoju biologii molekularnej odegrały badania nad bakteriofagami i wirusami. W 1922 roku Hermann Muller jako pierwszy porównał bakteriofag do genu, a rok później fitofizjolog Benjamin Duggar i Joanne Karer Armstrong dostrzegli podobieństwo pomiędzy genem a wirusem mozaiki tytoniu (TMV, ang. *tobacco mosaic virus*) [16]. W 1952 roku potwierdzono, że DNA stanowi materiał genetyczny fagów [17]. Wykazano, że po przyłączeniu się cząstki faga T2 do komórki bakteryjnej, większość fagowego DNA zostaje wprowadzona do komórki, pozostawiając białkowy płaszcz na zewnątrz. Doświadczenia te potwierdziły, że wirusowy DNA może być czynnikiem transformującym zarówno komórki bakteryjne jak i eukariotyczne.

STARY DOBRY GEN

Na początku XX wieku Archibald Garrod zauważył, że niektóre defekty metaboliczne wynikają z zablokowania

określonych etapów szlaków biochemicznych [18]. Obserwacje te pozostały niedocenione do czasu izolacji mutantów *Neurospora* przez George Beadle i Edwarda Tatum [19]. Rezultatem ich pracy była koncepcja „jeden gen – jeden enzym”, ostatecznie potwierdzona w latach 50-tych XX wieku [20]. W 1906 roku William Bateson podczas konferencji poświęconej „hybrydyzacji i udoskonalaniu roślin” zaproponował, żeby dział biologii, zajmujący się studiowaniem dziedziczenia i zmienności nazywać genetyką [1]. Trzy lata później botanik Wilhelm Johanssen dla ujednoczenia terminologii genetycznej, wystąpił z koncepcją „fenotypu” i „genotypu” oraz po raz pierwszy użył terminu „gen” w odniesieniu do Mendlowskich czynników dziedziczenia. Zastąpił również określenie Batesona „alleomorf”, słowem „allel” w odniesieniu do różnych alternatywnych form genu. Terminy te po raz pierwszy użyto podczas Międzynarodowego Kongresu Genetycznego w Berlinie, we wrześniu 1927 roku [1].

Jednym z przełomowych odkryć w historii DNA było stwierdzenie przez Waltera Suttona, Theodora Boveri i Thomasa Hunta Morgana, że geny są w fizycznie istniejącymi jednostkami ułożonymi liniowo w ściśle określonych miejscach na chromosomach [21]. Następnie Morgan określił gen jako jednostkę dziedziczenia niepodzielną w procesie rekombinacji, zlokalizowaną w loci pary chromosomów homologicznych, która może ulegać mutacji i przynależy do jednostki sprzężenia [22]. Te pierwsze wyobrażenia o naturze genów uzyskane w początkowym okresie rozwoju genetyki zostały doprecyzowane obecnie w wyniku rozwoju technik biologii molekularnej. Odkrycie procesów składania genów (ang. *splicing*), alternatywnego składania oraz innych elementów struktury i funkcji genu pokazało niespójność dotychczasowej definicji genu. W 2004 roku konsorcjum badawcze ENCODE (ang. *Encyclopedia of DNA elements*) założone w 2003 roku przez Narodowy Instytut Badań Genomu (NHGRI, ang. *National Genome Research Institute*) w USA opublikowało swoje plany stworzenia listy wszystkich elementów funkcjonalnych sekwencji DNA człowieka, w tym genów kodujących i nie kodujących białek, elementów regulatorowych oraz sekwencji odpowiedzialnych za strukturę i dynamikę chromosomów [23]. Inicjatywa ENCODE wydaje się być kontynuacją ukończonego w kwietniu 2003 roku Projektu Poznania Genomu Człowieka i obejmuje zagadnienia genomiki funkcjonalnej. Zaproponowano nową definicję genu jako związku sekwencji genomowych kodujących spójny zestaw potencjalnie nakładających się funkcjonalnych produktów [24].

DNA I RNA

Występowanie dwóch rodzajów kwasów nukleinowych (nazwę zaproponował R. Altman w 1889 roku) zasugerowało odkrycie przez Phoebusa Levene rybozy w 1909 r. i deoksyrybozy w 1929 r. [25]. Na początku lat 30-tych stwierdzono, że RNA i DNA wykazują różne właściwości w środowisku zasadowym i faktycznie stanowią odrębne klasy cząsteczek [26]. Odkrycie genetycznych funkcji RNA wirusa mozaiki tytoniu (TMV) przypisuje się Amerykaninowi Heinzowi Fraenkel-Conratowi oraz Niemcom Alfredowi Giere oraz Gerhardowi Schramm, którzy niezależnie doszli do tych samych wniosków w 1956 roku [27]. Jednakże już w 1948 roku Roy Markham, Kenneth Smith i Richard

Matthews oczyścili i scharakteryzowali wirus żółtej mozaiki rzepy (ang. *turnip yellow mosaic virus*, TYMV) i po raz pierwszy pokazali, że RNA decyduje o infekcyjności i zdolności do powielania się wirusa [27].

W latach 50-tych XX wieku pokazano, że RNA charakteryzuje się znacznie bardziej złożoną strukturą niż DNA [28]. W 1956 roku uzyskano obraz dyfrakcyjny podwójnej helisy RNA dla zhybrydowanych nici poli(A) i poli(U) [29]. Zaproponowano, że RNA bierze udział w przenoszeniu informacji genetycznej z DNA do cytoplazmy i sterowaniu syntezą białek. W 1960 roku doświadczalnie potwierdzono możliwość bezpośrednich oddziaływań RNA i DNA [30] oraz reasocjacji rozdzielonych w wyniku tremicznej denaturacji komplementarnych nici DNA [31]. Dwadzieścia lat później określono strukturę hybrydy RNA-DNA [32]. Odkrycia te stały się podstawą wielu nowoczesnych technik eksperymentalnych biologii molekularnej. W 1967 r. zidentyfikowano oddziaływania komplementarnych sekwencji DNA i RNA (tzw. strategia antysensowa) [33], której funkcjonalność wykazano *in vitro* 10 lat później z wykorzystaniem syntetycznych oligonukleotydów [34]. W 1960 roku Samuel Weiss wykazał, że RNA jest syntetyzowany na matrycy DNA przez polimerazę RNA wykorzystując trifosforany rybonukleotydów; udowodnił, że DNA i RNA są komplementarne [1]. Rok później Francois Jacob i Jacques Monod scharakteryzowali informacyjny RNA (mRNA, ang. *messenger RNA*) [1]. Pierwszym kwasem nukleinowym, dla którego poznano sekwencję nukleotydową był transferowy RNA specyficzny dla alaniny [35].

CHARGAFF I SKŁAD ZASAD DNA

Wczesne badania wykazały, że kwasy nukleinowe zawierają dwie zasady purynowe i dwie pirymidynowe w przybliżeniu w równomolarnych proporcjach [36]. Przez wiele lat uważano, że kwasy nukleinowe są stosunkowo małymi cząsteczkami składającymi się z jednego powtórzenia każdego nukleotydu, tworząc tetranukleotyd [26]. Hipoteza tetranukleotydu sformułowana w 1931 roku stała się impulsem dla podjęcia systematycznych badań nad składem zasad w DNA przez Erwina Chargaffa [37]. Duży wpływ na jego badania miała praca Raphaela Consdena dotycząca wykorzystania metod chromatograficznych do analizy białek i rozdziału aminokwasów [38]. Techniki te można było wykorzystać również do analizy puryn i pirymidyn w kwasach nukleinowych [39,40]. Prace Chargaffa dotyczące składu zasad w DNA z różnych organizmów, oraz różnych tkanek tego samego gatunku nie potwierdziły założeń hipotezy tetranukleotydu [26]. W swojej autobiografii „Heraklitowy ogień” Chargaff podsumował swoje osiągnięcia następująco: „Regularności składu DNA, które niektórzy przyjaciele określili jako „zasady Chargaffa” są następujące: (a) suma puryn (adeniny i guaniny) równa się sumie pirymidyn (cytozyny i tyminy), (b) stosunek molarny adeniny do tyminy równa się 1, (c) stosunek molarny guaniny do cytozyny równa się 1, (d) liczba grup 6-aminowych (adenina i cytozyna) jest równa ilości grup 6-keonowych (guanina i tymina)” [43]. Arthur Mirsky w 1943 roku zauważył, że liczba puryn wydaje się być zawsze równa liczbie pirymidyn (czyli $A+G = C+T$ lub $(A+G)/(C+T) = 1$) [41]. Obserwacje te zostały początkowo zignorowane przez Chargaffa,

który określił je jako „bez znaczenia” czy „przypadkowe” [42]. Niestety Chargaff nie przewidział komplementarności zasad, kluczowej cechy DNA, która stała się podstawą zaproponowanego przez Watsona i Cricka modelu podwójnej helisy. To niepowodzenie pozostawiło go rozgoryczonym do końca życia [26].

STRUKTURA DNA I CENTRALNY DOGMAT BIOLOGII MOLEKULARNEJ

Zastosowanie dyfrakcji promieni X do badań DNA wykazało, że ma on uporządkowaną i powtarzalną strukturę. Fakt ten zachęcał do budowania modeli jego struktury [44]. W 1949 roku Sven Furberg rozwiązał strukturę krystaliczną deoksycytydyny [45]. Pięcioczłonowy pierścień cukrowy występuje w dwóch formach: C3'-endo (występujące w A-DNA) i C2'-endo (występujące w B-DNA) [44]. W strukturze określonej przez Furberga, deoksyrboza miała konformację C3'-endo, dlatego początkowo zaproponowano model A-DNA.

Zainteresowanie Jamesa Watsona cząsteczką DNA ukształtowały się pod wpływem tzw. „grupy fagowej” zorganizowanej przez Maxa Delbrück i Salvadora Luria. Wbrew powszechnie obowiązującej wówczas opinii uważali oni, że DNA może stanowić materiał genetyczny. Po wysłuchaniu wykładu Maurice'a Wilkinsa na konferencji w Neapolu w 1951 roku, Watson zdecydował podjąć pracę w laboratorium Maxa Perutza w Cambridge, w którym stosowano techniki dyfraktometryczne do badań struktury. Pracujący w King's College w Londynie, Maurice Wilkins, badając DNA w świetle spolaryzowanym zauważył, że jego włókna zbudowane są z długich, równoległych ułożonych cząsteczek. Wilkins we współpracy z Raymondem Goslingiem uzyskał w 1950 roku pierwszy czysty obraz rozpraszania promieni X na kryształach DNA (wynik ten prezentowany był na wspomnianej konferencji w Neapolu). W styczniu 1951 roku do tego zespołu dołączyła Rosalind Franklin [46]. Miała ona doświadczenie w pracy z technikami dyfraktometrycznymi i umiała kontrolować wilgotność w komorze dyfrakcyjnej (uwodnienie włókien DNA), za pomocą nasyconych roztworów soli. Doprowadziło to do uzyskania obrazów dyfrakcyjnych dwóch rodzajów DNA, nazwanych później formami A i B. W listopadzie 1951 roku Franklin na seminarium w King's College (w którym uczestniczył również Watson) na podstawie obrazów dyfrakcyjnych wskazała na możliwość struktury helikalnej DNA zbudowanej z dwóch lub trzech nici z resztami fosforanowymi na zewnątrz [46]. Na podstawie tych informacji Watson i Crick zbudowali swój pierwszy błędny model struktury DNA złożony z trzech zwiniętych helikalnie nici, z resztami fosforanowymi ułożonymi wewnątrz struktury i zasadami azotowymi na zewnątrz.

W styczniu 1953 roku Franklin zauważyła, że forma A-DNA może zawierać dwa, biegnące w przeciwnych kierunkach łańcuchy. W lutym tego samego roku Watson i Crick powrócili do budowy znanego do dzisiaj modelu DNA. W *Nature* z dnia 25 kwietnia 1953 roku pojawiły się trzy publikacje dotyczące struktury DNA: pierwsza Watsona i Cricka [47], druga Wilkinsa, Stonesa i Wilsonsa [48], a trzecia

Franklin i Goslinga [49]. Ponieważ konformacja zaproponowanego modelu była bardziej właściwa dla formy A-DNA, Watson i Crick musieli zbudować uzupełniający model struktury DNA [50]. Po latach Francis Crick w rozmowach z Aaronem Klugiem stwierdził, że Rosalind Franklin rozwiązałaby sama strukturę DNA, chociaż trwałoby to dłużej [46]. Za odkrycie molekularnej struktury kwasów nukleinowych Francis Crick, James Watson i Maurice Wilkins otrzymali Nagrodę Nobla w 1962 roku.

Pierwszą alternatywną strukturę DNA, lewoskrętną helisę Z-DNA odkrył Alexander Rich w MIT (ang. *Massachusetts Institute of Technology*) w 1979 roku [51]. Odkrycie innych form DNA: w kształcie krzyża (ang. *cruciform*), trójniciowego H-DNA, czteroniciowych G-kwartetów oraz stabilnie rozwiniętego DNA nastąpiło w następnej dekadzie [52]. Większość z tych struktur powstaje przejściowo podczas różnych procesów genetycznych i nie stanowi stabilnych elementów budowy genomu.

W 1957 roku na corocznym spotkaniu Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej, Francis Crick zaproponował hipotezę cząsteczki adaptorowej pośredniczącej w biosyntezie białka na rybosomach i sformułował tzw. centralny dogmat biologii molekularnej [53,54]. Według tej hipotezy kwasy nukleinowe są źródłem jednokierunkowego przepływu informacji ostatecznie określającej białka, gdzie DNA jest matrycą do syntezy RNA, a ten do biosyntezy białka w procesie translacji. Trzeba podkreślić, że już na początku lat 50-tych XX wieku, że kwasy nukleinowe stanowią matrycę do syntezy białka [55]. Interpretacja centralnego dogmatu była kwestią sporną, ponieważ ograniczono go do nakazu przepływu informacji od DNA do RNA i od RNA do białek, podczas gdy według najbardziej oczywistego rozumowania centralny dogmat jedynie zabrania pewnych form przekazywania informacji, czyli od białek do białek i od białek do kwasów nukleinowych [54]. Według Francis Cricka można było rozróżnić trzy typy przenoszenia informacji: „mało prawdopodobny” od białek do kwasów nukleinowych, „możliwy” od RNA do DNA i od DNA do białek oraz „znany” (jak od DNA do RNA i dalej do białek, a także auto-transfer DNA i RNA) [54]. Crick wspierał rozwijający się od lat 20-tych XX wieku pogląd, że w procesach biologicznych centralną rolę odgrywa gen [54].

Podstawowa zasada „centralnego dogmatu” pozostaje niezmienna do dzisiaj chociaż była częściowo modyfikowana. W 1956 roku okazało się, że materiałem genetycznym wirusa mozaiki tytoniu (TMV) jest RNA [56]. Nieco później odkryto odwrotną transkrypcję, co nagrodzono Nagrodą Nobla dla Dawida Baltimore'a i Howarda Temina w 1975 roku [57]. W latach 70-tych zidentyfikowano introny i eksony, co doprowadziło do odkrycia procesu składania [58]. W latach 80-tych odkryto mechanizm różnicowego cięcia i składania mRNA [59] oraz różne typy dojrzewania mRNA [60], co uniemożliwiło przewidywanie w pełni sekwencji aminokwasów w białku tylko na podstawie znajomości sekwencji DNA. Kolejne kontrowersje wzbudziło odkrycie prionów [61] i dziedziczenia epigenetycznego [62]. Jednakże 50 lat po pierwszym sformułowaniu, centralny dogmat jest postrzegany jako jedna z przełomowych idei biologii molekularnej [54].

Odkrycie w 1955 roku polimerazy DNA odpowiedzialnej za zależną od matrycy syntezę DNA było przełomowe dla rozumienia replikacji, naprawy DNA i transkrypcji [63]. Przyczyniło się także do opracowania techniki PCR i metod sekwencjonowania DNA, bez których niewyobrażalny byłby rozwój współczesnej biologii molekularnej i biotechnologii.

Arthur Kornberg pracując w Narodowym Instytucie Zdrowia (ang. *National Institute of Health*, NIH), zainteresował się rozpuszczalnymi enzymami zaangażowanymi w syntezę ATP, a następnie metodami ich oczyszczania. W 1955 roku nie było jasne, w jaki sposób syntetyzowany jest DNA w komórce. Było kwestią sporną, czy powstawał on w wyniku polimeryzacji z monomerów, czy też w wyniku przyłączania zasad do wcześniej syntetyzowanego rdzenia fosfocukrowego [63]. Kornberg pokazał, że znakowane [¹⁴C] tymidyną cząsteczki DNA były rozpuszczalne w środowisku kwaśnym po potraktowaniu DNAzą. Wykorzystując tę metodę zidentyfikowano polimerazę DNA oraz jej substraty czyli trifosforany deoksynukleozydów (dNTP) [63]. Wyjaśniony został sposób działania enzymu, który wykorzystuje starterowe DNA i matrycę do polimeryzacji dNTP 5'→3'. Opisano również aktywność egzonukleazy 3'→5' oraz scharakteryzowano mechanizm tworzenia wiązań fosfodiesterowych [64-66].

Za odkrycie i badania nad polimerazą DNA, Artur Kornberg wyróżniony został w 1959 roku Nagrodą Nobla. W swoim wykładzie powiedział: „DNA, jak taśma, niesie specyficzne instrukcje do wykonania pracy. Można uzyskać dokładne kopie tej taśmy, aby informacje mogły być użyte ponownie w innym miejscu i czasie”¹. Ciekawostką jest, że Kornberg był jednym z siedmiu laureatów Nagrody Nobla, których dzieci także otrzymały to wyróżnienie. W 2006 roku Roger Kornberg otrzymał Nagrodę Nobla za badania molekularnych podstaw transkrypcji u Eukaryota.

W następnych latach uzyskano czyste preparaty enzymów *E. coli*: DNA polimerazę II, holoenzym DNA polimerazy III, DNA polimerazy IV i V, natomiast enzym odkryty przez Kornberga nazwano DNA polimerazą I [67]. Ponieważ nie może on inicjować syntezy łańcucha *de novo* zainteresowano się inicjacją replikacji. W ciągu dziesięciu lat Kornberg zidentyfikował i wykorzystał replisom do przekształcenia jednoniciowej kolistej formy DNA faga ΦX174 w dwuniciową formę replikacyjną, co przyczyniło się do zrozumienia wszystkich etapów replikacji chromosomu *E. coli* [68-70]. Możliwość klonowania genów i postępująca rewolucja w biologii była możliwa dzięki wykorzystaniu enzymów odkrytych przez Kornberga. DNA polimeraza I oraz jej analogi stały się kluczowymi reagentami technologii reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz współczesnych technik sekwencjonowania DNA [63]. Ciekawostką może być fakt, że Frederick Sanger wpadł na pomysł sekwencjonowania DNA metodą „dideoksy” czytając rozdział poświęcony DNA polimerazie I w książce Kornberga [63].

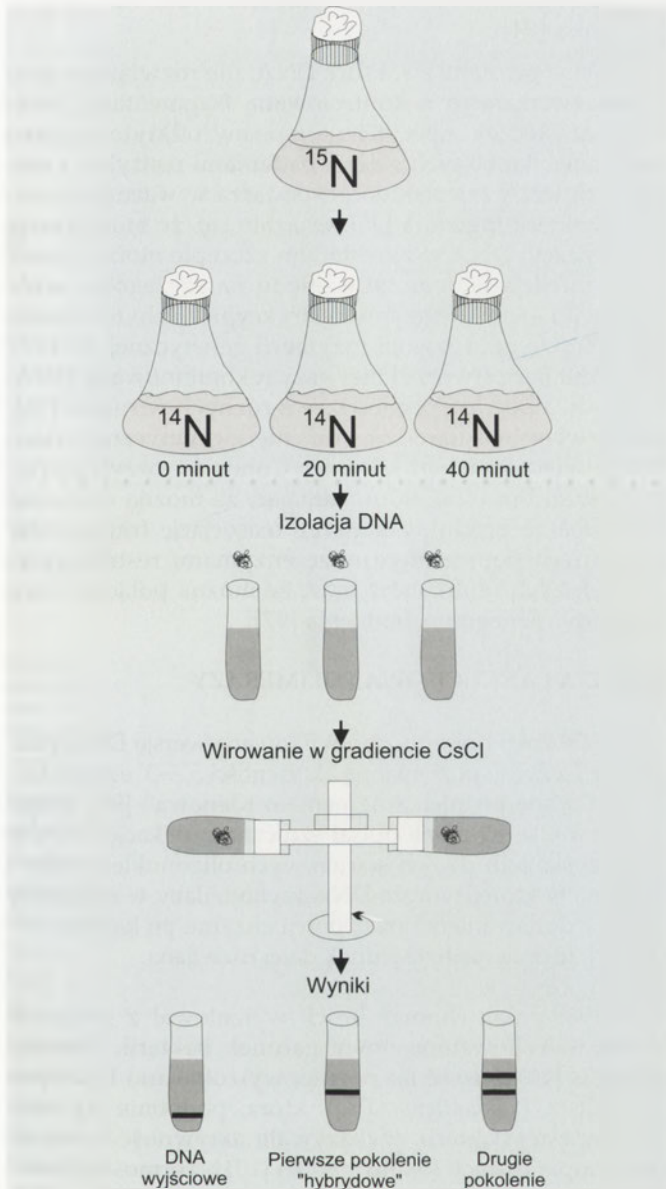
Komplementarność zasad obu nici DNA zasugerowały możliwy mechanizm kopiowania materiału genetycznego. Rozważane były trzy hipotezy. Pierwszy model replikacji semikonserwatywnej zaproponowany przez Watsona i Cricka zakładał, że w trakcie syntezy nici macierzystej cząsteczki DNA ulegają rozdzieleniu i każda z nich wchodzi w skład jednej z dwóch cząsteczek potomnych [47]. Model replikacji konserwatywnej zakładał zachowanie nienaruszonej macierzystej cząsteczki DNA i tworzenie całkowicie nowej cząsteczki potomnej. Kolejna hipoteza zakładała, że powstawałyby dwie cząsteczki DNA, a każda zawierałaby rozproszone fragmenty macierzystej cząsteczki. Chociaż pierwszy mechanizm wydawał się bardziej prawdopodobny, nie do końca było jasne, jak można to potwierdzić [71]. Głównym problemem była topologia związana z rozplataniem nici DNA. W 1958 roku potwierdzono, że replikacja zachodzi w sposób semikonserwatywny [72]. W procesie tym każda z nici DNA stanowi matrycę dla syntezy nici komplementarnej, w której kolejność nukleotydów określona jest przez sekwencję zasad nici macierzystej. Każda cząsteczka potomna zawiera jedną nić matrycy i jedną nowoobudowaną.

Meselson i Stahl wykorzystali fagowy DNA znakowany 5-bromouracylem (5BU) i analizowali materiał metodą wirowania w gradiencie gęstości. Znakowany „ciężki” DNA osiadał w próbowce szybciej, na poziomie odpowiadającym gęstości roztworu, podczas gdy „lekki” DNA powinien migrować wolniej. Hodowle bakterii prowadzono na pożywce, w której jedynym źródłem azotu był ¹⁵NH₄Cl. Po wielu pokoleniach rosnących na tym podłożu, rozcieńczano je 10-krotnie roztworem zawierającym ¹⁴NH₄Cl, a hodowle kontynuowano. Po wirowaniu DNA rodzicielski z pierwszej próbki znajdował się przy dnie próbki w pozycji ciężkiego izotopu ¹⁵N (Ryc. 4). DNA pobrany po 20 minutach hodowli na zmienionej pożywce znajdował się na wysokości pomiędzy pozycją ciężkiego izotopu ¹⁵N, a lekkiego ¹⁴N (kontrola). Dla pierwszego pokolenia obserwowano tylko jeden prążek charakteryzujący hybryd. Po następnym cyklu podziałowym obserwowano dwa prążki - jeden hybrydowy i drugi charakterystyczny dla lekkiego DNA, którego ilość zwiększała się po każdym cyklu replikacyjnym.

KOD GENETYCZNY

Sama struktura DNA, nie wyjaśniała sposobu kodowania informacji i jej odczytywania. Rdzeń fosfocukrowy ma charakter regularny i niezmienny, niezależnie od sekwencji zasad. Ponieważ w długiej cząsteczce możliwe są różne kombinacje, wydawało się prawdopodobne, że to sekwencja zasad stanowi kod niosący informacje genetyczną [73]. W 1957 roku Crick zaproponował hipotezę cząsteczki adaptorowej, która tłumaczyła zdolność tRNA do tłumaczenia informacji genetycznej [74]. Gdyby reszta aminokwasowa kodowana była przez dwie zasady, możliwych byłoby jedynie 16 kombinacji, podczas gdy czteronukleotydy dawałby zbyt wiele możliwości. Jako najbardziej prawdopodobny rozważano kod trójkowy [75], który Crick

¹Fragmenty wykładów noblistów pochodzą ze strony www.nobelprize.org



Rycina 4. Doświadczenie Meselsona i Stahla. Bakterie hodowano na pożywkę zawierającą sól azotową z ciężkim izotopem ^{15}N . Następnie bakterie przeszczepiono do pożywki zawierającej źródło azotu wyłącznie ^{14}N i hodowano przez 20 minut (uzyskując pierwsze pokolenie) i 40 minut (uzyskując drugie pokolenie). DNA izolowano i wirowano w gradiencie chlorku cezu. W zależności od zawartości poszczególnych izotopów azotu, prążek DNA znajdował się na określonej wysokości w probówce.

skomentował w trakcie uroczystości wręczenia Nagrody Nobla w 1962 roku: „nie jest nierozsądnym mieć nadzieję (...), że kod genetyczny będzie w pełni poznany w wyniku eksperymentów najbliższych kilku lat”. Słowa te okazały się prorocze. Hipoteza została poparta doświadczeniami *in vivo* z wykorzystaniem zmiany ramki odczytu podczas translacji oraz *in vitro* z wykorzystaniem aminoacylo-tRNA rozpoznających określone trójki zasad [76,77]. Rozszyfrowywanie zasad kodowania kolejnych trójek nukleotydów doprowadziło w latach 1961-1965 do pełnego poznania kodu genetycznego oraz stworzenia jego reprezentacji w postaci tabeli [78]. W 1968 roku Marshall Nirenberg, Robert Holley i Gobind Khorana otrzymali Nagrodę Nobla za rozpracowanie kodu genetycznego i odkrycie jego roli w syntezie białek.

Badania Fredericka Sngera nad insuliną wykazały, że białka składają się z liniowych polipeptydów zbudowanych z reszt aminokwasowych połączonych ze sobą w ściśle określonej kolejności oraz, że dla struktury i funkcji makrocząsteczek istotną rolę odgrywają ich sekwencje [79]. Pionierskie próby określenia sekwencji zasad w DNA natrafiły na szereg przeszkód wynikających z podobieństwa różnych cząsteczek DNA i problemu z ich rozdzieleniem, jak również braku DNaz specyficznych dla poszczególnych zasad. Mniej problemów przysporzyło sekwencjonowanie RNA, które powiodło się dla tRNA^{Ala} już w 1965 roku [35].

W 1959 roku oczyszczono dokładnie pierwszą cząsteczkę DNA z faga ΦX174 [80], a rok później DNA faga lambda [81]. Rezultatem pierwszych prób sekwencjonowania DNA było uzyskanie częściowej sekwencji kohezyjnych końców faga lambda [82]. Odkrycie enzymów restrykcyjnych klasy drugiej [83] było decydującym osiągnięciem ułatwiającym przygotowanie materiałów do sekwencjonowania DNA. Metody oznaczenia sekwencji nie były wystarczająco efektywne do czasu zaproponowania przełomowej metody „plus minus” przez Fredericka Sangera, z której wywodzą się systemy współczesne [84]. Sanger wykorzystał polimerazę DNA, specyficzne startery i znakowane ^{32}P nukleotydy w ośmiu reakcjach, gdzie syntezę zatrzymano w sposób zależny od sekwencji, poprzez uzupełnianie tylko jednego z czterech fosforanów deoksynukleozydów (reakcja „plus”) lub trzech z czterech (reakcja „minus”) [85]. Mieszaniny reakcyjne były rozdzielane elektroforetycznie w denaturującym żelu poliakrylamidowym, a pozycje poszczególnych zasad odczytywano z autoradiogramów. W pojedynczym doświadczeniu można było określić sekwencję około 50 zasad [84]. Metodą tą w 1977 roku określono pełną sekwencję DNA genomu faga ΦX174 [86]. W tym samym roku Allan Maxam i Walter Gilbert opisali metodę sekwencjonowania, w której DNA znakowany przy jednym końcu ^{32}P był chemicznie modyfikowany i hydrolizowany. W pierwszej reakcji dochodziło do modyfikacji puryn (reakcja A+G), w drugiej preferencyjnie adenin (A>G), w trzeciej pirymidyn (C+T), a w czwartej cytozyn (C). Modyfikowane DNA ulegały chemicznej hydrolizie. Podobnie jak w metodzie „plus minus” sekwencja odczytywana była z autoradiogramów żeli poliakryloamidowych po rozdzieleniu elektroforetycznym mieszanin reakcyjnych [87].

W tym samym roku Sanger opracował metodę „dideoksy”, w której wykorzystał trifosforany 2',3'-dideoksy nukleotydów (ddNTP) prowadzące do zależnej od sekwencji terminacji łańcucha [88]. Metoda ta została wykorzystana do potwierdzenia sekwencji faga ΦX174 w 1978 roku. Wraz z wprowadzeniem metod sekwencjonowania wykorzystujących żele poliakrylamidowe, tempo badań uległo przyspieszeniu, pociągając za sobą postęp technologiczny. Na początku lat 90-tych długość sekwencji otrzymywanych metodą „dideoksy” wzrosła z 100 do 400 nukleotydów [84].

Kolejny przełom stanowiło wprowadzenie automatyzacji sekwencjonowania z wykorzystaniem znakowania

fluorescencyjnego [89]. Metoda ta została pierwszy raz wykorzystana do określenia sekwencji genu przez Craiga Ventera [90]. W 1992 roku Venter założył Instytut Badań Genomowych (TIGR, ang. *The Institute for Genomic Research*) oraz firmę Celera posiadającą 30 automatycznych sekwencjonatorów ABI 373A oraz 17 robotów ABI Catalyst 800 [84]. Była to prawdziwa fabryka, w której pracowały zespoły ludzi ze ściśle określonym zakresem zadań jak przygotowanie matrycy, żeli i sekwencjonowanie [84]. Rok później centrum Sangera w Cambridge zostało przemianowane na Wellcome Trust Sanger Institute z udziałem Wellcome Trust i Medical Research Council. Od tej pory ilość danych uzyskiwanych co roku wzrastała gwałtownie. W latach 90-tych XX wieku poznano sekwencje genomów wielu wirusów, organelli, mikroorganizmów i małych organizmów wielokomórkowych [91]. Umożliwiło to rozwój nowych kierunków badań, jak kontrola ekspresji genów oraz poznawanie transkryptomu, proteomu, interaktomu, metabolomu oraz genomiki nowotworów. Powstała koncepcja komórki jako zintegrowanego systemu procesorów informacyjnych [91].

Po trzech dekadach stosowania, metoda Sangera może być stosowana do uzyskania odczytu sekwencji o długości do około 1000 par zasad z dokładnością 99,999% i przy koszcie 0,5 dolara za zasadę [92]. Pojawienie się nowych technologii umożliwiło redukcję kosztów i przyspieszenie procesu uzyskiwania danych. Czasopismo „Nature” ogłosiło nowe techniki sekwencjonowania jako „Metodę Roku 2007”, głównie ze względu na szeroki zakres ich zastosowań oraz fakt, że wykroczyły one już poza swoje oryginalne zastosowanie. Istnieje wiele implementacji cyklicznego sekwencjonowania, które zostały w ostatnich latach skomercjalizowane, takie jak sekwencjonowanie 454 (wykorzystane w Sekwencjonatorach Genomowych 454, Roche Applied Science; Bazylea), technologia Solexa (wykorzystana w Analizatorze Genomowym Illumina; San Diego), platforma SOLiD (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA), Polonator (Dover/Harvard) oraz technologia HelixScope Molecule Sequencer (Helicos; Cambridge, MA, USA) [92].

Interesującym jest fakt, że Frederick Sanger jest jedną z czterech osób nagrodzonych dwukrotnie Nagrodą Nobla. Po raz pierwszy otrzymał ją w 1958 roku za pracę nad strukturą białek, a w szczególności insuliny. Drugi raz razem z Paulem Bergiem i Walterem Gilbertem uzyskał ją w 1980 roku za wkład w określanie sekwencji kwasów nukleinowych.

MANIPULACJE GENETYCZNE

W latach 60-tych XX wieku Gobind Khorana opracował pierwszą metodę chemicznej syntezy oligonukleotydów. Jednakże przełomowym momentem w badaniach DNA było opracowanie metody chemicznej syntezy deoksynukleotydów na podłożu stałym używając fosforamidów [93]. Rozwój technik syntezy DNA doprowadził do opracowania metod automatycznych, które z kolei umożliwiło rozwój inżynierii genetycznej, sekwencjonowania oraz techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Pierwszy gen uzyskany metodami chemicz-

mi został zsyntetyzowany w laboratorium Khorany w 1972 roku [94].

Chociaż poznano strukturę DNA, nie rozwiązano problemu związanego z kontrolowaną fragmentacją dłuższych cząsteczek. Specyficzne enzymy odkryto dopiero pod koniec lat 60-tych wraz z badaniami restrykcji i modyfikacji DNA zależnej od gospodarza w warunkach infekcji bakterii fagiem λ [95]. Okazało się, że modyfikacja bakteryjnego DNA w określonym szczepie może chronić przed infekcją fagiem, ze względu na szczególnie wzór metylacji i swoiste enzymy restrykcyjne. Było to kluczowe odkrycie dla rozwoju inżynierii genetycznej. W 1972 roku Paul Berg stworzył pierwszy rekombinowany DNA, łącząc dwa odcinki pochodzące z różnych wirusów [96]. Były to właściwie narodziny inżynierii genetycznej. Nieco później Herbert Boyer i Stanley Cohen stworzyli pierwszy plazmid *in vitro*, udowadniając, że można otrzymać funkcjonalne produkty poprzez reasocjację fragmentów uzyskanych poprzez hydrolizę enzymami restrykcyjnymi większych replikonów oraz, że można połączyć dwa plazmidy różnego pochodzenia [97].

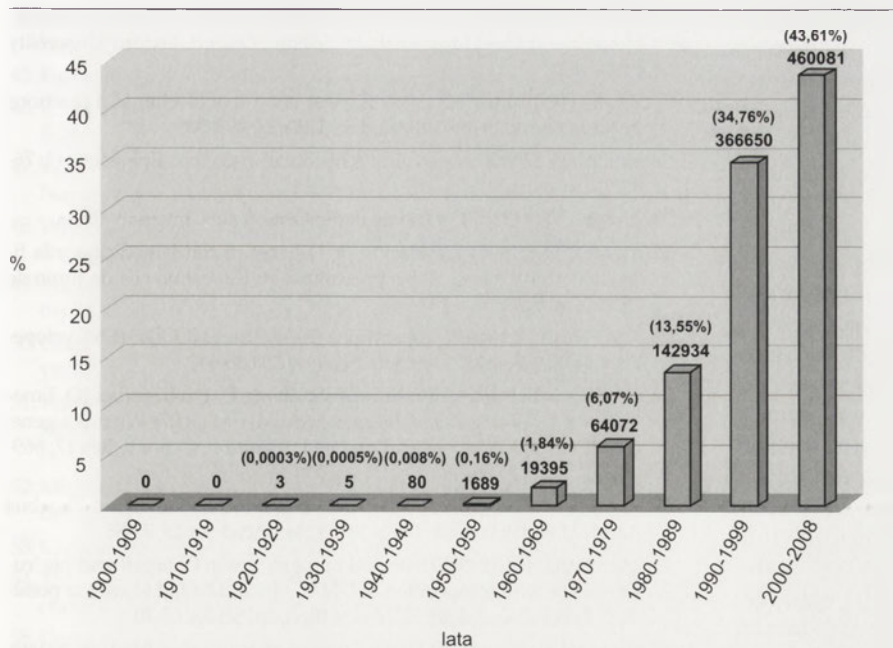
REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY

W 1970 roku opisano zmodyfikowaną wersję DNA polimerazy I z *E. coli* pozbawioną aktywności 5'→3' egzonukleazy, nazwaną później „fragmentem Klenowa” [98]. Mając to na uwadze Khorana opisał sztuczną replikację DNA, z wykorzystaniem dwóch starterowych oligonukleotydów i matrycy, w której synteza DNA zachodziła w cyklicznej reakcji z dodawaniem nowej porcji enzymu po każdym cyklu [99]. Idea ta nie była jednak dalej rozwijana.

W 1969 roku Thomas Brock wyizolował z gorących źródeł w Yellowstone nowy gatunek bakterii, *Thermus aquaticus* [100]. Sześć lat później wyizolowano DNA polimerazę z *T. aquaticus* (Taq), która, podobnie jak inne enzymy z tej bakterii, wykazywała aktywność w wysokich temperaturach (około + 80°C) [101]. Termostabilność Taq stała się kluczem do opracowania metody amplifikacji DNA w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) podobnej do tej zaproponowanej przez Khoranę. Twórcą metody PCR jest Kary Mullis, który wymyślił ją w 1983 roku, jak sam napisał „w trakcie nocnej jazdy samochodem przez góry Kalifornii” [102]. Otrzymał on Nagrodę Nobla w 1993 roku. Podczas wykładu noblowskiego powiedział o swoich pierwszych przemyśleniach na temat PCR: „Nagle rozwiązałem najbardziej irytujący problem chemii DNA. Obfitość i wyróżnienie. Z dwoma oligonukleotydami, DNA polimerazą i czterema fosforanami nukleozydów mógłbym mieć tyle DNA, ile bym zechciał i mógłbym określić specyficzny fragment o sprecyzowanej długości, łatwy do odróżnienia. To uczyniło by mnie sławnym. To zbyt proste. Ktoś inny zapewne to zrobił, a ja na pewno o tym słyszałem. Cały czas byśmy to robili. Co mi umknęło?”.

PROJEKT POZNANIA GENOMU CZŁOWIEKA

Rozwój technik klonowania i sekwencjonowania DNA, który dokonał się w początku lat 80-tych XX wieku po-



Rycina 5. Wzrastająca liczba publikacji na temat DNA w bazie danych PubMed NCBI od roku 1900 do 6.01.2009 roku. Bazę danych przeszukano z wykorzystaniem zapytania: „DNA” OR „nucleic acid” OR „nuclein” OR „D.N.A.”. Od 1950 roku można zaobserwować zwiększanie się liczby publikacji, ale niemal 80% z sumy 1054869 zostało opublikowanych w ciągu ostatnich 20 lat.

zwał zakładać, że możliwe będzie określenie pełnych sekwencji genomów w tym genomu człowieka. Idea podjęcia wysiłków w tym kierunku narodziła się w 1985 roku, podczas konferencji: „Czy możemy zsekwencjonować genom człowieka?” na Uniwersytecie Kalifornijskim Santa Cruz (UCSC) [91]. Na spotkaniu tym rozważane były m.in. problemy rozdziału chromosomów, tworzenia fizycznych map nakładających się fragmentów, polimorfizm oraz potrzeby tworzenia zaawansowanych programów komputerowych i rozwoju technologii. Koszty przedsięwzięcia zostały oszacowane na około 3 miliardy dolarów dla genomu człowieka (1 dolara za zasadę). Uważano, że jego realizacja wymagać będzie 15 lat pracy, co w rezultacie okazało się trafne [91]. W tym samym roku odbyła się pierwsza konferencja w Santa Fe dotyczące określenia wykonalności inicjatywy poznania genomu człowieka, a rozważania trwały aż do roku 1990, kiedy to Departament Energii USA (DOE) i NIH zaprezentowały Kongresowi USA 5-letni plan projektu poznania genomu człowieka [84]. Rozpoczęła się międzynarodowa współpraca w zakresie sekwencjonowania poszczególnych regionów genomu (USA, Europa i Japonia). Pod koniec lat 90-tych opublikowano pierwszą pełną sekwencję ludzkiego chromosomu 22 [103]. 25 czerwca 2000 roku w Waszyngtonie prezydent Bill Clinton i premier Tony Blair wspólnie ogłosili uzyskanie wstępnej wersji sekwencji genomu człowieka w ramach projektu publiczno-prywatnego (NIH i Celera) [84]. Wyniki zostały opublikowane w 2001 roku w *Science* [104] i w *Nature* [105].

EPIGENETYKA I PROJEKT POZNANIA EPIGENOMU CZŁOWIEKA

W XIX wieku uważano, że dziedziczenie i rozwój stanowią tą samą problematykę, ale w pierwszej połowie XX

wieku, biologia rozwoju i genetyka stanowiły odrębne dyscypliny [20]. Konrad Waddington, dobrze rozumiejący oba obszary badań, zaproponował dla nich wspólną dyscyplinę, którą nazwał epigenetyką [106]. Można ją określić jako program genetyczny kierujący rozwojem. Dla Waddingtona, nie różniła się ona jednak od embriologii [20]. Początków epigenetyki możemy upatrywać w identyfikacji 5-metylocytozyny jako składnika DNA prątków grzylicy [107]. W 1948 roku Hotchkiss zaobserwował mały punkt na chromatogramach hydrolizatów DNA grasicy cielęcej, który nazwał „epicytozyną” [40]. Sugestia, że metylacja DNA może mieć wpływ na ekspresję genów pojawiła się w latach 70-tych XX wieku [108, 109]. W 1987 roku Robin Holliday zawęził rozumienie epigenetyki do sytuacji, w których zmiany metylacji DNA decydują o aktywności ekspresji genów [110]. Kolejną zmodyfikowaną zasadą wykrytą w DNA była N6-metyloadenina.

Postęp w badaniach epigenetycznych oraz nowe podejścia technologiczne pozwoliły na analizy wzorów metylacji w DNA oraz modyfikacji histonów, zaangażowanych w strukturę i funkcję genomu człowieka [111]. Duże zainteresowanie tą dziedziną doprowadziło do powstania w 2005 roku projektu poznania epigenomu człowieka (HEP, ang. *human epigenome project*). Celem HEP jest identyfikacja chemicznych zmian w elementach chromatyny, które określają funkcjonalność DNA oraz pełniejsze zrozumienie rozwoju fizjologicznego, starzenia, niekontrolowanej ekspresji genów w nowotworach oraz innych chorobach, a także wpływu środowiska na zdrowie człowieka, mimo braku zmian w sekwencji DNA [111]. Obecna definicja epigenetyki mówi, że są to badania zmian dziedzicznych funkcji genomu, które nie zależą od zmian w sekwencji DNA [112]. Rozwijane technologie, takie jak określanie profilu metylacji w oparciu o wykorzystanie żeli, macierzy, sekwencjonowania, a także bisulfidowy PCR, dają nadzieje na określenie wkrótce pierwszego metylomu [113]. Wśród innych projektów i inicjatyw związanych z badaniami epigenetycznymi można wyróżnić Epigenome Network of Excellence (NoE), National Methylome 21 (NAME21), Epigenetic Treatment of Neoplastic Disease (EPITRON), Highthroughput Epigenetic Regulatory Organization in Chromatin (HEROIC), Epigenetic Control of the Mammalian Genome (GEN-AU), AACR Human Epigenome Taskforce, Alliance for the Human Epigenome and Disease (AHEAD) oraz the NIH Roadmap: Epigenomics [113].

DNA W XXI WIEKU

DNA został odkryty 140 lat temu, a biologia molekularna w XIX wieku dopiero stwarzała swoje podstawy. XX wiek przyniósł ogromny postęp wiedzy oraz rozwój no-

wych technik, które pozwoliły na wyodrębnienie nowych obszarów badań, takich jak biotechnologia, medycyna molekularna, kryminologia i inne. Liczba doniesień dotyczących DNA stopniowo wzrasta od początku XX wieku, ale niemalże 80% prac z ponad miliona zostało opublikowanych w ciągu ostatnich 20 lat (Ryc. 5). Wzrost zainteresowania badaniami DNA prawdopodobnie doprowadzi do wielkich odkryć XXI wieku. Możemy zgodzić się z Phoebusem Levene, wielkim biochemikiem, który już w 1931 roku opisał swoją wizję przyszłości biochemii: „I tak, krok po kroku, kolejne tajemnice życia są odkrywane. Nie jest istotne, czy ludzki umysł kiedykolwiek osiągnie stan wysycenia wiedzą dotyczącą doskonałości życia. Jest jednak pewne, że bunt biochemików przeciwko idei ograniczenia ludzkiej ciekawości będzie postępował. Biochemia będzie trwała tak, jakby wiedza, nawet ta dotycząca istoty życia, była dostępna dla ludzkiego pojmowania. Przeszłość pokazała, że rozwiązanie jednego problemu, stawia kolejne pytania. Nowe odkrycia w fizyce, matematyce, chemii teoretycznej, uzupełniają nowe narzędzia biochemii, nowe narzędzia do rozwiązania starych problemów i stworzenia nowych. Tak długo, jak istnieje życie, ludzki umysł będzie tworzył zagadki, a biochemia odegra dużą rolę w ich rozwikłaniu” [114].

PIŚMIENICTWO

- Frias DL (2007) The history of the Mendelian gene. *Riv Biol* 100: 69-92
- Darwin C (1859) On the origin of species by means of natural selection, or preservation of favoured races in the struggle for life, (1st ed.), London, John Murray
- Mendel G (1866) Versuche über Pflanzenhybriden. *Verh Nat forsch Ver Brünn* 4: 3-47
- Correns C (1900) G. Mendels Regeln über das Verhalten der Nachkommenschaft der Rassenbastarde. *Ber Dtsch Bot Ges* 18: 158-168
- de Vries H (1900) Sur la loi de dijonction des hybrids. *Comp Rend Acad Sci Paris* 130: 845-847
- von Tschermak E (1900) Über künstliche Kreuzung bei *Pisum sativum*. *Ber Dtsch Bot Ges* 18: 232-239
- Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS (2003) A vision for the future of genomics research. A blueprint for the genomic era. *Nature* 422: 835-847
- Haeckel E (1866) *Generelle Morphologie der Organismen*. Reimer, Berlin, str. 287-288
- His W (1897) F. Miescher. W: His W (red.) *Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher*, vol. 1 F.C.W. Vogel, Leipzig, str. 5-32
- Dahm R (2005) Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology* 278: 274-288
- Miescher F (1871) Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Medicinischemische Untersuchungen* 4: 441-460
- Vasil IK (2008) A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Rep* 27: 1423-1440
- Griffith F (1928) The significance of pneumococcal types. *J Hyg* 27: 113-119
- Avery OT, MacLeod CM, McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pseudococcus* Type III. *J Exp Med* 79: 137-158
- Fink GR (2005) A transforming principle. *Cell* 120: 153-154
- Pennazio S (2007) Genetics and virology: two interdisciplinary branches of biology. *Riv Biol* 100: 119-146
- Hershey AD, Chase M (1952) Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* 36: 39-56
- Garrod AE (1909) *Innate error of the metabolism*, London, Froude, Hodder and Sloughton 1909, 2nd Edition, Oxford, Oxford University Press 1923
- Beadle GW, Tatum EL (1941) Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci USA* 27: 499-506
- Holliday R (2006) Epigenetics. A historical overview. *Epigenetics* 1: 76-80
- Morgan TH (1926) *The theory of the Gene*, Yale University Press
- Morgan TH (1934) La relación de la genética con la medicina y la fisiología. Conferencia Nobel presentada en Estocolmo el 4 de Junio de 1934. *Genetica* 2: 627-631
- The ENCODE Project Consortium (2004) The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) project. *Science* 22: 636-640
- Gerstein MB, Bruce C, Rozowsky JS, Zheng D, Du J, Korbel JO, Emanuelsson O, Zhang ZD, Weissman S, Snyder M (2007) What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Res* 17: 669-681
- Van Slyke DD, Jacobs W (1945) Biographical memoir of Phoebus Aaron Theodor Levene. *Biogr Mem Natl Acad Sci* 23: 75-86
- Manchester KL (2008) Historical opinion: Erwin Chargaff and his 'rules' for the base composition of DNA: why did he fail to see the possibility of complementarity? *Trends Biochem Sci* 33: 65-70
- Pennazio S, Roggero P (2000) Tobacco mosaic virus RNA as genetic determinant: genesis of a discovery. *Riv Biol* 93: 431-455
- Rich A (2006) Discovery of the hybrid helix and the first DNA-RNA hybridisation. *J Biol Chem* 281: 7693-7696
- Rich A, Davies D (1956) A new two-stranded helical structure: polyadenylic acid and polyuridylic acid. *J Am Chem Soc* 78: 3548-3549
- Rich A (1960) A hybrid helix containing both deoxyribose and ribose polynucleotides and its relation to the transfer of information between the nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 46: 1044-1053
- Doty P, Marmur J, Eigner J, Schildkraut C (1960) Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: physical chemical studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 47: 137-146
- Wang AH-J, Fujii S, van Boo JH, van der Marel GA, van Boeckel SAA, Rich A (1982) Molecular structure of r(GCG)d(TATACGC): a DNA-RNA hybrid helix joined to double helical DNA. *Nature* 299: 601-604
- Belikova AM, Zarytova VF, Grineva NI (1967) Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues. *Tetrahedron Lett* 37: 3557-3562
- Paterson BM, Roberts BE, Kuff EL (1977) Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 4370-4374
- Holley RW, Apgar J, Everett GA, Madison JT, Marquisee M, Merrill SH, Penswick JR, Zamir A (1965) Structure of a ribonucleic acid. *Science* 147: 1462-1465
- Wyatt GR (1951) The purine and pyrimidine composition of deoxy-pentose nucleic acids. *Biochem J* 48: 584-90
- Levene PA, Bass LW (1931) *Nucleic Acids*, Chemical Catalog Company, New York
- Consden R, Gordon AH, Martin AJ (1944) Qualitative analysis of proteins: a Partition chromatographic method using paper. *Biochem J* 38: 224-232
- Vischer E, Chargaff E (1948) The separation and quantitative estimation of purines and pyrimidines in minute amounts. *J Biol Chem* 176: 703-714
- Hotchkiss RD (1948) The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem* 175: 315-332
- Mirsky AE (1943) Chromosomes and nucleoproteins. *Adv Enzymol* 3: 1-34
- Chargaff E, Zamenhof S, Green C (1950) Composition of human deoxy-pentose nucleic acid. *Nature* 165: 756-757
- Chargaff E (1978) *Heraclitean Fire, Sketches from a life before Nature*. Rockefeller University Press

44. Arnott S (2006) Historical article: DNA polymorphism and the early history of the double helix. *Trends Biochem Sci* 31: 349-354
45. Furberg S (1949) The crystal structure of cytidine. *Nature* 164: 22
46. Klug A (2004) The discovery of the DNA double helix. *J Mol Biol* 335: 3-26
47. Watson JD, Crick FHC (1953) A structure for deoxyribonucleic acid. *Nature* 171: 737-738
48. Wilkins MH, Stokes AR, Wilson HR (1953) Molecular structure of deoxyribose nucleic acids. *Nature* 171: 738-40
49. Franklin RE, Gosling RG (1953) Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* 171: 740-741
50. Crick FHC, Watson JD (1954) The complementary structure of deoxyribonucleic acid. *Proc R Soc London A* 223: 80-96
51. Wang AH, Quigley GJ, Kolpak FJ, Crawford JL, van-Boom JH, van der Marel G, Rich A (1979) Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature* 282: 680-686
52. Mirkin SM (2008) Discovery of alternative DNA structures: a heroic decade (1979-1989). *Front Biosci* 13: 1064-1071
53. Crick F (1958) On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol* 12: 138-163
54. Thieffry D (1998) Forty years under the central dogma. *Trends Biochem Sci* 23: 312-316
55. Dounce AL (1953) Nucleic acid template hypotheses. *Nature* 172: 541-542
56. Grierer A, Schramm G (1956) Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. *Nature* 177: 702-703
57. Temin HM, Baltimore D (1981) RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses. *Adv Virus Res* 17: 129-86
58. Berk AJ, Sharp PA (1978) Structure of the adenovirus 2 early mRNAs. *Cell* 14: 695-711
59. Smith CW, Patton JG, Nadal-Ginard B (1989) Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu Rev Genet* 23: 527-577
60. Cattaneo R (1991) Different types of messenger RNA editing. *Annu Rev Genet* 25: 71-88
61. Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136-144
62. Jablonka E, Lamb MJ (1995) Epigenetic inheritance and evolution: the Lamarckian dimension, Oxford University Press
63. Lehman IR (2008) Historical perspective: Arthur Kornberg, a giant of 20th century biochemistry. *Trends Biochem Sci* 33: 291-296
64. Lehman IR, Bessman MJ, Simms ES, Kornberg A (1958) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 233: 163-170
65. Bessman MJ, Lehman IR, Simms ES, Kornberg A (1958a) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. II. General properties of the reaction. *J Biol Chem* 233: 171-177
66. Lehman IR, Zimmerman SB, Adler J, Bessman MJ, Simms ES, Kornberg A (1958b) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. V. Chemical composition of enzymatically synthesized deoxyribonucleic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 44: 1191-1196
67. Lehman IR (2003) Discovery of DNA polymerase. *J Biol Chem* 278: 34733-34738
68. Brutlag D, Schekman R, Kornberg A (1971) A possible role for RNA polymerase in the initiation of M13 DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 2826-2829
69. Schekman R, Wickner W, Westergaard O, Brutlag D, Geider K, Bertsch LL, Kornberg A. (1972) Initiation of DNA synthesis: synthesis of Φ X174 replikative form requires RNA synthesis resistant to rimfampicin. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2691-2695
70. Schekman R, Weiner A, Kornberg A (1974) Multienzyme systems of DNA replication. *Science* 186: 987-993
71. Hanawalt PC (2004) Density matters: the semiconservative replication of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 17889-17894
72. Meselson MS, Stahl FW (1958) The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 44: 671-682
73. Watson JD, Crick FHC (1953) Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171: 964-967
74. Crick FH (1958) On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol* 12: 138-163
75. Crick FH, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ (1961) General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192: 1227-1232
76. Streisinger G, Okada Y, Emrich J, Newton J, Tsugita A, Terzaghi E, Inouye M (1966) Frameshift mutations and the genetic code. This paper is dedicated to Professor Theodosius Dobzhansky on the occasion of his 66th birthday. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 31: 77-84
77. Khorana HG (1965) Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Fed Proc* 24: 1473-1487
78. Crick FH (1966) Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J Mol Biol* 19: 548-555
79. Sanger F, Tuppy H (1951) The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymatic hydrolysates. *Biochem J* 49: 481-490
80. Sinsheimer RL (1959) A single-stranded DNA from bacteriophage phi X174. *J Mol Biol* 1: 43-53
81. Kaiser AD, Hogness DS (1960) The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage lambda-dg. *J Mol Biol* 2: 392-415
82. Wu R, Kaiser AD (1968) Structure and base sequence in the cohesive ends of bacteriophage lambda DNA. *J Mol Biol* 35: 523-537
83. Smith HO, Wilcox KW (1970) A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J Mol Biol* 51: 379-391
84. Hutchison III CA (2007) DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res* 35: 6227-6237
85. Sanger F, Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94: 441-448
86. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265: 687-695
87. Maxam AM, Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 560-564
88. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977 December) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
89. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321: 674-679
90. Gocayne J, Robinson DA, FitzGerald MG, Chung FZ, Kerlavage AR, Lentes KU, Lai J, Wang CD, Fraser CM, Venter JC (1987) Primary structure of rat cardiac beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptors obtained by automated DNA sequence analysis: further evidence for a multigene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8296-8300
91. Sinsheimer RL (2006) To reveal the genomes. *Am J Hum Genet* 79: 194-196
92. Shendure J, Ji H (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotech* 26: 1135-1145
93. Caruthers MH (1985) Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science* 230: 281-285
94. Khorana HG, Agarwal KL, Büchi H, Caruthers MH, Gupta NK, Kleppe K, Kumar A, Ohtsuka E, RayBhandary UL, van der Sade JH, Sgaramella V, Terao T, Weber H, Yamada T (1972) Studies on polynucleotides. CIII. Total synthesis of the structural gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *J Mol Biol* 72: 209-217
95. Arber W, Linn S (1969) DNA modification and restriction. *Annu Rev Biochem* 38: 467-500
96. Morrow JF, Berg P (1972) Cleavage of Simian virus 40 DNA at a unique site by a bacterial restriction enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 3365-3369
97. Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3240-3244

98. Klenow H, Henningsen I (1970) Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 65: 168-175
99. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases. *J Molec Biol* 56: 341-361
100. Brock TD, Freeze H (1969) *Thermus aquaticus*, a nonsporulating extreme thermophile. *J Bact* 98: 289-297
101. Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bact* 174: 1550-1557
102. Mullis KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262: 56-61, 64-65
103. Dunham I, Shimizu N, Roe BA, Chisoe S, Hunt AR, Collins JE, Bruskiewich R i wsp. (1999) The DANN sequence of human chromosome 22. *Nature* 402: 489-495
104. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO i wsp. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351
105. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K i wsp. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921
106. Waddington CH (1939) *Introduction to modern genetics*. Allen and Unwin, London
107. Johnson TB, Coghill RD (1925) Researches on pyrimidines. CIII. The discovery of 5-methyl-cytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the *Tubercle bacillus*. *J Am Chem Soc* 47: 2838-2844
108. Riggs AD (1975) X inactivation, differentiation and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 14: 9-25
109. Holliday R, Pugh JE (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187: 226-232
110. Holliday R (1987) The inheritance of genetic defects. *Science* 238: 163-170
111. Jones PA, Martienssen R (2005) A blueprint for a human epigenome project: the AACR human epigenome workshop. *Cancer Res* 65: 11241-11246
112. Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G (2009) Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 192-206
113. Beck S, Rakyán VK (2008) The methylome: approaches for global DNA methylation profiling. *Trends Genet* 24: 231-237
114. Simoni RD, Hill RL, Vaughan M (2002) The structure of nucleic acids and many other natural products: Phoebus Aaron Levene. *J Biol Chem* 277: 23-24

DNA: from Miescher to Venter and beyond

Marta M. Gabryelska, Maciej Szymański, Jan Barciszewski 

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

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

Keywords: DNA, discovery, structure, gene, sequencing, genetic engineering

ABSTRACT

DNA, one of the most famous molecules is 140 years old. Its history has engaged three centuries of experiments, leading us to a point, where the *Homo sapiens* genome sequence is known. The "DNA breakthrough" is dated on 1953, when James Watson and Francis Crick proposed the model of molecular structure of DNA. But the origin of that great achievement goes back to 1869 and early efforts of Friedrich Miescher, the Swiss doctor, who isolated DNA (than termed nuclein) for the first time. Since that time wealth information on "nuclein", its functions, structure and usage has been collected and formed a basis for modern molecular biology, chemical biology and biotechnology. This article describes the events and circumstances of the most important DNA discoveries since its first isolation up to completing the human genome project and deep DNA sequencing techniques application.

Prace przeznaczone do publikacji w „Postęпах Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych, krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach oraz listów do Redakcji. Redakcja nie ogranicza objętości manuskryptów, jakkolwiek w każdym przypadku zalecana jest zwięzłość stylu, bez utraty jasności przekazu.

Autorzy odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel i rycin (wykresy, schematy, reakcje, wzory chemiczne, fotografie), w uzasadnionych przypadkach kolorowych. W przypadku, gdy Autorzy zamierzają włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów cytowanych prac oryginalnych, do czego Redakcja zachęca, należy uzyskać i przekazać nam zgodę na przedruk, zarówno od autorów, jak i z wydawnictwa. Niemniej konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa jest również mile widziane. Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była publikowana ani nie została zgłoszona do publikacji w innym czasopiśmie, natomiast jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”, jej publikacja w całości lub we fragmentach w innym czasopiśmie wymagać będzie uprzedniej zgody Redakcji.

Redaktor Naczelny lub Redaktor Prowadzący pracę podejmuje decyzję o przyjęciu lub odrzuceniu manuskryptu na podstawie własnej opinii i opinii dwóch niezależnych recenzentów, w ciągu 6 tygodni od momentu otrzymania artykułu. W przypadku, kiedy praca wymaga poprawek odautorskich, Autorzy otrzymują drogą elektroniczną opinię recenzentów i proszeni są o przygotowanie poprawionej wersji manuskryptu i odesłanie go do Redakcji w ciągu 8 tygodni. Ostateczną decyzję o przyjęciu pracy podejmuje Redaktor Naczelny w ciągu 2 tygodni od otrzymania poprawionej wersji manuskryptu.

Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty autorskiej i poinformowania Redakcji o koniecznych zmianach, pocztą elektroniczną lub faksem, w ciągu 3 dni od chwili otrzymania.

Każdy z Autorów otrzymuje jeden egzemplarz numeru „Postępy Biochemii”, w którym ukazał się jego artykuł.

WSKAZÓWKI SZCZEGÓŁOWE:

Przed przystąpieniem do napisania artykułu Autorzy są proszeni o zapoznanie się z najnowszym numerem „Postępy Biochemii”, aby przygotować pracę pod względem edytorskim, językowym oraz jakości materiału ilustracyjnego, które będą odpowiadały aktualnym wymogom Redakcji. Artykuły powinny być pisane językiem naukowym, lecz zrozumiałym dla niespecjalistów. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy winni unikać składni obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie skrótów nawet, jeśli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z prac nadesłanych do Redakcji podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonania skrócenia tekstu i wprowadzenia koniecznych zmian, również w materiale ilustracyjnym.

PRZYGOTOWANIE MANUSKRYPTU:

Prosimy o nadsyłanie prac pocztą elektroniczną. W wyjątkowych przypadkach dopuszcza się przysyłanie prac na dyskietce lub płycie CD. Tekst winien być zapisany jako *.doc w formacie IBM PC, a pliki zawierające ryciny jako: *.tif, *.cdr, *.psd lub *.eps. Tekst powinien być napisany z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami, z użyciem czcionki Times New Roman 12 lub Arial 12. Symbole i znaki specjalne prosimy wstawiać komendą „insert”. W tekście prosimy wskazać miejsce umieszczenia figur i tabel.

ORGANIZACJA MANUSKRYPTU:

Wskazany jest podział artykułu na nienumerowane rozdziały i podrozdziały.

Strona 1 (tytułowa) zawiera tytuł artykułu, imiona i nazwiska Autorów (ze wskazaniem autora korespondującego), tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym, numerem

telefonu i adresem poczty elektronicznej, słowa kluczowe (do 6), wykaz stosowanych skrótów (do 10) w porządku alfabetycznym (ograniczony do niezbędnego minimum) oraz skrócony tytuł pracy (do 25 znaków).

Kolejno numerowane strony obejmują streszczenie (do 150 wyrazów), tekst pracy i piśmiennictwo. Na kolejnych stronach winny być umieszczone tabele oraz tytuły i objaśnienia rycin. Ostatnia strona winna zawierać następujące informacje w języku angielskim: tytuł artykułu, imiona i nazwiska Autorów oraz miejsca pracy, słowa kluczowe (do 6) i krótkie streszczenie artykułu (do 150 wyrazów).

Piśmiennictwo: Należy unikać nadmiernej liczby cytowań oryginalnych prac, odsyłając czytelników w miarę możliwości do artykułów przeglądowych. Redakcja zaleca zacytowanie co najwyżej 70 publikacji, w większości pochodzących z ostatnich 10 lat. Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania. W tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9-26]. Sposób cytowania prac oryginalnych (1) i przeglądowych (2), książek (3), rozdziałów z książek jednotomowych (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady:

1. Jiang QX, Wang ON, MacKinnon R (2004) Electron microscopic analysis of Kv AP voltage-dependent K⁺ channels in an open conformation. *Nature* 430: 806-810
2. Toyoshima C, Inesi G (2004) Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73: 269-292
3. Dołowy K, Szewczyk A, Pikuła S (2003) *Blony biologiczne*, Wydawnictwo Naukowe Ślask, Katowice, Warszawa
4. Michalak M, Nakamura K, Papp S, Opas M (2000) Calreticulin and dynamics of the endoplasmic reticulum lumenal environment, W: Pochet R (red) *Calcium: the molecular basis of calcium action in biology and medicine*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, str. 191-205
5. Darzynkiewicz E, Jankowska-Anyszka M (2000) Struktura i funkcja końca 5' (KAPU) mRNA i U snRNA, W: Koroniak H, Barciszewski J (red) *Na pograniczu chemii i biologii, t IV*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, str. 143-179

Tabele winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami umieszczonymi pod tabelą. Wielkość tabel powinna być dostosowana do szerokości jednego łamu (8,5 cm) lub strony (18 cm).

Ilustracje: ryciny winny być zapisane jako: *.tif, *.cdr, *.psd, lub *.eps. Ryciny powinny być wykonane w skali 1:1. Wielkość ryciny powinna być dostosowana do szerokości jednego łamu (8,5 cm) lub strony (18 cm). Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Opisy na rysunkach powinny być wykonane czcionką Arial 8 p. Ilustracje i tabele prosimy przysyłać w osobnych plikach. Bitmapy (pliki tif, psd) powinny mieć minimalną rozdzielczość 300 dpi dla obrazów kolorowych i skali szarości (zdjęcia czarno-białe) oraz 600 dpi dla ilustracji czarno-białych (schematy, wzory strukturalne zawierające tylko czerni i biel).

Prace w formie elektronicznej prosimy przysyłać na adres: postepy@nencki.gov.pl

W przypadkach uzasadnionych, np. brakiem odpowiedniego oprogramowania, prosimy o przysłanie pracy na dyskietce lub płycie CD; zabezpieczonej przed uszkodzeniem w czasie transportu, na adres:

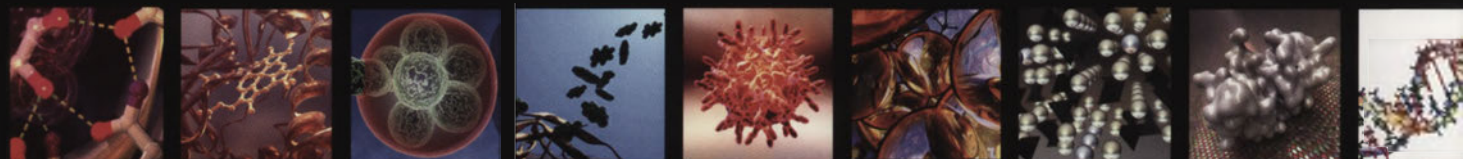
Sławomir Pikuła
redaktor naczelny kwartalnika „Postępy Biochemii”
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Oplata za druk: Zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, od 1 stycznia 2006 roku, Towarzystwo pobiera od Autorów opłatę, pokrywającą częściowo koszt druku artykułu. Oplata za wydrukowanie jednej strony artykułu wynosi 150 zł. Szczegółowe informacje zamieściliśmy pod adresem:

www.postepybiochemii.pl/oplaty.htm

TAN CZOS

Scientific Images



3D images created to order
or choose from the image gallery

www.ScientificImages.co.uk

<http://doi.org/10.1002/chem>

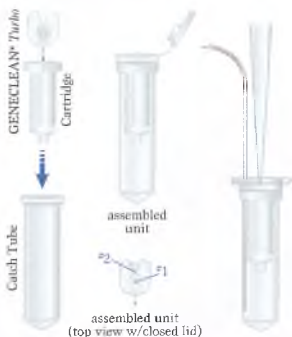
Oczyszczanie DNA i RNA z żelu lub mieszanin reakcyjnych przy pomocy unikalnej technologii

Opatentowana technologia GENE CLEAN® z użyciem GLASSMILK® upraszcza proces oczyszczania DNA do 3 prostych kroków: **BIND** – **WASH** – **ELUTE**.

Nie wymaga precypitacji etanolem, a oczyszczone DNA jest natychmiast gotowe do dalszych aplikacji. Zestawy do oczyszczania dostępne są w trzech różnych formach w zależności od sposobu wiązania macierzy.

Opatentowana technologia turbo cartridge.

Nieregularny kształt składników złoża GLASSMILK® osadzonego w filtrze oraz odpowiednia grubość filtra znacznie zwiększają całkowitą zdolność wiązania DNA.



Cartridge Turbo

Specjalnie zaprojektowana pokrywka wkładu pozwala na dodawanie roztworu #1 bez ciągłego otwierania i zamykania probówki. Drugi otwór #2 w pokrywce umożliwia usuwanie przefiltrowanego roztworu z probówki zbiorczej bez wyciągania wkładu z filtrem.



Nr kat.	Produkt	Ilość reakcji	Zakres wielkości oczyszczonego produktu	Rodzaj materiału	Format	Metoda
1102200	GENE CLEAN® Turbo	50	100 pz - 300 kpz	roztwór lub żel	membrana GENE CLEAN® z macierzą w filtrze typu SPIN	wirowanie lub próżnia
1102400	GENE CLEAN® Turbo	100				
1102600	GENE CLEAN® Turbo	300				
1103200	GENE CLEAN® Turbo for PCR	50	100 pz - 10 kpz	roztwór	membrana GENE CLEAN® z macierzą w filtrze typu SPIN	wirowanie lub próżnia
1103400	GENE CLEAN® Turbo for PCR	100				
1103600	GENE CLEAN® Turbo for PCR	300				
1104200	GENE CLEAN® Turbo 96	1x96	100 pz - 300 kpz	roztwór	membrana GENE CLEAN® z macierzą na 96 dołkowej płytce	wirowanie lub próżnia
1104400	GENE CLEAN® Turbo 96	4x96				
1001200	GENE CLEAN® Kit	200	200 pz - 20 kpz	roztwór lub żel	GENE CLEAN® zawiesina	wirowanie
1001400	GENE CLEAN® II Kit	300				
1001600	GENE CLEAN® III Kit	600				
1101200	GENE CLEAN® SPIN Kit	50	200 pz - 300 kpz	roztwór lub żel	GENE CLEAN® zawiesina + filtr SPIN	wirowanie
1101400	GENE CLEAN® SPIN Kit	100				
1101600	GENE CLEAN® SPIN Kit	300				
1005200	MERmaid® Kit	200	10 pz - 300 pz	roztwór lub żel	GLASSFOG® zawiesina	wirowanie
1105200	MERmaid® SPIN Kit	25	10 pz - 300 pz	roztwór lub żel	GLASSFOG® zawiesina + filtr SPIN	wirowanie
1105600	MERmaid® SPIN Kit	150				
1007200	RNaid® Kit	200	75 z - 10 kz	roztwór lub żel	RNAMATRIX® zawiesina	wirowanie
1107200	RNaid® SPIN Kit	200	75 z - 10 kz		RNAMATRIX® zawiesina + filtr SPIN	wirowanie

Więcej informacji:

www.mpbio.com

abo Grażyna Tarnowska Boreysza
 ul. Podleśna 6a, 80-255 Gdańsk
 Biuro: ul. Wichrowe Wzgórze 123, 80-293 Gdańsk
 tel.: (58) 341 21 43; fax: (58) 520 33 80
 e-mail: abo@abo.com.pl; www.abo.com.pl



Czy firma Merck może poprawić
proces dializy próbek?

D-Tube™ dializery

zapewniają wysoki odzysk białek,
oraz łatwą jednoetapową dializę
bez użycia dodatkowego sprzętu.

That's what's in it for you. Merck Chemicals

Cechy i korzyści:

- Przeznaczone do wymiany buforu oraz usuwania mocznika i detergentów z próbek.
- Dializa próbek o objętości od 10 µl do 20 ml.
- Idealne do elektroelucji białek, kompleksów białko-białko lub białko-DNA, oligonukleotydów oraz DNA i RNA z żeli PAGE (1D i 2D) i agarozowych (tylko pojemności od 10 µl do 3 ml).
- Łatwa jednoetapowa dializa nie wymaga użycia strzykawek ani innego dodatkowego sprzętu.
- Duża powierzchnia dializy ultra-czystych membran, pozbawionych siarki i metali ciężkich.
- Różne wartości punktu odcięcia od 3,5 kDa do 14 kDa.
- Wysoki wskaźnik odzysku próbek po dializie > 97%.
- Wysoki odzysk próbek po elektroelucji:
 - ▲ 60% odzysk białek w mniej niż 2 h,
 - ▲ 90% odzysk oligonukleotydów, RNA i DNA o długości od 15 nt do 80 kbp.
- Dializery pozbawione są DNaz, RNaz i proteaz.
- Próbkki oczyszczone po elektroelucji mogą być używane w dalszych aplikacjach np.: MALDI-MS i HPLC.

Zapraszamy do sklepu internetowego
<http://mecommm.merck.pl>

