POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2005
TOM 51
NUMER 2

50 lat Postępów Biochemii

Przełączniki RNA

Naprawa DNA przez wycinanie zasad

Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami

90-lecie urodzin Pani Profesor Zofii Zielińskiej

PL ISSN 0032-5422
Indeksowane w Medline /PubMed
www.postepybiochemii.pl

http://rcin.org.pl

XL

Lublin, 19-23 września 2005 r.

Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

PTBioch XL ZJAZD LUBLIN 2005

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE - OD 1958 -

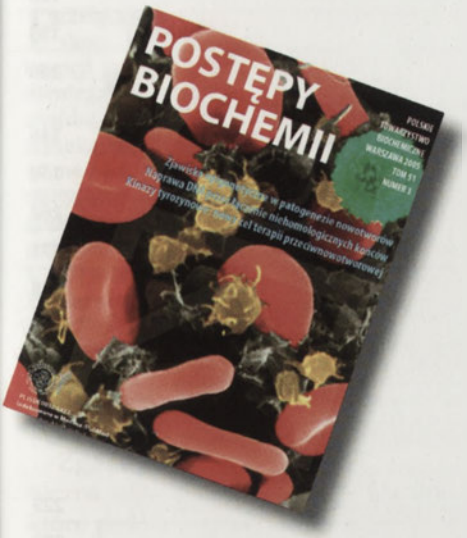
PAN LUBLIN

www.umcs.lublin.pl/ptb2005

http://rcin.org.pl

S P I S T R E Ś C I

Postępy Biochemii – vol. 51, nr 2, 2005



W NASTĘPNYM NUMERZE:

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Zjawiska epigenetyczne w patogenezie nowotworów: Nowe możliwości profilaktyki i terapii?
Jarosław Paluszczak, Wanda Baer-Dubowska

Naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców
Tomasz Popławski, Janusz Błasiak

Kinazy tyrozynowe: Nowy cel terapii przeciwnowotworowej
Ireneusz Majsterek, Dariusz Pytel, Janusz Błasiak

Choroby związane z agregacją białek
Daniel Bąk, Michał Milewski

Rysunek na okładce:

Bakterie *Escherichia coli* (wykorzystano za zgodą Dr Glenna H. Coultera, Marketing and Licensing Manager, A Director Office of Intellectual Property and Commercialization Agriculture and Agri-Food Canada/ Agriculture et Agroalimentaire Canada; http://res2.agr.ca/lethbridge/emia/SEM-proj/Ecoli_f.htm).

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Przełączniki RNA 111
Katarzyna Bugała, Marek Żywicki, Eliza Wyszko, Mirosława Z. Barciszewska, Jan Barciszewski

Naprawa DNA przez wycinanie zasad 120
Tomasz Śliwiński, Janusz Błasiak

Eukariotyczne polimerazy DNA 130
Agnieszka Czechowska, Janusz Błasiak

Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami 140
Michał Błażej Ponczek, Barbara Wachowicz

Rola białek opiekuńczych *Escherichia coli* w ochronie komórki bakteryjnej przed nieodwracalną agregacją białek indukowaną termicznie 146
Sabina Kędzierska

Acetylocholinoesteraza – rola w apoptozie komórek nerwowych, chorobach neurologicznych i białaczce 154
Bożena Bukowska

Lizosomalna karboksypeptydaza A 162
Marek Gacko, Anna Worowska, Arkadiusz Woźniak, Monika Jedynak, Bogusław Panek, Radosław Łapiński

Roślinne układy ubikwitylacji i degradacji białek w proteasomach, kluczowymi elementami hormonalnych szlaków sygnałowych 171
Stanisław Kowalczyk, Emilia Hadowska, Anna Piekarska

Roślinne kinazy białkowe stymulowane wapniem 188
Krzysztof Jaworski, Adriana Szmidt-Jaworska, Jan Kopcewicz

Mechanizmy i regulacja przyswajania żelaza i hemu przez bakterie gramujemne 198
Katarzyna Siudeja, Teresa Olczak

FORUM MŁODYCH BIOCHEMIKÓW

Charakterystyka antygenów i czynników wzrostu śródbłonka limfatycznego 209
Halina Waś

Agregacja a toksyczność białek z powtórzeniami polyQ 215
Paweł Leźnicki

WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

V Konferencja im. J. Parnasa, Kijów 2005 223

50-lecie Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie 225

http://rcin.org.pl

C O N T E N T S

ADVANCES IN BIOCHEMISTRY VOL. 51, NR 1, 2005

REVIEWS

Riboswitches	111
Base excision repair	120
Eukaryotic DNA polymerases	130
Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with proteins	140
A role of *Escherichia coli* molecular chaperones in protection of bacterial cell against irreversible aggregation induced by heat shock	146
Acetylcholinesterase - apoptosis induction, role in neurological diseases and leukemia	154
Lysosomal carboxypeptidase A	162
Plant ubiquitylation and proteolytic systems, the key elements in hormonal signaling pathway	171
Plant protein kinases stimulated by calcium	188
Mechanisms and regulation of iron and heme utilization in Gram-negative bacteria	198
Characterization of markers and growth factors for lymphatic endothelium	209
Aggregation and toxicity of the proteins with polyQ repeats	215

EVENTS/OPINIONS/COMMENTS

V Parnas Conference, Kiev 2005	223
50th Anniversary of the Institute of Biochemistry and Biophysics	225

DZIEWIĘĆDZIESIĄTE URODZINY PANI PROFESOR ZOFII ZIELIŃSKIEJ

Jeśli komuś daleko do Lwowa, aż strach, jak pisze we wstępie do trzeciego tomu swojego Alfabetu Lwowskiego Jerzy Janicki, to na pewno nie profesor Zofii Zielińskiej, redaktorowi seniorowi „Postępów Biochemii", a w latach 1973 – 2000 redaktorowi naczelnemu naszego kwartalnika, która 29 lipca tego roku obchodzi Swoje Dziewięćdziesięciolecie.

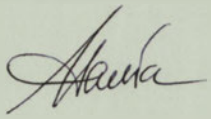
To Pani oddała w nasze ręce, parafrazując Mariana Hemara „chorągwi drzewce, byśmy ją cało nieśli do domu", to Pani nałożyła na nas odpowiedzialność za losy czasopisma w przyszłości. To duży ciężar, ale będziemy go dźwigali z godnością, pamiętając, że naukowe czasopiśmiennictwo w języku polskim to także część naszej narodowej spuścizny.

W dniu Pani Urodzin, oprócz życzeń wielu lat w zdrowiu, naręczy kwiatów, uśmiechów i uścisków, a także podziękowań za tyle lat poświęconych Polskiemu Towarzystwu Biochemicznemu oraz „Postępom Biochemii" - Autorom, Czytelnikom i Redaktorom czasopisma - w Ich imieniu oraz w imieniu Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego do życzeń dołączam fragment książki Jerzego Janickiego mówiący o nieznanej bliżej stronie Pani Profesor zainteresowań historią polskiej nauki. A przecież korzenie polskiej nauki tkwią, oprócz Krakowa, Paryża, Warszawy, Berlina, Londynu i Zurichu, także na Uniwersytecie Jana Kazimierza we Lwowie, świetnej uczelni, której profesorem w latach 1920-1941 był Jakub Karol Parnas. Jerzy Janicki pisze o tym na stronie 137 wspomnianej książki w następujący sposób:

„... na zebraniu członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, które odbyło się w Łodzi w dniu 6 września 1963 r. zapadła uchwała następującej treści: - III zwyczajne Walne Zebranie Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego postanowiło, iż doroczna nagroda Towarzystwa za najlepszą pracę doświadczalną z zakresu biochemii, wykonaną w kraju nazywać się będzie nagrodą imienia JAKUBA KAROLA PARNASA, jednego z największych biochemików polskich i światowych, nauczyciela i wychowawcy polskich kadr biochemicznych.

W długim rejestrze tych ‚kadr biochemicznych' (...) znajduje się dziś m.in. profesor Leszek Tomaszewski w Warszawie, doktor Włodzimierz Antyporowicz, emerytowany dziś ordynator Centralnego Szpitala Kolejowego w Międzylesiu pod Warszawą, profesor PAN Bronisław Halikowski, wrocławski profesor Tadeusz Baranowski, profesor Tadeusz Korzybski, którego powojenne prace umożliwiały produkcję polskiej penicyliny. Pierwsi trzej byli uczestnikami wspomnianej sesji naukowej, poświęconej pamięci ich mistrza, a ich referaty pomieszczone w 38 numerze czasopisma ‚Postępy Biochemii', z których korzystałem przy opracowaniu tej noty, udostępniła mi profesor Zofia Zielińska – prawdziwa skarbnica wiedzy o Parnasie. To z jej zbiorów pochodzą taśmy z nagranymi wspomnieniami Parnasa-juniora (...)", doktora Jana Oskara Parnasa (zmarł w 1995 roku), ordynatora oddziału chirurgicznego w Człuchowie".

Przedrukowano za zgodą Autora; Jerzy Janicki „A do Lwowa daleko aż strach...", tom 3 Alfabetu Lwowskiego wydany po raz pierwszy w 1996 roku przez Polską Oficynę Wydawniczą „BGW" w Warszawie.



Sławomir Pikuła

Redaktor naczelny: Sławomir Pikuła; e-mail: s.pikula@nencki.gov.pl, **Redaktor senior:** Zofia Zielińska
Redaktorzy: Joanna Bandorowicz-Pikuła, Jolanta Barańska, Grzegorz Bartosz, 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, Marek Zembala, Krzysztof Zabłocki, Alicja Żylicz
Redakcja: Hanna Laskowska (Sekretarz), e-mail: h.laskowska@nencki.gov.pl, tel. (022) 5892441; dyżur sekretarza redakcji: poniedziałki, czwartki, godz. 14-16; Skład i łamanie: Małgorzata Basaj
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 Informatyzacji, "Postępy Biochemii" są indeksowane w Medline i Agrolibrex. Nakład 850 egz.

http://rcin.org.pl

Przełączniki RNA

STRESZCZENIE

Przełączniki RNA (ryboprzełączniki, ang. *riboswitches*) są to struktury RNA wiążące niskocząsteczkowe metabolity i regulujące ekspresję genów zarówno na poziomie transkrypcji jak i translacji. Występują one przede wszystkim u bakterii, w regionach mRNA nieulegających translacji (UTR), przy końcu 5'. U *Bacillus subtilis* około 2% całego genomu znajduje się pod kontrolą przełączników RNA. Wiązanie metabolitów charakteryzuje się wysoką specyficznością i w niektórych przypadkach ma charakter kooperatywny. Obecnie znane są ryboprzełączniki wiążace mononukleotyd flawinowy, tiaminę i pirofosforan tiaminy, adenozylokobalaminę, S-adenozylometioninę, lizynę, glicynę, adeninę i guaninę oraz glukozoamino-6-fosforan. Niektóre z nich, np. element wiążący pirofosforan tiaminy występują również u grzybów (*Neurospora crassa*) oraz u roślin (*Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*). U człowieka zidentyfikowano dotychczas jeden przełącznik RNA, wiążący 2-aminopurynę. Występowanie przełączników RNA we wszystkich grupach taksonomicznych wskazuje na ich odległe pochodzenie ewolucyjne. Sugeruje ponadto pytanie o ich udział w regulacji ekspresji genów u wyższych *Eukaryota*, a w szczególności u człowieka.

WPROWADZENIE

Zgodnie z podstawowym dogmatem biologii molekularnej informacja genetyczna zakodowana w DNA przekazywana jest do RNA, a następnie do białek, które pełnią funkcje enzymatyczne, transportujące i regulatorowe. Ten prosty model został znacznie wzbogacony po odkryciu właściwości katalitycznych RNA. U wielu organizmów stwierdzono, że cząsteczki RNA wpływają bezpośrednio na takie procesy, jak hydroliza RNA, składanie RNA czy translacja, a niekodujące RNA (ncRNA) zaangażowane są w regulację ekspresji genów, zarówno na poziomie DNA, RNA, jak również białka [1-3].

Do szerokiego spektrum właściwości RNA w ostatnim czasie doszło jeszcze specyficzne wiązanie niskocząsteczkowych metabolitów komórkowych. Ta cecha umożliwia cząsteczkom mRNA samoregulację transkrypcji lub translacji. W konsekwencji cały proces może odbywać się bez udziału dodatkowych czynników białkowych. Funkcje te realizowane są przez niekodujące regiony mRNA (UTR, ang. *untranslated region*) w układzie *cis*, które tworzą motywy strukturalne wiążące poszczególne metabolity. Wiązanie to indukuje zmiany struktury niekodującego regionu mRNA oraz aktywację lub represję translacji czy transkrypcji. Regulacja ekspresji genów kodujących białka odbywa się poprzez odwracalne blokowanie znajdującej się w obrębie UTR sekwencji RBS (ang. *ribosome binding site*) stanowiącej miejsce przyłączenia mRNA do rybosomu. Możliwe jest również utworzenie, jeszcze na etapie transkrypcji, alternatywnej spinki atenuacyjnej będącej sygnałem terminacji transkrypcji u *Prokaryota*. Cząsteczki RNA wiążące metabolity nazywa się przełącznikami RNA (ryboprzełącznikami) (ang. *riboswitch*). Większość zidentyfikowanych do tej pory ryboprzełączników znaleziono u organizmów prokariotycznych.

STRUKTURA PRZEŁĄCZNIKÓW RNA

W obrębie struktury drugorzędowej wszystkich poznanych do tej pory przełączników RNA wyróżnić można następujące elementy: podstawowy trzon, centralną multipętlę oraz dodatkowe elementy strukturalne o charakterze spinki do włosów (Rys. 1). W oddziaływania trzeciorzędowe oraz w wiązanie ligandu zaangażowane są najprawdopodobniej regiony pojedynczoniciowe [4-6].

Ryboprzełączniki posiadają dwie domeny funkcjonalne: jest to element wiążący naturalny ligand lub aptamer oraz „platforma ekspresyjna", której konformacja wpływa na ekspresję genu [7]. Podobnie jak w przypadku aptamerów, przyłączenie ligandów do przełączników RNA jest „wiązaniem przystosowawczym" (ang. *adaptive binding*), polegającym na indukowanym „dopasowaniu"

Katarzyna Bugała
Marek Żywicki
Eliza Wyszko
Mirosława Z. Barciszewska
Jan Barciszewski✉

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

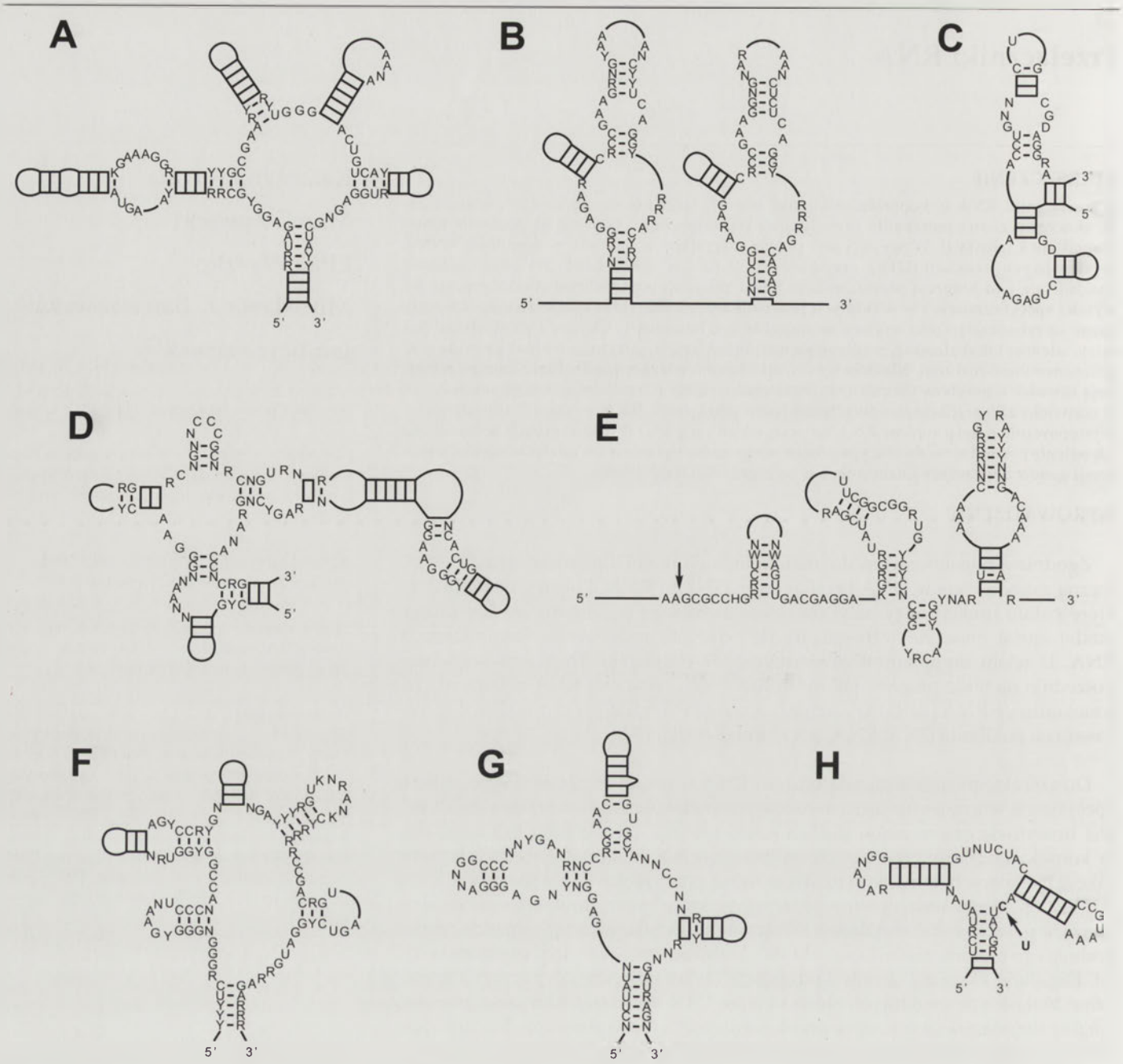
✉Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań; e-mail: Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl; tel. (61) 852 85 03

Artykuł otrzymano 28 października 2004
Artykuł zaakceptowano 28 grudnia 2004

Słowa kluczowe: przełączniki RNA, regulatorowe RNA, niekodujące RNA, regulacja ekspresji genów, transkrypcja, translacja

Wykaz skrótów: Ado-Cbl – adenozylokobalamina; FAD – dinukleotyd flawinoadeninowy; FMN – mononukleotyd flawinowy; GlcN6P – 6-fosfoglukozoamina; GTP – guanozynotrifosforan; ncRNA – niekodujące RNA; PKR – RNA-zależna kinaza białkowa; RBS – miejsce wiązania rybosomu; SAM – S-adenozylometionina; SD -sekwencja Shine-Dalgarno; TNFα – czynnik martwicy nowotworu; TPP – pirofosforan tiaminy; UTR – niekodujący region mRNA

http://rcin.org.pl



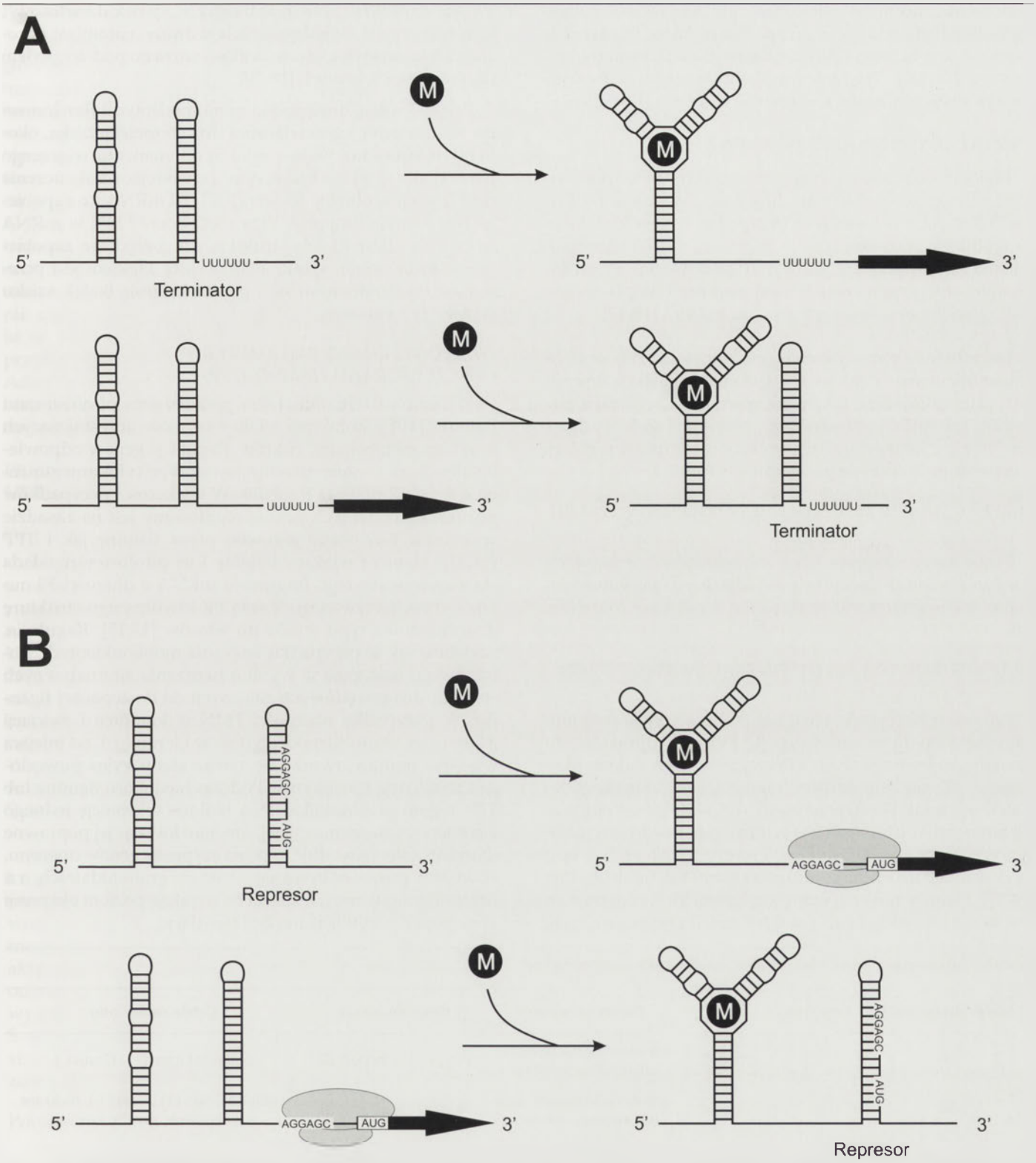
Rysunek 1. Znane bakteryjne motywy strukturalne RNA wiążące metabolity: A) lizynę, B) glicynę, C) pirofosforan tiaminy, D) adenozynokobalaminę, E) glukozoamino-6-fosforan (rybozymalnej, miejsce cięcia zaznaczono strzałką), F) mononukleotyd flawinowy, G) S-adenozylometioninę oraz H) guaninę i adeninę (kluczowy dla specyficzności nukleotyd - dla wiązania guaniny C, a dla wiązania adeniny U, zaznaczono pogrubioną czcionką i strzałką). Dokładne miejsca wiązania ligandów do przedstawionych struktur nie są znane.

struktury RNA do ligandu [8]. Zmiany strukturalne przenoszone są na platformę ekspresyjną, co prowadzi do modulacji poziomu ekspresji określonego genu. Domeny wiążące ligandy są wysoce zachowawcze w odległych od siebie ewolucyjnie organizmach, natomiast platforma ekspresyjna wykazuje pewne różnice w sekwencji, strukturze, jak również mechanizmie działania u różnych organizmów. To właśnie w obrębie tej platformy następuje tworzenie struktur modulujących ekspresję danego genu w zależności od dostępności metabolitu w środowisku.

MECHANIZM DZIAŁANIA PRZEŁĄCZNIKÓW RNA

Zmiana struktury mRNA indukowana wiązaniem niskocząsteczkowego metabolitu może powodować dwojakie konsekwencje w regulacji ekspresji genu (Rys. 2) [5,9-13]. Polegają one na kontroli przedwczesnej terminacji transkrypcji (atenuacja) w wyniku asocjacji ligandów z terminatorem transkrypcji, antyterminatorem i anty-antyterminatorem. Terminator ma strukturę spinki do włosów zakończonej sekwencją poli U. W przypadku represji transkrypcji, podczas niedoboru metabolitu część sekwencji terminatora oddziałuje z antyterminatorem, co pozwala na prawidłowy przebieg transkrypcji i powstanie transkryptu o pełnej długości. Po związaniu ligandu struktura antyterminatora w mRNA ulega zaburzeniu. Powoduje to utworzenie odpowiedniej konformacji terminatora, a następnie dysocjację polimerazy RNA za sekwencją poli U i w efekcie powstanie skróconego, niekodującego transkryptu (Rys. 2A). Regula-

http://rcin.org.pl



Rysunek 2. Sposoby regulacji ekspresji genów poprzez formowanie alternatywnych struktur drugorzędowych RNA pod wpływem wiązania metabolitów. A) Regulacja na poziomie transkrypcji poprzez tworzenie alternatywnej spinki atenuacyjnej (terminatora) pod wpływem wiązania metabolitu (M). Przykłady ilustrują aktywację oraz przedwczesną terminację transkrypcji. B) Regulacja na poziomie translacji odpowiednio poprzez uwalnianie lub blokowanie sekwencji Shine – Dalgarno i kodonu inicjatorowego pod wpływem wiązania metabolitu (M). Nie związana sekwencja Shine – Delgarno pozwala na przyłączenie rybosomu i rozpoczęcie translacji.

cja poprzez aktywację transkrypcji jest przeciwieństwem opisanego procesu. Struktura spinki atenuacyjnej występuje w sytuacji niedoboru ligandu, natomiast związanie metabolitu powoduje jej rozplecenie i umożliwia transkrypcję pełnej długości mRNA.

W przypadku drugiego typu regulacji polegającej na inhibicji translacji, modulacji podlega dostępność sekwencji Shine-Dalgarno (RBS) oraz kodonu AUG. Jeśli region ten uwikłany jest w strukturę drugorzędową jest on niedostępny dla rybosomu, co prowadzi do inhibicji translacji. Jego

http://rcin.org.pl

uwolnienie natomiast powoduje natychmiastową ekspresję białka. Podobnie jak w przypadku regulacji transkrypcji znane są przełączniki RNA działające jako aktywatory i represory translacji. Wiązanie metabolitu umożliwia uwolnienie lub związanie miejsca wiązania rybosomu (Rys. 2B).

PRZYKŁADY PRZEŁĄCZNIKÓW RNA

Biologiczne znaczenie ryboprzełączników może potwierdzać ich rozpowszechnienie i duża zachowawczość w obrębie *Prokaryota*, a w niektórych przypadkach również u *Eukaryota* [10]. Poszczególne typy przełączników RNA występują wielokrotnie w genomie jednego organizmu, np. 69 genów *Bacillus subtilis* regulowanych jest poprzez ryboprzełączniki, co stanowi ok. 2% całego genomu bakterii [10-12].

Dotychczas elementy o charakterze przełączników RNA zidentyfikowano u blisko 100 gatunków bakterii wszystkich grup taksonomicznych, jak również w regionach niekodujących mRNA archebakterii, grzybów i niektórych roślin [10,13]. Znane ryboprzełączniki oraz ich rolę w regulacji metabolizmu bakteryjnego zebrano w Tabeli 1.

PRZEŁĄCZNIKI W KONTROLI METABOLIZMU WITAMIN

Pierwsze przełączniki RNA zaangażowane w regulację poziomu ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę witamin, zidentyfikowano w *B.subtilis*, *E.coli* oraz *Rhizobium etli*.

WIĄZANIE MONONUKLEOTYDU FLAWINOWEGO (FMN)

Witamina B2 (ryboflawina) jest prekursorem koenzymu-mononukleotydu flawinowego (FMN) oraz dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD). Przełącznik RNA zidentyfikowano w 300 nukleotydowym fragmencie niekodującego rejonu 5' operonu ryboflawinowego (*rib*), kodującego pięć białek biorących udział w szlaku syntezy ryboflawiny z guanozynotrifosforanu (GTP) u *B. subtilis* oraz *E. coli*. FMN wiąże się do fragmentu mRNA o długości około 140 nukleotydów [14-17]. Element ten nazywany jest kasetą *rfn*. Występuje on również u innych bakterii gramdodatnich i gramujemnych. W jego strukturze wyróżnić można 5 „spinek do włosów", z których trzy są wyjątkowo zachowawcze, natomiast pozostałe wykazują większą zmienność zarówno pod względem długości jak i sekwencji [18-20].

Przy wysokiej dostępności mononukleotydu flawinowego w komórce i jego związaniu do ryboprzełącznika, około 60 nukleotydów w kierunku 3' od elementu wiążącego tworzy się spinka atenuacyjna, powodująca zakończenie transkrypcji w obrębie sekwencji 5'UTR mRNA, co zapobiega tym samym ekspresji. Przy niedoborze FMN w mRNA tworzy się alternatywna struktura drugorzędowa zapobiegająca formowaniu spinki atenuacyjnej. Efektem jest przepisanie całego operonu *rib* i pełna ekspresja białek szlaku syntezy ryboflawiny.

WIĄZANIE TIAMINY (WITAMINY B1) I PIROFOSFORANU TIAMINY (TPP)

Witamina B1 (tiamina) jest prekursorem pirofosforanu tiaminy (TPP), kofaktora wielu enzymów uczestniczących w szlaku metabolizmu cukrów. Regulacja genów odpowiedzialnych za syntezę tiaminy jest dobrze udokumentowana u *E.coli*, *R.etli* oraz *B.subtilis*. W większości przypadków poziom ekspresji tych genów regulowany jest na zasadzie sprzężenia zwrotnego zarówno przez tiaminę jak i TPP [21,22]. Element wiążący tiaminę i jej pirofosforan składa się z zachowawczego fragmentu mRNA o długości 39 nukleotydów, nazywanego kasetą *thi* i tworzącego strukturę drugorzędową typu spinki do włosów [13,15]. Regulacja, podobnie jak w przypadku wiązania mononukleotydu flawinowego następuje w wyniku tworzenia alternatywnych struktur drugorzędowych zależnych od dostępności ligandu. W przypadku obecności FMN w komórce i asocjacji z kasetą *thi*, około 30 nukleotydów w kierunku 3' od miejsca wiązania tiaminy, tworzy się spinka atenuacyjna powodująca terminację transkrypcji. Podczas niedoboru tiaminy lub TPP region przełącznika RNA blokuje sekwencję jednego z ramion spinki atenuacyjnej, uniemożliwiając jej poprawne uformowanie. Powoduje to pełną ekspresję genów operonu. Powyższy proces odbywa się u bakterii gramdodatnich, a u bakterii gramujemnych kaseta *thi* reguluje poziom ekspresji genu poprzez inhibicję inicjacji translacji.

Tabela 1. Ryboprzełączniki i ich rola w regulacji metabolizmu komórki bakteryjnej

Metabolit (ligand)	Prekursor	Sensor RNA	Proces docelowy	Geny docelowe	Gdzie znaleziono
FMN	B2	rfn-box	zakończenie transkrypcji lub inicjacja translacji	synteza i transport B2	bakterie Gram (+) i Gram (-)
TPP	B1	thi-box	zakończenie transkrypcji lub inicjacja translacji	synteza i transport B1	bakterie Gram (+) i Gram (-), niektóre archebakterie, grzyby i rośliny
Ado-Cbl	B12	B12-box	zakończenie transkrypcji i/lub inicjacja translacji	synteza i transport B12	bakterie Gram (+) i Gram (-)
SAM	Met	S-box	zakończenie transkrypcji	metabolizm siarki	bakterie Gram (+)
lizyna	N/A	L-box	zakończenie transkrypcji	LysC	bakterie Gram (+) i Gram (-)
glicyna	N/A	VCI-II	zakończenie transkrypcji	gcvT	*Bacillus subtilis*
guanina, hipoksantyna	N/A	G-box	zakończenie transkrypcji i atenuacja	metabolizm i transport puryn	bakterie Gram (+)

http://rcin.org.pl

WIĄZANIE ADENOZYLOKOBALAMINY (ADO-CBL)

Elementy wiążące Ado-Cbl znajdują się w obrębie dwóch głównych operonów kodujących białka odpowiedzialne za transport i syntezę kobalaminy. Taki system regulatorowy funkcjonuje u *E. coli* oraz bakterii z rodzaju *Salmonella*. Za wiązanie ligandu odpowiedzialny jest fragment 25-nukleotydowy, zwany kasetą B_{12}. Podobnie, jak w przypadku tiaminy i mononukleotydu flawinowego, wiązanie ligandu do elementu przełącznika RNA powoduje represję ekspresji genu, jednak regulacja odbywa się zarówno na poziomie transkrypcji jak i translacji [4,23,24]. Element wiążący adenozylokobalaminę w stanie wolnym znajduje się w pobliżu sekwencji Shine-Dalgarno (SD), odpowiedzialnej za wiązanie mRNA do rybosomu. Sekwencja SD nie bierze udziału w tworzeniu struktury drugorzędowej, co umożliwia przyłączenie rybosomu i translację. W momencie związania Ado-Cbl do ryboprzełącznika następuje rearanżacja struktury prowadząca do zablokowania sekwencji Shine-Dalgarno i represję translacji.

PRZEŁĄCZNIKI RNA W KONTROLI METABOLIZMU AMINOKWASÓW

WIĄZANIE S-ADENOZYLOMETIONINY (SAM)

S-adenozylometionina jest kluczowym koenzymem u wielu organizmów. Jest syntetyzowana bezpośrednio z metioniny przez syntetazę SAM i jest donorem grup metylowych dla modyfikacji białek i kwasów nukleinowych. U *B. subtilis* zidentyfikowano 11 operonów zawierających 26 genów podlegających kontroli poprzez ryboprzełącznik wiążący S-adenozylometioninę [25]. Charakteryzują się one obecnością w rejonie 5'UTR zachowawczego motywu sekwencyjnego nazywanego kasetą S (ang. *S-box*) [25,26]. Większość z tych genów zaangażowana jest bezpośrednio w metabolizm siarki, biosyntezę cysteiny i metioniny oraz S-adenozylometioniny.

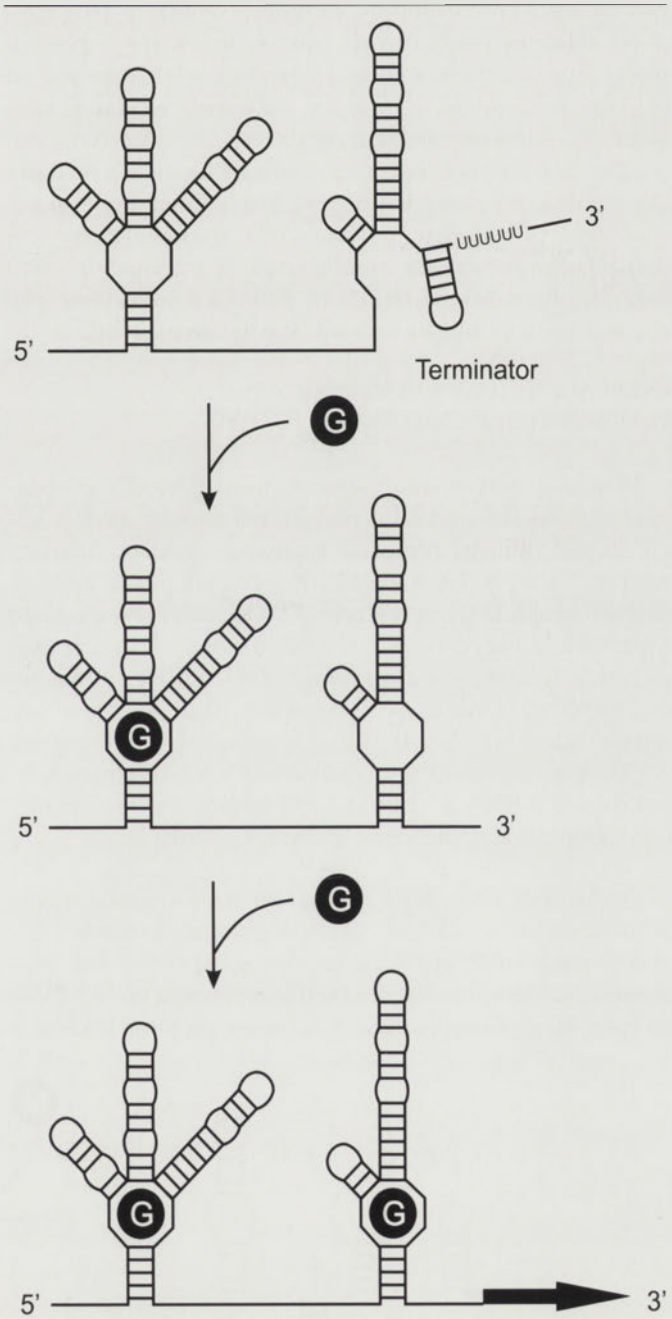
Regulacja ekspresji realizowana jest na poziomie transkrypcji, a jej mechanizm podobny jest do tego z udziałem mononukleotydu flawinowego i tiaminy. Brak SAM powoduje rearanżację struktury przełącznika RNA, uniemożliwiając tworzenie spinki atenuacyjnej i tym samym aktywując transkrypcję pełnego genu. Wiązanie SAM do odpowiedniej sekwencji jest procesem odznaczającym się wysoką specyficznością. Cząsteczki takie jak metionina lub S-adenozylohomocysteina, pomimo wysokiego podobieństwa do SAM nie mają wpływu na kontrolę ekspresji realizowaną przy pomocy tego mechanizmu [27-29].

WIĄZANIE LIZYNY

Przełączniki RNA wiążące lizynę występują w niekodujących regionach wielu genów związanych z biosyntezą tego aminokwasu u bakterii. Ich sekwencje 5'UTR zawierają wysoce konserwatywne kasety sekwencyjne oraz posiadają podobną strukturę drugorzędową regionu, w którym zlokalizowany jest ryboprzełącznik [7,30]. Pomimo tak wysokiej zachowawczości, mechanizm działania przełącznika RNA jest inny u bakterii gramdodatnich i gramujemnych. U pierwszej grupy organizmów polega on na powstaniu spinki atenuacyjnej oraz rearanżacji struktury prowadzącej do aktywacji transkrypcji pełnej długości mRNA po związaniu lizyny. U bakterii gramujemnych, przy niedoborze lizyny ryboprzełącznik oddziałuje z fragmentem UTR mRNA, blokującym sekwencję Shine-Dalgarno w stanie związania ligandu. W obu tych przypadkach brak lizyny powoduje w efekcie aktywację ekspresji genów związanych z biosyntezą tego aminokwasu [30,31].

WIĄZANIE GLICYNY

Przełącznik RNA wiążący glicynę znajduje się w regionach niekodujących genów odpowiedzialnych za katabolizm glicyny i włączenie jej do cyklu kwasu cytrynowego jako substratu energetycznego. Regulacja ekspresji białka odbywa się poprzez tworzenie spinki atenuacyjnej w przy-



Rysunek 3. Regulacja transkrypcji poprzez kooperatywne wiązanie dwóch cząsteczek glicyny. Związanie pierwszej cząsteczki powoduje zmiany strukturalne w obrębie drugiej domeny wiążącej, co umożliwia przyłączenie drugiej cząsteczki glicyny i aktywację transkrypcji pełnej długości mRNA.

http://rcin.org.pl

padku niedoboru glicyny. Ryboprzełącznik ten, w odróżnieniu od innych znanych tego typu elementów, wiąże dwie cząsteczki glicyny [32]. Jest to możliwe dzięki występowaniu dwóch podobnych do siebie motywów wiążących w ściśle określonej odległości od siebie. Wykazano, że wiązanie glicyny odbywa się w sposób kooperatywny, charakterystyczny dla białek (Rys. 3).

PRZEŁĄCZNIKI RNA W KONTROLI METABOLIZMU ADENINY I GUANINY

Pięć operonów kodujących białka szlaków biosyntezy, konwersji i transportu puryn u *B.subtilis* podlega regulacji poprzez przełączniki RNA [10]. W wiązaniu adeniny, guaniny oraz hipoksantyny biorą udział struktury RNA o długości około 70 nukleotydów, formujące strukturę drugorzędową składającą się z dwóch „spinek do włosów" spiętych helisą. Specyficzność wiązania ligandu uzależniona jest od jednego nukleotydu w obrębie sekwencji wiążącej, tzw. kasety G. Zamiana cytozyny w pozycji 74 na urydynę powoduje zmianę specyficzności wiązania ligandu z guaniny lub hipoksantyny na adeninę [14]. Mechanizm regulacji jest typowym przykładem powstawania spinki atenuacyjnej poniżej sekwencji wiążącej nukleotyd. W przypadku braku ligandu alternatywna struktura blokująca możliwość powstania spinki, umożliwia transkrypcję całego genu.

PRZEŁĄCZNIKI RNA UCZESTNICZĄCE W BIOSYNTEZIE ŚCIANY KOMÓRKOWEJ

Wiązanie glukozoamino-6-fosforanu (GlcN6P), podstawowego składnika budulcowego bakteryjnej ściany komórkowej, odbiega nieco od typowego modelu regulacji poprzez ryboprzełączniki [12]. Przełącznik RNA wiążący GlcN6P znajduje się w regionie 5'UTR mRNA związanego z genem kodującym białko odpowiedzialne za syntezę tego związku. Rearanżacja struktury 5' UTR mRNA odpowiedzialnej za wiązanie GlcN6P aktywuje znajdujący się w tym rejonie rybozym (Rys. 4) [12]. Aktywność tego rybozymu w układzie *cis* powoduje hydrolizę mRNA, skrócenie czasu półtrwania mRNA z 4 minut do 15 sekund i w efekcie niemal całkowite zahamowanie biosyntezy białka.

Przełącznik RNA dla GlcN6P wykazuje wysoką specyficzność - analogi GlcN6P takie jak glukozo-6-fosforan czy glukozoamina nie wpływają na aktywację rybozymu. Mechanizm ten jest przykładem bardzo efektywnego i szybkiego sposobu regulacji poprzez sprzężenie zwrotne [33,34].

PRZEŁĄCZNIKI RNA U *Eukaryota*

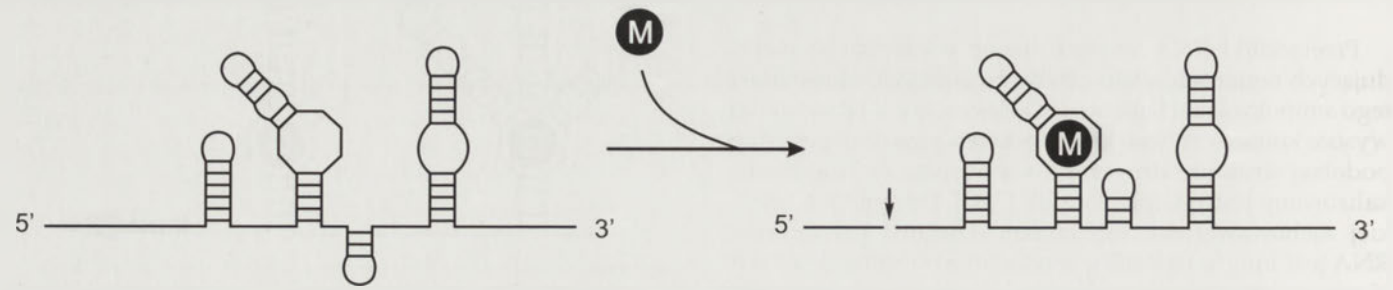
Dotychczas w organizmach eukariotycznych zidentyfikowano jedynie elementy wiążące pirofosforan tiaminy. Motywy takie znaleziono u grzybów (*Neurospora crassa, Fusarium oxysporum, Aspergillus oryzae*) oraz u roślin (*Oryza sativa, Poa secunda* oraz *Arabidopsis thaliana*) [10,34]. U *Arabidopsis* region wiążący pirofosforan tiaminy znajduje się w obrębie 3'UTR mRNA enzymu biorącego udział w syntezie tiaminy (ortologu bakteryjnego *thiC*). Postuluje się, że rearanżacja struktury tego regionu wywołana wiązaniem ligandu może wpływać na stabilność mRNA i na ekspresję białka.

W przypadku grzybów motyw wiążący pirofosforan tiaminy znajduje się w sekwencji intronu, a postulowany mechanizm polega na włączaniu i wyłączaniu alternatywnego miejsca składania mRNA w zależności od poziomu metabolitu.

Przełączniki RNA biorą również udział w regulacji poziomu czynnika TNF-α (ang. *tumor necrosis factor*) człowieka. W obrębie 3'UTR mRNA tego genu występuje element wiążący 2-aminopurynę [35,36]. Przy niskiej dostępności ligandu, element ten wiąże nieaktywną RNA-zależną kinazę białkową (ang. *RNA-dependent protein kinase-PKR*), następuje aktywacja tego enzymu, co z kolei powoduje zwiększoną efektywność składania mRNA kodującego TNF-α. Ryboprzełącznik wiążący 2-aminopurynę w stanie wolnym aktywuje PKR znacznie efektywniej niż dwuniciowy RNA [36]. Postuluje się, że wiązanie i aktywacja kinazy PKR przez niekodujący region mRNA pozwala na szybką ekspresję czynnika TNF-α podczas infekcji wirusowej.

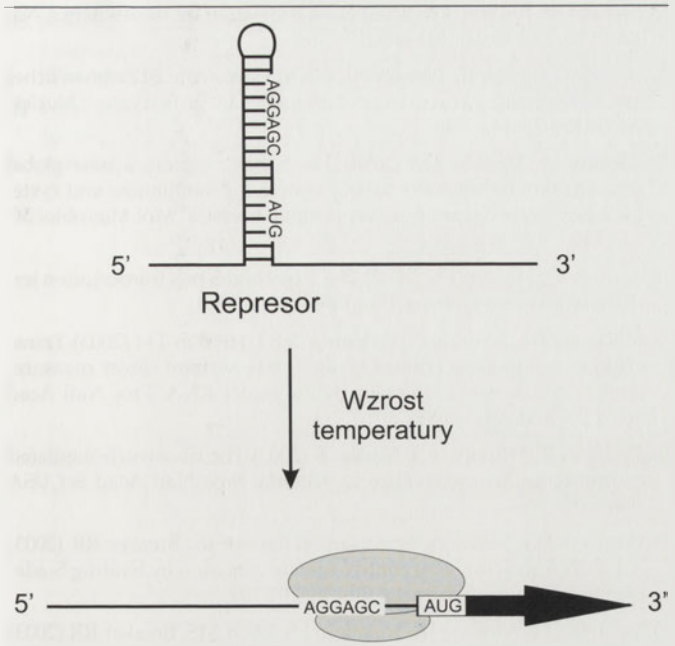
TERMOCZUJNIKI

Regulacja ekspresji i aktywności genów, w zależności od temperatury może być wywołana w dwóch przypadkach: jako odpowiedź na szok temperaturowy oraz na inwazję patogenów [37-40]. Struktura drugorzędowa RNA jest niezwykle wrażliwa na temperaturę, samo RNA może więc pełnić rolę termoczujnika (ang. *termosensor*). Dotychczas termosensory zidentyfikowano u bakterii z rodzaju *Rhizobium*, oraz *S. typhimurium, S. flexneri, E. coli, Y. pestis* i *L. monocytogenes* [40-44]. Zaangażowane są one bezpośrednio w mechanizm regulacji translacji, a ściślej w modulację dostępności sekwencji Shine-Dalgarno oraz miejsca inicjacji translacji AUG. Struktura o charakterze spinki do włosów obejmująca sekwencję Shine-Dalgarno zapobiega translacji mRNA przy obniżonej temperaturze. W przypadku podniesienia tempe-



Rysunek 4. Regulacja translacji poprzez ryboprzełącznik o aktywności rybozymalnej. Zmiana konformacji spowodowana wiązaniem metabolitu (M) - glukozoamino-6-fosforanu aktywuje rybozym hydrolizujący sekwencję mRNA w miejscu wskazanym strzałką.

http://rcin.org.pl



Rysunek 5. Zmiany strukturalne w regionie 5'UTR mRNA indukowane wzrostem temperatury. Uwolnienie sekwencji Shine-Delgarno i kodonu inicjatorowego umożliwia przyłączenie rybosomu i inicjację translacji.

ratury z 30°C do 37°C dochodzi do oddziaływań rybosomu z sekwencją RBS, a w konsekwencji do translacji odpowiedniego mRNA (Rys. 5).

METODY IDENTYFIKACJI PRZEŁĄCZNIKÓW RNA *in silico*

Obecnie znana jest jedna metoda przewidywania struktur przełączników RNA *de novo* [45]. Polega ona na poszukiwaniu sekwencji mogących tworzyć dwie alternatywne stabilne energetycznie struktury drugorzędowe. Powinny one być oddzielone barierą energetyczną, której pokonanie umożliwi dopiero jakiś czynnik zewnętrzny (np. wiążący się ligand). Alternatywne struktury powinny mieć zbliżoną końcową energię swobodną, jednak powinny się zdecydowanie różnić. Sekwencje tworzące więcej niż dwie struktury są odrzucane, gdyż po zadziałaniu czynnika zewnętrznego, cząsteczka powinna mieć możliwość przyjęcia tylko jednej, ściśle określonej konformacji. Implementacja powyższych założeń ma na celu wyszukanie sekwencji zdolnych do „przełączenia" struktury drugorzędowej na alternatywną, o zbliżonej energii, pod wpływem czynnika zewnętrznego. Metoda ta okazała się jednak nieskuteczna w przypadku występowania w jednej z alternatywnych struktur pseudowęzłów lub oddziaływań pomiędzy odległymi fragmentami sekwencji. Struktury tego typu zawiera około 2/3 wszystkich znanych przełączników RNA. Dla zidentyfikowanych sekwencji „przełącznikowych" nie można również przewidzieć potencjalnych ligandów zdolnych do wywołania zmiany struktury. Fakt ten pozostawia przewidziane riboprzełączniki bez żadnego znaczenia biologicznego.

Innym podejściem mającym na celu identyfikację nowych przełączników RNA jest poszukiwanie scharakteryzowanych eksperymentalnie motywów wiążących metabolity u organizmów, u których jeszcze nie stwierdzono ich obecności. Znana jest obecnie tylko jedna metoda pozwalająca na tego typu badania. Jej implementacja dostępna jest w postaci serwisu internetowego www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/bioinformatik/Riboswitch/ [46]. Polega ona na przeszukiwaniu zadanej sekwencji profilem sekwencyjno-strukturalnym stworzonym na podstawie porównania znanych riboprzełączników danego typu. Po zidentyfikowaniu sekwencji odpowiadającej profilowi następuje przewidywanie struktur suboptymalnych. Następnym krokiem jest weryfikacja struktury o najniższej energii pod kątem liczby utworzonych par zasad w każdym z elementów strukturalnych. Na tym etapie dopuszczalne jest wprowadzenie pewnych uproszczeń pozwalających na stopniowanie restrykcyjności metody.

Wyniki ewaluacji metody z użyciem profilu dla elementu wiążącego adeninę wykazały, że jest ona w stanie zidentyfikować wszystkie znane riboprzełączniki bakteryjne dla wypracowanego modelu. Dodatkowo przeszukiwanie bazy danych EMBL doprowadziło do identyfikacji 19 nowych potencjalnych przełączników RNA wiążących adeninę [46].

Metoda ta posiada jednak wiele ograniczeń. Jedynym modelem użytym do oceny i dostępnym w chwili obecnej do analizy jest riboprzełącznik adeninowy. Jak widać na Rys. 1, element ten jest najprostszym spośród znanych elementów wiążących metabolity. Obecność łatwych do zdefiniowania oddziaływań strukturalnych (trzy występujące blisko siebie struktury „spinki do włosów") pozwala na proste określenie punktacji w profilu (minimalna ilość par zasad w każdej helisie, krytyczne pozycje konserwatywnych nukleotydów). Metoda ta nie wydaje się jednak przydatna w przypadku przełączników RNA o bardziej złożonych oddziaływaniach.

PERSPEKTYWY

Możliwość regulacji ekspresji genów bezpośrednio przez mRNA, bez potrzeby biosyntezy białek receptorowych i regulacyjnych jest przykładem wyjątkowo ekonomicznego mechanizmu. Prostota działania riboprzełączników oraz powszechność ich występowania u bakterii, grzybów i roślin wskazuje na ich odległe pochodzenie ewolucyjnie. Na tej podstawie można przewidywać, że elementy te powinny być również obecne u człowieka oraz innych przedstawicieli królestwa zwierząt. Zidentyfikowany u człowieka element regulujący poziom czynnika TNF-α potwierdza słuszność tej tezy. Złożoność szlaków regulacyjnych u wyższych Eukaryota nie pozwala jednak na prostą analizę genów związanych bezpośrednio ze szlakiem transportu i syntezy wiązanego przez riboprzełącznik metabolitu. Skomplikowane mechanizmy sygnalizacyjne oraz aktywujące transkrypcję i translację zmuszają do poszukiwania przełączników RNA w szerokim spektrum genów pozornie niezwiązanych z danym szlakiem metabolicznym. Identyfikacja tego typu elementów w tak złożonych organizmach uzależniona jest od opracowania skutecznych narzędzi bioinformatycznych pozwalających na szybkie wyłonienie kandydatów dla badań eksperymentalnych.

http://rcin.org.pl

PIŚMIENNICTWO

1. Erdmann VA, Barciszewska MZ, Hochberg A, de Groot N, Barciszewski J (2001) Regulatory RNAs. Cell Mol Life Sci 58: 960-977
2. Lai EC (2003) RNA sensors and riboswitches: self-regulating messages. Curr Biol 13: R285-291
3. Szymanski M, Barciszewska MZ, Zywicki M, Barciszewski J (2003) Noncoding RNA transcripts. J Appl Genet 44: 1-19
4. Grundy FJ, Lehman SC, Henkin TM (2003) The L box regulon: lysine sensing by leader RNAs of bacterial lysine biosynthesis genes. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 12057-12062
5. Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA, Gelfand MS (2003) Regulation of the vitamin B12 metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element. RNA 9: 1084-1097
6. Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS (2003) Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: yet another RNA riboswitch? Nucleic Acids Res 31: 6748-6757
7. Winkler WC, Breaker RR (2003) Genetic control by metabolite-binding riboswitches. Chembiochem 4: 1024-1032
8. Hermann T, Patel DJ (2000) Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. Science 287: 820-825
9. Sudarsan N, Barrick JE, Breaker RR (2003) Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. RNA 9: 644-647
10. Nudler E, Mironov AS (2004) The riboswitch control of bacterial metabolism. Trends Biochem Sci 29: 11-17
11. Mandal M, Boese B, Barrick JE, Winkler WC, Breaker RR (2003) Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. Cell 113: 577-586
12. Winkler WC, Nahvi A, Roth A, Collins JA, Breaker RR (2004) Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. Nature 428: 281-286
13. Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS (2002) Comparative genomics of thiamin biosynthesis in procaryotes. New genes and regulatory mechanisms. J Biol Chem 277: 48949-48959
14. Winkler WC, Cohen-Chalamish S, Breaker RR (2002) An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 15908-15913
15. Mironov AS, Gusarov I, Rafikov R, Lopez LE, Shatalin K, Kreneva RA, Perumov DA, Nudler E (2002) Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. Cell 111: 747-756
16. Miranda-Rios J, Navarro M, Soberon M (2001) A conserved RNA structure (*thi* box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 9736-9741
17. Stormo GD, Ji Y (2001) Do mRNAs act as direct sensors of small molecules to control their expression? Proc Natl Acad Sci USA 98: 9465--9467
18. Kreneva RA, Perumov DA (1990) Genetic mapping of regulatory mutations of *Bacillus subtilis* riboflavin operon. Mol Gen Genet 222: 467-469
19. Mack M, van Loon AP, Hohmann HP (1998) Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by ribC. J Bacteriol 180: 950-955
20. Gusarov, II, Kreneva RA, Rybak KV, Podcherniaev DA, Iomantas Iu V, Kolibaba LG, Polanuer BM, Kozlov Iu I, Perumov DA (1997) Primary structure and functional activity of the *Bacillus subtilis ribC* gene. Mol Biol (Mosk) 31: 820-825
21. Begley TP, Downs DM, Ealick SE, McLafferty FW, Van Loon AP, Taylor S, Campobasso N, Chiu HJ, Kinsland C, Reddick JJ, Xi J (1999) Thiamin biosynthesis in prokaryotes. Arch Microbiol 171: 293-300
22. Petersen LA, Downs DM (1997) Identification and characterization of an operon in *Salmonella typhimurium* involved in thiamine biosynthesis. J Bacteriol 179: 4894-4900
23. Mandal M, Breaker RR (2004) Gene regulation by riboswitches. Nat Rev Mol Cell Biol 5: 451-463
24. Nahvi A, Barrick JE, Breaker RR (2004) Coenzyme B12 riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. Nucleic Acids Res 32: 143-150
25. Grundy FJ, Henkin TM (1998) The S box regulon: a new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in gram-positive bacteria. Mol Microbiol 30: 737-749
26. Grundy FJ, Henkin TM (2003) The T box and S box transcription termination control systems. Front Biosci 8: d20-31
27. McDaniel BA, Grundy FJ, Artsimovitch I, Henkin TM (2003) Transcription termination control of the S box system: direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 3083-3088
28. Epshtein V, Mironov AS, Nudler E (2003) The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria. Proc Natl Acad Sci USA 100: 5052-5056
29. Winkler WC, Nahvi A, Sudarsan N, Barrick JE, Breaker RR (2003) An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. Nat Struct Biol 10: 701-707
30. Sudarsan N, Wickiser JK, Nakamura S, Ebert MS, Breaker RR (2003) An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine. Genes Dev 17: 2688-2697
31. Kochhar S, Paulus H (1996) Lysine-induced premature transcription termination in the lysC operon of *Bacillus subtilis*. Microbiology 142 (Pt 7): 1635-1639
32. Mandal M, Lee M, Barrick JE, Weinberg Z, Emilsson GM, Ruzzo WL, Breaker RR (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. Science 306: 275-279
33. Soukup GA, Breaker RR (2000) Allosteric nucleic acid catalysts. Curr Opin Struct Biol 10: 318-325
34. Kubodera T, Watanabe M, Yoshiuchi K, Yamashita N, Nishimura A, Nakai S, Gomi K, Hanamoto H (2003) Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* thiA requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. FEBS Lett 555: 516-520
35. Kaempfer R (2003) RNA sensors: novel regulators of gene expression. EMBO Rep 4: 1043-1047
36. Osman F, Jarrous N, Ben-Asouli Y, Kaempfer R (1999) A cis-acting element in the 3'-untranslated region of human TNF-alpha mRNA renders splicing dependent on the activation of protein kinase PKR. Genes Dev 13: 3280-3293
37. Morita MT, Tanaka Y, Kodama TS, Kyogoku Y, Yanagi H, Yura T (1999) Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. Genes Dev 13: 655-665
38. Narberhaus F, Kaser R, Nocker A, Hennecke H (1998) A novel DNA element that controls bacterial heat shock gene expression. Mol Microbiol 28: 315-323
39. Nocker A, Hausherr T, Balsiger S, Krstulovic NP, Hennecke H, Narberhaus F (2001) A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes. Nucleic Acids Res 29: 4800-4807
40. Hurme R, Rhen M (1998) Temperature sensing in bacterial gene regulation--what it all boils down to. Mol Microbiol 30: 1-6
41. Hurme R, Berndt KD, Normark SJ, Rhen M (1997) A proteinaceous gene regulatory thermometer in *Salmonella*. Cell 90: 55-64
42. Falconi M, Colonna B, Prosseda G, Micheli G, Gualerzi CO (1998) Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of virF promoter to transcriptional repressor H-NS. EMBO J 17: 7033-7043

http://rcin.org.pl

43. Hoe NP, Goguen JD (1993) Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. J Bacteriol 175: 7901-7909

44. Johansson J, Mandin P, Renzoni A, Chiaruttini C, Springer M, Cossart P (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. Cell 110: 551-561

45. Voss B, Meyer C, Giegerich R (2004) Evaluating the predictability of conformational switching in RNA. Bioinformatics 20: 1573-1582

46. Bengert P, Dandekar T (2004) Riboswitch finder--a tool for identification of riboswitch RNAs. Nucleic Acids Res 32: W154-159

Riboswitches

Katarzyna Bugała, Marek Żywicki, Eliza Wyszko, Mirosława Z. Barciszewska, Jan Barciszewski✉

Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, 12 Noskowskiego St., 61-704 Poznan, Poland
✉e-mail: Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl

Key words: RNA switches, regulatory RNAs, non-coding RNAs, regulation of gene expression, transcription, translation

ABSTRACT

Riboswitches are RNA structures able to bind small molecules and regulate gene expression at both, transcriptional and translational level. They are present in a wide variety of bacterial species. In *Bacillus subtilis* more than 2% of the genome is regulated by riboswitches. Metabolite binding is highly specific and can be provided in cooperative manner. Several riboswitches has been identified and characterized to be specific for flavin mononucleotide, thiamine, thiamine pyrophosphate, adenosylcobalamin, S-adenosylmethionine, lysine, glycine, adenine, guanine and glucosamine-6-phosphate. Some of them have been found also in fungi (*Neurospora crassa*) and plants (*Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*). In human only one riboswitch with binding capacity for 2-aminopurine, has been found. Occurrence of riboswitches in all of the filogenetic groups suggests that they are one of the oldest regulatory systems. It provokes also the question about their involvement in regulation of gene expression in human.

http://rcin.org.pl

Naprawa DNA przez wycinanie zasad

Tomasz Śliwiński

Janusz Błasiak✉

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

✉Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: januszb@biol.uni.lodz.pl; tel. (42) 635 44 89, faks: (42) 635 44 84

Artykuł otrzymano 30 września 2004
Artykuł zaakceptowano 4 stycznia 2005

Słowa kluczowe: uszkodzenia DNA, modyfikacje zasad DNA, naprawa DNA przez wycinanie zasad, miejsca apurynowe/apirymidynowe, glikozylazy DNA

Wykaz skrótów: 8-oksoG – 7,8-dihydro-8--okso-deoksyguanina; BER – naprawa DNA przez wycinanie zasad; dIMP – deoksymonofosforan inozytolu; FapyAde, FapyGua – formamidopirymidyny; miejsce AP – miejce apurynowe lub apirymidynowe; NER – naprawa DNA przez wycinanie nukleotydów; NHEJ – naprawa przez niehomologiczne łączenie końców; PARP – polimeraza poli-ADP-rybozy; PCNA – jądrowy antygen proliferujących komórek; RTF – reaktywne formy tlenu; SSA – naprawa DNA przez dopasowanie pojedynczych nici; SSB – jednoniciowe pęknięcia DNA; XRCC1 – białko naprawy DNA

Podziękowanie: Praca powstała w trakcie realizacji projektu UŁ 505/450

STRESZCZENIE

Uszkodzenia zasad w DNA powstające w wyniku procesów deaminacji, utleniania czy alkilacji są naprawiane przede wszystkim przez system naprawy DNA przez wycinanie zasad (BER). Enzymami, które rozpoczynają naprawę DNA przez system BER są glikozylazy DNA, rozpoznające uszkodzone zasady i usuwające je z DNA poprzez hydrolizę wiązań *N*-glikozydowych pomiędzy uszkodzoną zasadą a resztą cukrową. Poznano i scharakteryzowano wiele glikozylaz DNA występujących w różnych organizmach (człowieka, *E. coli*, wirusów), różniących się specyficznością substratową. Niektóre z glikozylaz DNA wykazują dodatkowo aktywność liazy AP, enzymu katalizującego reakcję hydrolizy wiązania fosfodiestrowego pomiędzy nukleotydem po stronie 3' uszkodzenia a deoksyrybozą pozbawioną zasady azotowej. System BER składa się z dwóch różnych szlaków naprawy DNA (podstawowego i alternatywnego), w których zostają wprowadzone odpowiednio jeden nukleotyd, lub od dwóch do sześciu, w miejsce usuniętego wcześniej uszkodzonego pojedynczego nukleotydu. Kontrola przez system BER stabilności i integralności genomowej komórek oraz zapobieganie rozwojowi nowotworów (lub innych schorzeń), są najistotniejsze dla prawidłowego funkcjonowania całego organizmu i zdolności jego przeżycia.

WPROWADZENIE

Integralność i stabilność DNA są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania komórek, a uszkodzenia DNA mogą prowadzić do zaburzeń procesów komórkowych i śmierci, a w organizmach wielokomórkowych – do rozwoju nowotworów i innych schorzeń. Uszkodzenia DNA powstają zarówno w procesach endogennych (przede wszystkim jako konsekwencje błędów w replikacji DNA, uszkodzenia zasad w wyniku stresu oksydacyjnego, generowane między innymi przez produkty peroksydacji lipidów), bądź na skutek ekspozycji czynników zewnętrznych (substancje występujące w środowisku zewnętrznym, niewłaściwa dieta, skutki uboczne zastosowania różnych rodzajów promieniowania lub leków w terapii, itp.).

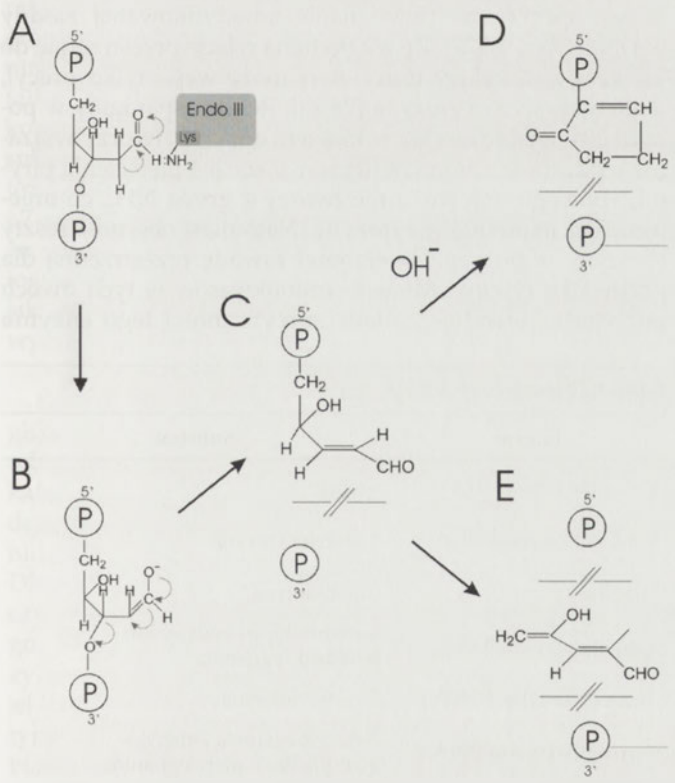
W warunkach, w których mogą być indukowane uszkodzenia DNA, podstawowe znaczenie ma prawidłowe funkcjonowanie systemów naprawy tych uszkodzeń. Szczególnie częstymi uszkodzeniami w komórce są modyfikacje zasad DNA w wyniku działania reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu, powstające spontanicznie bądź podczas ekspozycji na czynniki zewnętrzne, takie jak promieniowanie jonizujące lub UV. W następstwie aktywności RFT powstają zmodyfikowane zasady, np. 8-oksoguanina (8-oksoG), które jeśli nie zostaną usunięte z DNA, mogą być źródłem mutacji. Modyfikacje zasad azotowych wywoływane są też przez produkty peroksydacji lipidów. W wyniku utleniania długołańcuchowych nienasyconych kwasów tłuszczowych dochodzi do formowania egzocyklicznych adduktów DNA; między innymi dwuetapowa reakcja utleniania kwasu arachidonowego, której produkt (2,3-epoksy-4-hydroksynonenal) modyfikuje zasady azotowe do etenoadduktów DNA [1]. Podstawowym mechanizmem usuwania skutków działania RFT jest naprawa przez wycinanie zasad azotowych DNA (BER). Istnieją dwa szlaki działania systemu BER, podstawowy oraz alternatywny, który jest ściśle związany z replikacją DNA. Rozdzielenie szlaków podstawowego i alternatywnego zapewnia sprawne i szybkie działanie systemu BER, gdyż możliwe jest usunięcie uszkodzonych zasad zarówno podczas trwającego procesu replikacji, tak aby nie były one źródłem dalszych błędów, które będą powielone i utrwalone w nowosyntetyzowanym DNA, jak i podczas fazy stacjonarnej, kiedy to bardzo często generowane są uszkodzenia wywołane przez wolne rodniki. Ponadto system BER uczestniczy w usuwaniu alkilowanych zasad i innych modyfikacji DNA oraz naprawie pęknięć cząsteczek jednoniciowego DNA [2,3].

http://rcin.org.pl

SUBSTRATY DNA DLA BIAŁEK SYSTEMU NAPRAWY USZKODZEŃ DNA PRZEZ WYCINANIE ZASAD

Wycięcie uszkodzonych zasad azotowych z DNA rozpoczyna sie od reakcji katalizowanej przez glikozylazy DNA, które hydrolizują wiązania N-glikozydowe pomiędzy uszkodzoną zasadą a resztą cukrową [4-5]. Ten rodzaj naprawy DNA nazywany jest naprawą przez wycinanie zasad, ponieważ chemicznie zmodyfikowana zasada po wycięciu staje się „wolną zasadą" [6].

Uszkodzenia zasad przez wolne rodniki, powstające zarówno w wyniku metabolizmu komórkowego jak i działania czynników zewnętrznych, stanowią szeroką klasę uszkodzeń DNA, a uszkodzone cząsteczki stają się substratami systemu BER (m.in. 8-oksoG, glikol tyminy). Innym źródłem uszkodzeń naprawianych przez BER są uszkodzenia alkilacyje DNA (N-alkilowane puryny: 7-metyloguanina, 3-metyloadenina, 3-metyloguanina) i uszkodzenia hydrolityczne (deaminacja: uracyl, hipoksantyna) [7, 8]. Cząsteczka 8-oksoG jest silnie mutagenna, gdyż powoduje błędne sparowania z adeniną podczas replikacji, co może prowadzić do transwersji G:C→T:A [9]. N-alkilowane puryny są podatne na spontaniczną hydrolizę wiązania N-glikozydowego, prowadzącą do powstania miejsc AP, które następnie są usuwane przez kolejne reakcje enzymatyczne systemu BER [10].



Rysunek 1. Reakcje chemiczne mogące zachodzić w miejscu AP. Forma otwartego pierścienia miejsca AP (A) może podlegać reakcji β-eliminacji przez związek pośredni (B), w wyniku przecięcia wiązania 3'fosfodiestrowego (C). Koniec 3' powstały podczas tej reakcji prowadzi do powstania α,β-nienasyconego aldehydu, 4-hydroksy-2-pentenalu. W środowisku zasadowym ten nienasycony aldehyd może ulegać przegrupowaniu i powodować powstanie 3'-2-oksycyklopent-1-enylu (D). W obecności dodatkowego katalizatora α,β-nienasycony aldehyd może także podlegać reakcji δ-eliminacji, w rezultacie czego następuje przecięcie wiązania 5'fosfodiestrowego powodując powstanie 4-hydroksy-pent-2,4-dienalu (E), a powstała jednonukleotydowa luka w DNA zostaje oskrzydlona przez grupy 3' i 5' fosforanowe.

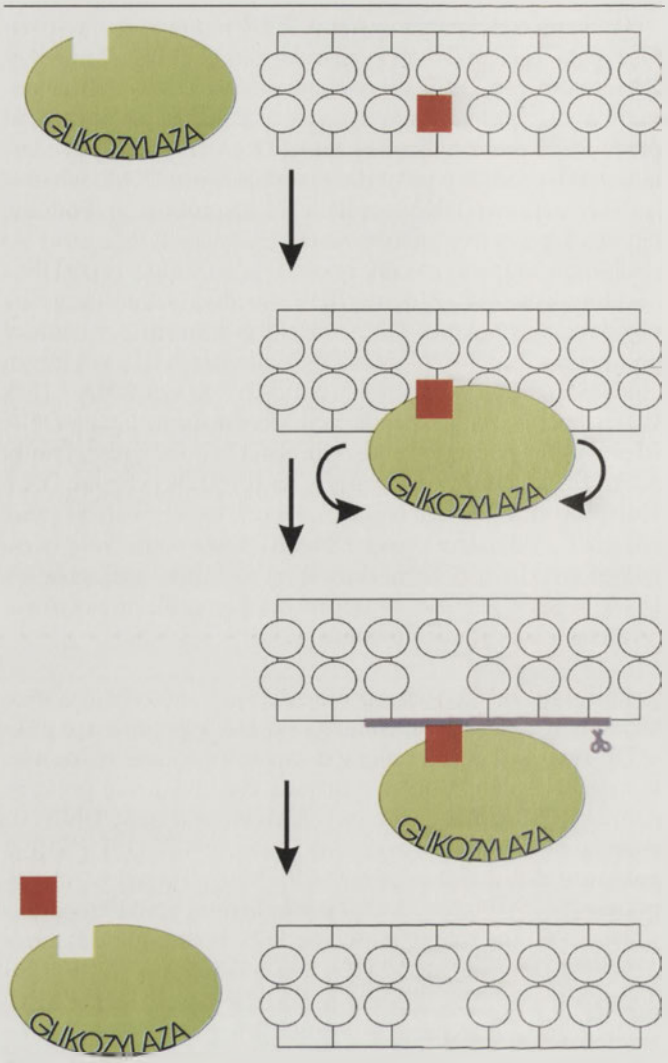
W wyniku działania systemu BER naprawiane są również pęknięcia pojedynczych nici DNA (SSB). Pomiędzy wieloma różnego rodzaju uszkodzeniami DNA, SSB są jednymi z najczęściej występujących uszkodzeń wywołanymi przez RFT i przez hydrolizę zasad DNA [11]. SSB powstają także jako produkty pośrednie metabolizmu DNA, włączając w to naprawę DNA, replikację i rekombinację. Podczas naprawy przez wycinanie zasad, SSB są wytwarzane po stronie uszkodzonej zasady przez działanie glikozylaz DNA i endonukleaz AP. Zidentyfikowano dwa szlaki naprawy pojedynczych pęknięć DNA: szlak, w którym uczestniczy polimeraza β (pol β) i ligaza DNA III oraz szlak, w którym biorą udział polimerazy δ/ε (pol δ/ε) i ligaza DNA I [12]. Wykazano, że nadekspresja genu kodującego ligazę DNA III powoduje podwyższenie oporności komórek na czynniki uszkadzające DNA, podczas gdy nadprodukcja ligazy DNA I nie powoduje takiego efektu, co może sugerować, że szlak naprawy z udziałem ligazy DNA III może pełnić rolę w regulacji wrażliwości komórkowej na czynniki uszkadzające DNA, w szczególności w oporności komórek nowotworowych na leki i promieniowanie [12].

Poli-ADP-rybozylacja, potranslacyjna modyfikacja białek, katalizowana przez zależną od DNA polimerazę poli-ADP-rybozy (PARP), należy do wczesnych reakcji komórki na SSB. Białko PARP-1 odgrywa kluczową rolę podczas naprawy SSB, gdyż może ono efektywnie wiązać DNA zawierające uszkodzenie oraz aktywować PARP [13]. PARP-2 jest także aktywowane przez SSB i bierze udział w ich naprawie [14,15]. Białko XRCC1 jest kolejnym białkiem odgrywającym ważną rolę w naprawie SSB. Białko to oddziałuje z PARP-1 [15,16], PARP-2 [15], ligazą DNA IIIα [17,18] i endonukleazą AP [19]. Poprzez te oddziaływania białko XRCC1 odgrywa ważną rolę w regulacji naprawy DNA przez wycinanie zasad.

MIEJSCA AP

Miejsca AP w DNA mogą powstawać w wyniku działania glikozylaz, a także podczas depurynacji i depirymidynacji, na skutek spontanicznej hydrolizy wiązań N-glikozydowych. Miejsca te występują w równowagowych formach: otwartego łańcucha α,β nienasyconego aldehydu, α- lub β-hemiacetali i otwartego łańcucha α,β nienasyconego hydratu, z czego hemiacetale stanowią większość, a otwarte łańcuchy aldehydów stanowią tylko 1% wszystkich miejsc AP, aczkolwiek są one chemicznie najbardziej reaktywne [20]. Miejsca AP mogą podlegać szeregu reakcjom, w tym β- i δ-eliminacji oraz rearanżacji, które prowadzą do przecięcia wiązań fosfodiestrowych [20]. Reakcje β-eliminacji wywołane są przez nukleofile i mogą pojawiać się w dwóch odrębnych szlakach. W szlaku pierwszym (Rys.1) proton jest przenoszony z grupy CH_2 α-deoksyrybozy na grupę karbonylową w pozycji C-1. W drugim szlaku wytwarzana jest zasada Schiffa pomiędzy aminą i grupą karbonylową C-1otwartego pierścienia aldehydu. Obie reakcje są następstwem β-eliminacji, która pozostawia 3' α,β nienasycony aldehyd, 4-hydroksy-2-pentenal i 5' resztę fosforanową [20]. Aldehyd 3' α,β nienasycony może podlegać dodatkowej reakcji δ eliminacji, powodującej uwolnienie 4-hydroksy-pent-2,4-dienalu i dającej jednonukleotydowe pęknięcie

http://rcin.org.pl



Rysunek 2. Schemat wycinania zasady przez mechanizm *flipped out*. Inne objaśnienia w tekście pracy.

oskrzydlone przez 3′ i 5′ reszty fosforanowe. W reakcji rearanżacji w środowisku zasadowym 3′ α,β nienasycony aldehyd może przekształcić się do reszty 3′-2-oksocyklopent-1-enylu.

Właściwości miejsca AP zależą od rodzaju zasady znajdującej się naprzeciwko oraz od sąsiednich nukleotydów. Jeżeli zasada naprzeciw miejsca AP jest puryną, oddziaływania pomiędzy zasadami w helisie DNA przeważają i struktura DNA jest zachowana, jeżeli zaś naprzeciwko znajduje się pirymidyna, struktura helisy DNA zapada się. Właściwości przestrzenne puryn umożliwiają im dopasowanie się do miejsca AP, stabilizując strukturę helisy DNA i chroniąc ją przed zagięciem. Proces ten wyjaśnia preferencyjne wprowadzanie puryn, zwłaszcza adeniny, w miejsce AP przez wiele polimeraz DNA [21].

GLIKOZYLAZY DNA

Glikozylazy DNA można podzielić na dwa typy I i II. Pierwsze usuwają zmodyfikowaną zasadę w DNA pozostawiając miejsce AP, natomiast drugie usuwają zasadę i następnie rozkładają miejsce AP dzięki aktywności 3′ endonukleolitycznej powodującej hydrolizę wiązania fosfodiestrowego pomiędzy nukleotydem po stronie 3′ uszkodzenia a deoksyrybozą pozbawioną zasady azotowej (wykazują aktywność liazy AP). Zidentyfikowano szereg glikozylaz DNA występujących u wielu nieraz odległych filogenetycznie organizmów [7]. Glikozylazy DNA, które powodują hydrolizę wiązań fosfodiestrowych w miejscu pozbawionym zasady, czynią to poprzez β-eliminację. W następstwie tej reakcji powstaje wolny koniec po stronie 3′ miejsca AP, pozostawiając resztę 3′ nienasyconych pochodnych cukrów, które nie mogą być bezpośrednio wykorzystywane przez polimerazy DNA jako startery [20].

GLIKOZYLAZY DNA *E. coli*

Większość znanych glikozylaz DNA zostało po raz pierwszy zidentyfikowanych u *E.coli*. Są to małe białka o masie poniżej 30 kDa, niewymagające kofaktorów [4, 5, 22]. W komórkach *E. coli* znanych jest jedenaście glikozylaz DNA, większość z nich jest specyficzna wobec określonej modyfikacji zasad (Tabela 1).

W ostatnich latach na podstawie badań krystalograficznych wyjaśniono między innymi molekularne podstawy specyficzności glikozylazy uracylu należącej do glikozylaz DNA typu I [23-26]. Wyniki tych badań sugerują, że zmodyfikowana zasada jest wyciągana (ang. *flipped out*) na zewnątrz helisy DNA do kieszeni katalitycznej enzymu, w której znajdują się odpowiednie aminokwasy warunkujące specyficzne rozpoznanie zmodyfikowanej zasady w DNA (Rys. 2) [27]. Ze względu na relacje przestrzenne do kieszeni glikozylazy uracylowej może wejść tylko uracyl, a nie tymina czy cytozyna [28,29]. Reszta asparaginy w pozycji 204, znajdująca się w kieszeni enzymu, tworzy wiązanie wodorowe z atomem tlenu w pozycji 4 pierścienia pirymidynowego uracylu, a nie tworzy z grupą NH_2, co uniemożliwia akomodację cytozyny. Natomiast obecność reszty tyrozyny w pozycji 147 stanowi zawadę przestrzenną dla grupy CH_3 tyminy. Mutacja aminokwasów w tych dwóch pozycjach powoduje zmianę specyficzności tego enzymu

Tabela 1. Glikozylazy DNA *E. coli*

Enzym	Substrat
Ura-glikozylaza DNA	uracyl
5-mC-glikozylaza DNA	5-metylocytozyna
Hx-glikozylaza DNA	hipoksantyna
Fapy-glikozylaza DNA	formamidopirymidyny lub 8-hydroksyguanina
3-mA-glikozylaza DNA I	3-metyloadenina
3-mA-glikozylaza DNA II	3-metyloadenina, 7-metyloguanina lub 3-metyloguanina
PD-glikozylaza DNA	dimery pirymidynowe
Hmu-glikozylaza DNA	hydroksymetylouracyl
T-G-glikozylaza DNA	pary G-T
MutY-glikozylaza DNA	pary G-A
Endonukleaza III	5,6-hydrat tyminy

http://rcin.org.pl

[30-34]. Znana jest glikozylaza uracylowa specyficzna w stosunku do uracylu zarówno w jednoniciowym, jak i dwuniciowym DNA (jak to ma miejsce w przypadku glikozylazy UNG), jak również glikozylaza specyficzna w stosunku do uracylu tylko w dwuniciowym DNA czyli glikozylaza Mug (dsUDG). Co ciekawe jednym z najlepszych substratów dla tego glikozylazy Mug jest etenocytozyna [35].

W komórkach *E. coli* zidentyfikowano dwa szlaki naprawy 3-metyloadeniny, glikozylazy DNA typu II: szlak konstytutywny, w którym uczestniczy gen *tag* (3-mA-glikozylaza DNA I) oraz szlak indukowany czynnikami alkilującymi, kontrolowany przez gen *ada*). Gen *alkA* koduje białko 3-mA-glikozylazy DNA II [36,37]. Gen ten położony jest na czterdziestej trzeciej minucie mapy genetycznej *E. coli*. Nie ma homologii na poziomie aminokwasowym pomiędzy produktami genów *tag* i *alkA*, co sugeruje, że mechanizm ich działania jest różny [38]. Nadekspresja genu *tag* prawie całkowicie hamuje wrażliwość mutanta *alkA* na alkilację DNA [39]. Pomimo, że 3-mA-glikozylaza DNA I usuwa 3--metyloguaninę z dużo mniejszą wydajnością, ograniczenie to może zostać zredukowane przez nadekspresję genu *tag*, która w komórkach typu dzikiego uwrażliwia je na uszkodzenia alkilacyjne [39]. 3-mA-glikozylaza DNA I jest białkiem o masie około 21 kDa, mającym szerokie optimum działania przy pH od 6 do 8,5 i zwiększającym swoją aktywność w obecności jonów Mg^{2+}, Mn^{2+} i Ca^{2+} [40]. Enzym ten jest wrażliwy na czynniki, które inaktywują grupy SH i charakteryzuje się ścisłą specyficznością substratową, działa głównie na 3-metyloadeninę, a oprócz niej na 3-etyloadeninę i 3-metyloguaninę [41,42]. Białko 3-mA-glikozylazy II (alkA) ma masę około 30 kDa i w odróżnieniu od 3-mA-glikozylazy DNA I charakteryzuje się szerszą specyficznością substratową. Oprócz działania na 3-metyloadeninę, enzym też katalizuje wycinanie 3-metyloguaniny, 7-metyloguaniny i 7-metyloadeniny z alkilowanego DNA. Powoduje on także wycinanie N^1-karbooksyetyloadeniny i N^7-karboksyetyloguaniny, $N^{2,3}$-etano- i -etenoguaninę, O^2-alkilopirymidyn, jak również niemodyfikowanych zasad (w tym ostatnim wypadku z niską wydajnością) [43,44].

Glikozylaza hipoksantynowa (Hx-glikozylaza DNA) jest glikozylazą DNA typu I. Została wykryta w ekstraktach *E. coli* i jest białkiem o masie około 30 kDa [45] . Enzym ten katalizuje uwalnianie hipoksantyny powstającej w wyniku deaminacji adeniny w DNA, bądź w wyniku wprowadzania dIMP zamiast dGMP podczas replikacji. Hx-glikozylaza DNA nie katalizuje uwalniania ksantyny, adeniny, guaniny czy uracylu z DNA poddanego działaniu kwasu azotawego. W przeciwieństwie do glikozylazy uracylowej, glikozylaza hipoksantynowa nie jest hamowana przez produkt jej działania. Analogi hipoksantyny, takie jak kofeina, ksantyna czy deoksyinozyna także nie hamują aktywności tego białka [45].

Glikozylaza DNA formamidopirymidyny (Fpg), wykazująca również aktywność liazy AP, usuwa utlenione puryny z uszkodzonego DNA zapoczątkowując proces naprawy uszkodzeń DNA pochodzenia wolnorodnikowego m.in.: 8--oksoG, 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyny, 4,6-diamino-5-formamidopirymidyny [46,47]. Rozpoznanie 8-oksoG przez białko Fpg (znane także jako MutM) jest ważne ze względu na wysoką częstość tego typu modyfikacji w genomowym DNA. Wyniki badań krystalograficznych wykazały, że MutM wiąże 8-oksoG w pozycji *syn* i rozróżnia 8-oksoG od guaniny poprzez sprawdzanie stanu protonacji atomu N7 [48]. Wyniki badań struktury przestrzennej Fpg sugerują specyficzne i niespecyficzne oddziaływanie tego białka z DNA [49]. Najbardziej prawdopodobne jest oddziaływanie reszty Lys w pozycji 217, umieszczonej w kieszeni katalitycznej Fpg, z atomem tlenu w pozycji 8 w cząsteczce 8-oksoG zlokalizowanej na zewnątrz helisy. Mutacja reszty Lys 219 powoduje zmniejszenie zdolności usuwania 8-oksoG z DNA [47]. Zostały identyfikowane inne reszty aminokwasowe biorące udział w rozpoznaniu uszkodzenia – His 89, Arg 108 i Arg 109. Reszta Arg 108 uczestniczy w tworzeniu dwóch wiązań wodorowych Fpg z cytozyną w DNA. Mutacja tej reszty zmniejsza zdolność białka do wycinania 8-oksoG z niestabilnych sparowań z guaniną i tyminą, zaś nie ma wpływu na wycinanie ze stabilnych sparowań z cytozyną i adeniną. Mutacja reszty histydyny w pozycji 89 selektywnie obniża tempo wycinania 8-oksoguaniny, podczas gdy mutacja reszty argininy w pozycji 109 prawie całkowicie znosi zdolność wiązania Fpg z DNA. Reszty His 89 i Lys 217 wyznaczają specyficzność Fpg w rozpoznawaniu uszkodzonej przez RFT zasady, zaś reszta Arg 108 odpowiada za specyficzność enzymu w stosunku do zasad zlokalizowanych naprzeciwko miejsca uszkodzenia [47].

Glikozylaza MutY *E. coli* należąca do glikozylaz typu II uczestniczy w naprawie błędnie sparowanych nukleotydów w DNA, wykazując specyficzność w stosunku do par: oxoG:A, G:A, C:A, skąd usuwa adeninę [50,51]. MutY *E. coli* jest białkiem o masie 39 kDa, zbudowanym z dwóch domen, domeny katalitycznej o masie 26 kDa (p26MutY), oraz domeny o masie 13 kDa, która determinuje specyficzność substratową i wydajność katalityczną [52]. Reszty aminokwasowe odpowiedzialne za aktywność naprawczą białka MutY znajdują się w jego N -końcowej części [53,54]. Struktura krystaliczna tego regionu [55] pokazuje, że białko to należy do rodziny enzymów naprawiających DNA, które zawierają charakterystyczny motyw helisa-szpilka-helisa (HhH) oraz dwie dodatkowe domeny o strukturze α helisy. Domeny te mają dodatnio naładowane powierzchnie umożliwiające efektywne wiązanie z DNA. Wyniki badań wykorzystujące techniki modelowania molekularnego używane do integracji dwóch domen MutY z DNA sugerują, że białko to może zawijać się dookoła DNA i zapoczątkowywać katalizę przez wyciągniecie i odsłonięcie adeniny i 8-oksoguaniny na zewnątrz helisy DNA [52]. Utrata MutY przez *E. coli* powoduje znaczne podniesienie częstości mutacji, co sugeruje, że poreplikacyjne działanie białka MutY na uszkodzenia DNA jest bardzo ważnym mechanizmem zapobiegającym mutagenezie [56].

Endonukleaza III (Endo III) jest enzymem o strukturze pierwszorzędowej zachowanej w ewolucji, zapoczątkowującym proces wycinania zasad DNA uszkodzonych przez wolne rodniki [57]. Endo III o masie 23 kDa (z grupą koordynacyjną 4Fe-4S) jest zarówno glikozylazą DNA o szerokim spektrum substratów, jak i AP liazą, która nacina DNA usuwając miejsca AP [58]. Endo III usuwa przede wszystkim uszkodzone pirymidyny, w tym glikol tyminy, reszty

http://rcin.org.pl

mocznikowe, cytozynę, uwodniony uracyl i 5-hydroksy pirymidynę, wytworzone przez promieniowanie jonizujące, UV oraz chemiczne czynniki utleniające [59-61].

Wyniki badań nad strukturą kryształu endonukleazy III z *E. coli* sugerują, że białko to także należy do rodziny enzymów zawierających motyw HhH odgrywający rolę w wiązaniu DNA [62]. Endo III jest zbudowana z domeny 6-α beczki, zawierającej motyw HhH o zachowanej w ewolucji strukturze pierwszorzędowej i motyw odczytujący mniejszy rowek DNA oraz domenę 4-α helisy, która jest strukturalnie koordynowana przez grupę żelazo-siarkową (4Fe-4S). Porównanie budowy Endo III z MutY wskazuje na różnice we wzajemnym przestrzennym ułożeniu domen w obu białkach [55]. Pomiędzy wspomnianymi domenami w cząsteczkach obu enzymów zlokalizowana jest hydrofilowa kieszeń katalityczna o różnej wielkości [62]. Większa kieszeń w cząsteczce MutY zapewnia specyficzność w stosunku do adeniny, zaś mniejsza kieszeń Endo III w stosunku do różnych typów uszkodzonych zasad pirymidynowych. Reszta Asp w centrum aktywnym Endo III aktywuje nukleofilowy azot Nζ zasady. Reszta Lys działa na węgiel C1 i wytwarza przejściowe zasady Schiffa pomiędzy enzymem a DNA, które przerywają 3' C-O wiązanie fosfodiestrowe poprzez β-eliminację i hydrolizują i uwalniają α,β- nienasycony aldehyd. Mutacja reszty Asp i Lys kilkakrotnie zmniejsza aktywność Endo III, nie ma jednak wpływu na wiązanie enzymu z DNA [74].

GLIKOZYLAZY DNA WIRUSÓW

Dotychczas odkryto dwie glikozylazy DNA typu II u wirusów: endonukleazę V bakteriofaga T4 (T4 glikozylazę dimerów pirymidynowych - T4-pdg) oraz glikozylazę dimerów pirymidynowych wirusa *Chlorella* (cv-pdg), która charakteryzuje się 41% identycznością sekwencji aminokwasowej z glikozylazą T4-pdg. Enzymy te działają na dimery pirymidynowe powstające w wyniku ekspozycji wirusów na światło UV. Wymienione enzymy wykazują również aktywność w stosunku do formamidopirymidyn [63,64]. Mimo podobieństwa strukturalnego, każdy z tych enzymów ma inną specyficzność substratową: T4-pdg działa na formamidoadeninę, zaś cv-pdg zarówno na formamidoadeninę FapyAde, jak i na formamidoguaninę FapyGua). Specyficzność tych enzymów w stosunku do formamidopirymidyn wskazuje na to, że organizmy poddane działaniu światła słonecznego mogą znajdować się pod selektywną presją i rozwijają te enzymy do wyeliminowania nie tylko dimerów pirymidynowych, ale również innych produktów wywołanych przez światło UV [63,64].

GLIKOZYLAZY DNA CZŁOWIEKA

U człowieka zidentyfikowano 11 glikozylaz DNA, charakteryzujących się różną specyficznością substratową (Tabela 2). Sześć z tych glikozylaz należy do grupy glikozylaz DNA typu I (MBD4, MPG, MYH, SMUG1, TDG, UNG), a pięć do grupy glikozylaz typu II (OGG1, NTH1, NEIL1, NEIL2, NEIL3) [7,65].

Niektóre glikozylazy DNA człowieka, w tym UNG, SMUG1, TDG, MBD4, wykazują aktywność wobec uracylu mogącego powstawać w wyniku deaminacji cytozyny. Glikozylaza UNG jest najbardziej wydajną glikozylazą DNA biorącą udział w usuwaniu z DNA większości reszt uracylowych. UNG oddziałuje z białkami replikacji i uwalnia reszty uracylowe z genomu bezpośrednio po replikacji [66]. Z kolei enzym SMUG1 przejawia aktywność podczas całego cyklu komórkowego i dlatego może stanowić pomocniczy system dla UNG [67]. UNG i SMUG1 są jedynymi glikozylazami DNA działającymi na jedno- i dwuniciowy DNA, podczas gdy pozostałe enzymy wymagają dla swojej aktywności dwuniciowego DNA.

TDG i MBD4 wykazują specyficzność w stosunku do reszt tyminy i uracylu powstałych w wyniku deaminacji reszt 5 MeC i C, tworzących pary z resztami guaninowymi, dzięki czemu mogą odgrywać rolę w utrzymywaniu stabilności metylowanych sekwencji CpG w DNA [68,69]. MBD4 składa się z dwóch domen: wiążącej zmetylowane CpG oraz domeny C-końcowej o aktywności glikozylazy specyficznej dla nieprawidłowo sparowanych zasad DNA [70]. Metylacja reszt C występuje wyłącznie w sekwencjach CpG genomów ssaków i jest bardzo ważna dla procesów wyciszania genów oraz regulacji transkrypcji [71,72].

U organizmów eukariotycznych zidentyfikowano dwa enzymy biorące udział w usuwaniu 8-oksoG, jednego z najczęściej występujących uszkodzeń DNA. OGG1 wycina 8-oksoG sparowaną z cytozyną, przez co zapobiega wstawieniu naprzeciwko 8-oksoG adeniny w następnym cyklu replikacyjnym [73]. Glikozylaza MYH (homolog MutY) usuwa błędnie wprowadzone reszty adeniny sparowane z resztami 8-oksoG [74]. Wspólnie z pirofosfatazą 8-OxodGTP MTH (homolog MutT), która hydrolizuje 8-OxodGTP i usuwa je z puli nukleotydów, te dwie glikozylazy DNA przeciwdziałają mutacjom DNA inicjowanym przez 8-oksoG [75,76].

Utlenione pirymidyny, takie jak glikole tyminy, wycinane są przez glikozylazy hNTH1 i hNEIL1. Oba enzymy wykazują szeroką specyficzność substratową i aktywnie

Tabela 2. Glikozylazy DNA człowieka

Enzym	Substrat
MBD4	U:G, T:G
MPG	3-MeA, 7-MeG, 3-MeG, etenoA, hipoksantyna
MYH	A:8-oksoG
NEIL1	formamidopirymidyny, utlenione pirymidyny (glikol tyminy)
NEIL2	5-hydroksyuracyl, 5-hydroksycytozyna
NEIL3	rozerwane i utlenione pirymidyny
NTH1	utlenione i rozerwane pirymidyny
OGG1	8-oksoG:C, 8-oksoG:T, 8-oksoG:G
SMUG1	uracyl
TDG	U:G, T:G, etenoC
UNG	uracyl

http://rcin.org.pl

wycinają z DNA całą gamę utlenionych pirymidyn. Białko hNEIL1 jest z jednym z ostatnio wykrytych ludzkich glikozylaz DNA dzięki przeszukiwaniu baz danych powstałych w następstwie projektu sekwencjonowania genomu człowieka [77,78]. Znaleziono także dwa homologi białka hNEIL1 – hNEIL2 oraz hNEIL3, które również mogą wycinać utlenione pirymidyny z DNA [79,80].

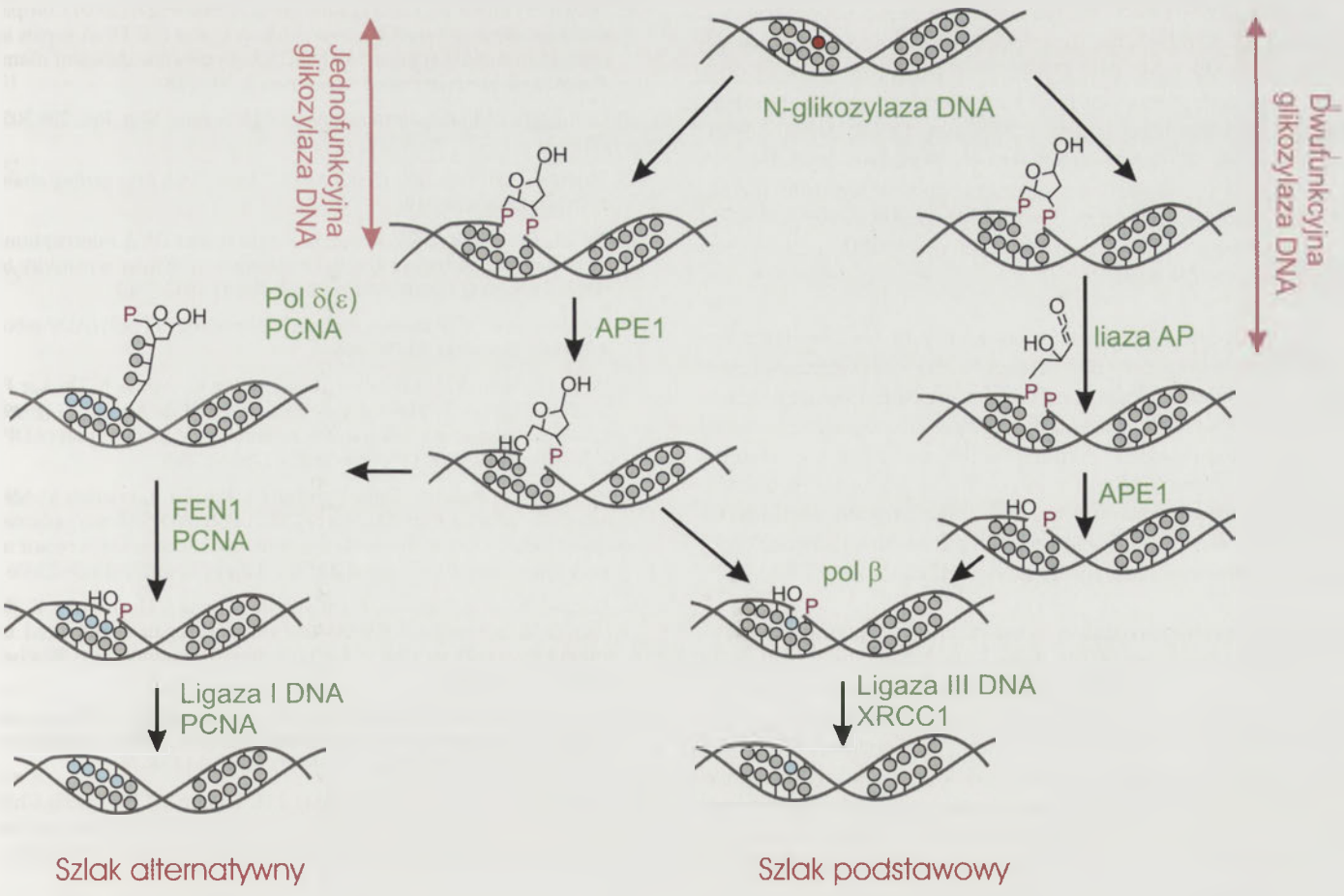
Główną funkcją glikozylazy MPG (zwanej także AAG, bądź ANPG) jest prawdopodobnie naprawa alkilowanych reszt purynowych w DNA, ale enzym ten ma szeroką specyficzność substratową obejmującą 3-metyloadeninę, 7-metyloadenię, 1,N^6-etenoadeninę i hipoksantynę [81]. MPG odznacza się niską aktywnością w stosunku do niezmodyfikowanych zasad DNA [82]. Zgodnie z tym, nadeksperesja glikozylazy DNA Mag (wykazującej podobne właściwości do białka MPG) drożdży prowadzi do powstania linii komórkowych charakteryzujących się występowaniem zwiększonej liczby mutacji. Dane te sugerują, że ścisła regulacja systemu BER jest bardzo ważna dla uniknięcia mutagennego efektu miejsc AP [83].

Można przypuszczać, że lista glikozylaz DNA organizmów eukariotycznych nie jest jeszcze zamknięta, a niedawne odkrycia SMUG1 i NEIL3 zdają się potwierdzać tę tezę [79,80,84]. Enzym SMUG1 został wyizolowany poprzez stosowanie podejścia, wykorzystując systemy klonowania i ekspresji pozwalające na monitorowanie i identyfikację enzymów, które wiążą się z syntetycznymi inhibitorami glikozylaz DNA [84]. Ze względu na współistnienie w komórce kilku enzymów usuwających uracyl o podobnych właściwościach, białko SMUG1 nie mogło być wykryte z zastosowaniem tradycyjnych metod biochemicznych i genetycznych.

SZLAKI SYSTEMU BER

Jak wspomniano, system naprawy uszkodzeń DNA przez wycinanie zasad jest inicjowany przez glikozylazy DNA, które rozpoznają uszkodzone zasady i wycinają je z DNA (Rys. 3). Niektóre glikozylazy wykazują również aktywność liazy AP i katalizują reakcję β-eliminacji wiązania 3′ fosfodiestrowego, bądź β,δ-eliminacji wiązań 3′, 5′ fosfodiestrowych [85]. W dalszej kolejności powstałe na drodze β,δ-eliminacji reszty fosforanowe na końcu 3′ usuwa endonukleaza AP (APE-1). Powstająca luka w łańcuchu DNA z wolną resztą 3′ OH jest wypełniana przez polimerazę β a następnie łączona przez ligazę DNA III, która współdziała z Polβ poprzez białko XRCC1 [86-88]. Pozostałe glikozylazy, nie wykazujące aktywności liazy AP, biorą przede wszystkim udział naprawie zasad uszkodzonych poprzez deaminację, bądź alkilację, chociaż niektóre z nich uczestniczą także w naprawie zasad uszkodzonych przez wolne rodniki tlenowe [85].

W następnym etapie liaza AP (APE-1) hydrolizuje wiązanie 5′-fosfodiestrowe pomiędzy nukleotydami po stronie 5′ uszkodzenia, powstałe w wyniku działania glikozylaz DNA nie posiadających aktywności liazy AP. Powstający wolny koniec 3′ OH jest „rozszerzany" przez Polβ i w tym



Rysunek 3. Szlaki systemu BER.

http://rcin.org.pl

samym czasie 5' końcowy fosforan deoksyrybozy (5'-dRP) jest usuwany przez Polβ wykazującą aktywność liazy AP, a następnie powstałe nacięcie jest łączone przez ligazę DNA III współdziałającą z białkiem XRCC1. Taki przebieg usuwania pojedynczej, uszkodzonej zasady w DNA jest nazywany podstawowym szlakiem BER (ang. *short path BER).*

W niektórych wypadkach system BER może odbywać się na drodze szlaku alternatywnego (ang. *long path BER*), w którym polimerazy DNA δ i ε syntetyzują kilka nukleotydów poprzez przemieszczenie nici DNA zawierającej 5'-dRP w kierunku 5'→ 3' poczynając od miejsca AP, w następstwie czego powstaje struktura tzw. odstającej nici DNA (ang. *flap*). Powstała wystająca struktura 5' jednoniciowego DNA jest następnie usuwana przez endonukleazę FEN-1. Ten szlak w odróżnieniu od szlaku podstawowego wymaga PCNA, które oddziałuje z Pol δ/ε, FEN1 oraz ligazą DNA I [89]. W końcowym etapie ligaza I skleja powstałe pęknięcia [90,91].

UWAGI KOŃCOWE

Etap wykrywania pojedynczej, uszkodzonej zasady DNA w genomie pozostaje jak dotąd słabo poznany i jest jednym z najważniejszych procesów naprawy DNA. Postęp w ostatnich latach w badaniach mechanizmów mutagenezy, który bardzo dobrze ilustruje analiza działania glikozylazy uracylowej na poziomie molekularnym, pozwolił na wydodrębnienie poszczególnych etapów wykrywania i rozpoznawania uszkodzeń DNA przez glikozylazy DNA i glikozylazy/AP liazy. Modyfikacje zasad są główną formą uszkodzeń DNA. Naprawa DNA przez wycinanie zachodzi na odrębne sposoby: poprzez wycinanie zasad lub wycinanie nukleotydów (NER) [92]. Poza tym uszkodzenia DNA mogą być naprawiane bezpośrednio (rekombinacja), bądź też przez inne systemy naprawy DNA, NHEJ i SSA. [93,94]. Określenie molekularnych podstaw rozpoznania uszkodzeń przez enzymy uczestniczące w każdym rodzaju naprawy DNA będzie wymagało podobnego podejścia metodycznego, jak zastosowany dla enzymów uczestniczących w systemie BER.

Ekspozycja uszkodzonego nukleotydu na zewnątrz helisy DNA wydaje się decydującym dla specyficzności rozpoznania uszkodzenia mechanizmem BER i tworzy odpowiednie aktywne katalitycznie miejsca dla usuwania uszkodzeń. Zastosowanie inżynierii białek może być kluczem do skonstruowania kieszeni rozpoznającej uszkodzoną zasadę dla enzymów o szerokiej specyficzności, takich jak Endo III czy AlkA, w celu odkrycia nowych aktywności, oprócz tych, które determinują ich zdolność do wiązania się z DNA.

Dokładne rozpoznanie specyficzności działania enzymów biorących udział w naprawie DNA jest niezbędne do stworzenia nowych efektywnych inhibitorów ich działania. Inhibitory te nie muszą przypominać struktury rozpoznawanej zasady DNA, ale mogą prawdopodobnie wykorzystywać budowę kieszeni enzymatycznej. Zastosowanie tego typu inhibitorów może stać się jedną ze strategii w terapii przeciwnowotworowych [23]. Innym podejściem może być zastosowanie związków chemicznych wiążących się z miejscami AP, co spowoduje zahamowanie dalszych etapów naprawy DNA przez wycinanie nieprawidłowych zasad i może zwiększyć skuteczność działania leków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej [95-98]. Dlatego dotychczasowa wiedza z zakresu białek systemu naprawy uszkodzeń DNA przez system BER może mieć istotne zastosowanie kliniczne. Wiedza na temat mechanizmów systemu naprawy uszkodzeń BER może stanowić podłoże do badań nad rolą związków, których celem pośrednim jest zaburzenie systemów naprawy, a efektem docelowym śmierć komórek nowotworowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Marnett LJ, Plastaras JP (2001) Endogenouse DNA damage and mutation. Trends Genet 17:214-221
2. Krokan HE, Nilsen H, Skorpen F, Otterlei M, Slupphaug G (2000) Base excision repair of DNA in mammalian cell. FEBS lett 476:73-77
3. Nilsen H, Krokan HE (2001) Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis 22:987-98*
4. Lindahl T (1976) New class of enzymes acting on damaged DNA. Nature *(London) 259:64-66*
5. Lindahl T (1979) DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 22:135-192
6. Duncan BK, Weiss B (1982) Specific mutator effects of ung (uracil-DNA glycosylase) mutations in Escherichia coli. J Bacteriol. 151:750-755
7. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. Toxicology 193(1-2):3-34
8. Janion C Some. (2001) Provocative Thoughts on Damage and Repair of DNA J. Biomed Biotechnol 1:50-51
9. Dantzer F, Bjoras M, Luna L, Klungland A, Seeberg E (2003) Comparative analysis of 8-oxoG:C, 8-oxoG:A, A:C and C:C DNA repair in extracts from wild type or 8-oxoG DNA glycosylase deficient mammalian and bacterial cells. DNA repair 2: 707-718
10. Lindahl T (1990) Repair of intrinsic DNA lesions. Mut. Res. 238:305-311
11. *Thompson LH, West MG (2000) XRCC1 keeps DNA from getting stranded* Mutat Res 459:1-18
12. Ho EL, Satoh MS (2003) Repair of single-strand DNA interruptions by redundant pathways and its implication in cellular sensitivity to DNA-damaging agents. *Nucleic Acids Res 31:7032-7040*
13. Burkle A (2001) Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. Bioessays 23:795-806
14. Ame JC, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P, Muller S, Hoger T, Menissier-de Murcia J and de Murcia G (1999) PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. J Biol Chem 274:17860-17868
15. Schreiber V, Ame JC, Dolle P, Schulz I, Rinaldi B, Fraulob V, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. J Biol Chem 277:23028-23036
16. Dantzer F, de la Rubia G, Menissier-de Murcia J, Hostomsky Z, de Murcia G, Schreiber V (2000) Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. Biochemistry 39:7559-7569
17. Caldecott KW, McKeown CK, Tucker JD, Ljungquist S, Thompson LH (1994) An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. Mol Cell Biol 14:68-76
18. Caldecott KW, Tucker JD, Stanker LH, Thompson LH (1995) Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells. Nucleic Acid Res 23:4836-4843

http://rcin.org.pl

19. Vidal AE, Boiteux S, Hickson ID, Radicella JP (2001) XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. EMBO J 20:6530-6539

20. Doetsch PW, Cunningham RP (1990) The enzymology of apurinic/apyrimidinic endonucleases. Mutat Res 236:173-201

21. Cuniasse P, Fazakerley GV, Guschlbauer W, Kaplan BE, Sowers LC (1990) The abasic site as a challenge to DNA polymerase. A nuclear magnetic resonance study of G, C and T opposite a model abasic site. J Mol Biol 213:303-314

22. Hanawalt PC, Cooper PK, Ganesan AK, Smith CA (1979) DNA repair in bacteria and mammalian cells. Annu Rev Biochem 48:783-836

23. Scharer OD, Jricny J (2001) Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. Bioessays 23:270--281

24. Mol CD, Parikh SS, Putnam CD, Lo TP, Tainer JA (1999) DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. Annu Rev Biophys Biomol Struct 28:101-128

25. McCullough AK, Dodson ML, Lloyd RS (1999) Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. Annu Rev Biochem 68:255-285

26. Pearl LH (2000) Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily Mutat Res 460:165-181

27. Parikh SS, Putnam CD, Tainer JA (2000) Lessons learned from structural results on uracil-DNA glycosylase. Mutat Res 460:183-199

28. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L (1995) The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. Nature 373:487–493

29. Mol CD, Arvai AS, Sanderson RJ, Slupphaug G, Kavli B, Alseth I, Krokan HE, Tainer JA (1995) Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. Cell 80:869–878

30. Kavli B, Slupphang G, Mol CD, Arvai AS, Peterson SB, Tainer JA, Krokan HE (1996) Excision of cytosine and thymine from DNA by mutants of human uracil-DNA glycosylase. EMBO J 15:3442-3447

31. Slupphaug G, Mol CD, Kavli B, Arvai AS, Krokan HE, Tainer JA (1996) A nucleotide-flipping mechanism from the structure of human uracil-DNA glycosylase bound to DNA. Nature 384:87-92

32. Parikh SS, Mol CD, Slupphaug G, Bharati S, Krokan HE, Tainer JA (1998) Base excision repair initiation revealed by crystal structures and binding kinetics of human uracil-DNA glycosylase with DNA. EMBO J 17:5214–26

33. Parikh SS, Wlacher G, Jones GD, Slupphang G, Krokan HE, Blackburn GM, Tainer JA (2000) Uracil-DNA glycosylase-DNA substrate and product structures: conformational strain promotes catalytic efficiency by coupled stereoelectronic effects. Proc Natl Acad Sci *USA* 97:5083-5088

34. Jiang YL, Kwon K, Stivers JT (2001) Turning On uracil-DNA glycosylase using a pyrene nucleotide switch. J Biol Chem 276:42347--42354

35. O'Neill RJ, Vorob'eva OV, Shahbakhti H, Zmuda E, Bhagwat AS, Baldwin GS (2003) Mismatch uracil glycosylase from Escherichia coli: a general mismatch or a specific DNA glycosylase? J Biol Chem 278:20526-32

36. Yamamoto Y, Sekiguchi M (1979) Pathways for repair of DNA damaged by alkylating agent in Escherichia coli. Mol Gen Genet 171:251-256

37. Grzesiuk E, Gozdek A, Tudek B (2001) Contribution of E. coli AlkA, TagA glycosylases and UvrABC-excinuclease in MMS mutagenesis. Mutat Res 480-481:77-84

38. Kaasen I, Evensen G, Seeberg E (1986) Amplified expression of the tag+ and alkA+ genes in Escherichia coli: identification of gene products and effects on alkylation resistance. J Bacteriol 168:642-647

39. Sakumi K, Sekiguchi M (1990) Structures and functions of DNA glycosylases. Mutat Res 236:161-172

40. Steinum AL., Seeberg E (1986) Nucleotide sequence of the tag gene from Escherichia coli. Nucleic Acid Res 14:3763-3772

41. Bjelland S, Bjoras M, Seeberg E (1993) Excision of 3-methylguanine from alkylated DNA by 3-methyladenine DNA glycosylase I of Escherichia coli. Nucleic Acid Res 21:2045-2049

42. Tudek B, Van Zeeland AA, Kusmierek JT, Laval J (1998) Activity of Escherichia coli DNA-glycosylases on DNA damaged by methylating and ethylating agents and influence of 3-substituted adenine derivatives. Mutat Res 407:169-176

43. Thomas L, Yang CH, Goldthwait DA (1982) Two DNA glycosylases in Escherichia coli which release primarily 3-methyladenine. Biochemistry 21:1162-1169

44. O'Brien PJ, Ellenberger T (2004) The Escherichia coli 3-methyladenine DNA glycosylase AlkA has a remarkably versatile active site. J Biol Chem 279:26876-26884

45. Karran P, Lindahl T (1978) Enzymatic excision of free hypoxanthine from polydeoxynucleotides and DNA containing deoxyinosine monophosphate residues. J Biol Chem 253:5877-5879

46. Zharkov DO, Ishchenko AA, Douglas KT, Nevinsky GA (2003) Recognition of damaged DNA by *Escherichia coli Fpg protein: insights from structural and kinetic data. Mutat Res 531:141-156*

47. Zaika EI, Perlow RA, Matz E, Broyde S, Gilboa R, Grollman AP, Zharkov DO (2004) Substrate discrimination by formamidopyrimidine-DNA glycosylase: a mutational analysis. J Biol Chem 279:4849--4861

48. Gilboa R, Zharkov DO, Golan G, Fernandes AS, Gerchman SE, Matz E, Kycia JH, Grollman AP, Shoham G. (2002) Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA. J Biol Chem 277:19811-19816

49. Fromme JC, Verdine GL (2003) DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM. J Biol Chem 278:51543-51548

50. Manuel RC, Hitomi K, Arvai AS, House PG, Kurtz AJ, Dodson ML, McCullough AK, Tainer JA, Lloyd RS (2004) Reaction intermediates in the catalytic mechanism of Escherichia coli MutY DNA glycosylase. J Biol Chem 279:46930-46939

51. *Fromme JC, Banerjee A, Huang SJ, Verdine GL (2004) Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase. Nature* 427:652-656

52. House PG, Volk DE, Thiviyanathan V, Manuel RC, Luxon BA, Gorenstein DG, Lloyd RS (2001) Potential double-flipping mechanism by *E. coli MutY. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 68:349-364*

53. *Gogos A, Cillo J, Clarke ND, Lu A-L (1996) Specific recognition of A/G and A/7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) mismatches by Escherichia coli* MutY: removal of the C-terminal domain preferentially affects A/8--oxoG recognition. Biochemistry 35:16665–16671

54. Manuel RC, Czerwinski EW, Lloyd RS (1996) Identification of the structural and functional domains of MutY, an Escherichia coli DNA mismatch repair enzyme. J Biol Chem 271:16218–16226

55. GuanY, Manuel RC, Arvai AS, Parikh SS, Mol CD (1998) Identification of the structural and functional domains of MutY, an *Escherichia coli* DNA mismatch repair enzyme. Nat Struct Biol 5:1058–1064

56. Pearson CG, Shikazono N, Thacker J, O'Neill P (2004) Enhanced mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanine when present within a clustered DNA damage site. Nucleic Acids Res *32:263-270*

57. Rogers PA, Eide L, Klungland A, Ding H (2003) Reversible inactivation of E. coli endonuclease III via modification of its [4Fe-4S] cluster by nitric oxide. DNA Repair (Amst) 2:809-817

58. *Katcher HL, Wallace SS (1983) Characterization of the Escherichia coli* X-ray endonuclease, endonuclease III. Biochemistry 22:4071–4081

59. Boorstein RJ, Hilbert TP, Cadet J, Cunningham RP, Teebor GW (1989) UV-induced pyrimidine hydrates in DNA are repaired by bacterial and mammalian DNA glycosylase activities. Biochemistry 28:6164–6170

http://rcin.org.pl

60. Hatahet Z, Kow YW, Purmal AA, Cunningham RP, Wallace SS (1994) New substrates for old enzymes. 5-Hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for *Escherichia coli* endonuclease III and formamidopyrimidine DNA N-glycosylase, while 5-hydroxy-2'-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA N--glycosylase. J Biol Chem 269:18814–18820

61. Gates FT III, Linn S (1977) Endonuclease from *Escherichia coli* that acts specifically upon duplex DNA damaged by ultraviolet light, osmium tetroxide, acid, or x-rays. J Biol Chem 252:2802–2807

62. Thayer MM, Ahern H, Xing D, Cunningham RP, Tainer JA (1995) Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. EMBO J 14:4108–4120

63. Dizdaroglu M, Zastawny TH, Carmical JR, Lloyd RS (1996)) A novel DNA N-glycosylase activity of *E. coli* T4 endonuclease V that excises 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine from DNA, a UV-radiation- and hydroxyl radical-induced product of adenine. Mutat Res 362:1-8

64. Jaruga P, Jabil R, McCullough AK, Rodriguez H, Dizdaroglu M, Lloyd RS (2002) Chlorella virus pyrimidine dimer glycosylase excises ultraviolet radiation- and hydroxyl radical-induced products 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine and 2,6-diamino-4-hydroxy--5-formamidopyrimidine from DNA. Photochem Photobiol 75:85--91

65. Scharer OD (2003) Chemistry and biology of DNA repair. Angew Chem Int Ed Engl 42:2946-2974

66. Otterlei M, Warbrick E, Nagelhus TA, Haug T, Slupphaug G, Akbari M, Aas PA, Steinsbekk K, Bakke O, Krokan HE (1999) Post-replicative base excision repair in replication foci. EMBO J **18:3834-3844**

67. Nilsen H, Haushalter KA, Robins P, Barnes DE, Verdine GL, Lindahl T (2001) Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: role of the SMUG1 uracil-DNA glycosylase. EMBO J 20:4278--4286

68. Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. Nature 401:301-304. Erratum in: Nature 2000 404:525

69. Hardeland U, Bentele M, Lettieri T, Steinacher R, Jiricny J, Schar P (2001) Thymine DNA glycosylase. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol *68:235-253*

70. Wu P, Qiu C, Sohail A, Zhang X, Bhagwat AS, Cheng X (2003) Mismatch repair in methylated DNA. Structure and activity of the mismatch-specific thymine glycosylase domain of methyl-CpG-binding protein MBD4. J Biol Chem 278:5285-5291

71. Um S, Harbers M, Benecke A, Pierrat B, Losson R, Chambon P (1998) Retinoic acid receptors interact physically and functionally with the T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. J Biol Chem 273:20728-20736

72. Zhu B, Zheng Y, Hess D, Angliker H, Schwarz S, Siegmann M, Thiry S, Jost JP (2000) 5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence. Proc Natl Acad Sci USA 97:5135-5139

73. Boiteux S, Radicella JP (1999) Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. Biochimie 81:59-67

74. Slupska MM, Luther WM, Chiang JH, Yang H, Miller JH (1999) Functional expression of hMYH, a human homolog of the Escherichia coli MutY protein. J Bacteriol 181:6210-6213

75. Michaels ML, Cruz C, Grollman AP, Miller JH (1992) Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. Proc Natl Acad Sci USA 89:7022--7025

76. Grollman AP, Moriya M (1993) Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. Trends Genet 9:246-249

77. Hazra TK, Izumi T, Boldogh I, Imhoff B, Kow YW, Jaruga P, Dizdaroglu M, Mitra S (2002) Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. Proc Natl Acad Sci USA 99:3523-3528

78. Bandaru V, Sunkara S, Wallace SS, Bond JP (2002) A novel human DNA glycosylase that removes oxidative DNA damage and is homologous to Escherichia coli endonuclease VIII. DNA Repair 1:517--529

79. Hazra TK, Kow YW, Hatahet Z, Imhoff B, Boldogh I, Mokkapati SK, Mitra S, Izumi T (2002) Identification and characterization of a novel human DNA glycosylase for repair of cytosine-derived lesions. J Biol Chem 277:30417-30420

80. Rosenquist TA, Zaika E, Fernandes AS, Zharkov DO, Miller H, Grollman AP (2003) The novel DNA glycosylase, NEIL1, protects mammalian cells from radiation-mediated cell death. DNA Repair 2:581-591

81. Wyatt MD, Allan JM, Lau AY, Ellenberger TE, Samson LD (1999) 3-methyladenine DNA glycosylases: structure, function, and biological importance. Bioessays 21:668-676

82. Berdal KG, Johansen RF, Seeberg E (1998) Release of normal bases from intact DNA by a native DNA repair enzyme. EMBO J 17:363--367

83. Glassner BJ, Rasmussen LJ, Najarian MT, Posnick LM, Samson LD (1998) Generation of a strong mutator phenotype in yeast by imbalanced base excision repair. Proc Natl Acad Sci USA 95:9997-10002

84. Haushalter KA, Todd Stukenberg MW, Kirschner MW, Verdine GL (1999) Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors. Curr Biol 9:174-185

85. Ide H, Kotera M (2004) Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. Biol Pharm Bull 27:480-485

86. Kubota Y, Nash RA, Klungland A, Schar P, Barnes DE, Lindahl T (1996) Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. EMBO J 15:6662

87. Bennett RA, Wilson III DM, Wong D, Demple B (1997) Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase beta in the base excision repair pathway. Proc Natl Acad Sci USA 94:7166

88. Vidal EA, Boitex S, Hickson ID, Radicella JP (2001) XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. EMBO J 20:6530

89. Matsumoto Y, Kim K, Bogenhagen DF (1994) Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in Xenopus laevis oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. Mol Cell Biol 14:6187-97

90. Pascucci B, Stucki M, Jonsson ZO, Dogliotti E, Hubscher U (1999) Long patch base excision repair with purified human proteins. DNA ligase I as patch size mediator for DNA polymerases delta and epsilon. J Biol Chem 274:33696

91. Matsumoto Y, Kim K, Hurwitz J, Gary R, Levin DS, Tomkinson AE, Park MS (1999) Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen--dependent repair of apurinic/apyrimidinic sites with purified human proteins. J Biol Chem 274:33703

92. Wood RD (1997) Nucleotide excision repair in mammalian cells. J Biol Chem 272:23465–23468

93. Mol CD, Kuo CF, Thayer MM, Cunningham RP, Tainer JA (1995) Structure and function of the multifunctional DNA-repair enzyme exonuclease III. Nature 374:381–386

94. Tsukamoto Y, Ikeda H (1998) Double-strand break repair mediated by DNA end-joining. Genes Cells 3:135–144

95. Taverna P, Liu L, Hwang HS, Hanson AJ, Kinsella TJ, Gerson SL (2001) Methoxyamine potentiates DNA single strand breaks and double strand breaks induced by temozolomide in colon cancer cells. Mutat Res 485:269-281

96. Liu L, Nakatsuru Y, Gerson SL (2002) Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer. Clin Cancer Res 8:2985-2991

http://rcin.org.pl

97. Liu L, Yan L, Donze JR, Gerson SL, (2003) Blockage of abasic site repair enhances antitumor efficacy of 1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in colon tumor xenografts. Mol Cancer Ther 2:1061-1066

98. Taverna P, Hwang HS, Schupp JE, Radivoyevitch T, Session NN, Reddy G, Zarling DA, Kinsella TJ (2003) Inhibition of base excision repair potentiates iododeoxyuridine-induced cytotoxicity and radiosensitization. Cancer Res 63:838-846

Base Excision Repair

Tomasz Śliwiński, Janusz Błasiak✉

Department of Molecular Genetics, University of Lodz, 12/16 Banacha St., 90-237 Lodz, Poland
✉e-mail: januszb@biol.uni.lodz.pl

Key words: DNA damage, DNA base modification, base excision repair, apurinic/apyrimidinic sites, DNA glycosylases

ABSTRACT

Damage to DNA bases resulting from deamination, oxidation, and alkylation is mainly repaired by base-excision repair. BER is initiated by DNA glycosylases, which recognize damaged bases and excise them from DNA by hydrolyzing the *N*-glycosidic bond between the base and the sugar phosphate backbone of DNA to generate an abasic site. Different human and *E. coli* DNA glycosylases have been cloned and characterized, each one with unique substrate specifity. Some of them additionaly have AP lyase activity, which enables them to cleave the bond between the sugar and phosphate 3′ to the damaged site. BER consist of two repair pathways (short or long) in which one or more nucleotides are introduced respectively. In conclusion, it seems to be likely that BER pathways are essential for genomic repair and stability in living cells.

http://rcin.org.pl

Eukariotyczne polimerazy DNA

Agnieszka Czechowska

Janusz Błasiak✉

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

✉Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: januszb@biol.uni.lodz.pl; tel. (42) 635 44 89, faks: (42) 635 44 84

Artykuł otrzymano 23 lipca 2004
Artykuł zaakceptowano 4 stycznia 2005

Słowa kluczowe: eukariotyczne polimerazy DNA, replikacja DNA, naprawa DNA, synteza na uszkodzonej matrycy DNA, aktywność korektorska 3'→5' egzonukleazy, starzenie się

Wykaz skrótów: BER – naprawa DNA przez wycinanie zasad; dRP – deoksyrybozo-5'-fosforan; MMR – naprawa błędnie sparowanych zasad DNA; NER – naprawa przez wycinanie nukleotydów DNA; NHEJ – naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców; pol – polimeraza; *POLA, POLB, POLG, POLD, POLE, POLZ, POLH, POLK, POLI, POLQ, POLL, POLM, POLS, hTERT, hTR* – geny kodujące ludzkie polimerazy DNA; TdT – terminalna transferaza deoksynukleotydowa; TREX1, TREX2, Mre11, WRN, RAD1, RAD9, APE1, VDJP – autonomiczne egzonukleazy 3'→5'; *Rev3, Rev7, XPV, DinB1, Rad30A, Rad30B, XPV, mus308, Trf4, POL4, POL5* – geny kodujące eukariotyczne polimerazy DNA

STRESZCZENIE

Wiedza o eukariotycznych polimerazach DNA wzrosła znacząco w czasie ostatnich lat. Dobrze została poznana zarówno struktura, jak i funkcja „klasycznych" polimeraz DNA pol α, β, δ, ε i γ. Poza tym zidentyfikowano wiele nowych polimeraz DNA o rzadko spotykanych właściwościach. Nowo odkryte polimerazy DNA mogą prowadzić syntezę na uszkodzonej matrycy, uczestniczyć w somatycznej hipermutacji immunoglobulin, rekombinacji DNA czy zapobiegać nowotworom. Wiele uwagi poświęcono również roli aktywności 3'→5' egzonukleazy w dokładności syntezy DNA. W niniejszym artykule przedstawiono także dane, które świadczą o tym, że brak niektórych polimeraz DNA lub zmiana ich funkcji mogą przyczyniać się do procesów nowotworzenia oraz starzenia się.

WPROWADZENIE

Polimerazy DNA odgrywają zasadniczą rolę w utrzymaniu stabilności genetycznej w czasie replikacji, naprawy i rekombinacji DNA. Od odkrycia w 1957 roku polimerazy α (pol α) liczba nowo poznanych polimeraz DNA rośnie, a identyfikacja we wczesnych latach 70-tych polimeraz β i γ pozwoliła na sformułowanie koncepcji, że pol α jest replikazą jądrowego DNA, pol β bierze udział w naprawie DNA, a pol γ katalizuje syntezę DNA w mitochondriach. Odkrycie w latach 80-tych pol δ i ε oraz poznanie ich właściwości pozwoliło przypisać poszczególnym polimerazom więcej niż jedną funkcję. Z drugiej strony odkryto, iż kompletna synteza określonego fragmentu DNA może wymagać udziału więcej niż jednej polimerazy. W miarę upływu lat odkrywano kolejne polimerazy, jednakże we wszystkich dotąd poznanych wyróżnić można wiele wspólnych motywów i cech. Na podstawie obecności homologicznych sekwencji i podobieństw strukturalnych podzielono wszystkie polimerazy na 4 klasy (rodziny): A, B, X i Y [1]. Szczególne zainteresowanie budzą stosunkowo niedawno odkryte pol ζ, η, ι i κ, biorące udział w syntezie na uszkodzonej matrycy (ang. *translesion synthesis)*. Poznanie funkcji polimeraz θ, λ, μ, σ i φ wymaga jeszcze dodatkowych badań.

EUKARIOTYCZNE POLIMERAZY DNA

Polimeraza a należy do grupy „klasycznych" polimeraz DNA, które odgrywają główną rolę w procesie replikacji i naprawy DNA. Do grupy tej zalicza się również polimerazy δ i ε, które razem z pol α stanowią rodzinę B eukariotycznych polimeraz DNA oraz mitochondrialną pol γ. Polimerazy rodziny B wykazują podobieństwa strukturalne, zawierają sekwencje homologiczne i charakteryzują się dużą dokładnością syntezy DNA. Pol α jest zbudowana z czterech podjednostek (masa cząsteczkowa podjednostek pol α człowieka wynosi 48, 55, 68 i 180 kDa) [2]. Największa podjednostka pol α, p180, wykazuje aktywność polimerazy i zawiera trzy domeny: w N-końcu, domenę centralną i w C-końcu. Największe znaczenie dla funkcji katalitycznej ma domena centralna (reszty 330–1279) o zachowanej w ewolucji sekwencji, natomiast domeny N-końcowa (reszty 1–329) i C-końcowa (reszty 1235–1465) nie są istotne dla aktywności katalitycznej pol α [2]. Dwie najmniejsze podjednostki pol α (p55 i p48) tworzą prymazę, syntetyzującą starter niezbędny do rozpoczęcia syntezy DNA przez inne polimerazy [3]. Prymaza, niezależnie od pozostałych podjednostek pol α, może przemieszczać się do jądra dzięki obecności w podjednostce p55 sekwencji sygnałowej kierującej ją do jądra p55 [2]. Podjednostka p55, oprócz bezpośredniego oddziaływania z p48, wiąże się z podjednostką katalityczną p180 [3]. Podjednostka p68, zwana także podjednostką B, dzięki jednoczesnemu związaniu z p180 i prymazą, bierze udział w utrzymaniu integralności funkcjonalnego heterotetrameru polimerazy α w jądrze komórkowym. Natomiast oddziaływanie podjednostek B i katalitycznej w cytosolu umożliwia ich przemieszczenie sie do jądra komórkowego. Podjednostka p68 może również pełnić funkcje regulatorowe, na co wskazuje jej

http://rcin.org.pl

fosforylacja skorelowana z fazami cyklu komórkowego [4]. Główną funkcją kompleksu polimerazy α jest skoordynowana synteza starterów na nici prowadzącej i opóźnionej. Pol α wiąże się z kompleksem inicjacyjnym replikacji w miejscu inicjacji i rozpoczyna syntezę hybrydy RNA/DNA zawierającej 10 nukleotydów RNA (aktywność prymazy) i 20-30 nukleotydów DNA (aktywność polimerazy) [5]. Powstały oligonukleotyd jest następnie wydłużany przez pol δ lub ε. Pol α jest zatem polimerazą DNA zdolną rozpocząć replikację *de novo* [2]. Poza replikacją pol α bierze udział w naprawie pęknięć dwuniciowych DNA, tworząc strukturę przypominającą widełeki replikacyjne [6]. Pol α uczestniczy także w synchronizacji replikacji DNA z cyklem komórkowym oraz wraz z telomerazą w syntezie telomerów [2].

Polimeraza β jest pojedynczym polipeptydem o masie cząsteczkowej 39 kDa, zbudowanym z 335 reszt aminokwasowych. Jest to najmniejsza dotychczas poznana eukariotyczna polimeraza DNA [7]. W jej budowie wyróżnia się większą (31 kDa), C-końcową domenę, wykazującą aktywność katalityczną polimerazy i mniejszą (8 kDa) domenę N-końcową o aktywności liazy deoksyrybozo-5'-fosforanu (dRP) i AP liazy [2]. Główną funkcją pol β jest udział w naprawie przez wycinanie zasad (BER) [8]. Najczęściej podczas BER wycinana jest jedna zasada (ang. *short patch*) i powstaje jednonukleotydowa luka, która u ssaków jest wypełniana przez polimerazę β. W pierwszym etapie BER uszkodzone zasady są wycinane przez glikozylazę DNA, w wyniku czego powstaje miejsce AP (apurynowe/apirymidynowe). Następnie działa endonukleaza AP, przecinająca wiązanie fosfodiestrowe po stronie 5' miejsca AP, polimeraza β i ligaza DNA. Pol β usuwa pozostały szkielet cukrowy dzięki aktywności AP liazy i włącza właściwy nukleotyd [9]. Gdy wycinany jest więcej niż jeden nukleotyd (ang. *long patch*), podczas BER biorą udział białka PCNA (antygen jądrowy komórek proliferujących) i endonukleazy FEN1, natomiast synteza naprawcza jest katalizowana przez pol δ i ε. PCNA jest trimerycznym białkiem, które z jednej strony tworzy pierścień otaczający nić DNA, a z drugiej może oddziaływać z pol δ i ε. FEN1 jest niezbędna do usuwania niezwiązanej struktury jednoniciowej z wolnym końcem 5', powstającej w wyniku wypierania starej nici przez nową w czasie syntezy naprawczej. Rola pol β w szlaku naprawy przez wycinanie zasad jest kluczowa, gdyż polimeraza ta dokonuje wyboru pomiędzy mechanizmem *long patch* i *short patch*. Choć system naprawy BER zależny od białka PCNA i od FEN1 wiąże się głównie z aktywnością pol δ i ε, to obecność pol β jest niezbędna, a brak tego enzymu zmniejsza efektywność naprawy DNA [10]. Dodatkowo wykazano stymulację aktywności pol β przez FEN1, co potwierdza, iż oba te enzymy mogą oddziaływać ze sobą i razem brać udział w naprawie przez wycinanie zasad [11]. Pol β może także uczestniczyć

Tabela 1. Eukariotyczne polimerazy DNA

Enzym	Rodzina	Gen	Dodatkowa aktywność	Podstawowa funkcja
α (alfa)	B	*POLA*	prymaza	inicjacja replikacji
β (beta)	X	*POLB*	AP liaza, liaza dRP	*BER, NHEJ*
γ (gamma)	A	*POLG*	egzonukleaza 3'→5', liaza dRP	replikacja mitochondrialnego DNA
δ (delta)	B	*POLD*	egzonukleaza 3'→5'	replikacja jądrowego DNA, *BER, NER*
ε (epsilon)	B	*POLE*	egzonukleaza 3'→5'	replikacja jądrowego DNA, *BER, NER*
ζ (dzeta)	B	*POLZ* (*Rev3/Rev7*)		synteza DNA na uszkodzonej matrycy
η (eta)	Y	*POLH* (*Rad30A, XPV*)		synteza DNA na uszkodzonej matrycy, somatyczna hipermutacja w genach *Ig*
κ (kappa)	Y	*POLK* (*DinB1*)		synteza DNA na uszkodzonej matrycy
ι (jota)	Y	*POLI* (*Rad30B*)	liaza dRP	synteza DNA na uszkodzonej matrycy, hipermutacja w genach *Ig, BER*
θ (theta)	A	*POLQ*	egzonukleaza 3'→5'	naprawa wiązań krzyżowych
λ (lambda)	X	*POLL*	liaza dRP, terminalna transferaza	*BER*, naprawa DNA podczas mejozy, *NHEJ*
μ (mi)	X	*POLM*	terminalna transferaza	somatyczna hipermutacja w genach *Ig, NHEJ*
σ (sigma)	X	*POLS* (*Trf4*)	egzonukleaza 3'→5'	łączenie chromatyd siostrzanych w mejozie
φ (phi)	B	*POL5*		udział w syntezie rRNA
TdT	X	*TDT*		somatyczna hipermutacja w genach Ig, *NHEJ*
Telomeraza		*hTERT, hTR*		synteza telomerów

http://rcin.org.pl

w tworzeniu synaps i rekombinacji w mejozie [7]. Ekspresja pol β jest również niezbędna dla prawidłowego przebiegu embriobenezy u myszy. Zarodki myszy pozbawione funkcjonalnego genu kodującego pol β charakteryzowały się opóźnionym wzrostem w okresie zarodkowym i umierały zaraz po urodzeniu na skutek zaburzeń oddechowych [12]. Dodatkowo obserwowano zwiększenie liczby komórek apoptotycznych w rozwijającym się ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, co może wskazywać na rolę pol β w procesie neurogenezy [12]. U *S. cerevisiae* wykazano, iż homolog pol β, kodowany przez gen *POL4*, uczestniczy w naprawie pęknięć dwuniciowych DNA, poprzez niehomologiczne łączenie końców (ang. *nonhomologous end joining*, NHEJ) [2, 7].

Polimeraza γ jest heterodimerem występującym w mitochondriach, ale kodowanym przez jądrowy DNA. Większa podjednostka o masie cząsteczkowej 140 kDa, wykazuje aktywność polimerazy DNA, 3'→5' egzonukleazy, jak również liazy deoksyrybozo-5'-fosforanu [13]. Mniejsza podjednostka, p55, zawierająca domeny odpowiedzialne za wiązanie podjednostki p140, dimeryzację i wiązanie DNA, stymuluje aktywność większej podjednostki [14]. Główna funkcja pol γ polega na replikacji mitochondralnego DNA (mtDNA) [2]. Dzięki aktywności 3'→5' egzonukleazy polimeraza zwiększa dokładność przeprowadzanej syntezy DNA [13]. Natomiast dzięki aktywności liazy dRP może ona również brać udział w naprawie mtDNA przez wycinanie [15]. Podjednostka p140, dzięki aktywności liazy, uwalnia grupę fosforanową, co umożliwia ligazie DNA utworzenie wiązania fosfodiestrowego pomiędzy nukleotydami [16].

Polimeraza δ jest enzymem charakteryzującym się zróżnicowaniem międzygatunkowym. U *S. cerevisiae* wyróżnia się 3 podjednostki (p125, p58 i p55), u ssaków 4 podjednostki (p125, p66, p50 i p12), a u *S. pombe* 5 podjednostek (p125, p55, p54, p40, p22) [17]. Pol δ, poza formą monomeryczną, może być składnikiem kompleksów wysokocząsteczkowych, których tworzenie się następuje w obecności mniejszych podjednostek. U *S. cerevisiae* heksamery $(p125/p58/p55)_2$ powstają po dodaniu do dimerów p125/p58 podjednostki p55. U *S. pombe* z trimerów p125/p55/p22 i podjednostki p54 powstają octamery $(p125/p55/p54/p22)_2$. W obu przypadkach wymienione kompleksy charakteryzują się większą efektywnością i procesywnością syntezy DNA niż formy monomeryczne [18]. Pol δ ssaków wyizolowana z tkanek ma masę cząsteczkową 250 - 500 kDa, co sugeruję, że pol δ również tworzy tetra i octamery [17]. Pol δ jest odpowiedzialna za replikację jądrowego DNA w komórkach eukariotycznych na obu niciach, po odłączeniu się pol α. Poza tą kluczową rolą, pol δ może również brać udział w systemach naprawy przez wycinanie zasad (BER) i nukleotydów (NER) [2]. Badania *in vitro* sugerują udział pol δ w systemie naprawy błędnie sparowanych zasad (MMR) [19].

Polimeraza ε zbudowana jest z czterech podjednostek, dwóch o niższej masie cząsteczkowej i dwóch o wyższej. Podjednostki enzymu wyizolowane z tkanek człowieka charakteryzują się masami cząsteczkowymi : 261, 59, 17 i 12 kDa, natomiast u *S. cerevisiae* - 256, 80, 23 i 22 kDa [20]. Pol ε jest niezbędna w procesie replikacji DNA [2]. Centrum aktywne enzymu drożdży znajduje się w N-końcu. Brak tego regionu u *S. pombe* i *S. cerevisiae*, spowodowany delecją, nie jest letalny, co sugeruje, iż inna polimeraza może przejmować rolę katalityczną pol ε [21]. Jakkolwiek brak tego regionu wiąże się z akumulacją uszkodzeń DNA i do przeżycia komórki konieczna jest ekspresja genów, których produkty biorą udział w kontroli cyklu komórkowego - *rad3*, *hus1*, *chk1* [2]. Sugeruje to, że pol ε w czasie ewolucji nabyła wyspecjalizowane funkcje, związane z kontrolą jakości replikacji DNA. Podobnie do pol δ, omawiana polimeraza bierze udział w procesach NER i BER [2].

Polimeraza ζ należy, obok pol η, κ i ι, do enzymów zdolnych do prowadzenia syntezy na uszkodzonej matrycy. Pol ζ należy do rodziny B polimeraz, a trzy pozostałe do rodziny Y [22]. Replikacja DNA prowadzona przez „klasyczne" polimerazy zostaje zablokowana w obecności uszkodzenia, natomiast synteza na uszkodzonej matrycy pozwala zakończyć proces replikacji i tym samym chroni komórkę przed śmiercią. Pol ζ została zidentyfikowana jako pierwsza polimeraza zdolna do syntezy na uszkodzonej matrycy [23]. Jest enzymem charakteryzującym się wysoką częstotliwością błędów w czasie procesu replikacji w porównaniu z „klasycznymi" polimerazami DNA. Zbudowana jest z dwóch podjednostek: Rev3 i Rev7, które razem tworzą holoenzym aktywny w replikacji DNA w obecności dimerów tymidyny. Podjednostka Rev3 stanowi centrum katalityczne pol ζ, natomiast Rev7 oddziałuje z Rev3 i stymuluje jej aktywność [23]. Pol ζ współdziała z dodatkowym enzymem - Rev1, charakteryzującym się aktywnością deoksycytydylotransferazy. Enzym ten włącza preferencyjnie cytozynę naprzeciw miejsca pozbawionego zasady, natomiast pol ζ wydłuża powstały produkt [23]. Synteza uszkodzonego DNA przez pol ζ jest poprzedzona przyłączeniem się kompleksu Rad6/Rad18 [24]. Rad6 jest enzymem stowarzyszonym z ubikwityną, natomiast Rad18 zawiera struktury palców cynkowych i wykazuje aktywność ATPazy oraz zdolność łączenia się z jednoniciowym DNA [41]. Inaktywacja genu kodującego katalityczną podjednostkę pol ζ (gen *Rev3*) u transgenicznych myszy jest letalna, prawdopodobnie na skutek kumulacji uszkodzeń DNA, które dla „klasycznych" polimeraz stanowiły barierę w procesie replikacji. Może to wskazywać na istotną funkcję pol ζ w rozwoju i wyjaśniać, dlaczego nigdy nie zidentyfikowano chorób genetycznych związanych z mutacjami w genie pol ζ [26].

Polimeraza η człowieka jest kodowana przez gen *XPV*, którego mutację można obserwować u pacjentów z wariantem *Xeroderma pigmentosum* (XP-V). Chorzy charakteryzują się nadwrażliwością na światło UV i predyspozycją do zachorowań na raka skóry. Jednocześnie ich komórki posiadają sprawny system naprawy DNA przez wycinanie nukleotydów [27]. W komórkach tych pacjentów replikacja uszkodzonego DNA jest zaburzona, co wiąże się ze zwiększoną częstością mutacji indukowanych przez promieniowanie UV. Przyczyną może być utrata aktywności polimerazy η zdolnej do syntezy na uszkodzonej matrycy. Pol η wykazuje stosunkowo wysoką częstość błędów, gdy dokonuje syntezy na matrycy nieuszkodzonego DNA, natomiast częstość ta spada, gdy synteza przebiega na matrycy zawierającej uszkodzenia DNA [28]. Pol η włącza komplementarny nukleotyd naprzeciwko uszkodzenia DNA, jakim mogą być dimery *cis-syn* TT, addukty cisplatyny, addukty

http://rcin.org.pl

AAF (N-2-acetylo-aminofluoren), a następnie odłącza się od DNA i nie jest zdolna do kontynuowania procesu replikacji [22]. Pol η nie może syntetyzować DNA na matrycy zawierającej fotoprodukty 6-4 [22]. W przypadku 8-oksoguaniny, jednego z najczęściej występujących uszkodzeń oksydacyjnych DNA, drożdżowa pol η preferencynie włącza C naprzeciwko 8-oxo-dG, zachowując wierność procesu replikacji [29]. Ludzka pol η włącza C lub A z podobną częstotliwością, dlatego stwierdza się, iż wprowadza ona błędy w trakcie syntezy na matrycy zawierającej 8-oksyguaninę i może być przyczyną transwersji G→T [22]. Bezpośrednie oddziaływanie PCNA z pol η stymuluje replikację na uszkodzonej matrycy [2]. Pol η może także brać udział w somatycznej hipermutacji w genach immunoglobulin, polegającej na zwiększeniu częstości mutacji w segmentach genowych V już złożonego genu immunoglobuliny, co dodatkowo, poza wcześniejszą rearanżacją genów, zwiększa różnorodność w układzie odpornościowym [30].

Polimeraza κ należy do rodziny Y polimeraz i jest produktem genu *DinB1* [2, 31]. Jako enzym biorący udział w syntezie poprzez uszkodzenie wykazuje niską wierność replikacji na nieuszkodzonej matrycy. Pol κ jest 33 razy mniej dokładna niż pol β. Może ona generować średnio jedną mutację na 200 syntetyzowanych nukleotydów, z przewagą transwersji T→G (1:147) [31]. Pol κ nie może przeprowadzać syntezy na matrycy zawierającej dimery TT *cis-syn*, fotoprodukty 6-4 TT oraz addukty cisplatyny [32]. Podobnie jak pol η, pol κ względem pewnych uszkodzeń jest polimerazą o dużej wierności replikacyjnej (ang. *error-free*), a względem innych jest skłonna wprowadzać błędy (ang. *error-prone*). Pierwszy przypadek dotyczy adduktu (–)-*trans-anti*-benzopiren-N^{2}-dG, który powstaje w wyniku ekspozycji na α-benzopiren. Ludzka pol κ włącza właściwą zasadę (C) naprzeciwko uszkodzenia, co sugeruje, iż może ona pełnić istotną rolę w hamowaniu mutacji indukowanych przez α-benzopiren [22]. Natomiast względem takich uszkodzeń jak addukty AAF-G, miejsca AP i 8-oksoguanina, pol κ charakteryzuje się wysoką częstością błędów, włączając niewłaściwy nukleotyd i stymulując tym samym mutagenezę [22]. Inną cechą pol κ jest stosunkowo wysoka procesywność (25 lub więcej nukleotydów), czyli zdolność do syntezy długich fragmentów DNA bez odłączania się od niego. Taka cecha wraz z niską wiernością replikacji, może świadczyć o udziale pol κ w spontanicznej mutagenezie [33]. Możliwy jest także udział tej polimerazy w spermatogenezie [34].

Polimeraza ι należy do rodziny polimeraz Y i jest produktem genu *Rad30B*. Pol ι jest najmniej dokładną polimerazą replikującą nieuszkodzony DNA [2]. Może ona tworzyć błędnie sparowane zasady. Dzieje się tak, gdyż pol ι wstawia 3-10 razy częściej G zamiast A naprzeciwko T oraz wstawia naprzeciwko C niewłaściwe zasady [22, 35]. Co więcej, gdy pol ι napotka T, to po wstawieniu G przerywa replikację, co ogranicza jej aktywność do syntezy krótkich odcinków DNA [22]. Sugeruje się, iż te specyficzne cechy pol ι mogą być związane ze zjawiskiem hipermutacji somatycznej w trakcie tworzenia immunoglobulin, w czasie którego poziom mutacji w genach kodujących lekkie i ciężkie łańcuchy przeciwciał wynosi 10^{-3}-10^{-4} na parę zasad [22]. Ludzka pol ι może włączać preferencyjnie G (rzadziej T, A i C) naprzeciw miejsca AP, po czym przerywa syntezę [36]. Napotykając 8-oksoguaninę, pol ι ulega zablokowaniu w przeciwieństwie do pol η, κ i β. W przypadku adduktu AAF z G pol ι preferencyjnie włącza cytozynę, po czym jej aktywność jest blokowana przez uszkodzenie. Natomiast w odpowiedzi na fotoprodukty 6-4 TT (dimery pirymidyna-pirymidon) pol ι preferencyjnie włącza A naprzeciwko T fotoproduktu TT od końca 3' DNA. Po napotkaniu dimeru *cis-syn* TT, pol ι włącza T, w odróżnieniu od pol η, która włącza właściwą zasadę [36]. Z drugiej strony, pol ι wykazuje aktywność liazy dRP. W obecności glikozylazy uracylu DNA, AP endonukleazy, pol ι i ligazy DNA można obserwować naprawę parowania A-U i G-U w DNA [37]. Inne badania sugerują, iż *in vitro* pol ι może stymulować aktywność BER w ekstrakcie komórek *pol β-/-* [38].

Polimeraza θ należy do grupy ostatnio odkrytych eukariotycznych polimeraz DNA. Została ona zidentyfikowana jako produkt genu *mus308* u *Drosophila melanogaster* [39]. Mutacja w tym genie objawiała się wrażliwością DNA na czynniki tworzące wiązania krzyżowe, zwiększoną częstotliwością aberracji chromosomowych i zmienionym metabolizmem DNA [39]. Efekt tej mutacji sugeruje, iż pol θ może uczestniczyć w naprawie DNA, a najprawdopodobniej w naprawie wiązań krzyżowych. Dokładny mechanizm tego procesu nie został jeszcze poznany. Ostatnio został sklonowany homolog genu *mus308* z biblioteki cDNA człowieka [40]. Ludzka pol θ jest polipeptydem o masie cząsteczkowej około 198 kDa, składającym się z 1762 aminokwasów. Oczyszczony enzym katalizuje efektywną syntezę na matrycy zawierającej miejsca AP, ale również charakteryzuje się wysoką wiernością procesu replikacji przeprowadzanego na prawidłowej, nieuszkodzonej matrycy, co może być związane z jego aktywnością egzonukleazy 3'→5'. Dokładność procesu replikacji pol θ jest większa niż pol α, a porównywalna z „klasycznymi" polimerazami δ i ε. Ze względu na duże podobieństwo w sekwencji DNA polimeraza θ muszki owocowej, jak i ludzka pol θ zostały zakwalifikowane do rodziny A polimeraz eukariotycznych, do których należy też mitochondrialna pol γ [39].

Polimeraza λ razem z pol μ, σ, β i terminalną transferazą deoksynukleotydową (TdT) należy do rodziny X eukariotycznych polimeraz DNA, które wykazują duże podobieństwo sekwencji i organizacji domenowej [41]. Pol λ zbudowana jest z 575 reszt aminokwasowych. Ponieważ sekwencja pol λ wykazuje dużą homologię z sekwencją pol β oraz oba enzymy wykazują aktywność liazy dRP, możliwe jest, iż pol λ bierze udział w naprawie przez wycinanie zasad (BER) [42]. Pol λ oddziałuje bezpośrednio z jądrowym antygenem komórek proliferujących (PCNA) poprzez domenę przy końcu karboksylowym genu *BRCA1* (ang. *BRCA1-C terminal domain*, BRCT), czym pol λ różni się od pol β, która nie wykazuje takiego oddziaływania. Konsekwencją jest negatywna regulacja aktywności pol λ przez PCNA [43]. Ludzka pol λ wykazuje również aktywność terminalnej transferazy deoksynukleotydowej, dzięki której może przyłączać nukleotydy przy końcu 3'-OH oligonukleotydów, bez matrycy. Z drugiej strony, pol λ *in vitro* może prowadzić syntezę DNA *de novo* przy braku starterów [44]. Sugeruje to, że pol λ może odgrywać rolę podobną do pol μ w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA i podobną do pol α w replikacji DNA [45]. Enzym ten nie wykazuje, podobnie jak

http://rcin.org.pl

pozostałe polimerazy rodziny X, aktywności egzonukleazy 3'→5', dlatego nie może poprawiać generowanych przez siebie błędów [34]. Ponieważ obserwuje się wysoki poziom pol λ w męskich gonadach oraz polimeraza ta jest ewolucyjnie związana z pachytenem spermatogenezy, to może ona mieć znaczenie w procesie naprawy DNA podczas mejozy [46].

Polimeraza μ, podobnie jak pol λ, należy do rodziny X polimeraz DNA. W największym stopniu, bo aż w 41%, pol μ (494 aminokwasy) przypomina terminalną transferazę deoksynukleotydową (TdT) (509 aminokwasów), jednak w odróżnieniu od niej pol μ jest polimerazą zarówno zależną, jak i niezależną od matrycy DNA [34, 47]. Podobnie jak pol λ i TdT wykazuje aktywność terminalnej transferazy deoksynukleotydowej i jest *in vitro* zdolna do syntezy DNA *de novo* [44]. Wysoki poziom pol μ można obserwować w peryferyjnej tkance limfoidalnej i do tego polimeraza ta charakteryzuje się małą dokładnością replikacyjną, co sugeruje, iż enzym ten bierze udział w somatycznej hipermutacji genów immunoglobulin [34]. Z drugiej strony wysoki poziom pol μ w limfie może wskazywać na jej rolę w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA, będących konsekwencją hipermutacji [48]. Poza tym, pol μ została zidentyfikowana w mniejszych ilościach również w innych tkankach, gdzie prawdopodobnie bierze udział w naprawie pęknięć dwuniciowych DNA, poprzez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ). Potwierdza to jej zdolność do oddziaływania z białkiem Ku, biorącym udział w rozpoznawaniu wolnych końców DNA w NHEJ, jak również z kompleksem ligazy IV/XRCC 4, niezbędnym do połączenia końców DNA [41]. Podobnie jak pol α, pol μ i TdT może *in vitro* syntetyzować DNA *de novo* [44].

Polimeraza σ, kodowana przez gen *Trf4* u *S. cerevisiae*, wykazuje niewielki stopień podobieństwa w stosunku do pozostałych członków rodziny X polimeraz. Pol σ bierze udział w mitozie i w segregacji chromosomów, oraz w syntezie DNA w czasie tworzenia połączeń pomiędzy siostrzanymi chromatydami chromosomów [49]. Poza aktywnością polimerazy, pol σ wykazuje również aktywność egzonukleazy 3'→5'. Mutanty *Trf4* wykazują wysoką wrażliwość na kamptotecynę, lek przeciwnowotworowy generujący pęknięcia dwuniciowe w miejscu zachodzenia replikacji, co sugeruje, że pol σ może odgrywać rolę w naprawie pęknięć dwuniciowych [50]. Dotąd odkryto dwa homologi genu *Trf4* u człowieka, *hTrf4-1* i *hTrf4-2*, z których pierwszy koduje polimerazę DNA [34].

Polimeraza φ, produkt genu *POL5* u *S. cerevisiae*, ma masę cząsteczkową około 130 kDa. Wykazuje ona słabe podobieństwo do członków rodziny B polimeraz. Enzym ten jest niezbędny dla wzrostu drożdży [51] Pol φ wykazuje wrażliwość na afidikolinę i może być stymulowana przez drożdżowe białko PCNA. Pol φ jest zlokalizowana wyłącznie w jąderku i może wiązać się z regionem wzmacniającym dla genów kodujących rRNA. Mutanty *POL5* z wrażliwą na temperaturę pol φ wykazywały silne zahamowanie syntezy rRNA w podwyższonej temperaturze, co wskazuje na udział tej polimerazy w syntezie rRNA. Z drugiej strony te same mutanty nie wykazywały zahamowania cyklu komórkowego w punkcie G2/M w podwyższonej temperaturze, co sugeruje, iż pol φ *in vivo* nie bierze udziału w replikacji chromosomalnego DNA [52]. *In vitro* pol φ charakteryzuje się niską częstością błędów, choć nie wykazuje aktywności 3'→5' egzonukleazy. Jak dotąd nie zidentyfikowano homologu genu *POL5* w innych komórkach eukariotycznych, oprócz *Schizosaccharomyces pombe* [2].

Terminalna transferaza deoksynukleotydowa (TdT - ang. *terminal deoxynucleotidyltransferase*) jest polimerazą niezależną od matrycy, należącą do rodziny X. Ulega ekspresji jedynie w tkance limfoidalnej, gdzie prawdopodobnie odgrywa istotną rolę w rozwoju komórek T i B. TdT dodaje losowo nukleotydy do kodujących końców genów immunoglobulin i receptorów komórek T, tworząc region N (niematrycowy) [53] W ten sposób TdT przyczynia się do różnorodności genów receptorów antygenów. Badania *in vitro* dowodzą, iż TdT może syntetyzować DNA *de novo* [44].

Telomeraza jest wysoko wyspecjalizowaną polimerazą DNA odpowiedzialną za syntezę końcowych odcinków chromosomów – telomerów - w komórkach eukariotycznych [2][1]. W jej budowie można wyróżnić dwie zasadnicze podjednostki. Pierwsza to fragment RNA, którego część centralną stanowi sekwencja komplementarna do powtarzalnej sekwencji telomerów $(TTAGGG)_n$ i ten fragment pełni funkcję matrycy dla enzymu. Drugą podjednostką jest białko o aktywności odwrotnej transkryptazy, która wykorzystuje fragment RNA jako matrycę do syntezy telomerów [54]. U człowieka fragment RNA koduje gen *hTR*, natomiast odwrotną transkryptazę - gen *hTERT*. Enzym ten ulega ekspresji i jest aktywny głównie w komórkach nowotworowych, jednakże jego aktywność może być obserwowana w niektórych narządach i tkankach prawidłowych, między innymi w endometrium [55]. Aktywność telomerazy w tym narządzie jest skorelowana z fazą cyklu menstruacyjnego i ma związek z aktywnością proliferacyjną komórek endometrium, co sugeruje, iż telomeraza może odgrywać rolę w podtrzymywaniu cyklicznego odnawiania się endometrium u kobiet. W przypadku raka tego narządu obserwuje się znaczący wzrost aktywności telomerazy [55].

AKTYWNOŚĆ KOREKTORSKA EUKARIOTYCZNYCH POLIMERAZ DNA

Polimerazy DNA są enzymami biorącymi udział w utrzymaniu integralności genomu w czasie takich procesów jak replikacja, naprawa czy rekombinacja DNA [2]. Za utrzymanie tej stabilności odpowiada między innymi aktywność korektorska egzonukleazy 3'→5' polimeraz DNA. Dzięki niej usuwane są niewłaściwie wstawione nukleotydy. Egzonukleazy 3'→5' można podzielić na takie, które są związane z polimerazami DNA, stanowiąc ich integralną część oraz na autonomiczne enzymy działające niezależnie od polimeraz [56]. Endogenną aktywność egzonukleazy 3'→5' wykazują replikacyjne polimerazy δ i ε, mitochondrialna pol γ oraz pol θ i σ. Zintegrowaną aktywność egzonukleazy 3'→5' zidentyfikowano również w przypadku pol I *E. coli* i polimeraz bakteriofagowych, które są często traktowane jako enzymy modelowe w badaniu zarówno aktywno-

[1] Telomeraza została opisana w „Postępach Biochemii" 45 (4) 1999

http://rcin.org.pl

ści polimerazy DNA, jak i egzonukleazy 3'→5'. Natomiast wśród autonomicznych egzonukleaz 3'→5' można wyróżnić enzymy TREX1, TREX2, Mre11, WRN, RAD1, RAD9, APE1 i VDJP. Niektóre z tych enzymów mogą współdziałać z polimerazami DNA pozbawionymi aktywności korektorskiej, takimi jak pol α czy pol β, czy też polimerazami DNA wykazującymi endogenną aktywność korektorską, zwiększając dokładność przeprowadzanej przez te enzymy replikacji DNA [57].

Podjednostka katalityczna pol δ i pol ε zawiera domenę egzonukleazy 3'→5' w końcu aminowym. Domena ta razem z domeną polimerazy tworzy strukturę w kształcie pierścienia, wewnątrz którego znajduje się dupleks DNA, tworzony przez matrycę i nowo syntetyzowaną nić. Ostatni nukleotyd włączony przez polimerazę może zostać usunięty przez aktywność egzonukleazy 3'→5'. Ponieważ koniec 3'-OH jest substratem zarówno dla syntezy, jak i wycinania, obie aktywności polimerazy współzawodniczą ze sobą o koniec 3'-OH. Dupleks DNA zajmuje stałą pozycję niezależnie od tego, czy zachodzi etap polimeryzacji, czy wycinania, natomiast koniec 3'-OH zmienia swoje miejsce, wiążąc się albo z miejscem aktywnym polimerazy albo egzonukleazy 3'→5'. Domeny te są oddzielone od siebie o około 30 Å [57]. W przypadku polimeraz DNA pozbawionych aktywności korektorskiej, takich jak pol α czy pol β, po wprowadzeniu nieprawidłowej zasady, następuje oddysocjowanie enzymu, a w jego miejsce przyłącza się autonomiczna egzonukleaza 3'→5', czy nawet inna polimeraza z wewnętrzną aktywnością korektorską [58].

Polimerazy mogą replikować DNA z prędkością 100--1000 nukleotydów na sekundę, jednak gdy zostanie wprowadzony niewłaściwy nukleotyd, tempo syntezy ulega zwolnieniu do 1 nukleotydu na dziesięć sekund [59]. Zjawisko to, zwane jako „przestój polimerazy DNA", pozwala endogennej (lub autonomicznej) egzonukleazie 3'→5'usunąć niewłaściwie włączoną zasadę [57]. Z drugiej strony replikacja nici opóźnionej jest dokładniejsza w porównaniu z nicią prowadzącą, zarówno w komórkach pro- jak i eukariotycznych [60]. Może to być wynikiem łatwiejszego odłączania się polimerazy DNA od nici opóźnionej, na której syntetyzowane są krótkie odcinki DNA (fragmenty Okazaki), co może ułatwiać przyłączanie się egzonukleazy 3'→5' i korekcję. Potwierdza to fakt, że polimerazy DNA o dużej procesywności, to znaczy syntetyzujące długie fragmenty DNA bez odłączania się od niego, są enzymami mniej dokładnymi [61].

Pol δ i ε drożdży wykazują aktywność egzonukleazy 3'→ 5', która umożliwia korekcję błędów replikacyjnych DNA *in vivo* [62]. Mutacje w domenie egzonukleazy 3'→5' pol δ prowadzą do 100-krotnego zwiększenia tempa mutacji spontanicznych i 10-krotnego w przypadku pol ε. Natomiast połączenie tych mutacji z defektywnym systemem MMR prowadziło do śmierci komórek haploidalnych. To wskazuje, że nieefektywnie działająca aktywność korektorska polimeraz replikacyjnych może prowadzić do akumulacji mutacji i w efekcie do załamania całego systemu naprawy błędnie sparowanych zasad. Z drugiej strony pol δ, w porównaniu z pol ε, odgrywa większą rolę w zapobieganiu mutacjom [63]. Podobne badania przeprowadzono dla drożdżowej pol γ. W ich wyniku obserwowano1500-krotny wzrost tempa mutacji w mitochondrialnym DNA i 10^4-krotne zmniejszenie aktywności egzonukleazy 3'→5' pol γ [64]. W przypadku pol δ ssaków wzrost spontanicznych mutacji wywołany defektem aktywności egzonukleazy 3'→5' zwiększał prawdopodobieństwo wystąpienia raka [65]. Nieefektywnie działająca egzonukleaza 3'→5' pol δ okazała się wystarczająca do zainicjowania transformacji nowotworowej u dwumiesięcznych homozygotycznych zmutowanych myszy [66]. Natomiast u heterozygotycznych osobników nowotwór nie rozwijał się, co można wiązać z efektywnie działającym MMR u tych myszy czy obecnością niezmutowanej formy pol δ, zdolnej do usuwania błędnego parowania. Również u organizmów prokariotycznych utrata aktywności korektorskiej ma niepożądane efekty. Mutacja w genie *dnaQ*, kodującym podjednostkę ε pol III *E. coli*, wykazującą aktywność egzonukleazy 3'→5' okazała się letalna [67]. Świadczy to o tym, że aktywność korektorska egzonukleazy 3'→5' w procesie replikacji jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania, zarówno dla eukariontów, jak i dla prokariontów.

Autonomiczne egzonukleazy 3'→5' zostały początkowo zidentyfikowane w komórkach białaczkowych i grasicy bydlęcej [68]. Uważano, iż enzymy te zwiększają wierność replikacji DNA w tych komórkach poprzez korekcję aktywności pol δ i ε, które mimo wewnętrznej aktywności egzonukleazy 3'→5' nie okazały się w pełni dokładnymi polimerazami DNA *in vivo*. Białko TREX2, wykazujące aktywność korektorską, wiążąc się z pol δ może zwiększać 4-krotnie dokładność replikacji DNA w warunkach sprzyjających wprowadzaniu nieprawidłowych zasad (przy braku równowagi pomiędzy nukleotydami), natomiast nie wpływa na wierność replikacji DNA w prawidłowych warunkach [69]. Autonomiczna egzonukleaza 3'→5' może również zapewniać aktywność korektorską polimeraz DNA poprzez współdziałanie z polimerazami DNA niewykazującymi aktywności egzonukleazy 3'→5', jak ma to miejsce w przypadku polimerazy β, biorącej udział w syntezie naprawczej. Część błędów wprowadzanych przez tę polimerazę jest usuwana przez egzonukleazę automomiczną, która współdziała z polimerazą β w obrębie białkowego kompleksu replikacyjnego. W badaniach *in vitro*, w których zastosowano pochodzącą z komórek wątroby szczurzej autonomiczną egzonukleazę 3'→5' i polimerazę β, obserwowano wycinanie błędnie sparowanych nukleotydów od końca 3' DNA, czego efektem był nawet 30-krotny wzrost wierności replikacji oraz przyspieszenie procesu replikacji w porównaniu z homogenną polimerazą β. Podobne wyniki osiągnięto dla polimerazy α, co może sugerować, iż polimerazy DNA niewykazujące aktywności egzonukleazy, zdolnej do korygowania błędów replikacyjnych, mogą współpracować z autonomicznymi egzonukleazami 3'→5' [58].

POLIMERAZY DNA A NOWOTWORY

Komórki nowotworowe charakteryzują się wysoką częstością występowania mutacji w genach mających podstawowe znaczenie dla utrzymania stabilności genetycznej. Efektem tych mutacji jest niestabilność genetyczna komórek nowotworowych, czego skutkiem mogą być kolejne mutacje. Jedną z endogennych przyczyn mutacji w DNA może być błędne włączanie zasad do DNA przez polime-

http://rcin.org.pl

razy DNA oraz brak naprawy błędnego sparowania. Może to nastąpić zarówno w czasie replikacji, i wtedy błędnego włączenia zasady dokonują polimerazy replikacyjne δ i ε, jak również w trakcie syntezy naprawczej przeprowadzanej najczęściej przez polimerazę β. Odkrycie polimeraz DNA o niskiej wierności replikacji DNA, do których zalicza się ζ, η, κ i ι, pozwala przypuszczać, iż one również mogą przyczyniać się do powstawania mutacji, mogących prowadzić do transformacji nowotworowej [70]. Poza niestabilnością genetyczną komórki nowotworowe charakteryzują się tzw. unieśmiertelnieniem, cechą której przyczyną może być reaktywacja telomerazy [54].

Wierność replikacji przez polimerazy δ i ε jest w dużej mierze zapewniona przez ich aktywność egzonukleolityczną 3'→5'. W wyniku mutacji punktowej w obu allelach genu kodującego domenę egzonulkeolityczną pol δ u myszy obserwowano rozwój różnego typu guzów pochodzenia epidermalnego, podczas gdy w grupie kontrolnej i u myszy hemizygotycznych nie zaobserwowano powstawania nowotworów. Zatem zahamowanie aktywności korektorskiej prowadzi do zwiększenia poziomu mutacji w genomie, czego efektem jest wzrost ilości spontanicznie powstających nowotworów złośliwych u myszy [70].

Polimeraza β jako enzym naprawczy może rozpoznawać i naprawiać błędne parowania, w tym G:U i G:T, które, gdy nie są naprawiane, prowadzą do tranzycji A→T [71]. Inaktywacja genu kodującego pol β w linii zarodkowej myszy jest letalna [72]. Natomiast mutacje w domenie katalitycznej pol β mogą mieć powiązanie z różnymi nowotworami. Opisane zostały mutacje genu *POLB*, kodującego pol β w komórkach ludzkiego raka żołądka. W 6 na 20 przypadków tej choroby zaobserwowano mutacje zmiany sensu w genie *POLB*, przy czym wszystkie te mutacje dotyczyły tylko jednego allelu. Jedna z tych mutacji, charakteryzująca się zastąpieniem Glu przez Lys w kodonie 295, hamowała aktywność systemu naprawy przez wycinanie zasad (BER) *in vitro* [71]. Mutacje w domenie katalitycznej pol β zidentyfikowano również w przypadku raka jelita grubego, prostaty czy pęcherza moczowego [73]. Sugeruje to, iż mutacja w genie *POLB* może zakłócać prawidłowe funkcjonowanie naprawczej polimerazy β i przyczyniać się do mutacji, które ostatecznie prowadzą do transformacji nowotworowej. Z drugiej strony w pewnych guzach obserwowano zwiększony poziom niezmienionej pol β, co może wiązać się z większą aktywnością tego enzymu w porównaniu z tkanką prawidłową. W tej sytuacji pol β może zastępować dokładniejsze polimerazy DNA, a tym samym zwiększać poziom mutacji [74].

Udział w mutagenezie mają także polimerazy DNA zdolne do syntezy na uszkodzonej matrycy. Polimerazy δ lub ε zatrzymują się w momencie napotkania uszkodzenia w DNA, a następnie oddysocjowują od niego, natomiast w ich miejsce przyłącza się jedna z polimeraz zdolnych do syntezy na uszkodzonej matrycy. Po syntezie taka polimeraza odłącza się i pol δ/ε może kontynuować replikację. W takim przypadku istotna jest kontrola procesu przyłączania i odłączania się polimeraz, jak również ich aktywności. Utrata takiej kontroli może grozić zwiększonym poziomem mutacji, gdy zamiast pol δ/ε, zwykle mniej dokładna polimeraza zdolna do syntezy na uszkodzonej matrycy będzie kontynuować ten proces na matrycy nieuszkodzonej [75]. Można też przypuszczać, iż w pewnych nowotworach polimerazy DNA o niskiej dokładności mogą występować w większych ilościach niż normalnie, co może zakłócać równowagę między nimi a „klasycznymi" polimerazami, na niekorzyść tych ostatnich i w ten sposób przyczyniać się do akumulacji mutacji w DNA w komórkach nowotworowych [70]. Z drugiej strony brak jednej z polimeraz syntetyzujących na uszkodzonej matrycy może również prowadzić do choroby. Ma to miejsce w przypadku osób z odmianą *X. pigmentosum*, u których polimeraza η jest nieaktywna. Przy braku aktywności tej polimerazy, powstające pod wpływem światła dimery pirymidyny powodują zatrzymanie replikacji, natomiast polimerazy DNA podejmujące próbę kontynuacji tego procesu nie są już tak dokładne względem dimerów pirymidynowch jak pol η. W rezultacie generowane są mutacje prowadzące do raka skóry [76]. Ze względu na fakt, iż polimerazy DNA zdolne do syntezy na uszkodzonej matrycy zostały odkryte stosunkowo niedawno, to ich rola w transformacji nowotworowej nie jest jeszcze w pełni jasna.

Polimerazą DNA mającą stosunkowo dobrze określoną rolę w transformacji nowotworowej jest telomeraza, syntetyzująca sekwencje powtarzającego się DNA na końcach chromosomów. Telomeraza razem z innymi białkami, chroni końce chromosomów przed rekombinacją, fuzją oraz degradacją [77]. W diploidalnych komórkach prawidłowych z każdym podziałem komórkowym długość telomerów ulega skróceniu o około 100 zasad, ponieważ polimeraza DNA nie jest w stanie replikować końców liniowych cząsteczek [78]. Takie skracanie końców DNA ogranicza ilość podziałów komórkowych (limit Hayflicka) [79]. Natomiast w niektórych komórkach nowotworowych telomery, poprzez działanie telomerazy, nie ulegają skróceniu w tempie, w jakim ma to miejsce w komórkach prawidłowych. W ten sposób komórki nowotworowe mogą ulegać nieograniczonej liczbie podziałów komórkowych; stan ten określa się czasem mianem nieśmiertelności [54]. Potwierdziły to badania, w których w wyniku przeniesienia telomerazy do różnych komórek prawidłowych obserwowano ich unieśmiertelnianie [80]. Obecnie wykorzystuje się telomerazę i telomery jako cel w terapii przeciwnowotworowej [54].

ROLA POLIMERAZ DNA W STARZENIU SIĘ

Proces starzenia się komórek można powiązać z aktywnością telomerazy, regulującą skracanie się telomerów w każdym cyklu komórkowym [54]. Inne powiązanie polimeraz DNA z procesem starzenia się może być poprzez szlak naprawy przez wycinanie zasad (BER), którego poziom znacząco zmniejsza się wraz z wiekiem. W ekstraktach jądrowych pochodzących z mózgu starych myszy obserwowano 85% zmniejszenie aktywności naprawczej, a w przypadku wątroby 50% spadek w porównaniu z aktywnością BER u myszy sześciodniowych. Poza tym, w ekstrakcie jądrowym pochodzącym z mózgu starych myszy obserwowano niższy poziom polimerazy β. Natomiast poziom innych białek biorących udział w BER nie ulegał zmianie wraz z wiekiem. Konsekwencją zmniejszenia efektywności naprawy DNA jest zwiększony poziom uszkodzeń DNA oraz mutacje starzejących się komórek [81]. Podobne ba-

http://rcin.org.pl

dania przeprowadzono przy zastosowaniu ograniczenia kalorycznego, które powodowało wzrost obniżającej się z wiekiem aktywności BER w wielu tkankach. Ograniczeniom kalorycznym towarzyszył również wzrost spadającego z wiekiem poziomu polimerazy β [82]. Badania na fibroblastach starszych osób pozwoliły stwierdzić, iż również polimeraza α była mniej aktywna i nie wiązała się tak łatwo z DNA jak pol α młodych osób, efektem czego była zmniejszona możliwość inicjowania syntezy DNA. Dodatkowo wierność replikacji DNA w starszych fibroblastach ludzkich była mniejsza niż w fibroblastach młodszych [83]. Podobne wyniki uzyskano dla mysiej i szczurzej polimerazy α [84]. Zastosowanie u myszy ograniczeń restrykcyjnych, tak jak w przypadku pol β, miało korzystny wpływ na pol α i wiązało się ze zwiększeniem jej aktywności i zdolności wiązania się z DNA [83].

UWAGI KOŃCOWE

Odkrycie wielu eukariotycznych polimeraz DNA zwiększyło zainteresowanie problemem różnorodności procesów komórkowych. Wywołać jednak może ono także refleksje czy nawet niepokój, czy jesteśmy zdolni do kompleksowego zrozumienia procesów, takich jak replikacja czy naprawa DNA, a więc mających fundamentalne znaczenie w funkcjonowaniu każdej komórki, każdego organizmu. Zatem poznanie roli polimeraz DNA i mechanizmów ich działania jest nie tylko wyzwaniem biologii molekularnej, ale ma także charakter epistemologiczny. Wydaje się, że najważniejszymi zadaniami w dziedzinie poznania polimeraz DNA są: dokładne zrozumienie mechanizmu łączenia fragmentów DNA przy udziale polimeraz, określenie przebiegu syntezy DNA na uszkodzonej matrycy oraz poznanie roli polimeraz w rekombinacji immunoglobulin. Poznana także winna zostać szczegółowa budowa jednostkowa polimeraz α, δ i ε oraz ich rola w replikacji i procesach naprawczych, a także wpływ aktywności 3'→5' egzonukleazy na powstawanie mutacji. Dalsze prace nad rolą polimeraz DNA mogą przynieść wyniki dające odpowiedź na nurtujące pytania z zakresu transformacji nowotworowej i procesów starzenia.

PIŚMIENNICTWO

1. Ohmori H, Friedberg EC, Fuchs RPP, Goodman MF, Hanaoka T, Hinkle D, Kunkel TA, Lawrence CW, Livneh Z, Nohmi T, Prakash L, Prakash S, Todo T, Walker GC, Wang Z, Woodgate R (2001) The Y-family of DNA polymerases. Mol Cell 8: 7-8
2. Hübscher U, Maga G, Spadari S (2002) Eukaryotic DNA polymerases. Annu Rev Biochem 71: 133-163
3. Arezi B, Kuchta RD (2000) Eukaryotic DNA primase. Trends Biochem Sci 25: 572-576
4. Mizuno T, Yamagishi K, Miyazawa H, Hanaoka F (1999) Molecular architecture of the mouse DNA polymerase alpha-primase complex. Mol Cell Biol 19: 7886-7896
5. Bell SP, Dutta A (2002) DNA replication in eukaryotic cells. Annu Rev Biochem 71: 333-374
6. Holmes AM, Haber JE (1999) Double-strand break repair in yeast requires both leading and lagging strand DNA polymerases. Cell 96: 415-424
7. Wilson SH (1998) Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta. Mutat Res 407: 203-215
8. Sobol RW, Horton JK, Kuhn R, Gu H, Singhal RK, Prasad R, Rajewsky K, Wilson SH (1996) Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. Nature 379: 183-186
9. Sobol RW, Prasad R, Evenski A, Baker A, Yang XP, Horton JK, Wilson SH (2000) The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. Nature 405: 807-810
10. Dianov GL, Prasad R, Wilson SH, Bohr VA (1999) Role of DNA polymerase beta in the excision step of long patch mammalian base excision repair. J Biol Chem 274: 13741-13743
11. Prasad R, Dianov GL, Bohr VA, Wilson SH (2000) FEN1 stimulation of DNA polymerase beta mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair. J Biol Chem 275: 4460-4466
12. Sugo N, Aratani Y, Nagashima Y, Kubota Y, Koyama H (2000) Neonatal lethality with abnormal neurogenesis in mice deficient in DNA polymerase beta. EMBO J 19: 1397-1404
13. Graves SW, Johnson AA, Johnson KA (1998) Expression, purification, and initial kinetic characterization of the large subunit of the human mitochondrial DNA polymerase. Biochemistry 37: 6050--6058
14. Carrodeguas JA, Theis K, Bodenhagen DF, Kisker C (2001) Crystal structure and deletion analysis show that the accessory subunit of mammalian DNA polymerase gamma, Pol gamma B, functions as a homodimer. Mol Cell 7: 43-54
15. Pinz KG, Bogenhagen DF (1998) Efficient repair of abasic sites in DNA by mitochondrial enzymes. Mol Cell Biol 18: 1257-1265
16. Pinz KG, Bogenhagen DF (2000) Characterization of a catalytically slow AP lyase activity in DNA polymerase gamma and other family A DNA polymerases. J Biol Chem 275: 12509-12514
17. Mo JY, Liu L, Leon A, Mazloum N, Lee MY (2000) Evidence that DNA polymerase delta isolated by immunoaffinity chromatography exhibits high-molecular weight characteristics and is associated with the KIAA0039 protein and RPA. Biochemistry 39: 7245-7254
18. Zuo S, Bermudez V, Zhang G, Kelman Z, Hurwitz J (2000) Structure and activity associated with multiple forms of Schizosaccharomyces pombe DNA polymerase delta. J Biol Chem 275: 5153-5162
19. Kolodner RD, Marsischky GT (1999) Eukaryotic DNA mismatch repair. Curr Opin Gen Dev 9: 89-96
20. Dua R, Edwards S, Levy DL, Campbell JL (2000) Subunit interactions within the *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase epsilon (pol epsilon) complex. Demonstration of a dimeric pol epsilon.J Biol Chem 275: 28816-28825
21. Feng W, D'Urso G (2001) Schizosaccharomyces pombe cells lacking the amino-terminal catalytic domains of DNA polymerase epsilon are viable but require the DNA damage checkpoint control. Mol Cell Biol 21: 4495-4504
22. Wang Z (2001) Translesion synthesis by the UmuC family of DNA polymerases. Mutat Res 486: 59-70
23. Morrison A, Christensen RB, Alley J, Beck AK, Bernstine EG, Lemontt JF, Lawrence CW (1989) REV3, a Saccharomyces cerevisiae gene whose function is required for induced mutagenesis, is predicted to encode a nonessential DNA polymerase. J Bacteriol 171: 5659-5667
24. Bailly V, Lamb J, Sung P, Prakash S, Prakash L (1994) Specific complex formation between yeast RAD6 and RAD18 proteins: a potential mechanism for targeting RAD6 ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites. Genes Dev 8: 811-820
25. Bailly V, Lauder S, Prakash S, Prakash L (1997) Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. J Biol Chem 272: 23360-23365
26. Wittschieben J, Shivji MK, Lalani E, Jacobs MA, Marini F, Gearhart PJ, Rosewell G, Stamp G, Wood RD (2000) Disruption of the developmentally regulated Rev3l gene causes embryonic lethality. Curr Biol 10: 1217-1220
27. Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmae N, Yokoi M, Yuasa M, Araki M, Iwai S, Takio K, Hanaoka F (1999) The XPV (xeroderma

http://rcin.org.pl

pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. Nature 399: 700-704

28. Masutani C, Araki M, Yamada A, Kasumoto R Nogomori T, Maekawa T, Iwai S, Hanaoka F (1999) Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. EMBO J 18: 3491-3501
29. Yuan F, Zhang Y, Rajpal DK, Wu D, Guo M, Wang M, Taylor J-S, Wang Z (2000) Specificity of DNA lesion bypass by the yeast DNA polymerase eta. J Biol Chem 275: 8233-8239
30. Zeng X, Winter DB, Kasmer C, Kreamer KH, Lehmann AR, Gearhart PJ (2001) DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. Nat Immunol 2: 537-541
31. Zhang Y, Yuan F, Xin H, Wu X, Rajpal DK Yang D, Wang Z (2000) Human DNA polymerase kappa synthesizes DNA with extraordinarily low fidelity. Nucleic Acids Res 28: 4147-4156
32. Ohashi E, Ogi T, Kusumoto R, Iwai S, Masutani C, Hanaoka F, Ohmori H (2000) Error-prone bypass of certain DNA lesions by the human DNA polymerase kappa. Genes Dev 14: 1589-1594
33. Ohashi E, Bebenek K, Matsuda T, Feaver WJ, Gerlach VL, Friedberg EC, Ohmori H, Kunkel TA (2000) Fidelity and processivity of DNA synthesis by DNA polymerase kappa, the product of the human DINB1 gene. J Biol Chem 275: 39678-39684
34. Bebenek K, Kunkel TA (2002) Family growth: the eukaryotic DNA polymerase revolution. Cell Mol Life Sci 59: 54-57
35. Tissier A, McDonald JP, Frank EG, Woodgate R (2000) poliota, a remarkably error-prone human DNA polymerase. Genes Dev 14: 1642-1650
36. Zhang Y, Yuan F, Wu X, Taylor J-S, Wang Z (2001) Response of human DNA polymerase iota to DNA lesions. Nucleic Acids Res 29: 928-935
37. Bebenek K, Tissier A, Frank EG, McDonald JP, Prasad R, Wilson SH, Woodgate R, Kunkel TA (2001) 5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase iota in vitro. Science 291: 2156--2159
38. Prasad R, Bebenek K, Hou E, Shock DD, Beard WA, Woodgate R, Kunkel TA, Wilson SH (2003) Localization of the deoxyribose phosphate lyase active site in human DNA polymerase iota by controlled proteolysis. J Biol Chem 278: 29649-29654
39. Maga G, Shevelev I, Ramadan K, Spadari S, Hübscher U (2002) DNA polymerase theta purified from human cells is a high-fidelity enzyme. J Mol Biol 319: 359-369
40. Sharief F, Vojta P, Ropp A, Copeland W (1999) Cloning and chromosomal mapping of the human DNA polymerase theta (POLQ), the eighth human DNA polymerase. Genomics 59: 90-96
41. Bebenek K, Garcia-Diaz M, Blanco L, Kunkel TA (2003) The frameshift infidelity of human DNA polymerase lambda. Implications for function. J Biol Chem 278: 34685-34690
42. Garcia-Diaz M, Bebenek K, Kunkel TA, Blanco L (2001) dentification of an intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in human DNA polymerase lambda: a possible role in base excision repair. J Biol Chem 276: 34659-34663
43. Shimazaki N, Yoshida K, Kobayashi T, Toji S, Tamai K, Koiwai O (2002) Over-expression of human DNA polymerase lambda in E. coli and characterization of the recombinant enzyme. Genes Cells 7: 639-651
44. Ramadan K, Shevelev IV, Maga G, Hubscher UJ (2004) De novo DNA synthesis by human DNA polymerase lambda, DNA polymerase mu and terminal deoxyribonucleotidyl transferase. J Mol Biol 339: 395-404
45. Ramadan K, Maga G, Shevelev IV, Villani G, Blanco L, Hubscher U (2003) Human DNA polymerase lambda possesses terminal deoxyribonucleotidyl transferase activity and can elongate RNA primers: implications for novel functions. J Mol Biol 328: 63-72
46. Garcia-Diaz M, Dominguez O, Lopez-Fernandez LA, de Lera LT, Sangier ML, Ruiz JF, Parraga M, Garcia-Ortiz MJ, Kirchhoff T, del Mazo J, Bernad A, Blanco L (2000) DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. J Mol Biol 301: 851-867
47. Ruiz JF, Dominguez O, de Lera LT, Garcia-Diaz M, Bernad A, Blanco L (2001) DNA polymerase mu, a candidate hypermutase? Phil Trans R Soc London Ser B 356: 99-109
48. Rogozin IB, Kunkel TA, Pavlov YI (2002) Double-strand breaks in DNA during somatic hypermutation of Ig genes: cause or consequence? Trends Immunol 23: 12-13
49. Wang Z, Castano IB, De La Penas A, Adams C, Christman MF (2000) Pol kappa: A DNA polymerase required for sister chromatid cohesion. Science 289: 774-779
50. Wang Z, Castano IB, Adams C, Vu C, Fitzhugh D, Christman MF (2002) Structure/function analysis of the Saccharomyces cerevisiae Trf4/Pol sigma DNA polymerase.Genetics 160: 381-391
51. Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H, Davis RW (1999) Functional characterization of the S. cerevisiae genome by gene deletion and parallel analysis. Science 285: 901–906
52. Shimizu K, Kawasaki Y, Hiraga S-I, Tawaramoto M, Nakashima N, Sugino A (2002) The fifth essential DNA polymerase phi in Saccharomyces cerevisiae is localized to the nucleolus and plays an important role in synthesis of rRNA. Proc Natl Acad Sci USA 99: 9133--9138
53. Bartl S, Miracle AL, Rumfelt LL, Kepler TB, Mochon E, Litman GW, Flajnik MF (2003) Terminal deoxynucleotidyl transferases from elasmobranchs reveal structural conservation within vertebrates. Immunogenetics 55: 594-604
54. Kelland LR (2001) Telomerase: biology and phase I trials. Lancet Oncol 2: 95-102
55. Pertynski T, Wozniak K, Romanowicz-Makowska H, Czechowska A, Blasiak J (2002) Telomerase expression and activity in endometrial cancer. Exp Oncol 24: 265-269
56. Kunkel TA (1998) Exonucleolytic proofreading.Cell 53: 837-840
57. Shevelev IV, Hübscher U (2002) The 3' 5' exonucleases. Nat Rev Mol Cell Biol 3: 364 -376
58. Shevelev IV, Belyakova NV, Kravetskaya TP, Krutyakov VM (2000) Autonomous 3'-->5' exonucleases can proofread for DNA polymerase beta from rat liver. Mutat Res 459: 237-242
59. Perrino FW, Loeb LA (1989) Differential extension of 3' mispairs is a major contribution to the high fidelity of calf thymus DNA polymerase-alpha. J Biol Chem 264: 2898-2905
60. Fijalkowska IJ, Jonczyk P, Tkaczyk MM, Bialoskorska M, Schaaper RM (1998) Unequal fidelity of leading strand and lagging strand DNA replication on the Escherichia coli chromosome. Proc Natl Acad Sci USA 95: 10020-10025
61. Mozzherin DJ, McConnell M, Jasko MV, Krayevsky AA, Tan CK, Downey KM, Fisher PA (1996) Proliferating cell nuclear antigen promotes misincorporation catalyzed by calf thymus DNA polymerase delta. J Biol Chem 271: 31711-31717
62. Morrison A, Johnson AL, Johnson LH, Sugino A (1993) Pathway correcting DNA replication errors in Saccharomyces cerevisiae. EMBO J 12: 1467-1473
63. Tran HT, Gordenin DA, Resnick MA (1999) The 3'-->5' exonucleases of DNA polymerases delta and epsilon and the 5'-->3' exonuclease Exo1 have major roles in postreplication mutation avoidance in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol 19: 2000-2007
64. Vanderstraeten S, Van den Brule S, Hu J, Foury F (1998) The role of 3'-5' exonucleolytic proofreading and mismatch repair in yeast mitochondrial DNA error avoidance. J Biol Chem 273: 23690-23697
65. Loeb LA (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. Cancer Res 51: 3071-3079
66. Goldsby RE, Lawrence NA, Hays LE, Olmsted EA, Chen X, Singh M, Preston BD (2001) Defective DNA polymerase-delta proofreading causes cancer susceptibility in mice. Nat Med 7: 638-639

http://rcin.org.pl

67. Fijalkowska IJ, Schaaper RM (1996) Mutants in the Exo I motif of Escherichia coli dnaQ: defective proofreading and inviability due to error catastrophe. Proc Natl Acad Sci USA 93: 2856-2861
68. Perrino FW, Miller H, Ealey KA (1994) Identification of a 3'-->5'-exonuclease that removes cytosine arabinoside monophosphate from 3' termini of DNA. J Biol Chem 269: 16357-16363
69. Shevelev IV, Ramadan K, Hübscher U (2002) The TREX2 3'-->5' exonuclease physically interacts with DNA polymerase delta and increases its accuracy.Sci World J 2: 275-281
70. Jackson AL, Loeb LA (2001) The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. Mutat Res 477: 7-21
71. Iwanaga A, Ouchida M, Miyazaki K, Hori K, Mukai T (1999) Functional mutation of DNA polymerase beta found in human gastric cancer--inability of the base excision repair in vitro. Mutat Res 435: 121-128
72. Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. Science 265: 103-106
73. Matsuzaki J, Dobashi Y, Miyamoto H, Ikeda I, Fujinami K, Shuin T, Kubota Y (1996) DNA polymerase beta gene mutations in human bladder cancer. Mol Carcin 15: 38-43
74. Canitrot Y, Frechet M, Servant L, Cazaux C, Hoffmann J-S (1999) Overexpression of DNA polymerase beta: a genomic instability enhancer process. FASEB J 13: 1107-1111
75. Kunkel TA (2003) Considering the cancer consequences of altered DNA polymerase function. Cancer Cell 3: 105-110
76. Limoli CL, Giedzinski E, Morgan WF, Cleaver JE (2000) Inaugural article: polymerase eta deficiency in the xeroderma pigmentosum variant uncovers an overlap between the S phase checkpoint and double-strand break repair. PNAS 97: 7939-7946
77. Blackburn EH (1991) Structure and function of telomeres. Nature 350: 569-573
78. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC (1990) Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. Nature 346: 866-868
79. DePinho RA (2000) The age of cancer. Nature 408: 248-254
80. Luiten RM, Pene J, Yssel H, Spits H (2003) Ectopic hTERT expression extends the life span of human CD4+ helper and regulatory T-cell clones and confers resistance to oxidative stress-induced apoptosis. Blood 101: 4512-4519
81. Intano GW, Cho EJ, McMahan CA, Walter CA (2003) Age-related base excision repair activity in mouse brain and liver nuclear extracts. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 58: 205-211
82. Cabelof DC, Yanamadala S, Raffoul JJ, Guo Z, Soofi A, Heydari AR (2003) Caloric restriction promotes genomic stability by induction of base excision repair and reversal of its age-related decline. DNA Repair 2: 295-307
83. Miller SD, Crouch EA, Busbee DL (1997) An accessory protein of DNA polymerase alpha declines in function with increasing age. Mutat Res 374: 125-138
84. Srivastava V, Tilley R, Hart R, Miller S, Busbee D (1991) Effects of aging and dietary restriction on DNA polymerase expression in mice. Exp Gerontol 26: 97-112

Eukaryotic DNA polymerases

Agnieszka Czechowska, Janusz Błasiak✉

Department of Molecular Genetics, University of Lodz, 12/16 Banacha St., 90-237 Lodz, Poland
✉e-mail: januszb@biol.uni.lodz.pl

Key words: eucaryotic DNA polymerases, DNA replication, DNA repair, translesion DNA synthesis, proofreading 3'→5' exonuclease activity, ageing

ABSTRACT

Knowledge about eukaryotic DNA polymerases has increased considerably during recent years. Much have been learnt about both the structures and the functions of "classical" DNA polymerases α, β, δ, ε and γ. New DNA polymerases that posses very unusual functions have been identified. They are able to perform translesion synthesis, take part in somatic hypermutation and prevent some cancers. Much attention has also been devoted to the role of 3'→5' exonuclease activity in the accuracy of DNA synthesis. On the other hand, it have been shown that there are also negative aspects of the activity of DNA polymerases. Lack of some DNA polymerases or even their altered functions may lead to carcinogenesis and accelerate the process of ageing.

http://rcin.org.pl

Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami

Michał Błażej Ponczek✉
Barbara Wachowicz

Katedra Biochemii Ogólnej, Instytut Biochemii, Uniwersytet Łódzki

✉Katedra Biochemii Ogólnej, Instytut Biochemii, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: mponczek@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 15 lipca 2004
Artykuł zaakceptowano 28 grudnia 2004

Słowa kluczowe: reaktywne formy tlenu i azotu, wolne rodniki, anionorodnik ponadtlenkowy, tlenek azotu, nadtlenoazotyn, stres oksydacyjny, utlenianie białek, grupy karbonylowe, nitrotyrozyna, dityrozyna, wodorotlenki białek, degradacja białek, proces starzenia

Wykaz stosowanych skrótów: ELISA – test enzymatyczno-immunosorbcyjny (ang. *enzyme linked immunosorbent assay*)

STRESZCZENIE

Wolne rodniki, reaktywne formy tlenu i azotu, wytwarzane podczas stresu oksydacyjnego lub jako produkty uboczne tlenowego metabolizmu komórki mogą modyfikować różne związki biologiczne. Głównym składnikiem komórki ulegającym peroksydacji są białka. Zmiany oksydacyjne w białkach, spowodowane przez wolne rodniki i reaktywne formy tlenu i azotu obejmują: tworzenie wodoronadtlenków białek, hydroksylację reszt aminokwasów aromatycznych i alifatycznych, nitrowanie reszt aminokwasów aromatycznych, utlenianie grup -SH, utlenianie reszt metioniny, przekształcanie niektórych reszt aminokwasowych w pochodne karbonylowe, fragmentację łańcucha polipeptydowego czy też tworzenie wiązań krzyżowych.
Oksydacyjne modyfikacje struktury białek, które prowadzą do utraty właściwości biologicznych, utrudniają degradację i powodują gromadzenie się zmodyfikowanych produktów białkowych, zaobserwowano w wielu stanach patologicznych, podczas procesu starzenia, różnicowania się komórek, a także w apoptozie. Specyficzne produkty utleniania białek mogą służyć jako znaczniki stresu oksydacyjnego.

WPROWADZENIE

Nieodłącznym elementem tlenowego metabolizmu komórkowego jest wytwarzanie reaktywnych form tlenu, azotu i chloru, m. in. takich jak rodnik hydroksylowy (OH), anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot}$), nadtlenoazotyn ($ONOO^-$), dwutlenek azotu (NO_2), chlorek nitrylu (NO_2Cl), kwas podchlorawy (HOCl). Ich źródłem są produkty pośrednie utleniania przenośników elektronów, związki wytwarzane w czasie reakcji zapalnych, tlenek azotu, peroksydacja lipidów oraz reakcje katalizowane przez oksydazy i jony metali (Fe^{3+}, Cu^{2+}). Organizm narażony jest także na działanie szkodliwych czynników zewnętrznych, takich jak promieniowanie jonizujące, zanieczyszczenia atmosfery (ozon, dwutlenek azotu, N_2O_3) czy dym papierosowy [1,2].

Organizmy bronią się przed szkodliwym działaniem utleniaczy wytwarzając wiele związków o charakterze antyoksydantów. Do ważnych antyoksydantów należą: kwas moczowy, bilirubina, kwas liponowy, kofaktory enzymów $NADP^+$/NADPH, NAD^+/NADH, różnorodne składniki pokarmowe, w tym witaminy A, E, C, flawonoidy oraz jony metali (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}). Ważną rolę w obronie antyoksydacyjnej odgrywają liczne enzymy, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa, S-transferaza glutationowa, peroksydaza tiolowa, reduktaza metionylosulfotlenkowa, reduktaza glutationowa, a także białka wiążące jony miedzi i żelaza – ceruloplazmina, ferrytyna i transferyna [2]. Pod wpływem reaktywnych form tlenu, azotu i chloru dochodzi do uszkodzeń wielu związków biologicznie czynnych – lipidów, kwasów nukleinowych oraz białek, które są głównym celem ataku wolnych rodników [3,4].

Naprawa uszkodzonych białek w organizmie ograniczona jest głównie do redukcji utlenionych aminokwasów siarkowych (cysteiny i metioniny), a za ich usuwanie odpowiadają proteazy: katepsyna c, kalpaina, trypsyna oraz proteosomy m.in. 20S [2,5].

Przy dużej aktywności reaktywnych form tlenu i azotu, a zmniejszonej skuteczności układów antyoksydacyjnych i proteolitycznych, dochodzi do nagromadzenia utlenionych produktów białkowych [6]. Może to prowadzić do wielu zmian patologicznych oraz jest jednym z elementów w procesie starzenia się organizmów [7,8].

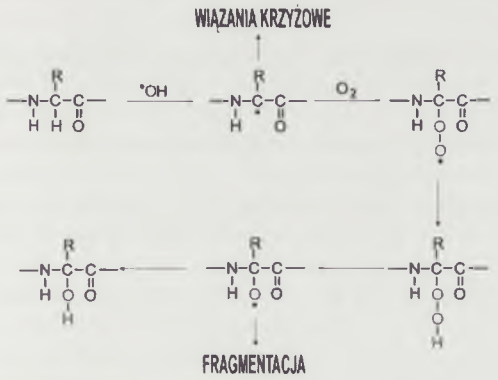
http://rcin.org.pl

REAKCJE ZACHODZĄCE W BIAŁKACH POD WPŁYWEM CZYNNIKÓW UTLENIAJĄCYCH

Pod wpływem utleniaczy w białkach dochodzi do utleniania łańcucha polipeptydowego oraz utleniania reszt aminokwasowych. Prowadzić to może do rozerwania łańcucha polipeptydowego, do tworzenia wiązań krzyżowych w obrębie tego samego lub kilku łańcuchów polipeptydowych oraz do pojawienia się zmienionych reszt aminokwasowych [7-9]. Tak zmienione białka mogą wykazywać utratę lub zwiększenie aktywności biologicznej oraz mieć tendencję do tworzenia agregatów [10,11]. Powstające w wyniku modyfikacji oksydacyjnych agregaty mają także zdolność hamowania systemów odpowiedzialnych za ich degradację [11]. Sprzyja to nagromadzaniu się zmienionych białek [12]. Wykazano, że pod wpływem reaktywnych form tlenu dochodzi do utraty aktywności m.in. takich enzymów jak dehydrogenazy gliceroaldehydofosforanowej czy dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej [13].

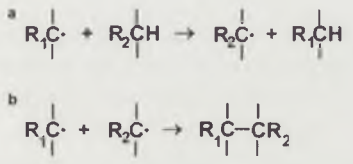
UTLENIANIE ŁAŃCUCHA POLIPEPTYDOWEGO

Rodnik hydroksylowy, powstający podczas radiolizy wody lub w wyniku reakcji nadtlenku wodoru np. z jonami Fe^{2+} (reakcja Fentona) albo z anionorodnikiem ponadtlenkowym (reakcja Habera-Weissa), zapoczątkowuje utlenianie łańcucha polipeptydowego odrywając atom wodoru przy węglu α aminokwasu. Powstający rodnik alkilowy reaguje gwałtownie z tlenem tworząc, poprzez rodnik alkilonadtlenkowy, alkilowodoronadtlenek. Tworzący się z niego rodnik alkoksylowy może przekształcić się w hydroksylowaną przy węglu α resztę aminokwasową lub może doprowadzić do fragmentacji łańcucha polipeptydowego [14] (Wzór 1).



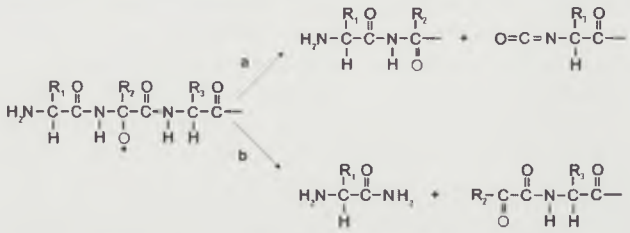
Wzór 1. Utlenianie łańcucha polipeptydowego przy węglu α

Rodniki: alkilowy, alkilonadtlenkowy i alkoksylowy reagują z innymi resztami aminokwasowymi tego samego lub innego łańcucha polipeptydowego białka, umożliwiając powstawanie kolejnych rodników (Wzór 2a). Przy niedoborze tlenu, gdy tworzenie rodników alkilonadtenkowych jest utrudnione, rodniki alkilowe w obrębie tego samego lub różnych białek, reagując ze sobą mogą prowadzić do powstawania wiązań krzyżowych między łańcuchami polipeptydowymi [2] (Wzór 2b).



Wzór 2. Reakcje rodnika alkilowego. a) tworzenie nowych rodników, b) tworzenie wiązań krzyżowych

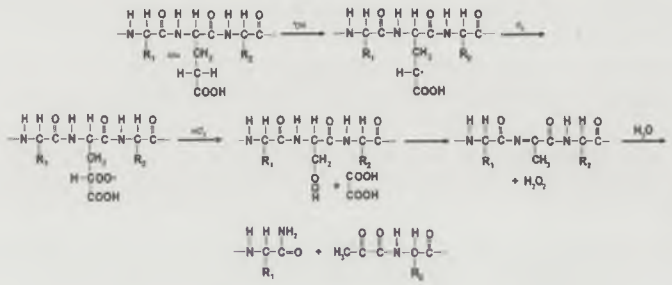
Obecność rodników alkoksylowych sprzyja reakcjom prowadzącym do rozerwania łańcucha polipeptydowego.



Wzór 3. Fragmentacja łańcucha polipeptydowego poprzez rodnik alkoksylowy

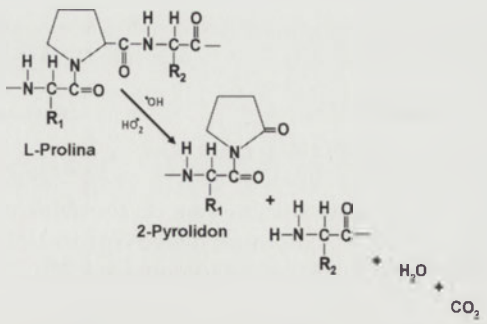
W zależności od miejsca pęknięcia przy węglu α powstaną dwa różne typy produktów rozpadu [14] (Wzór 3 a i b).

Przerwanie łańcucha polipeptydowego może nastąpić także po ataku aktywnych form tlenu na reszty kwasu glutaminowego, kwasu asparaginowego i proliny. Oderwanie atomu wodoru od atomu węgla γ reszty kwasu glutaminowego lub kwasu asparaginowego przez rodnik hydroksylowy również może doprowadzić do fragmentacji łańcucha [7,8,14]. Fragmentację łańcucha polipeptydowego poprzez utlenianie reszty kwasu glutaminowego przedstawia wzór 4.



Wzór 4. Fragmentacja łańcucha polipeptydowego poprzez utlenianie reszty kwasu glutaminowego

W wyniku utleniania reszt proliny powstaje 2-pyrolidon i równocześnie dochodzi do przerwania łańcucha polipeptydowego (Wzór 5). Z kolei hydroliza 2-pyrolidonu w środowisku kwasowym prowadzi do powstawania kwasu 4-aminomasłowego, którego obecność wśród produktów hydrolizy białek poddanych działaniu czynników utleniających wskazuje, że istotnie ma miejsce mechanizm fragmentacji białka poprzez utlenianie proliny [14].

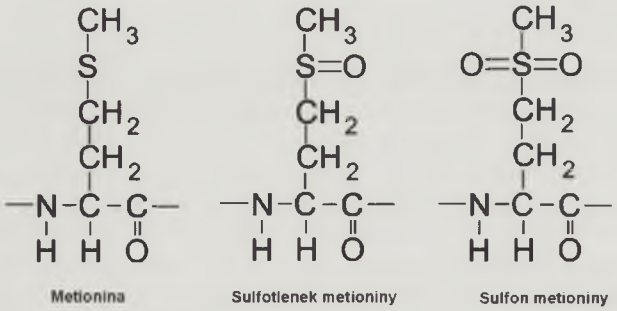


Wzór 5. Utlenianie reszt proliny

http://rcin.org.pl

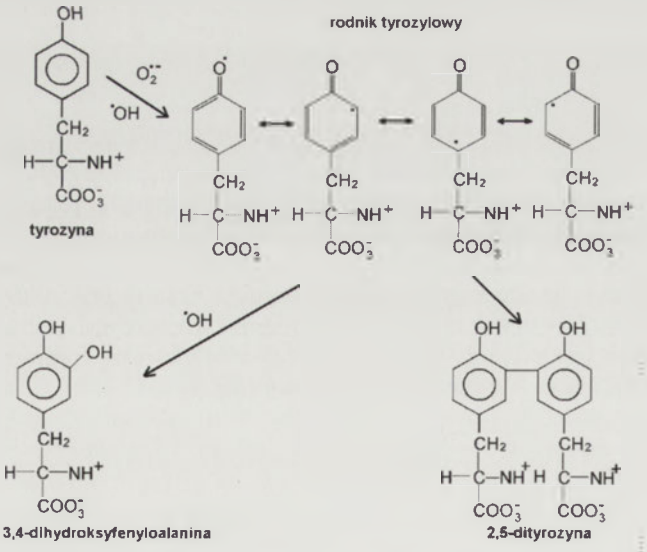
UTLENIANIE RESZT AMINOKWASOWYCH W BIAŁKACH

Wszystkie reszty aminokwasowe występujące w białkach podatne są na utlenianie. Największą wrażliwość na działanie reaktywnych form tlenu, azotu i chloru wykazują: cysteina, metionina, tyrozyna i tryptofan. Reszty cysteinowe utleniają się do reszt dwusiarczkowych, a metioninowe do sulfotlenku metioniny [14] (Wzór 6). Jest to jedyna modyfikacja aminokwasów w białkach *in vivo*, która może zostać naprawiona w obecności specyficznych reduktaz. Utlenianie i redukcja reszt metioniny może mieć znaczenie jako jeden z mechanizmów zmiatania wolnych rodników [14].



Wzór 6. Utlenianie reszt metioniny

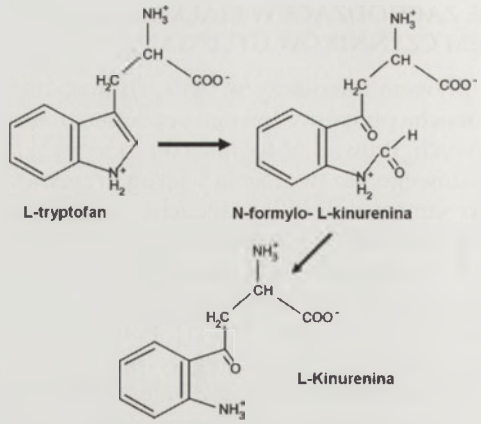
Wyjątkowo wrażliwe na atak aktywnych form tlenu są reszty aminokwasów aromatycznych. W wyniku utleniania reszt tyrozynowych powstaje 3,4-dihydroksyfenyloalanina (DOPA) poprzez włączanie dodatkowej grupy hydroksylowej do pierścienia aromatycznego lub dochodzi do tworzenia wiązań krzyżowych pomiędzy pierścieniami aromatycznymi dwóch cząsteczek tego aminokwasu dzięki powstaniu 2,5-dityrozyny [14] (Wzór 7).



Wzór 7. Utlenianie reszt tyrozyny

Reszty tryptofanowe utleniają się do formylokinureniny i kinureniny (Wzór 8), natomiast histydyny do 2-oksohistydyny, asparaginy i kwasu asparaginowego [14].

Utlenianie reszt aminokwasowych z wolną grupą aminową, amidową lub hydroksylową prowadzi do powstawania pochodnych karbonylowych. Dotyczy to również proliny, której pierścień ulega w czasie utleniania rozerwaniu. Takie



Wzór 8. Utlenianie reszt tryptofanu

pochodne aminokwasowe mogą reagować z innymi wolnymi grupami aminowymi reszt lizyny w tej samej lub innej cząsteczce białka, tworząc wiązania krzyżowe. Jest to kolejny, poza reakcjami rodników alkoksylowych i tworzeniem dityrozyny, mechanizm tworzenia wiązań krzyżowych w łańcuchach polipeptydowych [14].

Pochodne karbonylowe powstają również w reakcjach reszt aminokwasowych z produktami peroksydacji lipidów i cukrami redukującymi [2,14].

REAKCJE Z UDZIAŁEM NADTLENOAZOTYNU

Nadtlenoazotyn ($ONOO^-$) powstający *in vivo* w reakcji rodnika tlenku azotu i anionorodnika ponadtlenkowego ma zdolność utleniania wielu aminokwasów występujących w białkach [15], a także odpowiada za podstawienie grupy nitrowej ($-NO_2$) w ich pierścieniu aromatycznym [16,17]. Szczególnie narażone na atak tego związku są reszty cysteiny, metioniny, tyrozyny i tryptofanu [18]. Produktami reakcji nadtlenoazotynu z tyrozyną są: 3-nitrotyrozyna i 2,5-dinitrotyrozyna, która odgrywa rolę w tworzeniu nieprawidłowych wiązań krzyżowych [19]. Zdolność nadtlenoazotynu do utleniania aminokwasów siarkowych i do nitrowania aminokwasów aromatycznych zależy od dostępności dwutlenku węgla w miejscu reakcji [20,21]. O ile sam nadtlenoazotyn bardzo silnie utlenia reszty metioniny do sulfotlenku, o tyle zdolność do przeprowadzenia takiej reakcji przez pochodną powstającą z $ONOO^-$ i CO_2 ($O{=}NOOCO_2^-$ lub $O_2NOCO_2^-$) jest znacznie mniejsza [22,23]. Powstający związek silniej nitruje reszty aminokwasów aromatycznych niż sam nadtlenoazotyn. W środowisku, w którym występuje niskie stężenie dwutlenku węgla, przeważa utlenianie metioniny, natomiast przy wysokim nasyceniu CO_2 ma przewagę nitrowanie tyrozyny i tryptofanu [6].

Aktywność nadtlenoazotynu przejawia się nie tylko utlenianiem aminokwasów siarkowych i nitrowaniem aminokwasów aromatycznych, ale prowadzi także do tworzenia grup karbonylowych i do fragmentacji białek [24].

Wykazano, że na skutek oksydacyjnego działania nadtlenoazotynu dochodzi do zahamowania *in vitro* takich białek hemostazy jak fibrynogen, plazmina, aktywator tkankowy plazminogenu i czynnik tkankowy [25-31].

http://rcin.org.pl

ZNACZNIKI UTLENIANIA BIAŁEK I METODY DETEKCJI

Ocena stopnia uszkodzeń oksydacyjnych w strukturze białek, choć trudna, jest możliwa poprzez określenie stężenia związków powstających na skutek działania czynników utleniających. Najczęściej oznaczane związki uważane za znaczniki utleniania białek to: wodoronadtlenki białek, alkohole, grupy karbonylowe oraz nitrotyrozyna.

WODORONADTLENKI I ALKOHOLE

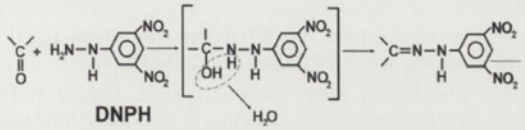
Powstające w wyniku utleniania wodoronadtlenki białek są nietrwałe, ulegają rozpadowi pod wpływem światła, podwyższonej temperatury, związków redukujących i jonów metali. Z tego powodu wodoronadtlenki białek nie są dobrymi znacznikami [32].

Alkohole powstające na skutek dwuelektronowego (utleniania) redukcji nadtlenków, lub bezpośrednio z rodników nadtlenkowych lub alkoksylowych są stosunkowo trwałymi produktami, mało podatnymi na dalsze utlenianie. Wiele z nich jest obecnych w prawidłowych białkach, (4-hydroksyprolina, 4- i 5-hydroksylizyna), a niektóre z nich podlegają dalszym reakcjom, dlatego też nie są zbyt dobrymi znacznikami utleniania białek [32].

GRUPY KARBONYLOWE JAKO ZNACZNIK USZKODZEŃ OKSYDACYJNYCH BIAŁEK

Na skutek utleniania reszt aminokwasowych zawierających wolną grupę aminową, amidową lub hydroksylową oraz reszt proliny, tryptofanu i histydyny, a także w wyniku przerwania łańcucha polipeptydowego po utworzeniu rodnika alkoksylowego, powstają związki o charakterze aldehydów lub ketonów. Ze względu na właściwości powstałej stosunkowo trwałej grupy chemicznej możliwe jest jakościowe i ilościowe oznaczanie grup karbonylowych, pozwalające na ocenę uszkodzeń struktury białek [33,34].

Aldehydy i ketony reagują z pochodnymi amoniaku, m.in. z hydroksylaminą, hydrazyną czy fenylohydrazyną tworząc połączenia, które mogą zostać wykorzystane do identyfikacji zmian w białkach. Do oznaczania powstających grup karbonylowych w białkach stosuje się zwykle 2,4-dinitrofenylohydrazynę (DNPH). Powstający w reakcji addycji 2,4-dinitrofenylohydrazon (DNP) (Wzór 9) wykazuje maksimum absorbancji przy długości fali 366 nm, a molowy współczynnik absorbancji dla tego związku wynosi 22000 $M^{-1}cm^{-1}$. Umożliwia to zastosowanie metod spektrofotometrycznych do oceny stężenia grup karbonylowych [35].



Wzór 9. Mechanizm reakcji sprzęgania grup karbonylowych z DNPH

Przeciwciała specyficzne w stosunku do DNP pozwalają na oznaczanie grup karbonylowych w białkach przy zastosowaniu metody ELISA lub metody *Western blotting* [36].

Tabela1. Aminokwasy najbardziej podatne na utlenianie [14].

Aminokwas	Produkt utleniania
cysteina	kwas cysteinowy, dwusiarczki
metionina	sulfotlenek metioniny, sulfon metioniny
tryptofan	formylokinurenina, kinurenina, 3-hydroksykinurenina, 2-,4-,5-,6-,7-hydroksytryptofan, nitrotryptofan
fenyloalanina	2,3-dihydroksyfenyloalanina, 2-, 3- lub 4-hydroksyfenyloalanina
tyrozyna	3,4-dihydroksyfenyloalanina, 2,5-dityrozyna, nitrotyrozyna
histydyna	2-oksohistydyna, asparagina, asparaginian
arginina	semialdehyd glutaminowy
lizyna	semialdehyd α-aminoadypinowy
prolina	2-pyrolidon, kwas pyroglutaminowy, 4- i 5- hydroksyprolina, semialdehyd glutaminowy
treonina	kwas 2-amino-3-ketomasłowy
kwas glutaminowy	kwas szczawiowy, kwas pirogronowy

3-NITROTYROZYNA – ZNACZNIK REAKTYWNYCH FORM AZOTU

Nitrotyrozyna jest znacznikiem działania *in vivo* reaktywnych form azotu ($ONOO^-$, NO_2, NO_2Cl). Obecna w białku nitrotyrozyna może być oznaczana spektrofotometrycznie przy długości fali 438 nm, (ε=4400 $M^{-1}cm^{-1}$, pH 9), testem ELISA [17] lub też metodą *Western blotting* z zastosowaniem dostępnych w handlu przeciwciał antynitrotyrozynowych.

BIOLOGICZNE ZNACZENIE UTLENIANIA BIAŁEK

Zmodyfikowane oksydacyjnie białka wykryto w licznych tkankach i wykazano, że stres oksydacyjny i modyfikacja białek zachodząca pod wpływem reaktywnych form tlenu i azotu odgrywają rolę zarówno w procesie starzenia jak i w patogenezie wielu chorób. Ilość produktów utleniania białek wzrasta wraz z wiekiem organizmu [37-41]. Zaobserwowano także skorelowany z wiekiem wzrost wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego oraz nadtlenku wodoru, a także spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych, przy równoczesnym wzroście aktywności innych enzymów [6]. Powstawanie i gromadzenie się utlenionych produktów białkowych zależy od szybkości wytwarzania reaktywnych czynników utleniających (przy zaburzonej aktywności układów antyoksydacyjnych), od wrażliwości białek na utlenianie i od szybkości degradacji utlenionych białek [38].

Powstawanie i kumulowanie się utlenionych produktów białkowych odgrywa ważną rolę w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera, Parkinsona) [42,43], także w patogenezie chorób naczyniowych, szczególnie w miażdżycy oraz w cukrzycy [33-47]. U diabetyków z komplikacjami miażdżycowymi w złogach wewnątrznaczyniowych wykryto oprócz utlenionych frakcji lipoproteinowych LDL także składnik podobny do fibryny, immunologicznie identyczny z fibryną. Za jego powstawanie może odpowiadać zmieniony oksydacyjnie fibrynogen [48]. W macierzy pozakomórkowej pochodzącej z uszkodzonych przez miażdżycę naczyń oraz w blaszce miażdżycowej wy-

http://rcin.org.pl

kryto produkty utleniania tyrozyny; dityrozynę [47], dihydroksyfenyloalaninę i hydroksyfenyloalaninę [45,49-51]. Stwierdzono także obecność modyfikowanych oksydacyjnie białek w osoczu osób z chorobą nowotworową i u palaczy tytoniu [52].

Gromadzenie się zmienionych oksydacyjnie białek jest charakterystyczne nie tylko dla starzejących się komórek [37-41], ale także jest obserwowane wielu chorobach związanych z wiekiem [2,14,38,42]. W młodych komórkach utlenione białka są rozpoznawane i degradowane przez proteosomy [38,52-58]. U ssaków degradacja zachodzi głównie z udziałem proteosomu 20S [55], przy czym nie jest konieczne przyłączenie do białek ubikwityny [53-56]. Utlenione białka tylko w niewielkim stopniu ulegają reakcji ubikwitylacji [9]. Stwierdzono także, że tylko niewielkie modyfikacje oksydacyjne w białkach zwiększają ich podatność na proteolizę, natomiast wyraźne zmiany oksydacyjne prowadzące do tworzenia wiązań krzyżowych i agregatów, powodują oporność tych białek na degradację [32,58]. Powstające agregaty białek zmienionych oksydacyjnie są mniej podatne na działanie enzymów proteolitycznych, hamują aktywność proteosomu 20S i mogą odkładać się w organizmie [10-11]. Gromadzenie się takich białek w komórce może doprowadzić do apoptozy lub nekrozy [5].

Reaktywne formy tlenu i azotu mogą nie tylko uszkadzać składniki komórki. Wykazano również ich rolę w przenoszeniu sygnału w komórce, w różnicowaniu komórek i apoptozie. Reaktywne formy tlenu i azotu mogą aktywować czynniki transkrypcyjne (NF-kappa B) [59-61], mają wpływ na reakcje zapalne, wzrost i różnicowanie komórek oraz apoptozę [59,60]. Patologiczna aktywacja takich procesów przez ROS może zaburzać prawidłowe funkcjonowanie komórki [61].

UWAGI KOŃCOWE

W ostatnich latach problem stresu oksydacyjnego i jego wpływ na białka jest badany przez wiele zespołów naukowych na całym świecie. Wynika to przede wszystkim ze znaczenia utleniania białek w procesie starzenia i w wielu stanach chorobowych związanych z wiekiem. Poszukuje się także czułych wskaźników tych procesów. Takim czułym znacznikiem modyfikacji oksydacyjnych w białkach wydają się być grupy karbonylowe.

Zmiany oksydacyjne w białkach są nieodłącznym efektem tlenowego metabolizmu komórkowego i mimo licznych układów ochronnych nie mogą zostać całkowicie wyeliminowane. Gromadzenie się utlenionych produktów białkowych upośledza funkcje organizmu i może przyśpieszać proces starzenia, w skrajnych sytuacjach prowadząc nawet do śmierci komórek [13].

PIŚMIENNICTWO

1. Bartosz G (2003) Druga twarz tlenu, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
2. Stadtman ER, Levine RL (2000) Protein oxidation. Ann N Y Acad Sci 899: 191-208
3. Du J, Gebicki JM (2004) Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. Int J Biochem Cell Biol 36: 2334-2343
4. Gieseg S, Duggan S, Gebicki JM (2000) Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxyl radicals. Biochem J 350: 215--218
5. Davies KJ (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. Biochimie 83: 301–310
6. Sohal RS (2002) Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. Free Radic Biol Med 33: 37-44
7. Stadtman ER (1992) Protein Oxidation and Aging. Science 257: 1220--1224
8. Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. Science 273: 59-63
9. Stadtman ER, Levine RL (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino Acids 25: 207--218
10. Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJ (2003) Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. Biochem Biophys Res Commun 305: 709–718
11. Grune T, Davies KJ (2003) The proteasomal system and HNE-modified proteins. Mol Asp Med 24: 195–204
12. Ryazanov AG, Nefsky BS (2002) Protein turnover plays a key role in aging. Mech Ageing Dev 123: 207–213
13. Ciolino HP, Levine RL (1997) Modification of proteins in endothelial cell death during oxidative stress. Free Radic Biol Med 22: 1277-1282
14. Berlett BS, Stadtman ER (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem 272: 20313-20316
15. Alvarez B, Radi R (2003) Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. Amino Acids 25: 295-311
16. Ducrocq C, Blanchard B, Pignatelli B, Ohshima H (1999) Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. Cell Mol Life Sci 55: 1068-1077
17. Khan J, Brennan DM, Bradley N, Gao B, Bruckdorfer R, Jacobs M (1998) 3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. Biochem J 330: 795-801
18. Alvarez B, Ferrer-Sueta G, Freeman BA, Radi R (1999) Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. J Biol Chem 274: 842-848
19. Pfeiffer S, Schmidt K, Mayer B (2000) Dityrosine formation outcompetes tyrosine nitration at low steady-state concentrations of peroxynitrite - implications for tyrosine modification by nitric oxide/superoxide in vivo. J Biol Chem 275: 6346–6352
20. Lymar SV, Jiang Q, Hurst JK (1996) Mechanism of carbon dioxide-catalyzed oxidation of tyrosine by peroxynitrite. Biochemistry 35: 7855--7861
21. Berlett BS, Levine RL, Stadtman ER (1998) Carbon dioxide stimulates peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues and inhibits oxidation of methionine residues of glutamine synthetase: Both modifications mimic effects of adenylation. Proc Natl Acad Sci USA 95: 2784--2789
22. Tien M, Berlett BS Levine RL, Chock PB, Stadtman ER. (1999) Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. Proc Natl Acad Sci USA 96: 7809--7814
23. Pryor WA, Jin X, Squadrito GL (1994) One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. Proc Natl Acad Sci USA 91: 11173-11177
24. Ischiropoulos H, Al-Mehdi AB (1995) Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. FEBS Lett 364: 279-282
25. Lupidi G, Angeletti M, Eleuteri AM, Tacconi L, Coletta M, Fioretti E (1999) Peroxynitrite-mediated oxidation of fibrinogen inhibits clot formation. FEBS Lett 462: 236-240
26. Vadseth C, Souza JM, Thomson L, Seagraves A, Naaswami C, Sheiner T, Torbet J, Vilaire G, Bonnet JS, Murciano JC, Muzykantov V, Penn MS, Hazen SL, Weisel JW, Ischiropoulos H (2004) Pro-thrombotic state iduced by pst-tranlational mdification of fibrinogen by reactive nitrogen species. J Biol Chem 279: 8820-8826
27. Gugliucci A (2003) Human plasminogen is highly susceptible to peroxynitrite inactivation. Clin Chem Lab Med 41: 1064-1068

http://rcin.org.pl

28. Nowak P; Kołodziejczyk J, Wachowicz B (2004) Peroxynitrite and fibrinolytic system: The effect of peroxynitrite on plasmin activity. Mol Cell Biochem 267: 141-146
29. Nielsen VG, Crow JP, Zhou F, Parks DA (2004) Peroxynitrite inactivates tissue plasminogen activator. Anesth Analg 98: 1312-1317
30. Nielsen VG, Crow JP, Mogal A, Zhou F, Parks DA (2004) Peroxynitrite decreases hemostasis in human plasma in vitro. Anesth Analg 99: 21--26
31. Nielsen VG, Crow JP (2004) Peroxynitrite decreases rabbit tissue factor activity in vitro. Anesth Analg 98: 668-671
32. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT (1999) Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. Free Radic Biol Med 27: 1151-1163
33. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta 329: 23-38
34. Dalle-Donne I, Giustarini D Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003) Protein carbonylation in human diseases. Trends Mol Med 9: 169-176
35. Fagan JM, Sleczka BG, Sohar I (1999) Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. Int J Biochem Cell Biol 31: 751-757
36. Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC (1997) Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. Free Radic Biol Med 23: 361-366
37. Beal MF (2002) Oxidatively modified proteins in aging and disease. Free Radic Biol Med 32: 797-803
38. Shringarpure R, Davies KJ (2002) Protein turnover by the proteasome in aging and disease. Free Radic Biol Med 32: 1084-1089
39. Levine RL (2001) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. Free Radic Biol Med 32: 790-796.
40. Jakubowski W, Bilinski T, Bartosz G (2000) Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Free Radic Biol Med 28: 659-664
41. Grzelak A, Skierski J, Bartosz G (2001) Decreased antioxidant defense during replicative aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* studied using the 'baby machine' method. FEBS Lett 492: 123-126
42. Perry G, Nunomura, Hirai K, Zhu X, Perez M, Avila J, Castellani RJ, Atwood CS, Aliev G, Sayre LM, Takeda A, Smith MA A (2002) Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? Free Radic Biol Med 33: 1475-1479
43. Perry G, Raina AK, Nunomura A, Wataya T, Sayre LM, Smith MA (2000) How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease. Free Radic Biol Med 28: 831-834
44. Practico D, Delanty N (2000) Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. Am J Med 109: 577-585
45. Heinecke JW (2002) Oxidized amino acids: culprits in human atherosclerosis and indicators of oxidative stress. Free Radic Biol Med 32: 1090-1101
46. Matteucci E, Biasci E, Giampietro O (2001) Advanced oxidation protein products in plasma: stability during storage and correlation with other clinical characteristics. Acta Diabetol 38: 187-189
47. Brennan ML, Hazen SL (2003) Amino acid and protein oxidation in cardiovascular disease. Amino Acids 25: 365-374
48. Lipinski B (2001) Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. J Diabetes Complications 15: 203-210
49. Leeuwenburgh C, Rasmussen JE, Hsu FF, Mueller DM, Pennathur S, Heinecke JW (1997) Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. J Biol Chem 272: 3520-3526
50. Woods AA, Linton SM, Davies MJ (2003) Detection of HOCl-mediated protein oxidation products in the extracellular matrix of human atherosclerotic plaques. Biochem J 370: 729-735
51. Fu S, Davies MJ, Stocker R, Dean RT (1998) Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. Biochem J 333: 519-525
52. Pignatelli B, Li CQ, Boffetta P, Chen Q, Ahrens W, Nyberg F, Mukeria A, Bruske-Hohlfeld I, Fortes C, Constantinescu V, Ischiropoulos H, Ohshima H (2001) Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. Cancer Res 61: 778-784
53. Grune T, Reinheckel T, Joshi M, Davies KJ (1995) Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. J Biol Chem 270: 2344-2351
54. Ullrich O, Reinheckel T, Sitte N, Hass R, Grune T, Davies KJ (1999) Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. Proc Natl Acad Sci USA 96: 6223-6228
55. Brooks P, Fuertes G, Murray RZ, Bose S, Knecht E, Rechsteiner MC, Hendil KB, Tanaka K, Dyson J, Rivett J (2000) Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. Biochem J 346: 155-161
56. Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJ (2003) Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. J Biol Chem 278: 311-318
57. Giulivi C, Davies KJ (1993) Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by (the 19 S) proteasome. J Biol Chem 268: 8752-8759
58. Reinheckel T, Sitte N, Ullrich O, Kuckelkorn U, Davies KJ, Grune T (1998) Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. Biochem J 335: 637-642
59. Wang T, Zhang X, Li JJ (2002) The role of NF-κB in the regulation of cell stress responses. Int Immunopharmacol 2: 1509–1520
60. Bowie A, O'Neill LAJ (2000) Oxidative stress and nuclear factor-κB activation A reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. Biochem Pharmacol 59: 13–23
61. Hensley K, Floyd RA (2002) Reactive oxygen species and Protein oxidation in aging: A look back, a look ahead. Arch Biochem Biophys 397: 377–383

Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with proteins

Michał Błażej Ponczek✉, Barbara Wachowicz

Department of General Biochemistry, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz
✉e-mail: mponczek@biol.uni.lodz.pl

Key words: reactive oxigen and nitrogen species, free radicals, superoxide, nitric oxide, peroxynitrate, oxydative stress, protein oxidation, carbonyl groups, nitrotyrosine, dityrosine, protein hydroperoxides, protein degradation, aging

ABSTRACT

Free radicals and reactive oxygen or nitrogen species generated during oxidative stress and as by-products of normal cellular metabolism may damage all types of biological molecules. Proteins are major initial targets in cell. Reactions of a variety of free radicals and reactive oxygen and nitrogen species with proteins can lead to oxidative modifications of proteins such as protein hydroperoxides formation, hydroxylation of aromatic groups and aliphatic amino acid side chains, nitration of aromatic amino acid residues, oxidation of sulfhydryl groups, oxidation of methionine residues, conversion of some amino acid residues into carbonyl groups, cleavage of the polypeptide chain and formation of cross-linking bonds. Such modifications of proteins leading to loss of their function (enzymatic activity), accumulation and inhibition of their degradation have been observed in several human diseases, aging, cell differentiation and apoptosis. Formation of specific protein oxidation products may be used as biomarkers of oxidative stress.

http://rcin.org.pl

Rola białek opiekuńczych *Escherichia coli* w ochronie komórki bakteryjnej przed nieodwracalną agregacją białek indukowaną termicznie

Sabina Kędzierska

Instytut Biologii, Uniwersytet Gdański, Gdańsk

Instytut Biologii, Katedra Biochemii, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; e-mail: kedzie@biotech.univ.gda.pl; tel. (058) 3015741

Artykuł otrzymano 13 stycznia 2005
Artykuł zaakceptowano 20 stycznia 2005

Słowa kluczowe: agregacja białek, dezagregacja, białka opiekuńcze, proteazy

Wykaz stosowanych skrótów: AAA – ATPazy związane z różnymi procesami komórkowymi; aldolaza FBP – aldolaza fruktozo-1,6-difosforanu; *E. coli* – *Escherichia coli*; Hsps – białka szoku termicznego; sHsps – małe białka szoku termicznego; MD – środkowa domena ClpB; *Tth* – *Thermus thermophilus*

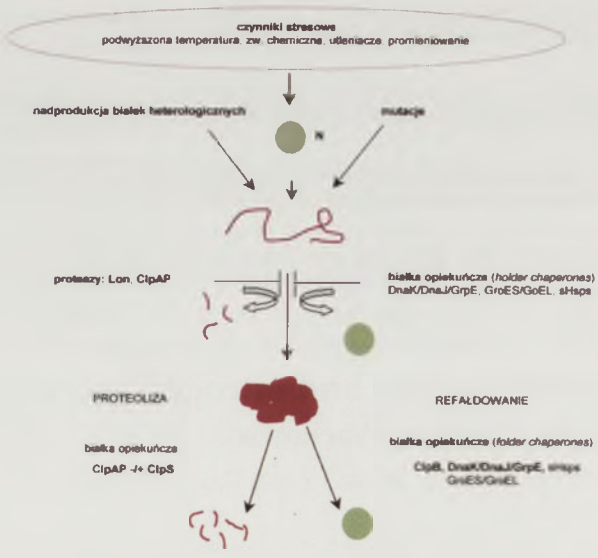
Podziękowania: Praca powstała w trakcie realizacji grantu UG BW 1460-5-0240-5

STRESZCZENIE

Wszystkie organizmy żywe odpowiadają na działanie czynników stresowych, takich jak podwyższona temperatura czy obecność etanolu, wzmożoną syntezą specyficznej grupy białek zwanych białkami szoku termicznego (Hsps) bądź białkami stresowymi. Wśród Hsps można wyróżnić białka opiekuńcze i proteazy. Białka opiekuńcze pośredniczą w prawidłowym zwijaniu polipeptydów, chronią białka komórkowe przed inaktywacją i uczestniczą w reaktywacji zagregowanych białek. Z kolei proteazy eliminują z komórki białka trwale uszkodzone pod wpływem stresu. W artykule jest opisany udział białek szoku termicznego modelowej komórki bakterii *E. coli* w ochronie innych białek przed agregacją i w mechanizmie usuwania z komórki agregatów białkowych powstających w warunkach stresowych, po szoku termicznym. Mechanizm ten nie jest w pełni poznany. Z dotychczasowych badań prowadzonych w wielu laboratoriach na świecie wynika, że obejmuje on renaturację i proteolizę z udziałem białek opiekuńczych i proteaz. Ostatnio szczególnie dużym zainteresowaniem cieszy się mechanizm dezagregacji i reaktywacji białek z udziałem systemu DnaK/DnaJ/GrpE oraz białka ClpB, ATPazy z rodziny AAA.

WPROWADZENIE

Gwałtowne podwyższenie temperatury powoduje wewnątrzkomórkową denaturację i agregację białek *Escherichia coli* [1-3]. Podobny efekt wywołują również inne czynniki stresogenne takie jak: etanol, metale ciężkie, analogi aminokwasów, czynniki uszkadzające DNA czy zmiany pH środowiska. Wszystkie wymienione czynniki łączy wspólna cecha – naruszają one natywną strukturę białek, co sprzyja ich agregacji (Rys. 1). Białka w stanie zagregowanym są nieaktywne funkcjonalnie i stanowią poważne zagrożenie dla komórki. W związku z tym, pojawienie się w komórce agregatów białkowych indukuje (poprzez uruchomienie odpowiedzi stresowej) wzmożoną syntezę specyficznej grupy białek zwanych białkami szoku termicznego (Hsps, ang. *Heat-shock proteins*) bądź białkami stresowymi [4-6]. Ich zadaniem jest ochrona komórki przed zgubnymi skutkami zmian czynników zewnętrznych, jak nieodwracalna agregacja białek. Prawie wszystkie organizmy reagują na czynniki stresowe tak, jak komórka bakteryjna *E. coli*, syntetyzują białka szoku termicznego [7]. Geny szoku termicznego i białka przez nie kodowane charakteryzują się zachowaną w ewolucji strukturą pierwszorzędową i wysokim stopniem homologii sekwencji [4]. Hsps syntetyzowane są również w warunkach fizjologicznych na poziomie konstytutywnym, a ich funkcja

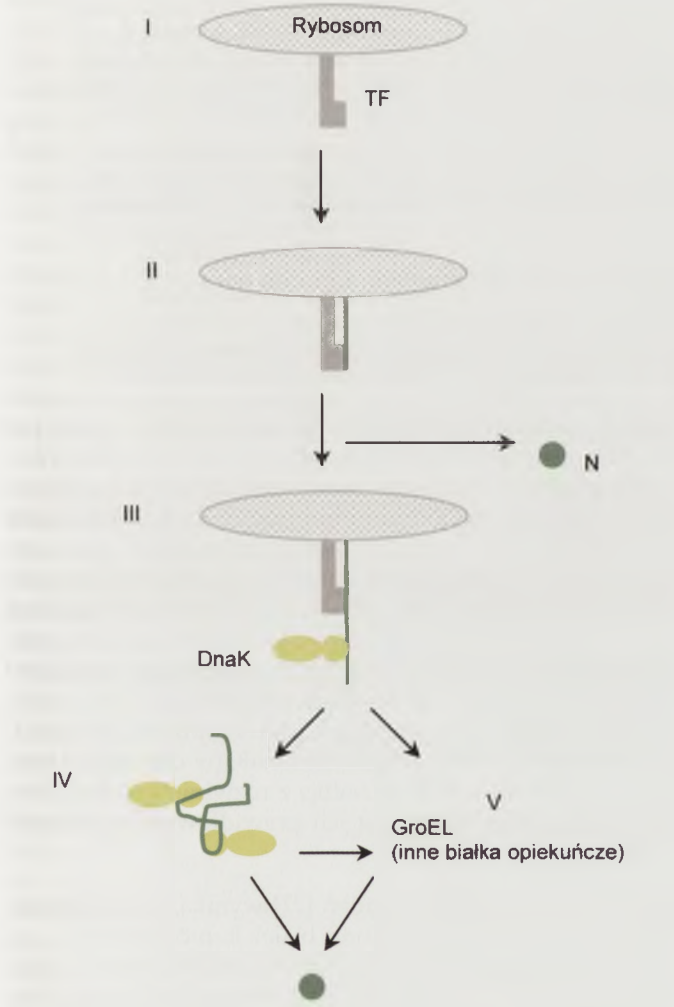


Rysunek 1. Mechanizm ochrony komórki *E. coli* przed nieodwracalną agregacją białek. Agregację białek wywołują różne czynnik stresogenne, nadprodukcja białek heterologicznych oraz niektóre mutacje. Tworzeniu agregatów białkowych zapobiegają białka opiekuńcze, głównie DnaK/DnaJ/GrpE i GroES/GroEL oraz proteazy, które usuwają trwale uszkodzone białka. Wysoki poziom rozwiniętych białek w komórce wyczerpuje pojemność białek opiekuńczych i proteaz, co prowadzi do tworzenia się agregatów. Zagregowane białka są „rozpuszczane" przez ClpB/DnaK/DnaJ/GrpE i refałdowane przy udziale DnaK/DnaJ/GrpE oraz GroES/GroEL. Działanie ClpB/DnaK/DnaJ/GrpE mogą usprawniać sHsps zasocjowane z agregatami. Proteazy szoku termicznego usuwają z komórki białka niefunkcjonalne, możliwy też jest w tym procesie udział białek opiekuńczych. N- białko natywne.

http://rcin.org.pl

wiąże się przede wszystkim z biogenezą białek, kontrolą prawidłowego fałdowania powstających polipeptydów [8-12] (Rys.2).

Wśród Hsps wyróżnić można białka opiekuńcze (ang. *molecular chaperones*): GroEL, GroES, DnaK, DnaJ, GrpE, ClpB, IbpA/B) (Tab.1) i proteazy szoku termicznego: ClpAP, ClpXP, ClpYQ, Lon [13,14]. Białka opiekuńcze w warunkach stresogennych zapobiegają przede wszystkim agregacji białek komórkowych, hamując agregację białek częściowo zdenaturowanych (ang. *holder chaperones*) i przywracając im ich właściwą konformację oraz właściwości biologiczne (ang. *folder chaperones*) [3, 15-17]. Z kolei główne zadanie proteaz szoku termicznego sprowadza się do wyeliminowania z komórki nieodwracalnie uszkodzonych białek, których obecność mogłaby niekorzystnie wpływać na funkcjonowanie innych białek komórkowych [18,19]. Białka opiekuńcze wraz z proteazami tworzą tzw. system kontroli jakości białek, sprawujący opiekę nad stanem fałdowania białek komórkowych i ich prawidłowym funkcjonowaniem w komórce (Rys.1).



Rysunek 2. Model fałdowania nowo syntetyzowanych białek *E. coli*. W fałdowaniu białek *E. coli* najważniejszą rolę odgrywają: czynnik TF- peptydylo-prolylo *cis/trans* izomeraza (ang. *trigger factor*), DnaK i GroEL. (I) Czynnik TF asocjuje z dużą podjednostką rybosomu i (II) oddziałuje z wyłaniającym się z tunelu rybosomu łańcuchem polipeptydowym. Większość krótkich polipeptydów (67%, Bukau i wsp. [12]) oddziałuje tylko z TF i po zakończonej syntezie osiąga natywną konformację bez pomocy dodatkowych białek opiekuńczych. (III) Dłuższe polipeptydy mogą w pierwszej kolejności oddziaływać z TF a następnie z białkiem DnaK (wiązanie ko-translacyjne), które współpracuje z DnaJ i GrpE. DnaJ również może przejściowo oddziaływać z polipeptydami (IV). System DnaK albo pośredniczy w potranslacyjnym fałdowaniu/składaniu polipeptydów (5-18% białek >30kDa) albo (V) stabilizuje intermediaty fałdowania, które następnie są przekazywane na kompleks GroEL/GroES (lub inne białka opiekuńcze). GroEL/GroES może przejmować substraty bez pośrednictwa systemu DnaK. 10-15% wszystkich białek cytoplazmatycznych *E. coli* oddziałuje podczas fałdowania *de novo* z GroEL/GroES i są to w większości białka ~20-60-kDa. N- białko natywne. Rysunek przedrukowano z: Teter SA, Houry WA, Ang D, Tradler T, Rockabrand D, Fischer G, Blum P, Georgopoulos C, Hartl FU (1999) Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. Cell 97: 755-765, za zgodą autorów i wydawnictwa Elsevier.

Do agregacji białek w komórkach *E. coli* może także dochodzić podczas nadprodukcji białek heterologicznych. Często w takich przypadkach tworzą się nierozpuszczalne ciała inkluzyjne (ang. *inclusion bodies*), będące szczególnym typem agregatów białkowych [20]. Jednoczesna nadprodukcja Hsps pozwala na utrzymanie takich białek w formie rozpuszczalnej, niezagregowanej [21,22].

WŁASNOŚCI BIAŁEK *E. COLI* ZAGREGOWANYCH PO SZOKU TERMICZNYM - FRAKCJA S

Białka *E. coli*, które uległy agregacji w wyniku szoku termicznego można wyizolować z komórki jako odrębną frakcję S, stosując metodę opracowaną przez Kucharczyka i wsp. [1]. Metoda ta polega na ultrawirowaniu lizatów bakteryjnych w gradientach stężeń sacharozy. Dzięki tej metodzie można śledzić agregację białek *in vitro* i dalszy ich los po szoku termicznym. Nie można jednak odróżnić procesów, w wyniku których frakcja S jest usuwana z komórek.

Frakcja S w szczepie *E. coli* typu dzikiego (*wt*) pojawia się w 15 minut po przeniesieniu bakterii z 30°C do 45°C i zanika po 10 minutach inkubacji w temperaturze 37°C. Szybkie zanikanie frakcji S w komórkach *wt* jest wynikiem efektywnie działającego mechanizmu odpowiedzi stresowej. W komórkach mutanta *rpoH*, niezdolnego do indukcji odpowiedzi stresowej, frakcja S jest znacznie większa niż w komórkach *E. coli wt* i bardziej stabilna (nie jest usuwana w czasie trwania jednej generacji [1]). Mutacje punktowe w genach białek opiekuńczych (*dnaK, dnaJ, groES, groEL*) także stabilizują frakcję S lub powodują niekompletne jej usunięcie [23]. Mutacje w genach proteaz szoku termicznego (*clp, htrA, lon*) opóźniają usuwanie frakcji S, niektóre też powodują niekompletne jej usunięcie [19]. Wyniki doświadczeń z mutantami w genach szoku termicznego świadczą o tym, że mechanizm usuwania z komórki zagregowanych białek frakcji S polega na renaturacji i/lub proteolizie z udziałem białek opiekuńczych i proteaz szoku termicznego.

Białka frakcji S charakteryzują specyficzne własności. Stwierdzono, że w skład frakcji S wchodzą niektóre z białek opiekuńczych: DnaK, DnaJ, ClpB oraz w dużych ilościach małe białka szoku termicznego (sHsps) IbpA/B [1,24]. Białka GroES, GroEL i GrpE pozostają po szoku termicznym we frakcji białek rozpuszczalnych [1]. Niewątpliwie to obecność Hsps i sHsps nadaje białkom frakcji S specyficzne własności. Dzięki Hsps i sHsps zagregowane białka frakcji S utrzymywane są w odpowiedniej konformacji, w stanie kompetencji do refałdowania lub proteolizy. Cennych informacji o własnościach białek frakcji S dostarczyły doświadczenia, w których porównywano je z białkami komórkowymi uwalnianymi z komórki i denaturowanymi *in vitro* w analogicznych

http://rcin.org.pl

Tabela 1. Białka opiekuńcze *E. coli* indukowane w warunkach stresogennych

Rodzina Hsps	Struktura	Białko *E. coli*	Efekt fenotypowy mutacji null	Funkcja
Hsp 100/Clp	heksamer/ heptamer	ClpB[49,55,59,60]	wolniejsze tempo wzrostu bakterii w temperaturze 44°C, zredukowana przeżywalność w 50°C, stabilizacja frakcji zagregowanych białek (frakcji S) po szoku termicznym (15 min, 45°C)	ATPaza biorąca udział wraz z systemem DnaK/DnaJ/GrpE w dezagregacji i reaktywacji białek oraz w termooporności
Hsp90	dimer	HtpG[61,62]	wolniejsze tempo wzrostu bakterii w temperaturze 44°C	ATPaza; fałdowanie i stabilizacja różnych białek
Hsp70/ Hsp40	monomer	DnaK[10,22], partnerzy: DnaJ i GrpE	mutant wrażliwy na temperaturę (39°C)	ATPaza; fałdowanie białek (rozpoznaje rozciągnięte peptydy, wiąże je i uwalnia w zależnym od ATP cyklu reakcji); zapobieganie agregacji białek; wraz z ClpB bierze udział w dezagregacji i reaktywacji białek; regulacja odpowiedzi na stres (negatywny regulator)
Hsp60/ Hsp10	14-mer	GroEL[63-65], partner GroES	mutacja letalna (obydwa białka GroE są niezbędne do wzrostu *E. coli*)	ATPaza; fałdowanie białek (rozpoznaje stany przejściowe fałdowania, stabilizuje polipeptydy w konformacji przypominającej *„molten globule"*); zapobieganie agregacji białek
sHsps	8-24-mery	IbpA, IbpB[33,38-40,66]	obniżona przeżywalność w warunkach przedłużonego szoku termicznego (50°C, 4 godziny), podwyższony poziom zagregowanych białek (frakcji S)	zapobieganie agregacji białek i ochrona białek przed nieodwracalną agregacją; białka odgrywajace rolę w zjawisku termooporności

warunkach (45°C, 15 minut) oraz z kazeiną, nienaturalnym substratem proteazy HtrA. Z doświadczeń tych wynikało, że HtrA (niezależna od ATP proteaza serynowa szoku termicznego) rozpoznaje białka frakcji S i degraduje je podobnie jak kazeinę, natomiast białka komórkowe denaturowane *in vitro* nie były substratami tej proteazy [19]. Poza tym, proteoliza zagregowanych białek frakcji S była stymulowana przez jony magnezu i hamowana w obecności DnaJ. Takiego efektu nie stwierdzono w przypadku trawienia kazeiny. Hamujący wpływ DnaJ na trawienie frakcji S proteazą HtrA może świadczyć o udziale DnaJ w ochronie endogennych białek *E. coli* zagregowanych po szoku przed proteolizą katalizowaną przez HtrA lub inne proteazy. Ponadto białka frakcji S w porównaniu z komórkowymi białkami denaturowanymi *in vitro* wykazywały inny wzór sedymentacji w gradientach stężeń sacharozy [25].

Różne własności białek frakcji S i białek denaturowanych *in vitro* jak najbardziej mogą świadczyć o różnicach w ich konformacji, zależności konformacji od poziomu Hsps w czasie denaturacji. Denaturacja w układach pozakomórkowych, w ekstraktach bakteryjnych zachodzi przy stałym poziomie Hsps, natomiast w komórkach, w warunkach stresu ilość Hsps gwałtownie wzrasta dzięki indukcji ekspresji genów szoku termicznego. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że utrzymywanie zdenaturowanych białek komórkowych w konformacjach umożliwiających ich refałdowanie lub degradację stanowi niezbędny warunek, od którego zależy skuteczna walka Hsps z agregacją białek komórkowych indukowaną termicznie.

HAMOWANIE AGREGACJI BIAŁEK DENATUROWANYCH TERMICZNIE

Zidentyfikowno szereg sposobów w jaki białka Hsps walczą z nieodwracalną agregacją białek komórkowych *E. coli* indukowaną czynnikami stresowymi. Jedną z nich jest zapobieganie agregacji białek, utrzymywanie ich w formie rozpuszczalnej, w stanie kompetencji do renaturacji/refałdowania lub proteolizy. Warunkiem utrzymania białek zdenaturowanych w formie niezagregowanej w czasie szoku termicznego jest zablokowanie w nich miejsc hydrofobowych, które zostają wyeksponowane w wyniku denaturacji i sprzyjają tworzeniu agregatów. Do białek opiekuńczych, które w ten właśnie sposób hamują agregację nienatywnych białek, wiążąc się do ich hydrofobowych powierzchni, należą: HtpG, DnaK, DnaJ, GroEL i IbpB [26,22]. GroEL (w obecności GroES i ATP) oraz DnaK (w obecności DnaJ, GrpE i ATP) nie tylko oddziałują z rozwiniętymi białkami, ale również pośredniczą w ich prawidłowym refałdowaniu.

Z przeprowadzonych badań [27] wynika, że najskuteczniejszym systemem w ochronie białek komórkowych *E. coli* przed agregacją indukowaną termicznie jest system białek opiekuńczych DnaK/DnaJ/GrpE. System ten efektywnie zapobiegał agregacji termolabilnych białek w ekstraktach *E. coli*. Z zastosowaniem mutantów w genach białek opiekuńczych Δ*dnak52*, Δ*clpB*, Δ*htpG*, Δ*ibpAB groEL44*, *groEL140* stwierdzono, że szok termiczny (60 minut w 42°C i 60 minut w 45°C) powodował znaczącą agregację białek (15--25% białek) jedynie w komórkach mutanta Δ*dnak52*. Brak takiej agregacji w komórkach pozostałych mutantów sugeruje, że inne białka opiekuńcze odgrywają mniej istotną rolę w ochronie termolabilnych białek komórkowych *E. coli* przed agregacją. Ponadto wykazano, że nadprodukcja GroES/GroEL, ClpB czy IbpA/B powodowała tylko częściowe zahamowanie agregacji białek w mutancie Δ*dnaK52*, co wskazywać może na kluczową funkcję systemu DnaK/DnaJ/GrpE w ochronie białek przed agregacją, której inne białka opiekuńcze nie są w stanie zastąpić. Z analizy bia-

http://rcin.org.pl

łek agregujących w komórkach mutanta *Δdnak52* metodą spektroskopii masowej wynikało, że większość z nich, aż 80%, to białka duże (>90kDa) i tylko 18% stanowią białka małe o masach <30 kDa. Wcześniej wykazano, że małe białka o masie 20-60 kDa są substratami systemu GroES/GroEL [28,29]. Z przytoczonych doświadczeń [27] wynika, że w warunkach stresogennych agregują głównie duże białka, a więc takie, których fałdowanie wymaga udziału systemu DnaK/DnaJ/GrpE.

Wkład głównych systemów białek opiekuńczych DnaK/DnaJ/GrpE i GroES/GroEL w zapobieganie agregacji białek komórkowych był badany także przez nas [23]. Z naszych doświadczeń wynika, że nie tylko system DnaK/DnaJ/GrpE skutecznie zapobiega wewnątrzkomórkowej agregacji białek, ale również system GroES/GroEL ma w tym procesie znaczny udział. Stwierdziliśmy, że mutacje punktowe *groES619*, *groEL44* podobnie jak mutacje *dnak757*, *dnaJ259* stabilizują frakcję zagregowanych białek, zaś nadprodukcja GroES/GroEL zapobiega tworzeniu się agregatów białkowych w komórkach *E. coli* w trakcie szoku termicznego, podobnie jak nadprodukcja DnaK/DnaJ. Nadprodukcja DnaK/DnaJ i GroES/GroEL zapobiegała również agregacji białek komórkowych w komórkach mutanta *rpoH*, defektywnego pod względem syntezy głównych białek opiekuńczych [30]. Zatem wyniki naszych doświadczeń zgodne są z wynikami Gragerov'a i wsp. [30].

Wyniki doświadczeń *in vitro* z użyciem różnych modelowych substratów (polimerazy RNA, aldolazy FBP) również potwierdzają udział głównych systemów opiekuńczych w ochronie białek przed ich nieodwracalną agregacją. Białka DnaK/DnaJ/GrpE i GroES/GroEL zapobiegały inaktywacji i agregacji polimerazy RNA [17]. Aldolazę FBP skutecznie chroniły przed inaktywacją i agregacją białka DnaK/DnaJ [31].

Funkcja małych białek szoku termicznego IbpA/B w zapobieganiu nieodwracalnej agregacji białek komórkowych znana jest przede wszystkim z doświadczeń *in vitro*. Wynika z nich, że oligomery IbpB efektywnie wiążą się do nienatywnych białek (niezależnie od ATP) i, tworząc z nimi stabilne kompleksy, zapobiegają ich agregacji [32-34]. Refałdowanie kompleksu substrat-sHsps jest już zależne od systemu DnaK/DnaJ/GrpE, bowiem sHsps nie wykazują aktywności refałdujących [35-37]. Białka GroES/GroEL bezpośrednio nie oddziałują z substratami białkowymi IbpB, ale mogą one usprawniać ich refałdowanie, wpływając na działanie systemu DnaK/DnaJ/GrpE [36]. Wyniki tych doświadczeń sugerują, że sHsps w czasie stresu stabilizują intermediaty fałdowania szczególnie wrażliwe na agregację, stanowiąc integralną część systemu multichaperonowego, który skupia różne klasy Hsps, współpracujące ze sobą w procesie refałdowania białek zdenaturowanych w warunkach stresowych. Wyniki najnowszych doświadczeń *in vitro* [38,39] wskazują na to, że zdenaturowane białka z kompleksów z sHsps nie są uwalniane spontanicznie, lecz prawdopodobnie w wyniku aktywnej zależnej od ATP ekstrakcji z udziałem systemu DnaK/DnaJ/GrpE lub ClpB/DnaK/DnaJ/GrpE. Zdaniem autorów wielkość agregatów związanych z sHsps ma decydować o tym, czy ich fałdowanie będzie zależne od systemu DnaK/DnaJ/GrpE, czy też będzie wymagało zaangażowania jeszcze dodatkowego białka opiekuńczego, ClpB. *In vivo*, funkcja sHsps ujawnia się dopiero w warunkach przedłużonego szoku termicznego (50°C, 4 godziny). Tylko w takich warunkach delecja operonu *ibpAB* w komórkach *E. coli* powodowała dwukrotny wzrost agregacji białek, inaktywację modelowego enzymu, aldolazy FBP, obniżenie efektywności usuwania agregatów białkowych oraz miała niekorzystny wpływ na przeżywalność bakterii [40]. Stąd wniosek, że IbpA/B są niezbędne do przeżycia komórce bakteryjnej w ekstremalnych warunkach stresowych. IbpA/B wchodzą również w skład ciał inkluzyjnych, które tworzą się w komórkach *E. coli* nadprodukujących białka heterologiczne [41].

Najmniej poznana jest rola HtpG (Hsp90) w ochronie białek komórkowych *E. coli*. *In vitro*, HtpG zapobiegało agregacji syntazy cytrynianowej [42]. Później stwierdzono, że delecja genu *htpG* powoduje spadek aktywności modelowego enzymu, preS2-β-galaktozydazy i wzrost jego agregacji. Stąd wniosek, że obecność HtpG niezbędna jest do optymalnego fałdowania niektórych białek cytoplazmatycznych *E. coli* w warunkach stresowych [43].

DEGRADACJA TRWALE USZKODZONYCH BIAŁEK

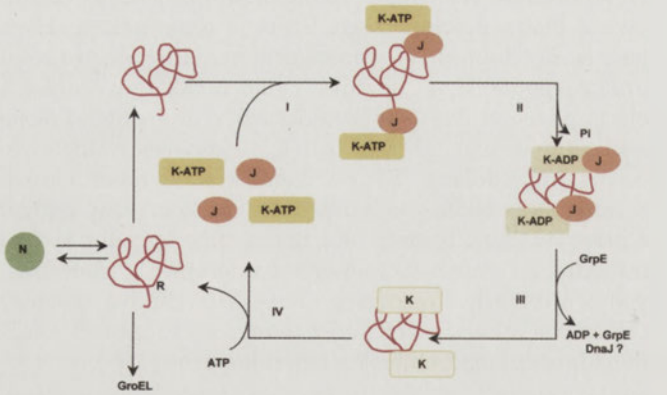
Proteoliza to kolejny z mechanizmów ochrony komórki przed agregacją białek. Rola proteaz szoku termicznego w usuwaniu agregatów białkowych z komórek *E. coli* została szczegółowo opisana w pracy przeglądowej Laskowskiej i wsp. [18].

W usuwaniu trwale uszkodzonych białek po szoku termicznym udział biorą przede wszystkim cytoplazmatyczne proteazy zależne od ATP: Lon, ClpAP, ClpXP, ClpQY. Komórki *E. coli* pozbawione tych proteaz nie rosną w temperaturze 45°C [44]. Badania z wykorzystaniem szczepów *E. coli* z regulowanym poziomem ekspresji operonu *dnaK dnaJ* i przenoszących jednocześnie mutacje w genach proteaz wykazały, że ClpXP i Lon stają się niezbędne do wzrostu i przeżycia bakterii w niższej temperaturze (42°C), gdy ilość białek DnaK, DnaJ zostaje w komórce zredukowana. Wynik ten wskazuje na synergiczne działanie proteaz i systemu DnaK/DnaJ/GrpE w zapobieganiu agregacji białek [45]. Mechanizm promowania wewnątrzkomórkowej proteolizy z udziałem białek opiekuńczych jest nieznany. Przypuszcza się, że udział białek opiekuńczych w proteolizie polega na stabilizacji populacji rozpuszczalnych, nieprawidłowo sfałdowanych polipeptydów, poprzez wiązanie się do ich nienatywnych struktur. O dalszym losie nieprawidłowego białka ma decydować kilka czynników, między innymi powinowactwo nienatywnych białek do proteaz i białek opiekuńczych oraz stosunek tempa degradacji, agregacji i refałdowania [46].

RENATURACJA ZDENATUROWANYCH BIAŁEK - PROCESY DEZAGREGACJI I REAKTYWACJI

Reaktywacja zagregowanych białek wiąże się z ich solubilizacją (dezagregacją). Główne systemy białek opiekuńczych *E. coli* DnaK/DnaJ/GrpE i GroEL/GroES zdolne są raczej do dezagregacji małych agregatów termicznie zdenaturowanych białek [3,16,17,27,31,47]. Systemy te w procesie fałdowania białek mogą działać samodzielnie lub współ-

http://rcin.org.pl



Rysunek 3. Model działania systemu DnaK/DnaJ/GrpE w procesie fałdowania polipeptydów [10]. (I) W pierwszej kolejności do rozwiniętego polipeptydu przyłącza się DnaJ, które następnie przekazuje substrat białku DnaK związanemu z ATP. (II) DnaJ i polipeptyd stymulują aktywność ATPazową DnaK. Powstaje stabilny kompleks polipeptyd-DnaK-DnaJ. (III) Przyłączenie GrpE do DnaK prowadzi do uwolnienia ADP i destabilizacji tego kompleksu. Możliwe, że na tym etapie dochodzi do odłączenia się białka DnaJ. (IV) Przyłączenie kolejnej cząsteczki ATP (nie hydroliza) do DnaK uwalnia polipeptyd. Jeżeli polipeptyd nie zostanie prawidłowo sfałdowany w pojedynczym cyklu działania systemu DnaK/DnaJ/GrpE, może on być ponownie wiązany przez DnaJ lub przekazany innemu systemowi białek opiekuńczych (GroES/GroEL). N- białko natywne, R- białko rozwinięte.

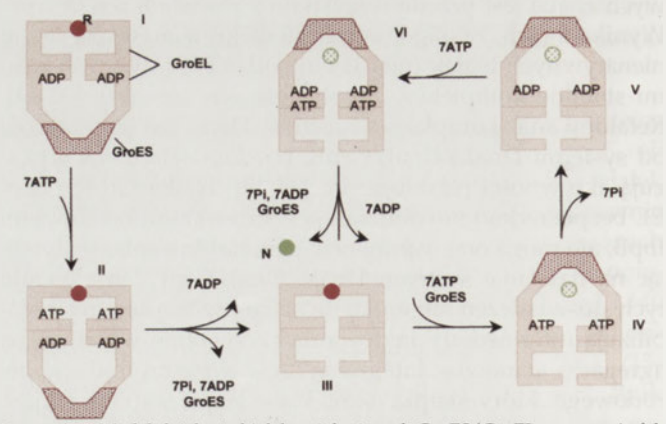
pracować ze sobą [15] (Rys. 3, 4). Przekazanie substratów (intermediatów fałdowania) z systemu DnaK na system GroES/GroEL może odbywać się za pośrednictwem GrpE [18].

Zdolność przerabiania dużych agregatów, pozyskiwania z nich aktywnych biologicznie białek przypisuje się przede wszystkim białku ClpB (homolog drożdżowego Hsp104) i jego współpracy z systemem DnaK/DnaJ/GrpE [27,48--50]. Stwierdzono, że przynajmniej 75% termicznie zagregowanych białek w ekstraktach *E. coli* jest reaktywowana w wyniku współpracy ClpB z systemem DnaK/DnaJ/GrpE [27]. Z tego wniosek, że dezagregacyjną aktywność systemu ClpB/DnaK/DnaJ/GrpE charakteryzuje szeroka specyficzność substratowa. Białko ClpB w kombinacji z systemem DnaK skutecznie reaktywowało także modelowe substraty denaturowane termicznie, np.: dehydrogenazę maleinową, dehydrogenazę glukozo-6-fosforanu oraz lucyferazę denaturowaną chemicznie [27,48,51].

Po raz pierwszy ATP-zależna dezagregacja zdenaturowanych białek (termicznie denaturowanej lucyferazy) została odkryta w cytozolu drożdży i przypisana Hsp104 [52]. W kilka lat później stwierdzono, że Hsp104 współpracuje z Hsp70/Hsp40 w procesie reaktywacji zagregowanych białek i współpraca ta jest specyficzna, nie zachodzi między Hsp104 z drożdży a DnaK z *E. coli* [53].

Wyniki doświadczeń *in vivo*, w których badano wpływ koprodukcji ClpB i DnaK/DnaJ/GrpE na powstawanie i zanikanie frakcji zagregowanych białek w komórkach mutanta Δ*clpB* sugerują, że zachowany powinien być odpowiedni stosunek ilościowy między białkami systemu ClpB/DnaK/DnaJ/GrpE, aby współpracowały ze sobą w procesie dezagregacji i reaktywacji przejściowo nieaktywnych białek komórkowych [54]. Przy niedostatecznej ilości białek systemu DnaK/DnaJ/GrpE nadmiar ClpB może sprzyjać agregacji białek *E. coli*, stabilizować w pewnych warunkach agregaty białkowe i wywoływać efekt zwany agregacją pozornie podtrzymywaną [54].

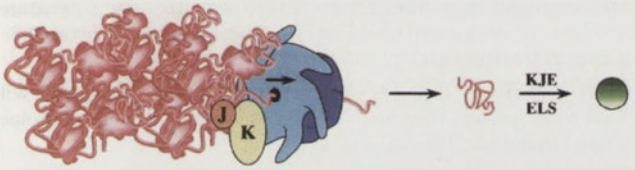
Sposób oddziaływania ClpB ze zagregowanymi substratami, podobnie jak mechanizm współpracy ClpB z systemem DnaK, pozostaje niewyjaśniony. Istnieją co najmniej cztery modele, niektóre przeciwstawne, opisujące ten mechanizm. Pierwszy i najstarszy model zakłada, że ClpB oddziałuje z agregatami białkowymi w pierwszej kolejności i wymusza w ich strukturze pewne zmiany, dzięki którym mogą być rozpoznawane i przejmowane przez DnaK/DnaJ/GrpE do dalszej „obróbki". Model ten opiera się na wynikach badań, które wskazują, że wydajność dezagregacji białek z udziałem systemu DnaK obniża się wraz ze wzrostem wielkości agregatów [47,48]. Kolejny model powstał w oparciu o strukturę krystaliczną białka ClpB pochodzącego z *Thermus thermophilus* [55]. Według tego modelu ClpB/Hsp104 działa jak molekularny łamacz, który kruszy duże agregaty białkowe na mniejsze fragmenty i udostępnia je systemowi DnaK/DnaJ/GrpE. Przypuszcza się, że aktywność „łamacza" nadaje białku ClpB jego środkowa domena (MD), znajdująca się na zewnątrz białka i będąca ruchliwym elementem o charakterystycznej strukturze (ang. *coiled coil*). Stwierdzono bowiem, że od położenia i ruchu MD zależy aktywność chaperonowa ClpB i w związku z tym proces dezagregacji białek [55]. Usunięcie nawet niewielkiego fragmentu MD jest fatalne w skutkach dla ClpB, białko nie osiąga pełnej oligomeryzacji i traci swoje funkcje opiekuńcze [56]. Model alternatywny zakłada, że fragmentacja dużych agregatów białkowych następuje w wyniku deoligomeryzacji ClpB/Hsp104 [49]. Według tego modelu heksamery ClpB/Hsp104 w obecności ATP wiążą się do agregatów białkowych, hydroliza ATP powoduje dysocjację ClpB, której towarzyszy rozbicie agregatów białkowych na mniejsze fragmenty. Na doświadczeniach z wariantem ClpB zasocjowanym z proteazą ClpP jest oparty kolejny i jak na razie ostatni model dezagregacji białek z udziałem systemu ClpB/DnaK/DnaJ/GrpE [57]. Według tego modelu do



Rysunek 4. Model działania białek opiekuńczych GroES/GroEL w procesie fałdowania polipeptydów [10]. (I) Asymetryczny kompleks GroES-GroEL-ADP wiąże substrat białkowy w wolnym pierścieniu GroEL. (II, III) Wiązanie i hydroliza ATP w tym pierścieniu powoduje uwolnienie ADP i GroES z drugiego pierścienia. (IV-V) GroES i ATP ponownie wiążą się z domeną GroEL zawierającą substrat, co prowadzi do jego zamknięcia. Hydroliza ATP w pierścieniu GroEL związanym z GroES „utrwala" oddziaływania między GroEL i GroES. (VI) Przyłączenie i hydroliza ATP w sąsiednim pierścieniu prowadzą do otwarcia kompleksu GroEL-GroES i uwolnienia sfałdowanego polipeptydu. Polipeptydy, które nie uzyskały natywnej konformacji ulegają kolejnym cyklom przyłączania i uwalniana aż do uzyskania prawidłowej konformacji. N- białko natywne, R- białko rozwinięte.

http://rcin.org.pl

dezagregacji białek mogłoby dochodzić w wyniku translokacji pojedynczych polipeptydów, wyekstrahowanych z agregatów, przez kanał ClpB (mechanizm translokacyjny) [55,57] (Rys. 5). W takim przypadku aktywność translokacyjna białka ClpB przypominałaby aktywność ATPaz Clp zasocjowanych z podjednostką proteolityczną. Rola systemu DnaK/DnaJ/GrpE współpracującego z ClpB w procesie dezagregacji białek jest różna w zależności od modelu. Mniejsze agregaty białkowe wyprodukowane przez ClpB w wyniku kruszenia czy deoligomeryzacji mogą być przejmowane do dalszego refałdowania przez białko DnaK, które wykazuje aktywność dezagregazy w stosunku do małych agregatów białkowych. Substratami DnaK mogą być także agregaty białkowe, w których ClpB wprowadza zmiany konformacje bez rozbijania ich na mniejsze fragmenty. W przypadku mechanizmu translokacyjnego, DnaK byłoby niezbędne do efektywnego przeciągania substratów przez kanał ClpB, tj. do zapoczątkowania procesu rozwijania polipeptydów, wyekstrahowania ich z dużych agregatów. Zatem, w zależności od modelu, ClpB i system DnaK mogą działać jednocześnie lub w określonej kolejności. Według ostatniego modelu [57] wyekstrahowane polipeptydy po przejściu przez kanał ClpB stają się substratami systemów DnaK/DnaJ/GrpE oraz GroES/GroEL, które pośredniczą w ich poprawnym zwijaniu (Rys. 5).



Rysunek 5. Model dezagregacji białek z udziałem ClpB i systemu DnaK/DnaJ/GrpE- mechanizm translokacyjny. Dezagregacja białek polegająca na ekstrakcji z agregatów pojedynczych, rozwiniętych polipeptydów zachodzi dzięki aktywności translokacyjnej ClpB. System DnaK/DnaJ/GrpE inicjuje ten proces i w ten sposób wspiera działanie ClpB. Polipeptydy po przejściu przez kanał ClpB są uwalniane i zwijane w natywną konformację przy pomocy systemów DnaK/DnaJ/GrpE i GroES/GroEL.
Rysunek przedrukowano z: Weibezahn J, Tessarz P, Schlieker C, Zahn R, Maglica Z, Lee S, Zentgraf H, Weber-Ban EU, Dougan DA, Tsai FT, Mogk A, Bukau B (2004) Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. Cell 119: 653-665, za zgodą autorów i wydawnictwa Elsevier.

Mechanizm resolubilizacji agregatów białkowych przy udziale ClpB/DnaK/DnaJ/GrpE może obejmować tworzenie dużego kompleksu chaperonowego. Niedawno stwierdzono, że taki kompleks tworzą białka ClpB i DnaK pochodzące z *Thermus thermophilus* [49]. Oddziaływania te są słabe, zachodzą przy niskim powinowactwie białek (K_D=17μM), są jednak specyficzne, bowiem występują tylko pomiędzy homologicznymi parami chaperonów, $ClpB_{Tth}$ nie tworzyło kompleksu z $DnaK_{E.coli}$.

Z ostatnich doniesień literaturowych wynika, ze dezagregację białek *in vivo* z udziałem ClpB/DnaK/DnaJ/GrpE może ułatwiać obecność sHsps w agregatach. Dzięki IbpA/B nierozpuszczalne agregaty białkowe są szybciej przerabiane przez ClpB/DnaK/DnaJ/GrpE. IbpA/B wraz z ClpB i systemem DnaK/DnaJ/GrpE tworzą tzw. triadę funkcjonalną [38,39].

PODSUMOWANIE

Z przedstawionych danych literaturowych wynika, że refałdowanie białek komórkowych *E. coli* znajduje się pod kontrolą systemu multichaperonowego, który skupia Hsps należące do różnych rodzin białek współpracujących ze sobą. O ile funkcja poszczególnych Hsps w procesach ochrony białek komórkowych przed agregacją i reaktywacji zagregowanych białek została określona, to mechanizm współpracy między poszczególnymi Hsps pozostaje niewyjaśniony. Dalsze badania biochemiczne i strukturalne są potrzebne, aby w pełni zrozumieć mechanizm dezagregacji białek z udziałem niedawno odkrytego systemu białek opiekuńczych ClpB/DnaK/DnaJ/GrpE. Na razie istnieją tylko modele opisujące ten proces, niektóre z nich są modelami przeciwstawnymi. Kolejność działania ClpB i systemu DnaK/DnaJ/GrpE w dezagregacji dużych agregatów białkowych wymaga szczególnej weryfikacji. Do niedawna uważano, że ClpB poprzedza działanie DnaK/DnaJ/GrpE [47,48]. Ostatnie doświadczenia Ziętkiewicza i wsp. [50] oraz Weibezahn i wsp. [57] sugerują, że system DnaK/DnaJ/GrpE w reakcji ATP-zależnej jako pierwszy rozpoznaje zagregowane substraty. Nie wiadomo jednak, czy DnaK i DnaJ samodzielnie wprowadzają zmiany w agregatach białkowych, czy tez w obecności ClpB.

Odkrycie nowej funkcji opiekuńczej, jaką jest aktywność dezagregacyjna ClpB/Hsp104, otwiera nowe możliwości terapeutyczne, strategie w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Stwierdzono bowiem, że w skład nierozpuszczalnych agregatów (ang. *neuronal inclusions*), które pojawiają się w neuronach i towarzyszą chorobom neurodegeneracyjnym, wchodzą oprócz Hsp70 i Hsp40 także takie białka jak: VCP/p97, torsyna A czy kompleks proteasomalny 19S. Wymienione białka są zaliczane do ATPaz z rodziny AAA (ang. *ATPase associated with a variety of cellular activities*), podobnie jak ClpB/Hsp104 [58]. Dalsze badania *in vitro* i *in vivo* są niezbędne, aby przekonać się, czy ATPazy AAA ssaków pełnią podobną funkcję jak ClpB/Hsp104.

PIŚMIENNICTWO

1. Kucharczyk K, Laskowska E, Taylor A (1991) Response of *Escherichia coli* cell membranes to induction of *λcI857* prophage by heat shock. Mol Microbiol 5: 2935-2945
2. Gragerov AI, Martin ES, Krupenko MA, Kashlev MV, Nikiforov VG (1991) Protein aggregation and inclusion body formation in *Escherichia coli rpoH* mutant defective in heat-shock protein induction. FEBS Lett 291: 222-224
3. Schröder H, Langer T, Hartl FU, Bukau B (1993) DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. EMBO J 12: 4137-4144
4. Lindquist S, Craig EA (1988) The heat-shock proteins. Annu Rev Genet 22: 631-677
5. Gross CA, Straus DB, Erickson JW Yura T (1990) The function and regulation of heat shock proteins in *Escherichia coli*. W: Morimoto R, Tissiers A, Georgopoulos C (red) Stress Proteins in Biology and Medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, str.166-190
6. Georgopoulos C, Ang D, Liberek K, Zylicz M (1990) Properties of the *Escherichia coli* heat shock proteins and their role in bacteriophage λ growth. W: Morimoto R, Tissiers A, Georgopoulos C (red) Stress Proteins in Biology and Medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, str. 190-221

http://rcin.org.pl

7. Morimoto RI, Tissiers A, Georgopoulos C (1994) Progress and perspectives on the biology of heat shock proteins and molecular chaperones. W: Morimoto RI, Tissieres A, and Georgopoulos C (red) The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, str. 1-30
8. Ang, D, Liberek K, Skowyra D, Zylicz M, Georgopoulos C (1991) Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. J Biol Chem 266: 24233-24236
9. Frydman J, Hartl U (1994) Molecular chaperone functions of hsp70 and hsp60 in protein folding. W: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (red) The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, str. 251-283
10. Hartl U (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature (Lond) 381: 571-580
11. Teter SA, Houry WA, Ang D, Tradler T, Rockabrand D, Fischer G, Blum P, Georgopoulos C, Hartl FU (1999) Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. Cell 97: 755-765
12. Bukau B, Deuerling E, Pfund C, Craig EA (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. Cell 101: 119-122
13. Hendrick JP, Hartl FU (1993) Molecular chaperone functions of heat shock proteins. Annu Rev Biochem 62: 349-384
14. Georgopoulos C, Liberek K, Żylicz M, Ang D (1994) Properties of the heat shock proteins of Escherichia coli and the autoregulation of the heat ahock response. W: Morimoto RI, Tissiers A, Georgopoulos C (red) The Biology of Heat Shock Protein and Molecular Chaperones, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, str. 209-250
15. Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK, Hartl FU (1992) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. Nature (Lond) 356: 683-689
16. Skowyra D, Georgopoulos C, Żylicz M (1990) The E. coli *dnaK* gene product, the hsp70 homolog, reactivates heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. Cell 62: 939-944
17. Ziemienowicz A, Skowyra D, Zeilstra_Ryalls J, Fayet O, Georgopoulos C, Żylicz M (1993) Both the *Escherichia coli* chaperones systems, GroEL/GroES and DnaK/DnaJ/GrpE, can reactivate heat-treated RNA polymerase. J Biol Chem 268: 25425-25431
18. Laskowska E, Taylor A (1996) Rola proteaz szoku termicznego w usuwaniu zdenaturowanych białek z komórek *E. coli*. Post Biochem 44: 334-344
19. Laskowska E, Kuczyńska-Wiśnik D, Skórko-Glonek J, Taylor A (1996) Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated *in vivo* by heat shock; HtrA protease action *in vivo* and *in vitro*. Mol Microbiol 22: 555-571
20. Carrio MM, Villaverde A (2003) Role of molecular chaperones in inclusion body formation. FEBS Lett 537: 215-221
21. Thomas JG, Ayling A, Baneyx F (1997) Molecular chaperones, folding catalysts and the recovery of biologically active recombinant proteins from *E. coli*: to fold or to refold. Appl Biochem Biotechnol 66: 197-238
22. Schlieker C, Bukau B, Mogk A (2002) Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. J Biotech 96: 13-21
23. Kędzierska S, Staniszewska M, Węgrzyn A, Taylor A (1999) The role of DnaK/DnaJ and GroEL/GroES systems in the removal of endogenous proteins aggregated by heat-shock from E*scherichia coli* cells. FEBS Lett 446: 331-337
24. Laskowska E, Wawrzynów A, Taylor A (1996) IbpA and IbpB, the new heat-shock proteins, bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracellularly by heat shock. Biochimie 78: 117-122
25. Kucharczyk K (1991) Zmiany zachodzące w błonach *Escherichia coli* (λcI857) i *Escherichia coli* pod wpływem szoku termicznego. Praca doktorska, Uniwersytet Gdańsk
26. Bukau B, Horwich AL (1998) The hsp70 and hsp60 chaperone machines. Cell 92: 351-366
27. Mogk A, Tomoyasu T, Goloubinoff P, Rűdiger, Röder, Langen H, Bukau B (1999) Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. EMBO J 18: 6934-6949
28. Houry WA, Frishman D, Eckerskorn C, Lottspeich F, Hartl FU (1999) Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. Nature 402: 147-154
29. Ewalt KL, Hendrick JP, Houry WA, Hartl FU (1997) In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. Cell 90: 491-500
30. Gragerov A, Nudler E, Komissarova N, Gaitanaris GA, Gottesman ME, Nikiforov V (1992) Cooperation of GroEL/ES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing proteins misfolding in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 89: 10341-10344
31. Kędzierska S, Jezierski G, Taylor A (2001) DnaK/DnaJ chaperone system reactivates endogenous *E. coli* thermostable FBP aldolase in vivo and in vitro; the effect is enhanced by GroE heat shock proteins. Cell Stress Chaperones 6: 29-37
32. Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, Vierling (1997) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. EMBO J 16: 659-671
33. Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. J Biol Chem 268: 1517-1520
34. Horwitz J (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. Proc Natl Acad Sci USA 89: 10449-10453
35. Ehrnsperger M, Gräber S, Gaestel M, Buchner J (1997) Binding of nonnative protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. EMBO J 16: 221-229
36. Veinger L, Diamant S, Buchner J, Goloubinoff P (1998) The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. J Biol Chem 273: 11032-11037
37. Lee GJ, Vierling E (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. Plant Physiol 122: 189-198
38. Mogk A, Schlieker C, Friedrich KL, Schönfeld HJ, Vierling E, Bukau B (2003) Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. J Biol Chem 278: 31033-31042
39. Mogk A, Deuerling E, Vorderwűlbecke, Vierling E, Bukau B (2003) Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. Mol Microbiol 50: 585-595
40. Kuczyńska-Wiśnik D, Kędzierska S, Matuszewska E, Lund P, Taylor A, Lipińska B, Laskowska E (2003) The *Escherichia coli* small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured in vivo during extreme heat shock. Microbiology 148: 1757-1765
41. Allen SP, Polazzi JO, Gierse JK, Easton AM (1992) Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. J Bacteriol 174: 6938-6947
42. Jakob U, Lilie H, Meyer I, Buchner J (1995) Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock *in vivo*. J Biol Chem 270: 7288-7294
43. Thomas JG, Baneyx F (2000) ClpB and HtpG facilitate *de novo* protein folding in stressed *Escherichia coli* cells. Mol Microbiol 36: 1360-1370
44. Kanemori M, Nishihara K, Yanagi H, Yura T (1997) Synergistic roles of HslVU and other ATP-dependent proteases in controlling in vivo turnover of σ^{32} and abnormal proteins in *Escherichia coli*. J Bacteriol 179: 7219-7225
45. Tomoyasu T, Mogk A, Langen H, Goloubinoff P, Bukau B (2001) Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. Mol Microbiol 40: 397-413
46. Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. Science 286: 1888-1893

http://rcin.org.pl

47. Diamant S, Ben-Zvi AP, Bukau B, Goloubinoff P (2000) Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery. J Biol Chem 275: 21107-21113
48. Goloubinoff P, Mogk A, Ben-Zvi AP, Tomoyasu T, Bukau B (1999) Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. Proc Natl Acad Sci USA 96: 13732-13737
49. Schlee S, Beinker P, Akhrymuk A, Reinstein J (2004) A chaperone network for the resolubilization of protein aggregates: direct interaction of ClpB and DnaK. J Mol Biol 336: 275-285
50. Ziętkiewicz S, Krzewska J, Liberek K (2004) Successive and synergistic action of the Hsp70 and hsp100 chaperones in protein disaggregation. J Biol Chem 279:
51. Zolkiewski M (1999) ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. J Biol Chem 274: 28083-28086
52. Parsel DA, Kowal AS, Singer MA, Lindquist S (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein hsp104. Nature 372: 475-477
53. Glover JR, Lindquist S (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. Cell 94: 73-82
54. Kędzierska S, Akoev V, Barnett ME, Zolkiewski M (2003) Structure and function of the middle domain of ClpB from *Escherichia coli*. Biochemistry 42: 14242-14248
55. Lee S, Sowa ME, Watanabe Y, Sigler PB, Chiu W, Yoshida M, Tsai FT (2003) The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. Cell 115: 229-240
56. Kędzierska S, Matuszewska E (2001) The effect of DnaK/DnaJ/GrpE and ClpB proteins on the removal of heat-aggregated proteins from *Escherichia coli* Δ*clpB* mutant cells – new insight into the role of Hsp70 in a functional cooperation with Hsp100. FEMS Microbiol Lett 204: 355-360
57. Weibezahn J, Tessarz P, Schlieker C, Zahn R, Maglica Z, Lee S, Zentgraf H, Weber-Ban EU, Dougan DA, Tsai FT, Mogk A, Bukau B (2004) Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. Cell 119: 653-665
58. Weibezahn J, Bukau B, Mogk A (2004) Unscrambling an egg: protein disaggregation by AAA$^+$ proteins. Microbial Cell Factories 3: 1-12
59. Squires CL, Pedersen S, Ross BM, Squires C (1991) ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. J Bacteriol 173: 4254-4262
60. Akoev V, Gogol E, Barnett ME, Zolkiewski M (2004) Nucleotide-induced switch in oligomerization of the AAA$^+$ ATPase ClpB. Protein Sci 13: 567-574
61. Bardwell JCA, Craig EA (1988) Ancient heat shock protein is dispensible. J Bacteriol 170: 2977-2983
62. Harris SF, Shiau AK, Agard DA (2004) The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the *Escherichia coli* Hsp90, reveals a potential substrate binding site. Structure 12: 1087-1097
63. Fayet O, Ziegelhoffer T, Georgopoulos C (1989) The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. J Bacteriol 171: 1379-1385
64. Horwich AL, Low KB, Fenton WA, Hirshfield IN, Furtak K (1993) Folding *in vivo* of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL. Cell 74: 909-917
65. Xu Z, Horwich AL, Sigler PB (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)$_7$ chaperonin complex. Nature 388: 741--750
66. Jacob U, Buchner J (1994) Assisting spontaneity – the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. Trends Biochem Sci 19: 205-211.

A role of *Escherichia coli* molecular chaperones in protection of bacterial cell against irreversible aggregation induced by heat shock

Sabina Kędzierska

Department of Biochemistry, University of Gdańsk, 24 Kladki st., 80-822 Gdansk, Poland
e-mail: kedzie@biotech.univ.gda.pl

Key words: protein aggregation, disaggregation, molecular chaperones, proteases

ABSTRACT

All living organisms respond to environmental stresses, such as heat or ethanol by increasing the synthesis of a specific group of proteins termed heat shock proteins (Hsps) or stress proteins. Major Hsps are molecular chaperones and proteases. Molecular chaperones facilitate the proper folding of polypeptides, protect other proteins from inactivation, and reactivate aggregated proteins. Heat shock proteases eliminate proteins irreversibly damaged by stress. This review describes the role of heat shock proteins of the model bacterial cell, *E. coli* in the protection of other proteins against aggregation and in the mechanism of removal of protein aggregates from the cell. This mechanism remains unclear and it is believed to involve substrate renaturation and proteolysis by molecular chaperones and heat shock proteases. Recently, many studies have been focused on the disaggregation and reactivation of proteins by a bi-chaperone system consisting of DnaK/DnaJ/GrpE and ClpB, an ATPase from the AAA superfamily of proteins.

http://rcin.org.pl

Acetylocholinoesteraza – rola w apoptozie komórek nerwowych, chorobach neurologicznych i białaczce

Bożena Bukowska

Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: bukow@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 16 grudnia 2004
Artykuł zaakceptowano 13 stycznia 2005

Słowa kluczowe: esteraza acetylocholinowa, apoptoza, choroba Alzheimera, *Myasthenia gravis*, Aβ-amyloid, białaczka

Wykaz stosowanych skrótów: AChE – (ang. *acetylcholinesterase*) esteraza acetylocholinowa; APP (ang. β *amyloid precursor protein*) białkowy prekursor Aβ-amyloidu; BFU-E – komórka będąca prekursorem erytrocytów; CFU-E komórka będąca w dalszym etapie rozwoju BFU-E z ekspresją receptora erytropoetyny; CFU-S – komórka macierzysta szpiku; EN101 – oligonukleotyd wywołujący selektywny rozkład mRNA formy R acetylocholinoesterazy; L-VGCC – typ kanału wapniowego zależnego od potencjału błonowego; nAChR – receptor acetylocholiny; NMDA – (ang. *N-methyl-D-aspartate receptors*) receptor glutaminianu

STRESZCZENIE

Acetylocholinoesteraza jest enzymem pełniącym kluczową rolę w przewodzeniu impulsów nerwowych. Z jej funkcjonowaniem wiążą się także procesy destrukcyjne, doprowadzające nawet do śmierci komórek. Stwierdzono, że peptyd pochodzący z acetylocholinoesterazy może wywoływać śmierć neuronów a sama acetycholinoesteraza może przyczyniać się do zmian neurologicznych w chorobie Alzheimera. Stwierdzono, że kompleks acetylocholinoesterazy z Aβ-amyloidem jest znacznie bardziej toksyczny niż sam amyloid i powoduje większe zmiany neurologiczne. Ponadto udowodniono, że oczyszczona acetylocholinoesteraza podwyższa ekspresję prekursora białkowego (β-APP) w komórkach glejowych i zwiększa tworzenie agregatów amyloidu poprzez przyspieszenie przechodzenia peptydu Aβ we włókna Aβ. Acetylocholinoesteraza odgrywa także istotną rolę w powstawaniu i przebiegu chorób hematologicznych. Związki fosforoorganiczne hamują ekspresję prekursora acetylocholinoesterazy, co wiąże się ze spadkiem stężenia hemoglobiny, liczby erytrocytów i hematokrytu, prowadzi do anemii wraz ze zmianą prekursora hematopoetycznego. Artykuł jest próbą wyjaśnienia roli acetylocholinoesterazy w apoptozie komórek nerwowych, w chorobie Alzheimera i *Miastenia gravis* oraz w białaczce.

WPROWADZENIE

Acetylocholinoesteraza (E.C 3.1.1.7; AChE), (esteraza acetylocholinowa lub hydrolaza acetylocholiny) jest głównym białkiem synaps cholinergicznych mózgu oraz połączeń nerwowo-mięśniowych. Występuje w większości tkanek zwierzęcych: w błonie erytrocytów, mózgu i rdzeniu kręgowym, płytkach motorycznych mięśni szkieletowych, mięśni gładkich drzewa oskrzelowego i pęcherza [1]. Główną funkcją enzymu jest regulowanie przewodzenia impulsów nerwowych poprzez szybką hydrolizę neurotransmitera – acetylocholiny. Zahamowanie aktywności acetylocholinoesterazy prowadzi do nagromadzenia dużych ilości acetylocholiny i nadpobudzenia układu cholinergicznego. Znaczne podwyższenie stężenia acetylocholiny pobudza proliferację komórek miofibroblastycznych i ekspresję genów kolagenu, podwyższa aktywność polimerazy DNA i RNA a przez to wpływa na syntezę kwasów nukleinowych, wzmaga fosforylację białek zależną od cyklicznych nukleotydów (cykliczną, nukleotydo-zależną fosforylację białek), jak również aktywuje hematopoezę mieloidową określonego onkogenu [2, 3].

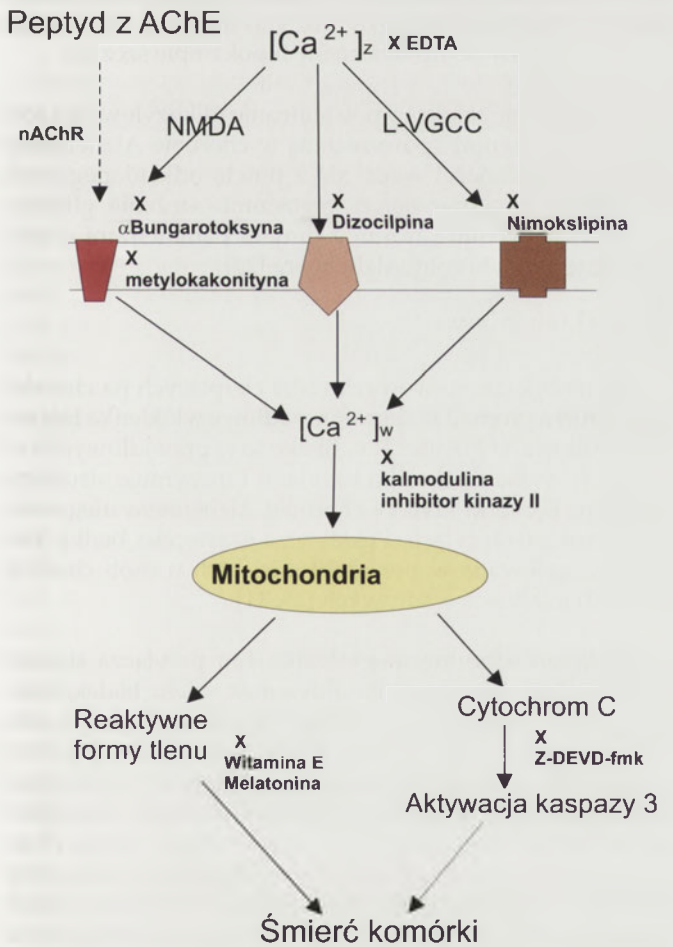
PEPTYD POCHODZĄCY Z AChE INDUKUJE APOPTOZĘ KOMÓREK NERWOWYCH

Apoptoza jest wieloetapowym procesem obejmującym szereg zmian morfologicznych i biochemicznych w komórce, ostatecznie prowadzącym do jej śmierci. Cechami charakterystycznymi dla apoptozy są: obkurczanie cytoplazmy, kondensacja i degradacja chromatyny, ekspozycja fosfatydyloseryny na powierzchni błony komórkowej a w końcowym efekcie podział na małe, otoczone błoną ciałka apoptotyczne [4]. Podczas rozwoju i dojrzewania układu nerwowego ssaków apoptozie ulega ok. 50% neuronów wyjściowej populacji. Uruchomienie procesu apoptozy może być związane nie tylko z prawidłowym przebiegiem procesów dojrzewania i różnicowania. Może być też spowodowane przez czynniki uszkadzające komórkę oraz braki możliwości naprawienia powstałych uszkodzeń.

W ostatnim czasie bada się udział acetylocholinoesterazy w procesie apoptozy komórek nerwowych. W mózgu szczura zidentyfikowano peptyd powstający w czasie syntezy acetylocholinoesterazy [5,6], wywołujący apoptozę neuronów hipokampa. Day i Greenfield [6] badali, stosując specyficzne inhibitory, serię zmian biochemicznych, wywoływanych przez peptyd-AChE o stężeniu 1 nmol/l. Autorzy ci obserwowali: aktywację receptora glutaminergicznego NMDA (N-Methyl-D-Aspartate Receptor), otwarcie kanałów wapniowych ty-

http://rcin.org.pl

pu-L bramkowanych potencjałem błonowym, aktywację kinazy II zależnej od wapnia i kalmoduliny, powstawanie wolnych rodników i aktywację kaspaz. Ponadto Day i Greenfield [6] stwierdzili, że peptyd-AChE o stężeniu 1 nmol/l nie powodował uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (marker cytosolowy, którego uwalnianie świadczy o uszkodzeniu błony plazmatycznej), ale efekt ten występował dopiero przy stężeniu peptydu-AChE 1 mmol/l. Na podstawie obserwowanych zmian w badanych parametrach biochemicznych, zaproponowano mechanizm wywoływania apoptozy przez nanomolowe stężenia peptydu z AChE (Rys.1). Aktywacja nikotynowego receptora acetylocholiny α7 nAChR wywołuje depolaryzację błony i prowadzi do aktywacji receptora glutaminianu. Intensywna aktywacja receptora glutaminianu wywołuje masowy napływ wapnia i niefizjologiczne podwyższenie wewnątrzkomórkowego stężenia tego jonu. Nadmierny wzrost stężenia jonów wapnia w komórce obniża szybkość oksydacyjnej fosforylacji, co powoduje redukcję w wewnątrzkomórkowej puli ATP, wzrost poziomu reaktywnych form tlenu oraz sprzyja otwarciu megakanałów mitochondrialnych. W efekcie dochodzi do uwolnienia cytochromu c z przestrzeni miedzybłonowej, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji kaspazy 3 i ostatecznie do apoptotycznej śmierci komórki. Dane te sugerują, że peptyd AChE w nanomolowych stężeniach



Rysunek. 1. Schemat przedstawia potencjalną przemianę biochemiczną, indukowaną przez peptyd pochodzący z białka AChE, a prowadzącą do śmierci komórki. X –hamowanie, L-VGCC – L-typ kanału wapniowego zależnego od potencjału błonowego, $[Ca^{2+}]_z$ – zewnątrzkomórkowy wapń i $[Ca^{2+}]_w$ – wewnątrzkomórkowy wapń [6].

wykazuje patofizjologiczną aktywność, aktywując proces apoptozy, co może odgrywać istotną rolę w kształtowaniu ośrodkowego układu nerwowego oraz w neurodegeneracji. Peptyd ten pochodzi z C-końca acetylocholinoesterazy. Wykazuje on istotny stopień homologii sekwencji aminokwasowej oraz podobieństwa struktury z Aβ-amyloidem (peptydem), którego odkładanie w komórkach nerwowych wiąże się z neurodegeneracją [7].

AKTYWNOŚĆ AChE A ZMIANY NEUROLOGICZNE

ZWIĄZEK ACHE Z CHOROBĄ ALZHEIMERA

Choroba Alzheimera jest schorzeniem neurodegeneracyjnym, które charakteryzuje się obecnością blaszek amyloidowych oraz zwyrodnień włókienkowych w mózgu osób chorych. Te zmiany prowadzą ostatecznie do uszkodzenia neuronów układu cholinergicznego i zmniejszenia się stężenia acetylocholiny odpowiedzialnej za procesy uwagi i pamięci [8].

Uważa się, że główną przyczyną choroby Alzheimera jest powstawanie określonych form białek skłonnych do tworzenia patologicznych agregatów. Takimi białkami są Aβ-amyloid (peptyd), tworzący tzw. płytki starcze, oraz hiperfosforylowane białka Tau, tworzące zwyrodnienia włókienkowe, tj. splątki neurofibrylarne [9]. Do chwili obecnej nie wiadomo jednak jaka jest pierwotna przyczyna powyższych zmian.

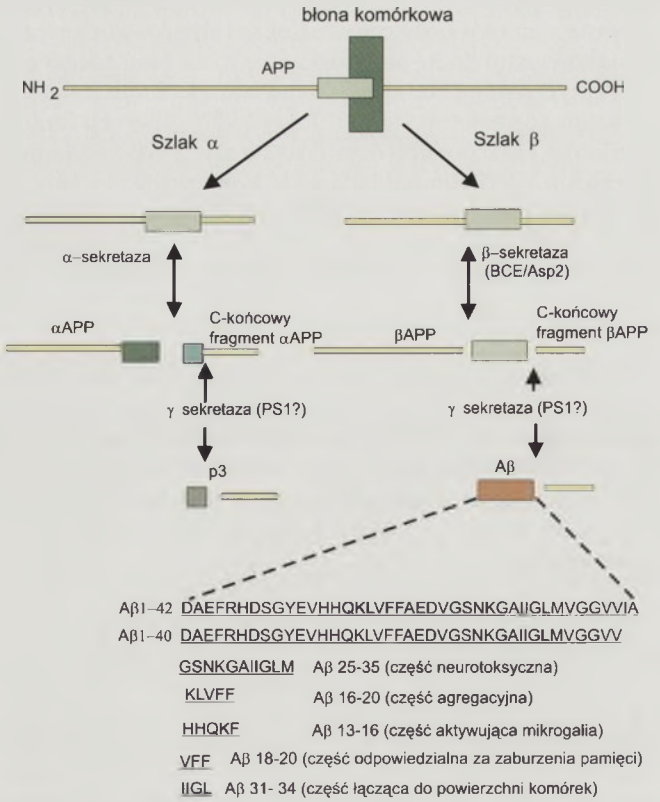
Aβ-AMYLOID

Określenie amyloid oznacza pozakomórkowe złogi białkowe barwiące się na niebiesko jak skrobia (amyloidowy = skrobiopodobny). Hipoteza kaskady amyloidowej zakłada, że odkładanie Aβ-amyloidu jest powodem zmian patologicznych obserwowanych w mózgach pacjentów z chorobą Alzheimera. Aβ-amyloid powstaje z dużego, powszechnie występującego białka prekursorowego – APP, przechodzącego przez błony komórek i organelli. Geny kodujące peptyd APP znajdują się na chromosomie 21 [10]. Białko to we wszystkich tkankach jest hydrolizowane przez dwa enzymy – α i β sekretazy, na dwóch szlakach: szlaku α i szlaku β. Szlak α jest nieamyloidotwórczy zaś szlak β amyloidotwórczy. Produktem działania α-sekretazy jest rozpuszczalne białko αAPP pozostające na zewnątrz błony oraz domena wewnętrzna. Białko αAPP pełni ochronną rolę dla komórek zaś domena wewnętrzna pełni rolę czynnika transkrypcyjnego i modyfikującego wewnątrzkomórkowy sygnał wapniowy [11].

W szlaku β białko APP jest hydrolizowane początkowo przez β-sekretazę a następnie przez γ-sekretazę (Rys. 2). Sekretaza β została zidentyfikowana w ostatnich czasach i scharakteryzowana jako (BACE/Asp2). Sugeruje się, że czynnik PS1 pełni bezpośrednią rolę w procesie hydrolizy katalizowanym przez γ-sekretazę. Ostatecznie w szlaku β otrzymujemy 2 fragmenty od C terminalnego końca o liczbie aminokwasów 40 i 42 [11].

Uważa się, że peptyd składający się z 42 aminokwasów ma największe predyspozycje do tworzenia nierozpusz-

http://rcin.org.pl



Rysunek 2. Proteoliza APP i produkcja Aβ-amyloidu [11].

czalnych złogów Aβ-amyloidu. Złogi te są neurotoksyczne, indukując procesy zapalne i uwalnianie wolnych rodników tlenowych, co prowadzi do śmierci sąsiednich neuronów.

Aβ-amyloid wpływa na dysfunkcję systemu cholinergicznego obniżając stężenie acetylocholiny. Acetylocholinoesteraza występuje w neuronach mózgu, natomiast w komórkach glejowych obecna jest butyrylocholinoesteraza, również katalizująca hydrolizę acetylocholiny. Oba enzymy występują w płytkach starczych. W wyniku ubytku neuronów cholinergicznych znacznie spada stężenie acetylocholinoesterazy, a acetylocholina jest intensywnie rozkładana przez zawartą w gleju i płytkach starczych butyrylocholinoesterazę. W miarę postępu choroby Alzheimera aktywność butyrylocholinoesterazy wzrasta a acetylocholinoesterazy maleje [12].

Istnieje szereg dowodów na to, że AChE może odgrywać istotną rolę w powstawaniu i intensywności odkładania Aβ-amyloidu w chorobie Alzheimera:

– AChE przyczynia się do powstawania złogów Aβ amyloidu poprzez przyspieszenie przechodzenia Aβ peptydu we włókna Aβ [13, 14]. Ostatnie badania prowadzone na myszach transgenicznych z podwyższoną dwukrotnie ekspresją ludzkiego białka APP i ludzkiej acetylocholinoesterazy potwierdzają te dane. AChE podwyższa odkładanie Aβ-amyloidu. Transgeniczne myszy (z podwójną ekspresją AChE i APP) wykazują obecność większej ilości i większych płytek starczych niż zwierzęta kontrolne. Ponadto wcześniej rozpoczyna się proces tworzenia płytek amyloidowych, niż u myszy transgenicznych z podwójną ekspresją tylko samego białka APP [15].

– Inhibitory cholinoesteraz podwyższają wydzielanie nieamyloidowych, rozpuszczalnych pochodnych białka APP [16]. Badania układu cholinergicznego mózgu sugerują, że obniżenie unerwienia cholinergicznego wpływa na ekspresję białka APP i tworzenie jego rozpuszczalnej formy. Ponadto zaobserwowano, że wzrost stężenia rozpuszczalnej formy peptydu pochodzącego z APP korelował z obniżeniem stężenia acetylocholinoesterazy we frontowych partiach kory i regionie CA3 hipokampa szczura. Sugeruje się, że AChE może wpływać na wzrost stężenia C-końcowego fragmentu APP czyli Aβ-amyloidu [11].

– Aktywacja komórek glejowych (astrocytów i mikrogleju) często cechuje różne choroby neurodegeneracyjne. Liczne badania dowodzą, że prozapalne cytokiny wywołują nadekspresję acetylocholinoesterazy i białka APP, co prowadzi do przedwczesnego wystąpienia choroby Alzheimera [17–20]. Von Bernhardi i wsp. [21] wykazali, że oczyszczona AChE wywołuje powstawanie amyloidu poprzez podwyższoną ekspresję prekursora białkowego (β-APP) w komórkach gleju.

– Jak wspomniano wyżej, istnieją sugestie, że samo białko enzymu acetylocholinoesterazy może wywoływać neurologiczne zmiany w chorobie Alzheimera [5, 6]. Reyes i wsp. [22] wykazali, że kompleks AChE z Aβ-amyloidem jest znacznie bardziej toksyczny niż sam amyloid i powoduje większe zmiany neurologiczne w hipokampie szczura.

– Stwierdzono także, że powstawanie glikozylowanej acetylocholinoesterazy (powszechnej w chorobie Alzheimera) w prostej zależności wiąże się z ilością odkładanego Aβ-amyloidu. Sugeruje się, że oznaczanie stężenia glikozylowanej AChE może razem z innymi parametrami służyć w diagnostyce choroby Alzheimera [23].

BIAŁKO Tau (pTau)

W komórkach nerwowych ludzi cierpiących na chorobę Alzheimera gromadzą się nieprawidłowe włókienka białkowe, zbudowane z białka Tau. Białko to w prawidłowych komórkach wiąże się z mikrotubulami i utrzymuje strukturę szkieletu komórki [24]. W chorobie Alzheimera ulega ono nadmiernej fosforylacji. Pojedyncza cząsteczka białka Tau jest fosforylowana w ponad 20 miejscach u osób chorych a w 8-10 miejscach u zdrowych [25, 11].

Do hiperfosforylowanego białka Tau przyłącza się izomeraza Pin1. Reguluje ona aktywność wielu białek, kontrolujących przechodzenie komórki przez kolejne stadia cyklu komórkowego. Całkowite usunięcie izomerazy Pin1 z komórki prowadzi do zatrzymania podziałów mitotycznych i apoptozy. Prawdopodobnie w chorobie Alzheimera izomeraza Pin1 łączy się z cząsteczkami białka pTau i przywraca jego prawidłową konformację przestrzenną. Jednakże część izomerazy Pin1 pozostaje związana z nadmiernie fosforylowanymi białkami pTau, co uniemożliwia prawidłowe działanie izomerazy Pin1 w innych częściach komórki i ostatecznie może wzbudzać apoptozę komórek nerwowych.

http://rcin.org.pl

FARMAKOLOGIA W CHOROBIE ALZHEIMERA

W przeszłości próbowano wpływać na przekaźnictwo acetylocholiny za pomocą prekursorów jej syntezy - choliny, acetylokarnityny, lecytyny, fosfatydylocholiny i dimetyloaminoetanolu. Uzyskane wyniki nie były jednak pozytywne. Wykazano niewielką i przemijającą poprawę we wczesnych stadiach choroby. Próbowano także eksperymentalnie zastosować substancje, które uwalniałyby acetylocholinę z magazynów synaptycznych: 4-aminopirydynę i fosfatydyloserynę. Niestety skuteczność i tych prób nie została potwierdzona [26].

Inhibitory cholinesteraz to jedyne leki zaakceptowane obecnie przez Urząd ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration, FDA) jako metoda leczenia choroby Alzheimera [27]. Leki te są przydatne we wczesnych stadiach choroby - przejściowo poprawiają pamięć i jakość życia osób dotkniętych chorobą. Nie wywierają natomiast istotnego wpływu na postęp schorzenia i nie hamują postępujących zmian neurodegeneracyjnych. Do leków hamujących aktywność cholinoesteraz należą huperzina A, donpenzil, rivastigmina, takryna, galantamina i memantina [28-31].

Prowadzi się intensywne badania nad działaniem związków selektywnie hamujących butyrylocholinoesterazę, której aktywność w mózgu osób chorych na chorobę Alzheimera jest bardzo wysoka [32, 33].

Próby leczenia przyczynowego choroby Alzheimera, mające na celu zapobieganie i likwidowanie zjawisk destrukcyjnych zachodzących w tkance nerwowej osób chorych, pozostają nadal w fazie wstępnej. Teoretycznie istnieją możliwości powstrzymywania tworzenia się β-amyloidu - głównie poprzez hamowanie funkcji proteaz (np. sekretazy β) związanych z tworzeniem β-amyloidu z jego białkowego prekursora APP [34, 35]. Ostatnio podejmowane są próby szczepienia zwierząt doświadczalnych szczepionką, która zawiera przeciwciała skierowane przeciw β-amyloidowi lub też czynnego uodparniania przez dożylne lub donosowe podawanie samego peptydu β-amyloidu [36]. Prowadzi to do spowolnienia procesu tworzenia blaszek amyloidowych oraz dezintegracji już istniejących [37, 38]. Pomimo udowodnionej skuteczności takiej szczepionki, badania dotyczą jedynie myszy transgenicznych [39-41]. Pacjentom z chorobą Alzheimera próbowano podawać przeciwciała, lecz wiązało się to z wystąpieniem poważnych powikłań neurologicznych, spowodowanych przede wszystkim nadmierną aktywacją układu odpornościowego. Zastosowanie zaś biernej immunizacji - „szczepionki amyloidowej"- wiązało się z groźnym powikłaniem - zapaleniem mózgu, i w związku z tym czasowo zaniechano dalszych prób klinicznych [39-41]. Inna koncepcja terapeutyczna zakłada możliwość oddziaływania na funkcję białka Tau poprzez wpływ na fosfatazy i fosforylazy, niezbędne w procesie tworzenia zwyrodnienień włókienkowych [8,12, 42-45]. Dalszemu pogłębianiu choroby Alzheimera mogłoby zapobiegać hamowanie kinazy białkowej, która może fosforylować białko Tau. Ponadto izomeraza Pin 1 także mogłaby być używana w terapii [46].

W licznych doniesieniach podkreśla się istotną rolę wolnych rodników w cytotoksyczności amyloidu [47, 48]. Aβ-amyloid powoduje powstawanie wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu oraz przyczynia się do utleniania białek i peroksydacji lipidów. Mózg osób cierpiących na chorobę Alzheimera jest poddawany dużemu stresowi oksydacyjnemu. W związku z tym w profilaktyce dąży się do neutralizacji powstawania wolnych rodników. Lek o nazwie Huperzina B jest nie tylko selektywnym inhibitorem acetylocholinoesterazy, ale również znacząco podwyższa aktywność katalazy i peroksydazy glutationowej a także obniża peroksydację lipidów [28]. Do tej pory korzystne wyniki uzyskiwano, stosując w średnio zaawansowanych postaciach choroby Alzheimera selegilinę (inhibitor monoaminooksydazy B), witaminę E i colostrininę (kompleks polipeptydowy bogaty w prolinę) [49].

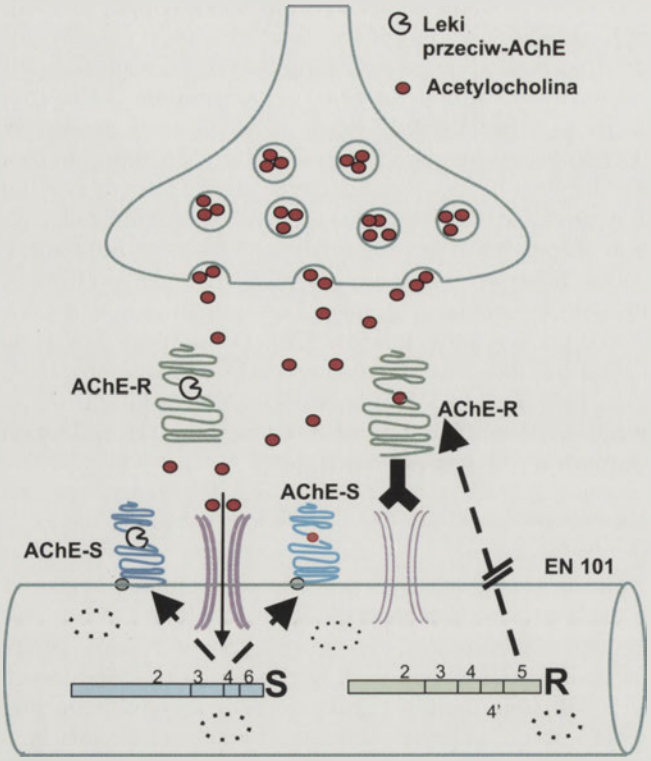
Miastenia gravis - ROLA RECEPTORA (nAChR) I FORM R I S AChE

Liczne zakłócenia w neuromięśniowej funkcji wiążą się ze zmianami w homeostazie acetylocholiny i aktywności acetylocholinoesterazy. Te zależności odgrywają istotną rolę w dystrofii mięśniowej, w chorobach neuromotorycznych, jak stwardnienie zanikowe boczne, wrodzone miastenie i *Miastenia gravis*, w których autoprzeciwciała łączą się z nikotynowym receptorem acetylocholiny, indukując powtarzające się wielokrotne neuromięśniowe połączenia [50].

Acetylocholina działa poprzez receptory, które są bezpośrednio związane z kanałem jonowym oraz receptory sprzężone z białkiem G. Pierwsze z nich są pobudzane przez nikotynę drugie zaś przez muskarynę. Receptory obydwu typów występują zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym jak i na obwodzie. Uznaje się, że receptor nikotynowy odgrywa niezwykle istotną rolę w regulowaniu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, a przez to i procesów zależnych od Ca^{2+} jak np. apoptozy [51].

Synaptyczna odmiana acetylocholinoesterazy (AChE-S) jest połączona z błoną komórkową. Natomiast forma rozpuszczalna acetylocholinoesterazy (AChE-R) jest pozbawiona C-końcowej cysteiny, co jest niezbędne dla połączenia z receptorem błonowym i dlatego nie jest ona związana z błoną komórkową [52]. AChE-S uczestniczy w hydrolizie acetylocholiny w synapsach i regulacji przekaźnictwa synaptycznego zaś AChE-R w niesynaptycznej (pozabłonowej) hydrolizie acetylocholiny i morfogenezie. Wynika z tego, że działanie sygnału kontrolowanego przez receptor acetylocholiny (nAChR), kończącego się w wyniku hydrolizy i morfogenetycznych właściwości enzymu acetylocholinoesterazy, może zależeć od ilościowego składu różnych form acetylocholinoesterazy. Podkreśla się wzajemną zależność funkcji receptora nAChR i odmian enzymu R i S AChE w *Miastenia gravis* [53]. W *Miastenia gravis* acetylocholina jest uwalniana z końcowych motoneuronów do szczeliny synaptycznej (Rys. 3). W błonie postsynaptycznej oddziałuje z receptorem nAChR, co wywołuje pobudzenie mięśnia (zmianę potencjału). Acetylocholina jest następnie hydrolizowana przez związaną z synapsą AChE-S. W jądrach komórkowych w komórce

http://rcin.org.pl



Rysunek 3. Mechanizm powstawania zakłóceń w przewodnictwie synaptycznym w *Miastenia gravis*, AChE-R i AChE-S: dwie odmiany AChE, EN101 (oligonukleotyd) selektywnie indukuje rozkład AChE-R mRNA zapobiegając syntezie AChE-R [53].

mięśniowej, znajdujących się w rejonie podsynaptycznym dochodzi do syntezy, oprócz pierwotnego transkryptu AChE-S mRNA, także niewielkiej ilości AChE-R mRNA z końcem 3'. Ten drugi transkrypt wydzielany jako monomer AChE-R jest rozpuszczalny, występuje w synapsie i nie jest związany z błoną. Miasteniczne przeciwciała skierowane przeciwko receptorowi acetylocholiny powodują jego eliminację, przyczyniając się przez to do ograniczenia odpowiedzi na acetylocholinę. Odpowiada to obniżonemu stężeniu acetylocholiny. Takie nieprawidłowości w odpowiedzi cholinergicznej powodują podwyższoną ekspresję formy AChE-R, co prowadzi do nadmiernego rozkładu acetylocholiny. Powszechnie stosowane związki chemiczne o działaniu przeciwcholinergicznym nieselektywnie blokują AChE-S i AChE-R, powodują dalszy wzrost poziomu acetylocholiny w synapsie. Konsekwencją tego jest dalsza nadprodukcja AChE-R. Zastosowany przez Brennera i wsp. [53] czynnik EN101 (oligonukleotyd) selektywnie zmniejsza stężenie AChE-R mRNA, poprzez hamowanie jego syntezy. Natomiast synteza AChE-S odbywa się prawidłowo i nie występują zatem zakłócenia w przewodnictwie neuromięśniowym.

AChE A POWSTAWANIE BIAŁACZKI

Już od dawna próbowano wyjaśnić rolę acetylocholinoesterazy w powstawaniu białaczek. W wyniku klonowania genu ludzkiej AChE stwierdzono, że ekspresja acetylocholinoesterazy w białaczce ulega wzmocnieniu, a jej geny mogą ulegać mutacji lub delecji [54]. Badania prowadzone przez Johnsona i Cotter [55] wskazują na ścisły związek białaczki z acetylocholinoesterazą. Rokowanie u pacjentów chorych na białaczkę, u których występowały pęknięcia w chromosomie w miejscu 7q22 loc (w obrebie genów AChE) było niekorzystne.

Boros i Williams [56] stwierdzili występowanie zmian metabolizmu pod wpływem antycholinoesteraz (acetylocholinoesterazy) i uznali to jako podstawę powstawania białaczki. Aby zanalizować zmiany w metabolizmie znakowanego izotopu glukozy, w komórkach białaczkowych lini K562, pod wpływem wzrastających dawek fosforowego pestycydu – isofenfosu autorzy zastosowali spektrometrię masową. Ich badania pokazały zależną od dawki względną zmianę procesu różnicowania w stosunku do procesu proliferacji pod wpływem ekspozycji na isofenfos. Boros i Williams wykazali, że pod wpływem isofenfosu glukoza jest przekształcana w cyklu pentozowym kosztem glikolizy. Obserwowano podwyższony przepływ węgla do fosforanów pentoz i obniżony przepływ glikolityczny do pirogronianu i dalej do acetylo-CoA. Stwierdzono zwiększenie syntezy kwasów nukleinowych oraz hamowanie syntezy białek i lipidów. Takie zmiany są charakterystyczne dla zmian nowotworowych.

Isofenos powoduje metaplazję komórek szpiku a w przypadku przewlekłej ekspozycji ostrą białaczkę szpikową. Jedną z dróg tłumaczącą zachodzący proces jest inhibicja AChE. Powszechnie wiadomo, że związki fosforoorganiczne mają zdolność hamowania AChE. Hamowanie aktywności cholinoesteraz jest wynikiem oddziaływania enzymu ze związkiem fosforoorganicznym (analogicznie jak w przypadku oddziaływania z substratem fizjologicznym – acetylocholiną). Związki fosforoorganiczne łączą się z grupą OH seryny, znajdującej się w centrum aktywnym enzymu i powodują hamowanie hydrolizy acetylocholiny. Powszechnie bada się wpływ na aktywność acetylocholinoesterazy takich pestycydów fosforoorganicznych jak dichlorvos [57], glifosat [58, 59], isofenfos [56, 60] czy malation [61].

Jennings i wsp. [62] stwierdzili, że limfocyty poddane działaniu isofenfosu wykazują nadprodukcję acetylocholinoesterazy (na zasadzie sprzężenia zwrotnego). Hamowanie istniejących cząsteczek acetylocholinoesterazy pobudza produkcję nowych. Taką reakcję obserwowano również w neuronach mózgu i w mięśniach zwierząt pod wpływem działania zarówno karbaminianów jak i insektycydów fosforoorganicznych [63, 64]. Czy zatem nadprodukcja AChE po ekspozycji na związki fosforoorganiczne powoduje ryzyko wystąpienia nowotworu?

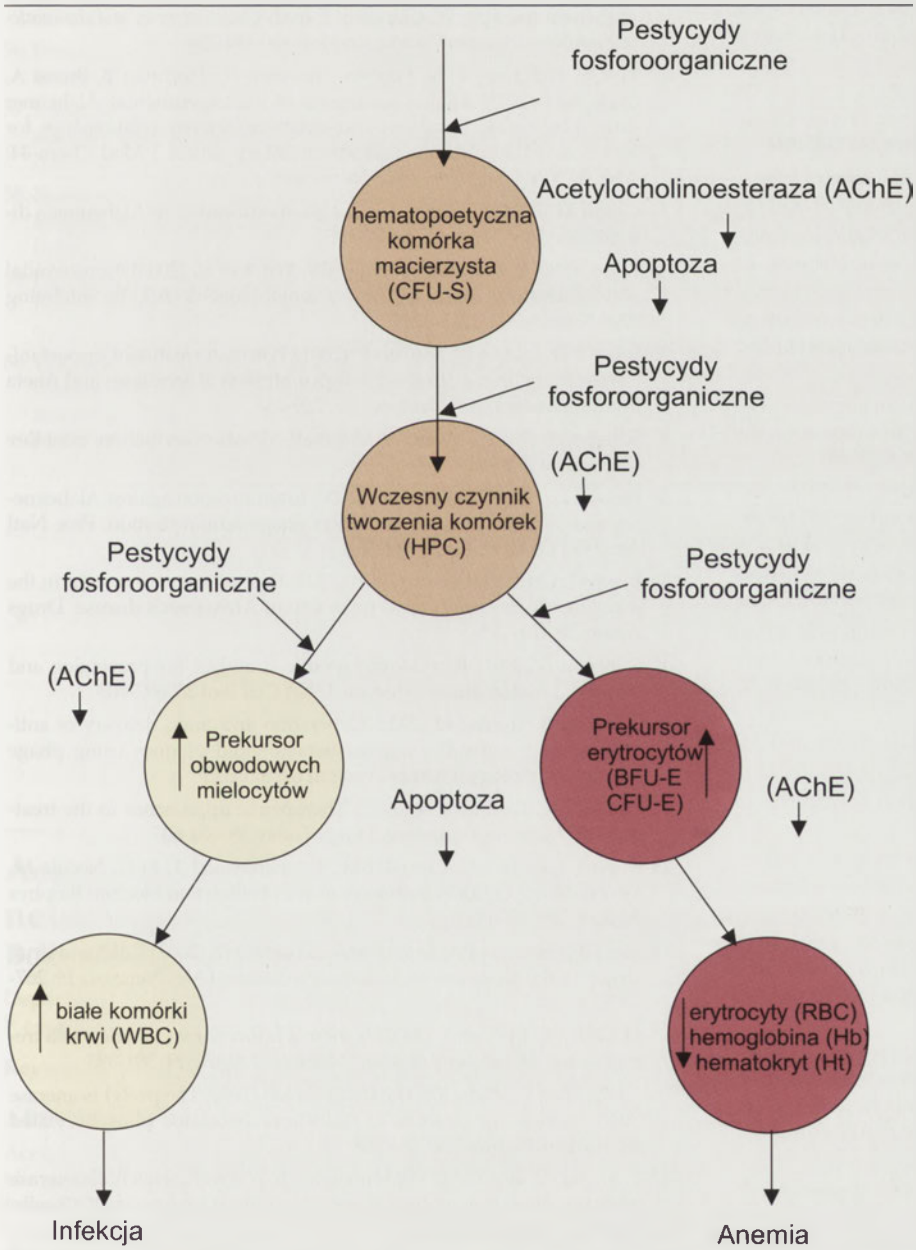
Pytanie to dotyczy głównie glejaków oraz lini komórkowych wyprowadzonych z takich nowotworów. Stwierdzono znaczną nadprodukcję acetylocholinoesterazy związaną ze wzmagającym się różnicowaniem komórek i agresywnością nowotworu. Wyhamowanie wzrostu nowotworu następowało na skutek zahamowania nadprodukcji AChE. Zatem, paradoksalnie poprawa komórkowej homeostazy cholinergicznej, po ekspozycji na inhibitory cholinesterazy, może ułatwiać powstawanie nowotworu.

Inni autorzy postulują powstawanie białaczki poprzez zmiany aktywności acetylocholinoesterazy, związane z hematopoetyczną proliferacją komórek [60, 65]. Acety-

http://rcin.org.pl

locholinoesteraza katalizuje hydrolizę acetylocholiny, co kończy międzykomórkową komunikację cholinergiczną. Sygnał cholinergiczny informuje o poziomie regulowania dojrzewania komórkowego prekursora hematopoetycznego. Zahamowanie aktywności acetylocholinoesterazy przez pestycydy fosforoorganiczne wpływa odwrotnie na hematopoetyczną proliferację komórki i doprowadza do wzrostu intensywności megakariocytopoezy *in vitro* i *in vivo* [66]. Zaburzenia w funkcjonowaniu acetylocholinoesterazy są związane ze częstością występowania zespołu mielodysplastycznego, białaczki szpikowej i białaczki włochatokomórkowej [67]. Williams i wsp. [60] postulują, że związki fosforoorganiczne powodują inhibicję prekursora acetylocholinoesterazy, co wiąże się ze spadkiem stężenia hemoglobiny, liczby erytrocytów oraz hematokrytu i ostatecznie prowadzi do anemii wraz ze zmianą prekursora komórek hematopoetycznych (Rys. 4). Wywołanie hematopoezy przez isofenfos odbywa się klasycznie. Tworzenie erytrocytu rozpoczyna się najpierw wykształceniem prekursora erytrocytów (BFU-E) z komórki macierzystej szpiku. Prekursor erytrocytów dojrzewa w kolonię formującą jednostkę (CFU-E), z ekspresją receptora erytropoetyny. W nieobecności receptora erytropoetyny CFU-E ulega apoptozie. W obecności dostatecznej ilości tego receptora CFU-E rozwija się w dojrzały erytrocyt. Po syntezie DNA i hemoglobiny, wymagającej 4 podziałów komórkowych, następuje zanik jądra w powstałych komórkach. Pojawienie się anomalii w aktywności acetylocholinoesterazy (w wyniku zaburzeń transkrypcyjnych czy też inhibicji potranslacyjnej) wywołanych przez pestycydy fosforoorganiczne, wyraża się pomiędzy różnorodnością i liczbą komórek macierzystych szpiku i CFU-E [64].

Zwraca się również uwagę na ogromną rolę stresu w powstawaniu białaczek. Stwierdzono, że stres psychiczny wywołuje ekspresję genów acetylocholinoesterazy w mózgu i w komórkach hematopoetycznych. Grissaru i wsp., [68] zauważyli, że stres psychiczny i chemiczny wywołują transkrypcję głównie izoformy AChE-R i przez kortyzol CD^{34+} hematopoetycznego prekursora komórek. Przeciwna sytuacja występuje w limfocytach, gdzie w wyniku stresu większej ekspresji ulega forma AChE-S [69]. Ekspresja AChE-S w komórkach krwi - limfocytach łączyła się z końcowym różnicowaniem i apoptozą, zaś ekspresja AChE-R wiązała się z rozmnażaniem (proliferacją) komórki mieloidowej. Ostatnie badania Perry i wsp. [70] podkreślają negatywną rolę formy AChE-R. Autorzy stwierdzili, że w komórkach glejaka forma AChE-R wpływa na kinazę C, co uruchamia transdukcję sygnału komórkowego i przyczynia się do proliferacji nowotworu.



Rysunek 4. Zachodzenie hematopoezy pod wpływem isofenfosu [60]. CFU-S - komórka macierzysta szpiku, BFU-E - komórka będąca prekursorem erytrocytów, CFU-E komórka będąca w dalszym etapie rozwoju BFU-E z ekspresją receptora erytropoetyny.

Przedstawione powyżej dane, dotyczące zaburzeń biochemicznych związanych z dodatkowymi funkcjami acetylocholinoesterazy, wydają się niezwykle cenne i mogą przybliżać zespoły badawcze do odkrycia prawdziwych przyczyn niektórych chorób neurologicznych i hematologicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Pick M, Flores-Flores C, Grisaru D, Shochat S, Deutsch V, Soreq H (2004) Blood-cell-specific acetylcholinesterase splice variations under changing stimuli. Int J Devl Neurosci 22: 523-531

2. Lieberman DA, Hoffman B (2003) Myeloid differentiation (MyD) primary response genes in hematopoiesis. Blood Cells Mol Dis 31: 213-228

3. Oben JA, Yang S, Lin H, Ono M, Diehl AM (2003) Acetylcholine promotes the proliferation and collagen gene expression of myofibroblastic hepatic stellate cells. Biochem Biophys Res Commun 300: 172-177

http://rcin.org.pl

4. Reszeć J, Sulkowska M, Guzińska-Ustynowicz K, Zalewska R, Sulkowski S (2003) Wirus brodawczaka ludzkiego a proces apoptozy. Post Biol Kom 30: 311-323
5. Day T, Greenfield SA (2002) A non-cholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal neurones in vitro: molecular mechanisms. Neurosci 111: 649-656
6. Day T, Greenfield SA (2003) A peptide derived from acetylocholinesterase induces neuronal cell death: characterisation of possible mechanisms. Experimen Brain Res 153: 334-342
7. Emmett SR, Greenfield SA (2004) Peptide derived from the C-terminal region of acetylcholinesterase modulates extracellular concentrations of acetylcholin-esterase in the rat substantia nigra. Neurosci Lett 358: 210-214
8. Lahiri DK, Farlow MR, Sambamutri K, Greig NH, Giacobini E, Schneider LS (2003) A critical analysis of new molecular targets and strategies for drug developments in Alzheimer's disease. Curr Drug Targets 42: 97-112
9. Frank RA, Galasko D, Hampel H, Hardy J, de Leon MJ, Mehta PD, Rogers J, Siemers E, Trojanowski JQ (2003) Biological markers for therapeutic trials in Alzheimer's disease: Proceedings of the biological markers working group; NIA initiative on neuroimaging in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 24: 521-536
10. Goldgaber D, Lerman MI, McBridge OW, Saffiotti U, Gajduse DS (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. Science 235: 877-890
11. Yamada S, Nebeshima T (2000) Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. Pharmacol Therap 88: 93-113
12. Barber KL, Mesular MM, Kraft GA, Klein WL (1996) Butyrylcholinesterase alters the aggregation state of β-amyloid. Proc Soc Neurosci 72: 1172
13. Bartoli M, Bertucci C, Cavrini V, Andisano V (2003) Beta-amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. Biochem Pharmacol 65: 407-416
14. De Ferrari GV, Canales MA, Shin I, Weiner LM, Silman I, Inestrosa NC (2001) A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid-β-peptide fibril formation. Biochemistry 40: 10447-10457
15. Rees T, Hammond O, Soreq H, Younkin S, Brimijoin S (2003) Acetylcholinesterase promoters beta-amyloid plaques in cerebral cortex. Neurobiol Aging 24: 777-787
16. Mori F, Lai CC, Fusi F, Giacobini E (1995) Cholinesterase inhibitors increase secretion of APPs in rat brain cortex. NeuroRaport 6: 633-636
17. Li Y, Liu L, Kang J, Sheng JG, Barger SW, Mrak RE, Griffin WST (2000) Neuronal-glial interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. J Neurosci 20: 149-155
18. Mrak RE, Griffin WS (2001) Interleukin-1, neuroinflamation, and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 22: 903-908
19. Tuppo EE, Arias HR (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. Int J Biochem Cell Biol 37: 289-305
20. Lemere CA, Maron R, Selkoe DJ, Weiner HL (2001) Nasal Vaccination with beta-amyloid peptide for the treatment of Alzheimer's disease. DNA Cell Biol 20: 705-711
21. von Bernhardi R, Ramirez G, De Ferrari G, Inestrosa NC (2003) Acetylcholinesterase induces the expression of the β-amyloid precursor protein in glia and activates glial cells in culture. Neurobiol Disease 14: 447-457
22. Reyes AE, Chacon MA, Dinamarca MC, Cerpa W, Morgan C, Inestrosa NC (2004) Acetylcholinesterase-A beta complexes are more toxic than A beta fibrils in rat hippocamous – Effect on rat beta-amyloid aggregation, laminin expression, reactive astrocytosis, and neuronal cell loss. Am J Pathol 164: 2163-2174
23. Talesa VN (2001) Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. Mech Ageing Dev 122: 1961-1969
24. Goedert M (2004) Tau protein and neurodegeneration. Semin Cell Dev Biol 15: 45-49
25. Mandelkow EM, Mandelkow E (1998) Tau in Alzheimer's disease. Trends Cell Biol 8: 425-427
26. Crook T, Petrie W, Wells C, Massari DC (1992) Effects of phosphatidylserine in Alzheimer's disease. Psychopharmacol Bull 12: 347-359
27. Cummings JL, Cole G (2002) Alzheimer Disease. JAMA 287: 2335--2338
28. Liang YQ, Tang XC (2004) Coparative effects of huperzine A, donepezil and rivastigmine on cortical acetylcholine level and acetylcholinesterase activity in rats. Neurosci Lett 361: 56-59
29. Sonkusare SK, Kaul CL, Ramarao P (2005) Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders-memantine, a new hope. Pharmacol Res 51: 1-17
30. Wilkinson DG, Francis PT, Schwam E, Payne-Parris J (2004) Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. Drugs Aging 21: 453-478
31. Sobrado M, Roda JM, Lopez MG, Egea J, Garcias AG (2004) Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation. Neurosci Lett 365: 132-136
32. Giacobini E (2000) Cholinesterase inhibitors: from the calabar bean to Alzheimer therapy. W: Giacobini E (red) *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. Martin Dunitz, London, str. 181-226
33. Yu QS, Holloway HW, Flippen-Anderson JL, Hoffman B, Brossi A, Greig NH (2001) Methyl analogues of the experimental Alzheimer drug, phenserine: synthesis and structure/activity relationships for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory action. J Med Chem 44: 4062-4071
34. Citron M (2004) Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci 5: 677-685
35. Zhou Y, Su Y, Li B, Liu F, Ryder JW, Wu X et al. (2003) Nonsteroidal anti-inflamatory drugs can lower amyloidogenic $A\beta_{42}$ by inhibiting Rho. Science 302: 1215-1217
36. Schenk D, Games D, Seubert P (2001) Potential treatment opportunities for Alzheimer's disease through inhibition of secretases and Abeta immunization. J Mol Neurosci 17: 259-267
37. Solomon B (2002) Towards Alzheimer's disease vaccination. mini Rev Med Chem 2: 85-92
38. Frenkel D, Katz O, Solomon B (2000) Immunization against Alzheimer's beta-amyloid plaques via EFRH phage administration. Proc Natl Acad Sci USA, 97: 11455-11459
39. Blasko I, Grubeck-Lobenstein B (2003) Role of immune system in the patogenesis, prevention and treatment of Alzheimer's disease. Drugs Aging 20: 101-113
40. Solomon B (2001) Immunotherapeutic strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. DNA Cell Biol 20: 697-703
41. Solomon B, Frenkel D (2002) Generation and brain delivery of anti--aggregating antibodies against beta-amyloid plaques using phage display technology. J Neural Transm 62: 321-325
42. Yamada K, Toshitaka N (2002) Therapeutic approaches to the treatment of Alzheimer's disease. Drugs Today 38: 631-637
43. Kuret J, Chirita NC, CongdonEE, Kannanayakal T, Li G, Necula M, Yin H, Zhong Q (2005) Pathways of tau fibrillization Biochim Biophys Aacta 1739: 167-178
44. Lau L F, Seymour PA, Sanner MA, Schachter JB (2002) Cdk5 as a drug target for the treatment of Alzheimer's disease. J Mol Neurosci 19: 267--273
45. McGeer PL, McGeer E (2003) Is there a future for vaccination as a treatment for Alzheimer's disease? Neurobiol Aging 24: 391-395
46. Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP (1999) The prolyl isomerase Pin 1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. Nature 399: 784-788
47. Zhang HY, Tang XC, (2000) Huperzine B. A novel acetylcholinesterase inhibitor attenuates hydrogen peroxide induced injury in PC12 cells. Neurosci Lett 292: 41-44
48. Esposito E, Rotilio D, Di Matteo V, Di Giulio C, Cacchio M, Algieri S (2002) A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. Neurobiol Aging 23: 719-735

http://rcin.org.pl

49. Boldogh I, Hughes T, Georgiades J, Stanon GJ (2001) Antioxidants and Alzheimer's disaese: from bench to bedside (and back again). Rocznik Psychogeriatryczny 4: 58-65

50. Skangel-Kramska J (2004) Receptory cholinergiczne W: Nowak JZ, Zawilska JB (red) Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. Wyd Nauk PWN, str. 351-364

51. Dajas-Bailador F, Wonnacott S (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. Trends Pharmacol Sci 25: 317-324

52. Perrier AL, Massoulie J, Krejci E (2002) PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. Neuron 33: 275-285

53. Brenner T, Hamra-Amitay Y, Evron T, Boneva N, Seidman S, Soreq H (2003) The role of readthrough acetylcholinesterase in the pathophysiology of *Myasthenia gravis*. FASEB J 17: 214-222

54. Stephanson J, Czepulkowski B, Hirst W, Mufti G (1996) Deletion of the acetylcholinesteraze locus at 7q22 associated with meylodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemia (AML). Leuk Res 20: 235-241

55. Johnson E, Cotter FE (1997) Monosomy 7 and 7q-associated with myeloid malignancy. Blood Rev 11: 46-55

56. Boros LG, Williams RD (2001) Isophenos induced metabolic changes in K562 myeloid blast cells. Leukemia Res 25: 883-890

57. Lazarini CA, Lima RY, Guedes AP, Bernardi MM (2004) Prenatal exposure to dichlorvos: physical and behavioral effects on rat offspring. Neurotoxiol Terat 26: 607-614

58. Bukowska B, Pieniążek D, Duda W (2002) Hemolysis and lipid peroxidation in human erythrocytes incubated with Roundup. Curr Topics Biophys 26: 245-249

59. Pieniążek D, Bukowska B, Duda W (2004) Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. Pest Biochem Physiol 79: 58-63

60. Williams RD, Boros LG, Kolanko CHJ, Jackman SM, Egers TR (2004) Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed to the anticholinesterase pesticide isofenphos with mechanisms of leukemogenesis. Leuk Res 28: 947-958

61. Abdollahi M, Mostafalou S, Pournourmohammadi S, Shadnia S (2004) Oxidative sress and cholinesterase inhibition in silva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. Comp Biochem Physiol Part C 137: 29-34

62. Jennings LL, Malecki M, Komives EA, Taylor P (2003) Direct analysis of kinetic profiles of organophosphate-acetylcholinesterase adducts by MALDI-TOF mass spectrometry. Biochemistry 42: 11083-11091

63. Kaufer D, Fridman A, Seidman S, Soreq H (1998) Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. Nature 393: 373-377

64. Lev-Lehman E, Evron T, Broide RS, Meshorer E, Ariel I, Seidman S (2000) Synaptogenesis and myopathy under acetylcholinesterase overexpression. J Mol Neurosci 14: 93-105

65. Kawashima K, Fujii T (2003) The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. Life Sci 74: 675--96

66. Soreq H, Patinkin D, Lev-Lehman E, Grifman M, Ginzberg D, Eckstein F, Zakut H (1994) Antisense oligonucleotide inhibition of acetylcholinesterase gene expresion induces progenitor cell expansion and suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo. Proc Natl Acad Sci USA 91: 7907-7911

67. Clavel J, Hemon D, Mandereau L, Dlemotte B, Severin F, Flandrin G (1996) Farming pesticide use and hairy-cell leukemia. Scand J Work Environ Health 22: 285-293

68. Grisaru D, Deutch V, Shapira M, Pick M, Sternferd M, Melamed-Book N (2001) ARP, a peptide derived from the stress-associated acetylcholinesterase variant has hematopoietic growth promoting activities. Mol Med 7: 93-105

69. Pick M, Flores-Flores C, Grisaru D, Shochat S, Deutsch V, Soreq H (2004) Blood-cell-specific acetylcholinesterase splice variations under changing stimuli. Int J Devl Neurosci 22: 523-531

70. Perry Ch, Sklan EH, Soreq H (2004) CREB regulates ACHE-R-induced proliferation of human glioblastoma cells. Neoplasia 6: 279-288

Acetylcholinesterase – apoptosis induction, role in neurological diseases and leukemia

Bożena Bukowska✉

Department of Biophysics of Environmental Pollution, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland
✉ e-mail:bukow@biol.uni.lodz.pl

Keywords: acetylcholinesterase, apoptosis, Alzheimer's disease, *Myasthenia gravis*, Aβ-amyloid, leukemia

ABSTRACT

Acetylcholinesterase (AChE – EC. 3.1.1.7) plays an essential role in acetylcholine-mediated neurotransmission. Unfortunately, an AChE-peptide exhibits pathophysiological activity via an apoptotic pathway that could play an important role in neuronal development and neurodegeneration. It was found that a peptide derived from AChE may induce neuronal death and acetylcholinesterase may induce neurological changes in the development of Alzheimer's disease. It was also stated that complex of AChE with β-amyloid is much more toxic than amyloid and causes stronger neurological changes. AChE promotes the generation of amyloid by accelerating the expression of peptide precursor (β-APP) in glial cells. The essential role is also played by AChE in induction of hematological disease. It is well known that phosphoroorganic compounds cause inhibition of AChE precursors what is related to decrease of hemoglobin concentration, number of erythrocytes and hematocrit level. The article is an attempt to explain the role of acetylcholinesterase in neuronal apoptosis, Alzheimer's disease and *Myasthenia gravis* as well as in leukemia.

http://rcin.org.pl

Lizosomalna karboksypeptydaza A

Marek Gacko[1]✉
Anna Worowska[1]
Arkadiusz Woźniak[1]
Monika Jedynak[2]
Bogusław Panek[1]
Radosław Łapiński[1]

[1]Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantacji i [2]Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii Akademii Medycznej w Białymstoku, Białystok

✉Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantacji, Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. M. Skłodowskiej-Curie 24a, 15-269 Białystok; e-mail: chirnacz@amb.edu.pl; tel. (85) 746 82 77

Artykuł otrzymano 23 września 2004
Artykuł zaakceptowano 4 stycznia 2005

Słowa kluczowe: lizosomalna karboksypeptydaza A, biosynteza, struktura chemiczna, mechanizm katalizy, rola biologiczna

STRESZCZENIE

Lizosomalna karboksypeptydaza A (katepsyna A) jest syntetyzowana w postaci preproenzymu, który w wyniku potranslacyjnej modyfikacji przechodzi w aktywny enzym. Odszczepia od peptydów i białek C-końcowe reszty aminokwasowe i współdziała z innymi proteazami w zachodzącej w lizosomach degradacji białek komórkowych. Działa także na hormony peptydowe i biologicznie czynne peptydy w tkankach i w płynach ustrojowych. Występuje w postaci kompleksów z niektórymi glikozydazami, co chroni je przed degradacją proteolityczną, a jej niedobór prowadzi do chorób spichrzeniowych. Lizosomalna karboksypeptydaza A jest enzymem wielofunkcyjnym, o ważnej roli regulacyjnej w metabolizmie ustrojowym.

WPROWADZENIE

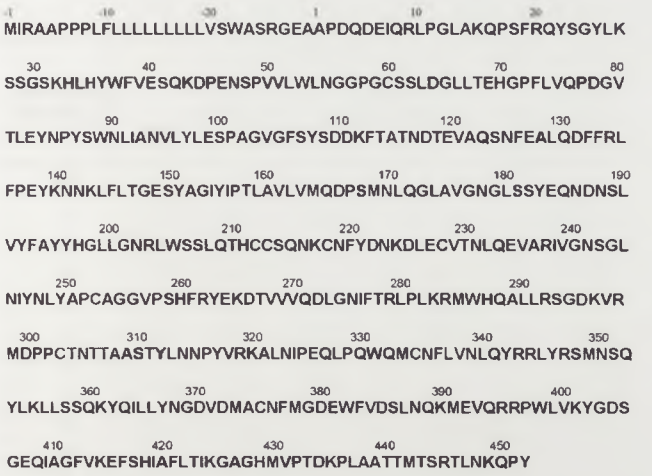
W lizosomach degradowanych jest około 80% białek komórkowych i białek dostających się do komórki na drodze endocytozy [1]. W organellach tych występuje ponad 30 różnych peptydaz, z których większość nosi nazwę katepsyn [2]. Działają one w kwaśnym środowisku. Według lokalizacji rozszczepianego wiązania peptydowego katepsyny dzieli się na endopeptydazy i egzopeptydazy. Endopeptydazy rozszczepiają wiązania peptydowe zlokalizowane wewnątrz łańcucha polipeptydowego. Najbardziej aktywne są katepsyny B, D, E, F, H, I, J, K i L [3]. Produktem działania endopeptydaz na białka jest mieszanina peptydów, stanowiących substraty egzopeptydaz [4,5]. Egzopeptydazy rozszczepiają wiązania peptydowe znajdujące się na N- i C-końcach peptydów [6]. Aminopeptydazy rozszczepiają wiązania peptydowe za ostatnim (lizosomalne aminopeptydazy) lub przedostatnim (katepsyna C) aminokwasem N-końcowym. Karboksypeptydazy rozszczepiają wiązania peptydowe utworzone przez aminokwasy C-końcowe [7,8]. Jedynie katepsyna B i katepsyna H jest równocześnie endopeptydazą i egzopeptydazą [3,7]. Poszczególne aminopeptydazy i karboksypeptydazy różnią się między sobą specyficznością względem odszczepianych aminokwasów N- i C-końcowych i uzupełniają się dzięki temu w działaniu na peptydy. Końcowym produktem działania aminopeptydaz i karboksypeptydaz są tripeptydy. Tripeptydy są substratami tripeptydaz (aminotripeptydaz i karboksytripeptydaz) [9]. Powstające dipeptydy są rozkładane do aminokwasów, przez dipeptydazy lizosomalne i cytosolowe. Charakterystyka lizosomalnych karboksypeptydaz podana jest w tabeli 1. Miejsce katalityczne karboksypeptydaz lizosomalnych stanowi reszta serylowa lub cysteinylowa, a ich inhibitorami są odpowiednio diizopropylofluorofosforan i jodooctan. W lizosomach nie występują metalokarboksypeptydazy. Poszczególne karboksypeptydazy lizosomalne różnią się między sobą specyficznością względem odszczepianych C-końcowych aminokwasów. Warunkiem działania karboksypeptydaz na dipeptydy i tripeptydy jest zablokowanie N-końcowej grupy aminowej i wolna

Tabela 1. Charakterystyka lizosomalnych karboksypeptydaz, wg [27,95]

Karboksypeptydaza	Substrat	Miejsce katalityczne	Aktywator	Inhibitor	Optimum pH
Lizosomalna karboksyptydaza A (EC 3.4.16.1)	Z-Phe-Ala	Ser	brak	diizopropylofluorofosforan, fluorek 4-aminofe-nylmetylsulfonylu	5,5
Lizosomalna karboksyptydaza B (EC 3.4.18.1)	Z-Gly-Arg	Cys	ditiotreitol	jodooctan, leupeptyna	5
Lizosomalna karboksyptydaza C (EC 3.4.16.2)*	Z-Pro-Phe	Ser	brak	diizopropylofluorofosforan	5

* – niewrażliwa na fluorek 4-aminofenylmetylsulfonylu

http://rcin.org.pl



Rysunek 1. Sekwencja aminokwasowa lizosomalnej preprokarboksypeptydazy A [88]. M1-A28 - prepeptyd sygnałowy; A1-R284 - podjednostka 32 kDa; M299--Y452 - podjednostka 20 kDa; Ser150, Arg372, His429 - triada katalityczna; N117, N305 - reszty N-glikozylowane; Q75-Y84, V400-G407 - sekwencje wiążące β-galaktozydazę.

grupa karboksylowa aminokwasu C-końcowego. Lizosomalna karboksypeptydaza A (EC 3.4.16.5) jest opisywana w literaturze także pod nazwą katepsyna A, katepsyna I, katepsynowa karboksydaza A, deamidaza i lizosomalne białko ochronne [10].

BIOSYNTEZA

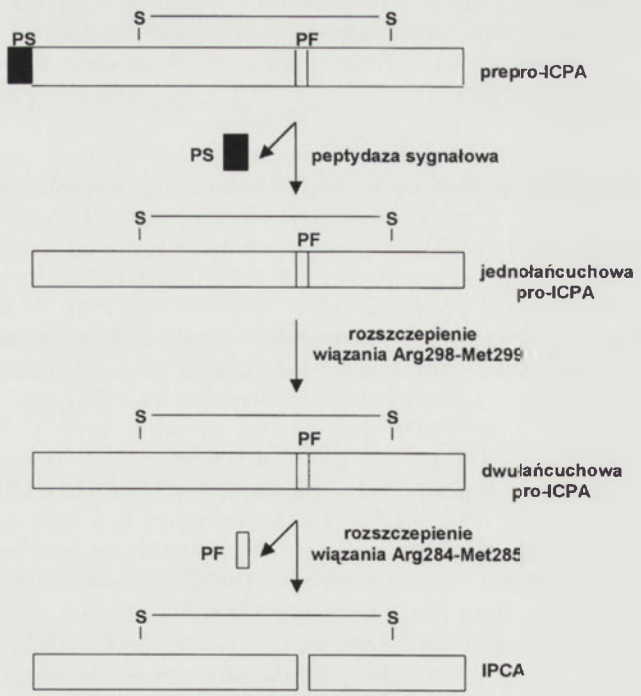
Gen kodujący lizosomalną karboksypeptydazę A występuje na fragmencie 20q 13.1 chromosomu 20 [11]. Zawiera on 15 eksonów i posiada 7,5 kb par zasad DNA. Lizosomalna karoksypeptydaza A jest syntetyzowana w postaci preproenzymu w rybosomach związanych z szorstką siateczką endoplazmatyczną [12-15]. W zbiornikach siateczki endoplazmatycznej następuje jego potranslacyjna modyfikacja. Przez proteazę sygnałową zostaje odszczepiony prepeptyd, tworzy się struktura przestrzenna, powstają mostki disiarczkowe, proenzym ulega glikozylacji, w wyniku której do dwóch grup amidowych reszt asparaginylowych zostają kowalencyjnie przyłączone łańcuchy oligosacharydowe. Od siateczki endoplazmatycznej odpączkowują pęcherzyki transportowe, które przenoszą proenzym lizosomalnej karboksypeptydazy A do aparatu Golgiego. Reszty mannozy oligosacharydu związanego z Asn305 ulegają fosforylacji do mannozo-6-fosforanu. To umożliwia łączenie się proenzymu z receptorem mannozo-6-fosforanu występującym w aparacie Golgiego. Odpączkowanie od aparatu Golgiego pęcherzyków prowadzi do utworzenia lizosomu pierwotnego. Kwaśne środowisko w lizosomie powoduje rozdysocjowanie połączenia proenzymu z receptorem, uwolniony receptor powraca do aparatu Golgiego, a od proenzymu odszczepiany jest peptyd aktywujący.

IZOLOWANIE I OCZYSZCZANIE

Lizosomalna karboksypeptydaza A występuje w lizosomach komórek budujących wszystkie tkanki i narządy ssaków oraz w lizosomach elementów morfotycznych krwi [16-18]. Największą aktywność tego enzymu obserwuje się w nerkach, wątrobie, płucach, śledzionie, mózgu, mięśniach szkieletowych i łożysku [19-24]. Występuje on także w fibroblastach, limfocytach, makrofagach i płytkach krwi [25-27]. Lizosomalną karboksypeptydazę A do niedawna izolowano i oczyszczano technikami stosowanymi powszechnie do rozdzielenia mieszanin białkowych, uzyskując 500-1000 krotne oczyszczenie białka. Obecnie oczyszczone preparaty katepsyny A otrzymuje się stosując chromatografię powinowactwa na unieruchomionej na sefarozie konkanawalinie A, chromatografię hydrofobową z zastosowaniem fenylo-oktylo-sefarozy i Phe-Leu-agarozy oraz chromatografię jonowymienną z zastowaniem kolumny wypełnionej dietyloaminoetylo-Sefacelem [28,29]. W celu wyizolowania kompleksu lizosomalnej karboksypeptydazy A z beta-galaktozydazą stosuje się chromatografię powinowactwa z zastosowaniem PATGAL-sefarozy, z którą kompleks wiąże się poprzez beta-galaktozydazę [30]. Kompleks ten można także wyizolować stosując chromatografię powinowactwa z zastosowaniem para-aminofenylo-tio-beta-galaktozydo--agarozy, w pH 4,5. Uzyskany kompleks rozdysocjowuje się w pH 7,5 i rozdziela budujące go składniki przy użyciu filtracji żelowej z zastosowaniem kolumny Shim-pack Dial-300 [31]. Zastosowanie powyższych technik pozwoliło otrzymać lizosomalną karboksypeptydazy A oczyszczoną 3000-4000 krotne. Lizosomalna karboksypeptydaza A jest stabilna w pH 5,0-6,0. Aktywność enzymu stabilizują aniony chlorkowe i sacharoza [19,32]. W pH powyżej 7,0 i w temperaturze 69°C lizosomalna karboksypeptydaza A ulega szybko zahamowaniu.

STRUKTURA

Preprolizosomalna karboksypeptydaza A o masie cząsteczkowej 58 kDa zbudowana jest z 480 reszt aminokwasowych i (Rys. 1). Sekwencja sygnałowa o masie cząsteczkowej 3,5 kDa zlokalizowana jest w N-końcowym fragmencie cząsteczki i zawiera 28 reszt aminokwasowych. Sekwencję tę odszczepia proteaza sygnałowa. Powstaje w wyniku tego



Rysunek 2. Aktywacja lizosomalnej prokarboksypeptydazy A (ICPA). PS - peptyd sygnałowy;PF - profragment, wg [88].

http://rcin.org.pl

Tabela 2. Skład aminokwasowy lizosomalnej kaboksypeptydazy A

Aminokwas*		Prepro-lizosomalna karboksy-peptydaza A	Pre-peptyd	Pro-lizosomalna karboksypeptydaza A	Pro--peptyd	Lizosomalna karboksypeptydaza A	Podjednost-ka 32kDa	Podjednost-ka 20kDa
Ala	(A)	28	4	24	1	23	14	9
Arg	(R)	19	2	17	2	15	8	7
Asn	(N)	33		33		33	22	11
Cys	(C)	9		9		9	6	3
Phe	(F)	21	1	20		20	14	6
Gln	(Q)	27		27	1	26	15	11
Gly	(G)	32	1	31	1	30	23	7
His	(H)	9		9	1	8	6	2
Ile	(I)	13	1	12		12	7	5
Asp	(D)	23		23	1	22	15	7
Glu	(E)	20	1	19		19	14	5
Leu	(L)	63	10	53	2	51	35	16
Lys	(K)	21		21	1	20	11	9
Met	(M)	12	1	11	1	20	2	8
Pro	(P)	28	3	25		25	16	9
Ser	(S)	36	2	34	1	33	24	9
Thr	(T)	21		21		21	11	10
Trp	(W)	9	1	8	1	7	4	3
Tyr	(Y)	27		27		27	18	9
Val	(V)	29	1	28	1	27	19	8
Suma amino- kwasów		480	28	452	14	438	284	154
Masa cząsteczkowa		62939,09	3561,31	59377,78	1931,22	57446,56	36888,5	20558,06

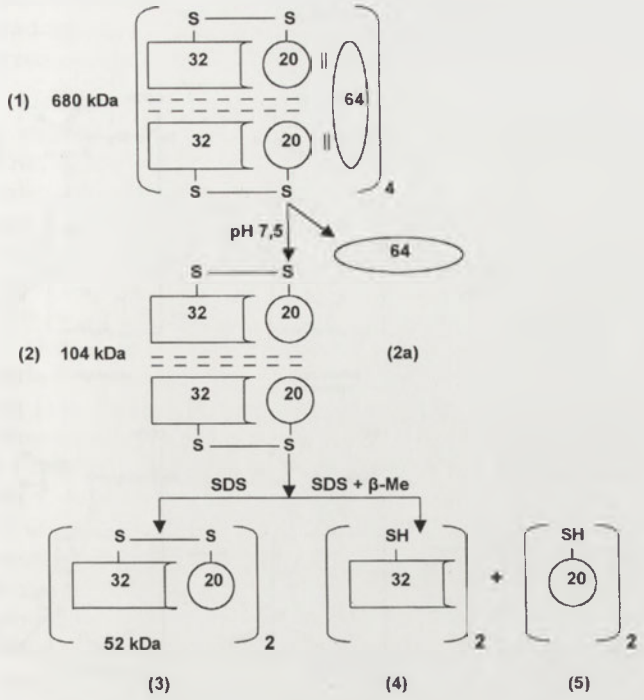
* - symbol trójliterowy (jednoliterowy)

proenzym lizosomalnej karboksypeptydazy A. o masie cząsteczkowej 54 kDa i zbudowany z 452 reszt aminokwasowych. Aktywacja proenzymu zachodzi w lizosomach i rozpoczyna się od rozszczepienia wiązania Arg298-Met299 przez proteazę trypsynopodobną. Następnie rozszczepiane jest wiązanie R284-Met285, co powoduje odszczepienie fragmentu złożonego z 14 reszt aminokwasowych (Met285--Arg298) o masie cząsteczkowej 2 kDa (Rys. 2). Aktywna forma lizosomalnej karboksypeptydazy A posiada masę cząsteczkową 52 kDa.

W wyniku odszczepienia peptydu aktywującego powstają dwie podjednostki, większa o masie cząsteczkowej 32 kDa (Ala1-Arg284) i mniejsza o masie cząsteczkowej 20 kDa (Met299-Tyr452) [33]. Skład aminokwasowy prolizosomalnej karboksypeptydazy A, form pośrednich i formy aktywnej podany jest w tabeli 2. Podjednostka o masie 32 kDa połączona jest z podjednostką o masie 20 kDa wiązaniem disiarczkowym. Miejsce katalityczne stanowi triada: Ser150, Asp372, His429 [14]. Lizosomalna karboksypeptydaza A zawiera 9 reszt cysteiny zajmujących pozycje: C60, C212, C213, C218, C228, C253, C303, C334 i C373. Osiem z nich tworzy 4 mostki disiarczkowe: C60-C375, C212-C228, C213-C218 i C303-C334. Mostek disiarczkowy C60-C375 łączy podjednostki [14]. Grupa sulfhydrylowa reszty cysteiny C253 jest wolna i ma istotne znaczenie dla zachowania aktywności enzymu. Dwie reszty Asn (Asn117, Asn305) znajdujące się w sekwencji Asn-Asp-Thr i Asn-Thr-Thr ulegają N-glikozylacji. Oligosacharyd związany z podjednostką 32 kDa zawiera mannozo-6-fosforan [12]. Rozmiary monomeru lizosomalnej karboksypeptydazy A wynoszą 60x50x70 Å [34]. Składa się on z dwóch domen, szczytowej i rdzeniowej. Domena szczytowa zawiera subdomenę utworzoną ze 121 reszt aminokwasowych uformowanych w 3 alfa-helisy i 3 beta-struktury [35]. Subdomena ta zawiera odszczepiany w czasie aktywacji czternastoaminokwasowy propeptyd Met285-Arg298. Domena rdzeniowa składa się z centralnie położonych 10 alfa-helis i 10 beta-struktur oraz położonych bocznie 2 małych beta-struktur.

W środowisku kwaśnym lizosomów około 70% lizosomalnej karboksypeptydazy A występuje w postaci homodimeru o masie cząsteczkowej 98 kDa [30]. Pozostałe 30% lizosomalnej karboksypeptydazy A występuje w postaci dwuskładnikowego, aktywnego enzymatycznie połączenia kompleksowego z beta-galaktozydazą [36]. W cząsteczce lizosomalnej karboksypeptydazy A występują dwie sekwencje: Gln76-Tyr84 i Val400-Glu407 stanowiące powierzchnię kontaktową, wiążącą beta-galaktozydazę. Dimer lizosomalnej karboksypeptydazy A (104 kDa) łączy się z monomerem beta-galaktozydazy (64 kDa) tworząc heterotrimer o masie cząsteczkowej 168 kDa. Cztery cząsteczki heterotrimeru stanowią makrokompleks o masie cząsteczkowej 680 kDa [37]. Makrokompleks ten rozpada się w pH 7,5 na składowe: 8 cząsteczek lizosomalnej karboksypeptydazy A i 4 cząsteczki beta-galaktozydazy [37,38]. Sól sodowa siarczanu dodecylu rozdysocjowuje ten kompleks na monomery, a dodatek związku redukującego rozszczepia go na podjednostki, co można śledzić techniką elektroforezy w żelu poliakryloamidowym (Rys. 3). W pH 4,5 makrokompleks tworzy się ponownie. Około 1% lizosomalnej karboksypeptydazy A występuje w kompleksie z beta-galaktozydazą, N-acety-

http://rcin.org.pl



Rysunek 3. Makrokompleks lizosomalnej prokarboksypeptydazy A (ICPA) z beta-galaktozydazą [8, 36, 37]. Kompleks lizosomalnej karboksypeptydazy A z beta-galaktozydazą (1) w pH 7,5 rozdysocjowuje na 2 homodimery lizosomalnej karboksypeptydazy A (2) i beta-galaktozydazę (2a); sól sodowa siarczanu dodecylu (SDS) rozdysocjowuje homodimer lizosomalnej karboksypeptydazy A na 2 monomery (3) i przez merkaptoetanol (β-Me) na podjednostkę 32 (4) i podjednostkę 20 (5). S-S - mostki disiarczkowe łączące podjednostki monomeru. = - wiązania hydrofobowe łączące monomery. Dalsze objaśnienia w tekście.

lo-alfa-neuramidazą i N-acetylogalaktozamino-6-siarczano sulfatazą, o masie cząsteczkowej około 1280 kDa [37].

SPECYFICZNOŚĆ

Lizosomalna karboksypeptydaza A odszczepia od peptydów kolejno większość aminokwasów C-końcowych do momentu powstania tripeptydu. Szybkość odszczepiania poszczególnych aminokwasów zależy od rozmiarów i właściwości fizykochemicznych ich rodnika oraz od konformacji cząsteczki. C-końcowe reszty Arg, Lys i Pro nie są odszczepiane przez ten enzym. Warunkiem działania lizosomalnej karboksypeptydazy A na dipeptydy i tripeptydy jest zablokowanie ich N-końcowej grupy aminowej i wolna grupa karboksylowa C-końcowego aminokwasu, ale ostatni warunek nie jest bezwzględnie konieczny [39]. Najszybciej hydrolizowane są substraty z aromatycznymi (Phe) i hydrofobowymi alifatycznymi (Ala) resztami aminokwasowymi w pozycji przedostatniej oraz aminokwasami aromatycznymi (Tyr) i hydrofobowymi alifatycznymi (Ala, Leu) w pozycji C-końcowej (Tabela 3). Potwierdzają to wyniki pomiarów kinetycznych (Vmax, Km) hydrolizy przez tą peptydazę N-blokowanych dipeptydów [40]. Specyficzność lizosomalnej karboksypeptydazy A uwarunkowana jest hydrofobowym charakterem miejsca wiążącego, które stanowi reszta Tyr247, Met430 i Asn305. Wiąże ono hydrofobową resztę aminokwasową znajdującą się w przedostatniej pozycji substratu. Aktywność esterolityczną lizosomalnej karboksypeptydazy A można wykazać przy użyciu estru etylowego karbobenzoksy-tyrozyny, a aktywność amidazową używając amidu benzoilo-fenyloalaniny [21,41-43]. Lizosomalna karboksypeptydaza A nie hydrolizuje hemoglobiny,

Tabela 3. Dipeptydy z zxablokowanym N-końcem i wolną grupą karboksylową na C-końcu jako substraty lizosomalnej karboksypeptydazy A, wg [22,28,31]

Substrat	Źródło lizosomalnej karboksypeptydazy A			
	wątroba szczura	wątroba wołu	wątroba kury	nerka świni
	aktywność, %*			
Z-Glu-Tyr	100	100	100	100
Z-Phe-Leu	-	7143	12500	-
Z-Phe-Tyr	61	4936	11889	-
Z-Phe-Ala	-	2972	4400	1850
Z-Ala-Leu	-	1386	3038	-
Z-Phe-Phe	-	-	-	648
Z-Glu-Phe	-	-	136	475
Z-Phe-Pro	-	-	-	333
Z-Phe-Gly	271	50	50	-
Z-Leu-Gly	130	129	125	-
Z-Gly-Phe	64	100	138	70
Z-Ala-Glu	-	107	50	-
Z-Gly-Leu	64	57	57	50
Z-Gly-Met	46	-	-	-
Z-Gly-Ala	-	-	-	35
Z-Gly-Tyr	19	-	-	26
Z-Ile-Gly	-	21	25	-
Z-Gly-Gly	5	50	13	-
Z-Gly-Arg	5	-	-	-
Z-Gly-Pro	0,5	-	-	5,9
Z-Gly-Glu	0,5	-	-	-
Z-Pro-Gly	0	-	-	-

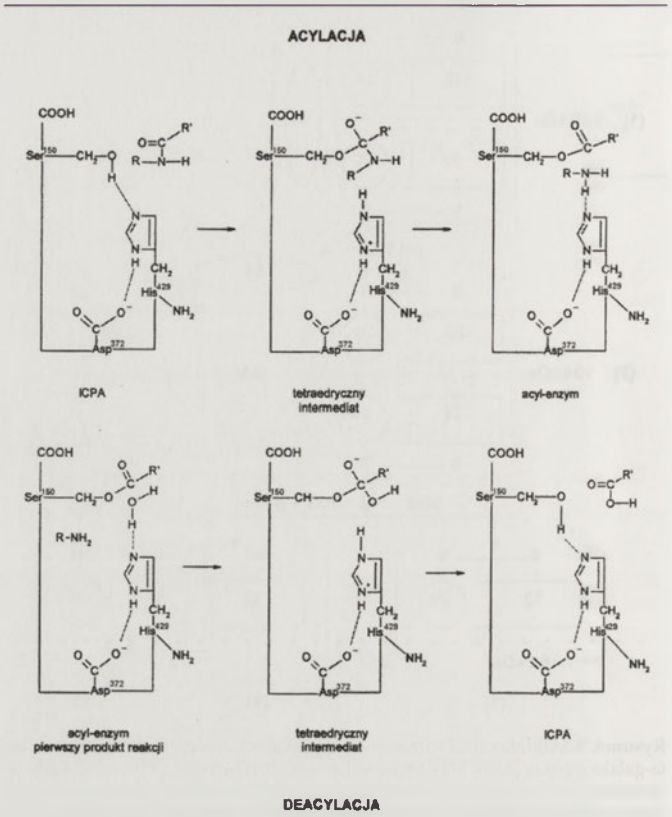
* - za 100% przyjęto aktywność oznaczoną przy użyciu Z-Glu-Tyr

http://rcin.org.pl

mioglobiny, gamma-globuliny, albuminy, cytochromu C i histonów [40,44,45]. Rozkłada jednak produkty degradacji tych białek powstające w wyniku działania katepsyny D i innych endopeptydaz [4,5,42,46,47].

MECHANIZM DZIAŁANIA

Triada katalityczna lizosomalnej karboksypeptydazy A złożona jest z reszt Ser150, Asp372 i His429. Reszty te są odległe sekwencyjnie, ale zbliżone przestrzennie [14]. Dominujące znaczenie w procesie rozszczepienia wiązania peptydowego ma reszta seryny. Hydroliza wiązania peptydowego katalizowana przez lizosomalną karboksypeptydazę A, podobnie jak w przypadku innych peptydaz serynowych, przebiega w dwóch etapach: acylacji i deacylacji [48]. Na etapie acylacji następuje atak tlenu grupy wodorotlenowej Ser150 na karbonylowy atom węgla hydrolizowanego wiązania peptydowego (Rys. 4). Wiązanie między atomem węgla i tlenem w grupie karbonylowej przekształca się w wiązanie pojedyncze, a atom tlenu uzyskuje ładunek ujemny. Powstaje przejściowy tetraedryczny związek pośredni i następuje przeniesienie protonu z Ser150 na His429. Z His429 proton przenoszony jest z kolei na atom azotu hydrolizowanego wiązania peptydowego, które w wyniku tego zostaje rozerwane. Aminowa część substratu wiąże się wiązaniem wodorowym z His429, a kwasowa - wiązaniem estrowym z Ser150. Odłączenie pierwszego produktu reakcji (z wolną grupą aminową) kończy etap acylacji. Po oddysocjowaniu aminowej części substratu jego miejsce zajmuje cząsteczka wody. Reszta His429 odciąga proton od cząsteczki wody. Powstała zjonizowana His429 atakuje karbonylowy atom węgla grupy acylowej, połączonej z Ser150. Podobnie jak to miało miejsce w procesie acylacji, powstaje przejściowy tetraedryczny związek pośredni. Po uwolnieniu drugiego produktu reakcji (z wolną grupą karboksylową) odtwarzany jest enzym, który uczestniczy w następnym cyklu katalizy.



Rysunek 4. Mechanizm działania lizosomalnej karboksypeptydazy A (ICPA), wg [48]. Objaśnienia w tekście.

ZNACZENIE W FIZJOLOGII I PATOLOGII

Lizosomalna karboksypeptydaza A jest białkiem wielofunkcyjnym. Wykazuje aktywność enzymatyczną: karboksypeptydazową w pH 5,0-5,5 oraz amidazową i esterazową w pH 7,0, a także pełni rolę ochronną względem niektórych glikozydaz [13,27,54-56]. Głównym zadaniem biologicznym

INHIBITORY

Aktywność karboksypeptydazy A, jako peptydazy serynowej, hamuje diizopropylofluorofosforan i 3,4-dichloroizokumaryna [49]. Hamują ją także blokery grup sulfhydrylowych takie jak fluorek 4-aminofenylometylosulfonylu, kwas p-chlorortęciobenzoesowy, kwas marsalowy i kationy Hg^{2+} [40,41,50] oraz laktacystyna, chymostatyna, ebelakton B i antypaina [51,52]. Nie poznano dotychczas endogennych inhibitorów lizosomalnej karboksypeptydazy A. Wpływ różnych inhibitorów na aktywność peptydazową, esterazową i amidazową lizosomalnej karboksypeptydazy A podany jest w tabeli 4. Pepstatyna, leupeptyna i fosforoamidon nie hamują aktywności tej karboksypeptydazy [41,53].

Tabela 4. Hamowanie aktywności peptydazowej (furyloakrylooil-Phe-Phe, pH 5,5), esterazowej (Z-Tyr-OEe, pH 7,0) i amidazowej (DLE- NH_2, pH 7,0) lizosomalnej karboksypeptydazy A [21]

Inhibitor		Hamowanie aktywności, %		
nazwa	stężenie mmol/l	peptydazowej	esterazowej	amidazowej
Diizopropylofluorofo-sforan	1	100	100	100
Z-Gly-Leu- Phe-CH_2Cl	0,1	100	90	100
Chymostatyna	0,1	85	15	76
Kwas p-chlorortęcio--fenylosulfonowy	1	75	98	94
Chlorek rtęciowy	0,01	70	88	75
Tos-Phe-chlorometyloketon	0,1	32	40	77
Leupeptyna	0,1	26	36	25
N-etylomaleimid	1	25	19	9
Trans-epoksydulcynylo-L-leucyloamido-(3-metylo)butan	0,2	10	14	17
Jodoacetamid	1	15	2	11
Tos-Lys-chlorometylo-keton	0,1	2	11	0
Octan kadmu	0,01	5	1	8
Sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego	0,1	12	0	0

http://rcin.org.pl

lizosomalnej karboksypeptydazy A jest współudział w degradacji zużytych białek komórkowych, po ich fragmentacji przez endopeptydazy.

Lizosomalna karboksypeptydaza A uczestniczy także w ograniczonej proteolizie biologicznie czynnych peptydów, zwłaszcza działających na naczynia krwionośne i centralny układ nerwowy. W procesie tym funkcjonuje lizosomalna karboksypeptydaza A występująca w osoczu krwi i w płynach ustrojowych, do których uwalniana jest z płytek krwi i z limfocytów oraz z komórek różnych tkanek i narządów w wyniku egzocytozy ciałek resztkowych i rozpadu na skutek fizjologicznego zużycia. Uwolniona lizosomalna karboksypeptydaza A może wiązać się z błoną komórkową [13]. Biologicznie czynne peptydy degradowane przez lizosomalną karboksypeptydazę A wymienione są w tabeli 5 i tabeli 6. Ze znaczną szybkością peptydaza ta odszczepia C-końcową resztę tryptofanu od endoteliny I [57-59]. W wyniku odszczepienia C-końcowej reszty Leu i His konwertuje angiotensynę I do angiotensyny II [60-62] i inaktywuje angiotensynę II [63]. Odszczepia C-końcową resztę argininową od bradykininy [45]. Odszczepia także niewielkie ilości C-końcowej leucyny od Leu-enkefaliny-Phe-Leu. Ze znaczną szybkością odszczepia jednak C-końcową leucynę od Z-Phe-Leu. Wskazuje to, że podatność na hydrolizę fragmentu peptydu zależna jest od jego całkowitej struktury. Lizosomalna karboksypeptydaza A odszczepia C-końcową fenyloalaninę od Met-enkefaliny-Arg6-Phe7 [64-66]. Odszczepia też sekwencyjnie aminokwasy C-końcowe od formy amidowej i od formy kwasowej substancji P [67]. Lizosomalna karboksypeptydaza A uwalnia C-końcową amidowaną glicynę (Gly-NH_2) od formy amidowej oksytocyny, a także resztę C-końcową glicyny od formy kwasowej tego peptydu. Bardzo wolno odłącza grupę aminową od formy amidowej wazopresyny, a forma kwasowa tego peptydu nie jest w ogóle wrażliwa na jej działanie. Lizosomalna karboksypeptydaza A odszczepia kolejno pięć C-końcowych aminokwasów od glukagonu [68] i C-końcową alaninę od łańcucha B insuliny [45,69]. Peptydaza ta uwalnia resztę fenyloalaniny od syntetycznego czynnika chemotaktycznego f-Met-Leu-Phe [70]. Skompleksowanie lizosomalnej karboksypeptydazy A z pro-beta-galaktozydazą umożliwia aktywację prekursora beta-glalitozydazy [71] i chroni ją przed degradacją i inaktywacją proteolityczną [55,56,72,73]. Dziedziczny niedobór lub mutacje punktowe sekwencji aminokwasowej lizosomalnej karboksypeptydazy A (Q21R, S23Y, W37R, S61L, V104M, L208P, Y221N, Y365C, M378T, G411S, F412V) uniemożliwiają powstawanie formy dimerycznej i kompleksów z glikozydazami [54,74-76]. Degradacja i inaktywacja beta-galaktozydazy i neuraminidazy powoduje wtórny niedobór tych enzymów, co prowadzi do nagromadzenia się galaktozaminoglikanów i sialoglikosacharydów i do choroby spichrzeniowej - galaktosialidozy [77-83]. Degradacji beta-galaktozydazy dokonują katepsyny cysteinowe. Inhibitor tych katepsyn - leupeptyna hamuje ten proces [84,85]. Obniżenie aktywności lizosomalnej karboksypeptydazy A obserwuje się w dystrofii mięśni [86,87] i w stwardnieniu rozsianym [26].

Tabela 5. Działanie lizosomalnej karboksypeptydazy A na biologicznie czynne peptydy, wg [28]

Peptyd	Sekwencja aminokwasowa	Aktywność %
Endotelina I	Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys- Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-OH	100
Angiotensyna I	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH	9,5
Bradykinina	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH	6,1
Leu-enkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH	<0,5
Substancja P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH_2	3,8
Substancja P (forma kwasowa)	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-OH	21,6
Oksytocyna	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH_2	4
Oksytocyna (forma kwasowa)	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-OH	10,4
Wazopresyna (forma zasadowa)	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly- NH_2	<0,5
Wazopresyna (forma kwasowa)	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-OH	0

▼ - rozszczepiane wiązanie; za 100% przyjęto aktywność względem endoteliny I;
aktywność peptydazową oceniano w pH 5,5; aktywność amidazową oceniano w pH 7,0

http://rcin.org.pl

Tabela 6. Działanie lizosomalnej karboksypeptydazy A na biologicznie czynne peptydy, wg [21]

Peptyd	Sekwencja aminokwasowa
Eledoizyna	▼ ▼ ▼ pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH_2 Δ
Neurokinina A	▼ His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH_2 Δ
D-Ala2-Leu5-enkefalinamid	▼ Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-NH_2 Δ
D-Ala2-Met5-enkefalinamid	▼ Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Met-NH_2 Δ
Angiotensyna II	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH*
Polipeptyd trzustkowy (31-36)	Leu-Thr-Arg-Pro-Arg-Tyr-NH_2*
Metorfinamid	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Arg-Val-NH_2*
Met-enkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH*

Działanie w pH: ▼ - 5,5, Δ - 7,0 ; * - aktywność śladowa, lub brak aktywności.

OZNACZANIE STĘŻENIA I AKTYWNOŚCI

Ilościowego oznaczenia stężenia lizosomalnej karboksypeptydazy A w homogenatach tkankowych i w płynach ustrojowych dokonuje się przy użyciu specyficznych przeciwciał, techniką immunoenzymatyczną ELISA lub Western blot [33,88,89]. Przy użyciu przeciwciał można także dokonać lokalizacji komórkowej i tkankowej tej peptydazy metodą immunohistoenzymatyczną [89]. O ekspresji lizosomalnej karboksypeptydazy A wnioskuje się także na podstawie wyizolowania i oznaczenia ilościowego specyficznego mRNA [90]. Aktywność lizosomalnej karboksypeptydazy A oznacza się przy użyciu Z-Phe-Tyr, Z-Phe-Leu lub Z-Phe-Ala, w obecności 0,5 mol/l sacharozy i 0,1 mol/l KCl jako stabilizatora [22,91,92]. Ilość uwolnionego C-końcowego aminokwasu oznacza się metodą ninhydrynową [93]. Można także się posłużyć FA-Phe-Phe, śledząc rozkład tego substratu przez pomiar absorbancji przy 330 nm [92,94]. Aktywność esterazową lizosomalnej karboksypeptydazy A oznacza się przy użyciu Z-Glu-Tyr-OEe [39]. Enzymatyczna hydroliza wiązania estrowego powoduje uwalnianie grup karboksylowych, które miareczkuje się mianowanym roztworem NaOH wobec wskaźnika lub potencjometrycznie. Do oznaczenia aktywności amidazowej lizosomalnej karboksypeptydazy A używa się Z-Ser-Tyr-NH_2 [49]. Uwolniony amoniak oznacza się przy użyciu odczynnika Nesslera. Aktywność lizosomalnej karboksypeptydazy B oznacza się przy użyciu dipeptydów mających C-końcowe aminokwasy zasadowe: Z-Gly-Arg, Z-Gly-Lys, po aktywacji związkami sulfhydrolowymi [95]. Do oznaczania aktywności lizosomalnej karboksypeptydazy C służą peptydy zawierające resztę prolilową w przedostatniej pozycji od C-końca, takie jak Z-Pro-Phe i Z-Pro-Val [6].

ZAKOŃCZENIE

Jak wynika z dokonanego przeglądu literatury biosynteza, potranslacyjne modyfikacje, transport i aktywacja lizosomalnej prokarboksypeptydazy A odbywa się według schematu dotyczącego także innych peptydaz lizosomalnych. W odróżnieniu od innych peptydaz lizosomalnych, lizosomalna karboksypeptydaza A jest peptydazą wielofunkcyjną. Współuczestnicząc w zachodzącej w lizosomach degradacji białek i peptydów pełni funkcje kataboliczne. Dokonując ograniczonej degradacji biologicznie czynnych peptydów w płynach ustrojowych i tkankach pełni funkcję regulatorową. Pełni także rolę ochronną tworząc międzycząsteczkowe kompleksy z glikozydazami, co czyni je niewrażliwymi na degradację i inaktywację proteolityczną. Struktura, specyficzność substratowa i mechanizm działania lizosomalnej karboksypeptydazy A tkanek zwierzęcych jest bardzo podobna do serynowych karboksypeptydaz niższych organizmów, takich jak karboksypeptydaza Y drożdży i karboksypeptydaza II ziarna pszenicy [13,96].

PIŚMIENNICTWO

1. Seglen PO, Bohley P (1992) Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. Experientia 48: 158-172
2. Pillay CS, Elliott E, Dennison C (2002) Endolysosomal proteolysis and its regulation. Biochem J 363: 417-430
3. Bohley P, Seglen PO (1992) Proteases and proteolisis in the lysosome. Experientia 48: 151-157
4. Goettlich-Riemann W, Young JO, Tappel AL (1971) Cathepsin D, A and B and the effect of pH in the pahway of protein hydrolizys. Biochem Biophys Acta 243: 137-146
5. Iodice AA, Leong V, Weinstockl M (1966) Separation of cathepsins A and D of skeletal muscle. Arch Biochem Biophys 117: 477-486
6. Mc Donald JK (1985) An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. Histochem J 17: 773-785
7. Lynn KR, Labow RS (1984) A comparison of four sulfhydryl cathepsins (B, C, H, and L) from porcine spleen. Can J Biochem Cell Biol 62: 1301-1308
8. Skidgel RA, Erdös EG (1998) Cellular carboxypeptidases. Immunol. Immunol Rev 161: 129-141
9. Tomkinson B (1999) Tripeptidyl peptidase: enzymes that count. TIBS 24: 355-359
10. Pshezhetsky AV (1998) Lysosomal carboxypeptidase A, W: Barret AJ Rawlings ND, Woessner JF (red) Handbook of proteolytic enzymes Academic Press, San Diego, str. 393-398
11. Shimmoto M, Nakahori Y, Matsuhita I, Shinaka T, Kuroki Y, Itoh K, Sakuraba H (1996) A human protective protein gene partially overlaps the gene encoding phospholipid transfer protein on the complementary strand of DNA. Biochem Biophys Res Commun 220: 803-806

http://rcin.org.pl

12. Morreau H, Galjart NJ, Willemsen R, Gillemans N, Zho XY, d'Azzo A (1992) Human lysosomal protective protein. Glycosylation, intracellular transport, and association with β-galactosidase in the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 267: 17949-17956
13. Ostrowska H, Gacko M (1998) Cellular serine carboxypeptidases. Rocz AMB 43: 39-55
14. Rudenko G, Bonten E, d'Azzo A, Hol WGJ (1995) Three-demensional structure of the human protective protein: structure of the precursor form suggests a complex activation mechanism. Structure 3: 1249-1259
15. Von Figura K, Hasilik A (1986) Lysosomal enzymes and their receptors. Ann Rev Biochem 55: 167-182
16. Gacko M, Głowiński S (1998) Activities of proteases in parietal thrombus of aortic aneurysm. Clin Chim Acta 271: 171-177
17. Gacko M, Worowska A, Głowiński S (1998) Activity of lysosomal carboxypeptidases in aneurysmal aortic wall. Bull Pol Acad Sci 46: 15-20
18. Hanna WL, Turbov JM, Jackman HL, Tan F, Froelich CJ (1994) Dominant chymotrypsin-like esterase activity in human lymphocyte granules is mediated by the serine carboxypeptidase called cathepsin A- like protective protein. J Immunol 153: 4663-4672
19. Bowen DM, Davison AN (1973) Cathepsin A in human brain and spleen. Biochem J 131: 1973, 417-419
20. Doi E, Kawamura Y, Matoba T, Hata T (1974) Cathepsin A of two different molecular sizes in pig kidney. J Biochem 75: 889-894
21. Jackman HL, Tan F, Tamei H, Beurling-Harburg C, Li XY, Skidgel RA, Erdös EG (1990) A peptidase in human platelets that deamidates tachykinins. J Biol Chem 265: 11265-11272
22. Kawamura Y, Matoba T, Hata T, Doi E (1974) Purfication and some properties of cathepsin A of largemolecular size from pig kidney. J Biochem 76: 915-924
23. Kawamura Y, Matoba T, Hata T, Doi E (1975) Purification and some properties of cathepsin A of small molecular size from pig kidney. J Biochem 77: 729-737
24. Kawamura Y, Matoba T, Hata T, Doi E (1977) Substrate specificities of cathepsin A, L and A,S from pig kidney. J Biochem 81: 435-441
25. Beese J, Farr W, Grüner E, Haschen RJ (1966) Proteolitysche enzyme in normalen menschlichen blutplättchen. Klin Wsch 44: 1049-1053
26. Bowen DM, Davison AN (1974) Macrophages and cathepsin A activity in multiple sclerosis brain. J Neurol Sci 21: 1974, 227-231
27. Ostrowska H, Krukowska K, Kalinowska J, Orłowska M, Lengiewicz J (2003) Lysosomal high molecular weight multienzyme complex. Cell Molec Biol Lett 8: 19-24
28. Hiraiwa M (1999) Cathepsin A / protective protein: on unusual lysosomal multifunctional protein. Cell Mol Life Sci 56: 894-907
29. Miller JJ, Changaris DG, Levy RS (1992) Purification subunit structure and inhibitory profile of cathepsin A. J Chromatogr 627: 153-162
30. Pshezhetsky AV, Potier M (1994) Direct affinity purification and supramolecular organization of human lysosomal cathepsin A. Arch Biochem Biophys 313: 64-70
31. Hiraiwa M, Saitoh M, Arai N, Shiraishi T, Odani S, Uda Y (1997) Protective protein in the bovine lysosomal β-galactosidase complex. Biochem Biophys Acta 1341: 189-199
32. Doi E (1974) Stabilisation of pig kidney cathepsin A by sucrose and chloride ion, and inhibition of the enzyme activity by diisopropyl fluorophosphate and sulfhydryl reagents. J Biochem 75: 881-887
33. Bonten EJ, Galjart NJ, Willemsen R, Usmany M, Vlak JM, d'Azzo A (1995) Lysosomal protective protein cathepsin A: role of the ' linker ' domain in catalytic activation. J Biol Chem 270: 26441-26445
34. Rudenko G, Bonten E, Hol WGJ, d'Azzo A (1998) The atomic model of the human protective protein cathepsin. Proc Natl Acad Sci USA 95: 621-625
35. Rudenko G, Bonten E, d'Azzo A, Hol WGJ (1996) Structure determination of the human protective protein: twofold averaging reveals the three-dimensional structure of a domain which was entirely absent in the initial model. Acta Cryst D52: 923-936
36. Randall A, Skidgel EG, Erdos EG (1998) Cellular caroxypeptidases. Immunol Rev 161: 129-141
37. Pshezhetsky AV, Elsliger MA, Vinogradova MV, Potier M (1995) Human lysosomal β-galactosidase-cathepsin A complex: definition of the β-galactosidase binding interface on cathepsin A. Biochemistry 34: 2431-2440
38. Pshezhetsky AV, Potier M (1993) Stoichiometry of the human lysosomal carboxypeptidase-β-galactosidase complex. Biochem Biophys Res Commun 195: 354-362
39. Logunov AI, Orekhovich VN (1972) Isolation and some properties of cathepsin A from bovine spleen. Biochem Biophys Commun 46: 1161-1168
40. Taylor SL, Tappel AL (1974) Characterization of rat liver lysosomal cathepsin A1. Biochim Biophys Acta 341: 112-119
41. Ioth K, Takiyama N, Kase R, Kondoh K, Sano A, Oshima A, Sakuraba H, Suzuki Y (1993) Purification and characterization of human lysosomal protective protein expressed in stably transformed Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem 268: 1180-1186
42. Marks N, Grynbaum A, Benuck M (1976) On the sequencial cleavage of myelin basic protein by cathepsin A and D. J Neurochem 27: 765-768
43. Matsuzaki H, Ueno H, Hayashi R, Liao TH (1998) Bovine spleen cathepsin A: characterization and comparison with the protective protein. J Biochem 123: 701-706
44. Logunov AI, Orekhovich VN (1972) Substrate specificity of cathepsin A and its behaviour toward inhibitors. Biochemistry USSR (Engl Transl) 37: 888--892
45. Matsuda K (1976) Studies on cathepsins of rat liver lysosomes.III. Hydrolysis of peptides and inactivation of angiotensin and bradykinin by cathepsin A. J Biochem 80: 659-669
46. Kussendrager KD, Jong Y, Bouma JMW, Gruber M (1972) The degradation of the β chain of oxidised insulin by extracts of rat liver lysosomes. Biochem Biophys Acta 279: 75-86
47. Shibko S, Tappel AL (1965) Rat-kidney lysosomes: isolation and properties. Biochem J 95: 731-741
48. Nduwimana J, Guenet L, Dorval I, Blayau M, LeGall JY, LeTreut A (1995) Proteases. Ann Biol Clin 53: 251-255
49. Chikuma T, Matsumoto K, Furukawa A, Nakayama N, Yajima R, Kato T, Ishii Y, Tanaka A (1996) A fluorometric assay for measuring deamidase (lysosomal protective protein) using high-performance liquid chromatography. Anal Biochem 233: 36-41
50. Tranchemontagne J, Michaud L, Potier M (1990) Deficient lysosomal carboxypeptidase activity in galactosialidosis. Biochem Biophys Res Commun 168: 22-29
51. Ostrowska H, Wójcik C, Omura K, Worowski K (1997) Lactacystin a specific inhibitor of the proteasome, inhibits human platelet lysosomal cathepsin A--like enzyme. Biochem Biophys Res Commun 234: 729-732
52. Suda H, Aoyagi T, Hamada M, Takeuchi T, Umezawa H (1972) Antipain, a new protease inhibitor isolated from actinomycetes. J Antybiot 25: 263--266
53. Matsuda K, Misaka E (1975) Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. II. Comparative studies on multiple forms of cathepsin A. J Biochem 78: 31-39
54. Pshezhetsky AV, Ashmarina M (2001) Lysosomal multienzyme complex: biochemistry, genetics, and molecular pathophysiology. Progr Nucl Acid Res Mol Biol 69: 81-114
55. Van der Spoel A, Bonten E, d'Azzo A (1998) Transport of human lysosomal neuraminidase to mature lysosomes requires protective protein cathepsin A. EMBO J 17: 1588-1597
56. Verhijen F, Palmeri S, Hoogeveen AT, Galjaard H (1985) Human placental neuraminidase: activation, stabilization and association with β-galactosidase and its 'protective' protein. J Biochem 149: 315-321
57. Ioth K, Kase R, Shimmoto M, Satake H, Suzuki Y (1995) Protective protein as an endogenous endothelin degradation enzyme in human tissues. J Biol Chem 270: 515-518
58. Jackman HL, Morris PW, Deddish PA, Erdos EG (1992) Inactivation of endothelin I by deamidase(lysosomal protective protein). J Biol Chem 267: 2872--2875
59. Jackman HL, Morris PW, Rabito SF, Johansson GB, Skigel RA, Erdös EG (1993) Inactivation of endothelin-1 by an enzyme of the vascular endothelial cells. Hypertension 21: 925-928
60. Jackman HL, Massad MG, Sehosan M, Tan F, Brovkovych V, Marcie BM, Erdos EG (2002) Angiotensin 1-9 and 1-7 release in human heart- role of cathepsin A. Hypertension 39: 976-981
61. Miller JJ, Changaris DG, Levy RS (1988) Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cathepsin A isoenzymes of porcine kidney. Biochem Biophys Res Commun 154: 1122-1129

http://rcin.org.pl

62. Snyder RA, Watt KWK, Wintrub U (1985) A human platelet angiotensin I processing system. J Biol Chem 260: 7857-7860
63. Grynbaum A, Marks N (1976) Characterisation of a rat brain catheptic carboxypeptidase (cathepsin) inactivating angiotensin-II. J Neurochem 26: 313--318
64. Marks N, Sachs L, Stern F(1981) Conversion of Met-enkephalin-Arg6-Phe7 by a purified brain carboxypeptidase (cathepsin A). Peptides 2: 159-164
65. Rossier J, Audigier N, Ling N, Cros J, Udenfriend S (1995) Met-enkephalin-Arg6-Phe7. Presence in high amounts in brain of rat, cattle and man, is an opioid agonist. Nature 288: 88-90
66. Stern AS, Lewis RV, Kimura S, Rossier J, Gerber LD Brink L (1979) Isolation of the opioid heptapeptide Met-enkephalin (Arg6, Phe7) from bovine adrenal medullary granules and striatum. Proc Natl Acad Sci USA 76: 6680-6683
67. Pernow B (1983) Substance P. Pharmacol Rev 35: 85-141
68. Iodice AA (1967) The carboxypeptidase nature of cathepsin A. Arch Iochem Biophys 121: 241-242
69. Bohley P (1987) Intracelular proteolisis, W: Neuberger K, Brocklehurst K (red) Hydrolitic enzymes. Elsevier, Sci. Publ. Amsterdam, str. 307-331
70. Jackman HL, Tan F, Schraufnagel D, Dragovic T, Dezso B, Becker RP, Erdös EG (1995) Plasma membrane-bound and lysosomal peptidases in human alveolar macrophages. Am J Resp Cell Mol Biol 13: 196-204
71. Okamura-Oho Y, Zhand S, Hilson W, Hinek A, Callahan JW(1996) Early proteolytic cleavage with loss of a C-terminal fragment underlies altered processing of the β-galactosidase precursor in galactosialidosis. Biochem J 313: 787-794
72. Potier M, Michaud L, Tranchemontagne J, Thauvette L (1990) Structure of the lysosomal neuraminidase-β-galactosidase-carboxypeptidase multimeric complex. Biochem J 267: 197-202
73. Pshezhetsky AV, Potier M (1996) Association of N-acetyl-galactosamine-6-sulfate sulfatase with the multienzyme lysosomal complex of β-galactosidase, cathepsin A and neuraminidase: possible implication for intralysosomal catabolism of keratan sulfate. J Biol Chem 271: 28359-28365
74. Richard C, Tranchemontagne J, Elsliger MA, Mitchell GA, Potier M, Pshezhetsky AV (1998) Molecular pathology of galaktosialidosis in a patient affected with two new frameshift mutations in the cathepsin A protective protein gene. Hum Mutation 11: 461-469
75. Shimmoto M, Fukuhara Y, Itoh K, Oshima A, Sakuraba H, Suzuki Y (1993) Protective protein gene mutations in galactosialidosis. J Clin InvesT 91: 2393--2398
76. Zhou XY, Galjart NJ, Willemsen R, Gillemans N, Galjaard H (1991) A mutation in a mild form of galactosialidosis impairs dimerization of the protective protein and renders it unstale. EMBO J 10: 4041-4048
77. D'Agrosa R, Hubbes M, Zhang S, Shankaran R, Callahan JW (1992) Characteristics of the β-galactosidase-carboxypeptidase complex in GMl-gangliosidosis and β-galactosialidosis fibroblasts. Biochem J 285: 833-838
78. d¢Azzo A, Andria G, Strisciuglio P, Galijaard H (1995) Galactosialidosis, W: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (red) Mc Graw-Hill, New York, str. 2835-2837
79. d¢Azzo A, Hoogeveen AT, Reuser JJ, Robinson H, Galjaard H (1982) Molecular defect in combined β-galactosidase and neuraminidase deficiency in man. Proc Natl Acad Sci USA 79: 4535-4539
80. Kase R, Itoh K, Takiyama N, Oshima A, Sakuraba H, Suzuki Y (1990) Galactosialidosis: simultaneous deficiency of esterase, carboxy-terminal deamidase and acid carboxypeptidase activities. Biochem Biophys Res Commun 172: 1175-1179
81. Neufeld EF (1991) Lysosomal storage diseases. Am Rev Biochem 60: 257-280
82. Schiffmann R, Brady RO (2002) New prospects for the treatment of lysosomal storage diseases. Drugs 62: 733-742
83. Zhou XY, van der Spoel A, Rottier R, Hale G., Willemsen R, Berry GT (1996) Molecular and biochemcal-analysis of protective protein cathepsin A mutations: correlation with clinical severity in galactosialidosis. Hum Mol Genet 5: 1977-1987
84. Hoogeveen AT, Verheijen FW, Galjaard H (1983) The relation between human lysosomal β-galactosidase and its protective protein J Biol Chem 258: 12143-12146
85. Suzuki Y, Sakuraba H, Hayashi K, Suzuki K, Imahori K (1981) β-Galactosidase-neuraminidase deficiency: restoration of β-galactosidase activity by protease inhibitors. J Biochem 90: 271-273
86. Iodice AA, WeinstockI M (1965) Cathepsin A in nutritional and hereditary muscular dystrophy. Nature 207: 1102
87. Kar NC, Pearson CM (1976) Arylamidase and cathepsin A activity of normal and dystrophic human muscle. Proc Soc Exp Biol Med 151: 583-586
88. Galjart NJ, Gillemans N, Harris A, Gijsbertus T, van der Horst J, Verheijen FW, Galjaard H., d' Azzo A (1988) Expression of cDNA encoding the human `protective protein` associated with lysosomal β-galactosidase and neuraminidase : homology to yeast proteases. Cell 54: 755-764
89. Satake A, Itoh K, Shimmoto M, Saido TC, Sakuraba H, Suzuki Y (1994) Distribution of lysosomal protective protein in human tissues. Biochem Biophys Res Commun 205: 38-43
90. Galjart NJ, Gillemans N, Meijer D, d¢Azzo A (1990) Mouse ¢protective protein ¢ cDNA cloning, sequence comparison and expression. J Biol Chem 265: 4678-4684
91. Kawamura Y, Matoba T, Doi E (1980) Subunit structure of pig kidney cathepsin A. J Biochem 88: 1559-1561
92. Pshezhetsky AV, Vinogradova MV, Elslige MA, El-Zein F, Svedas VK, PotierM (1995) Continous spectrophotometric assay of human lysosomal cathepsin A/protective protein in normal and galactosialidosis cells. Anal Biochem 230: 303-307
93. Morre S (1968) Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for ninhydrin reaction. J Biol Chem 243: 6281-6283
94. Pshezhetsky AV, Levashov AV, Wiederschain GY (1992) Regulation of the Gm-galactosidase supramolecular structure and catalytic activity in vitro. Biochem Biophys Acta 1122: 154-160
95. Lones M, Chatterjee R, Sing H, Kalnitsky G (1983) Lysosomal carboxypeptidase B from rabbit lung.Purification and characterization. Arch Biochem Biophys 221: 64-78
96. Esliger MA, Pshezhetsky AV, Vinogradova MV, Svedas VK, Potier M (1996) Comparative modeling of substrate binding in the S¢1 subsite of serine carboxypeptidases from yeast, wheat and human. Biochemistry 35: 14899--14909

Lysosomal carboxypeptidase A

Marek Gacko[1]✉, Anna Worowska[1], Arkadiusz Woźniak[1], Monika Jedynak[2], Bogusław Panek[1], Radosław Łapiński[1]

[1]Department of Vascular Surgery and Transplantation, [2]Department of Anesthesiology and Intensive Care, Medical University of Białystok, 24a M. Skłodowska-Curie St., 15-269 Białystok, Poland
✉e-mail: chirnacz@amb.edu.pl;

Key words: Lysosomal carboxypeptidase A, biosynthesis, structure, mechanism of catalysis, biological role

ABSTRACT

Lysosomal carboxypeptidaze A (cathepsin A) is synthetized in the form of preproenzyme, which undergoes to active enzyme as a result of post--translational modification. It splits off C-terminal amino acid residues from peptides and proteins and synergizes with other proteases in degradation of cellular proteins in lysosomes. Lysosomal carboxypeptidaze A has an effect on peptide hormones and peptides of biological activity of tissues and body fluids as well. It forms complexes with some glycosidases that protects them against proteolytic degradation. Deficiency of this enzyme induces storage diseases. Lysosomal carboxypeptidaze A as multifunctional enzyme plays an important regulatory role in organismal metabolism.

http://rcin.org.pl

Roślinne układy ubikwitylacji i degradacji białek w proteasomach – kluczowe elementy hormonalnych szlaków sygnałowych

Stanisław Kowalczyk

Emilia Hadowska✉

Anna Piekarska

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

✉Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń; e-mail: hadowska@uni.torun.pl; tel. (56) 611 45 42

Artykuł otrzymano 2 września 2004
Artykuł zaakceptowano 4 stycznia 2005

Słowa kluczowe: ligazy ubikwitynowe E3, proteasom 26S, proteoliza, fitohormony, sygnalizacja hormonalna

STRESZCZENIE

Układy ubikwitylacji uczestniczą w tworzeniu połączeń między ubikwityną a resztą lizyny w białku przeznaczonym do degradacji w proteasomie. Genom *Arabidopsis thaliana* zawiera ponad 1300 genów (~5% proteomu) kodujących poszczególne elementy układu ubikwityna/proteasom 26S, z tego około 90% genów koduje monomeryczne lub polimeryczne ligazy ubikwitynowe E3 odpowiedzialne za swoiste rozpoznanie białka kierowanego do degradacji. Roślinne ligazy E3 tworzą zróżnicowaną rodzinę białek lub kompleksów białkowych z charakterystycznymi domenami HECT, RING-finger lub U-box. W badaniach roślinnych układów ubikwitylacji szczególne zainteresowanie budzą wielopodjednostkowe ligazy typu SCF uczestniczące m. in. w regulacji hormonalnych szlaków sygnałowych. Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że sygnały hormonalne (auksyny, gibereliny) mogą aktywować ubikwitylację białek represorowych lub mogą chronić określone białka regulatorowe, które przy braku hormonu (w odpowiedzi na etylen, kwas abscysynowy lub brasinosteroidy) są ubikwitylowane i degradowane w proteasomie.

WPROWADZENIE

Ubikwitylacja białek, katalizowana przez układ trzech enzymów oraz zależna od ATP, uważana była przez długi czas jako sposób znakowania uszkodzonych i nieprawidłowo sfałdowanych białek, a także białek o krótkim czasie życia do degradacji w proteasomach 26S. Dzisiaj, po upływie niemal 30 lat od odkrycia ubikwityny, wiemy, że poli- i monoubikwitylacja białek pełni również szereg innych funkcji niezwiązanych z proteolizą. Poliubikwitylacja może być sygnałem w aktywacji kinaz białkowych, w endocytozie białek zlokalizowanych w błonie komórkowej, a także w naprawie DNA [1-3]. Mono- i diubikwitylacja nie jest sygnałem do degradacji, natomiast odgrywa rolę w internalizacji receptorów, sortowaniu pęcherzyków błonowych, w regulacji transkrypcji, w naprawie DNA i w wyciszaniu genów [1-3]. W ostatnich latach opublikowano szereg artykułów przeglądowych w języku polskim, w których omówiono różne zagadnienia związane z układem ubikwityna/proteasom 26S w drożdżach i w komórkach zwierzęcych [4-7]. Niniejsza praca jest próbą podsumowania najważniejszych osiągnięć w badaniach układów ubikwitylacji i proteasomalnej degradacji białek w roślinach. Rola tych układów w regulacji procesów wzrostu i rozwoju roślin jest obecnie intensywnie badana. Selektywna ubikwitylacja białek jawi się tu jako kluczowy element szlaków sygnałowych aktywowanych przez roślinne hormony. Spektakularne osiągnięcia, jakie odnotowano na tym polu, dają podstawę do przypuszczeń, że badania związane z hormonalną regulacją proteolizy nie tylko dostarczą odpowiedzi na wiele kluczowych pytań dotyczących funkcjonowania fitohormonów, ale także umożliwią poznanie wzajemnych związków między szlakami sygnałowymi aktywowanymi przez różne czynniki biotyczne i abiotyczne [8-12].

ROŚLINNE UKŁADY UBIKWITYLACJI I DEGRADACJI BIAŁEK W PROTEASOMACH

GENY *A. thaliana* KODUJĄCE UBIKWITYNĘ I BIAŁKA UBIKWITYNOPODOBNE

Ubikwityna (Ub) *A. thaliana*, różniąca się tylko dwiema resztami aminokwasowymi od ubikwityny drożdży i trzema od ubikwityny kręgowców, kodowana jest przez rodzinę 14 genów *UBQ* dzielącą się na trzy podrodziny [13]. Geny poliubikwitynowe tworzące pierwszą podrodzinę (*UBQ3*, *UBQ4*, *UBQ10*, *UBQ11*, *UBQ14*) różnią się między sobą liczbą jednostek kodujących ubikwitynę; na przykład *UBQ11* ma ich trzy, a *UBQ10* sześć [13,14]. Geny drugiej podrodziny (*UBQ7*, *UBQ8*, *UBQ9*, *UBQ12*) mają od dwóch do ośmiu sekwencji kodujących ubikwitynę bądź polipeptydy do niej podobne. Na przykład białko kodowane przez drugie powtórzenie w *UBQ7* jest identyczne z ubikwityną zaledwie w 57%, podczas gdy podobieństwo innych polipeptydów sięga nawet 99% [13,15]. Jedna z jednostek genu *UBQ7* koduje białko RUB1 (ang. *related to Ubiquitin1*) uczest-

Wykaz skrótów: ARF (ang. *auxin response factor*) – czynnik odpowiedzi na auksynę; AUX/IAA – białka represorowe kodowane przez geny pierwotnych odpowiedzi na auksynę; CAND1 (ang. *cullin associated and neddylation dissociated 1*) – białko uczestniczące w regulacji ligaz SCF; LRR (ang. *leucine-rich repeat*) – powtórzenia motywu bogatego w reszty leucyny; PUB (ang. *plant U-box protein*) – ligaza z domeną U-box; RUB1 (ang. *related to ubiquitin 1*) – białko ubikwitynopodobne; SCF (ang. *Skp1-cullin-F-box proteins*) – kompleks ligazy ubikwitynowej; *UBA* – gen kodujący enzym E1 aktywujący ubikwitynę; *UBC* – gen kodujący enzym koniugujący E2; UPL (ang. *ubiquitin protein ligase*) – ligazy ubikwitynowe z domeną HECT

http://rcin.org.pl

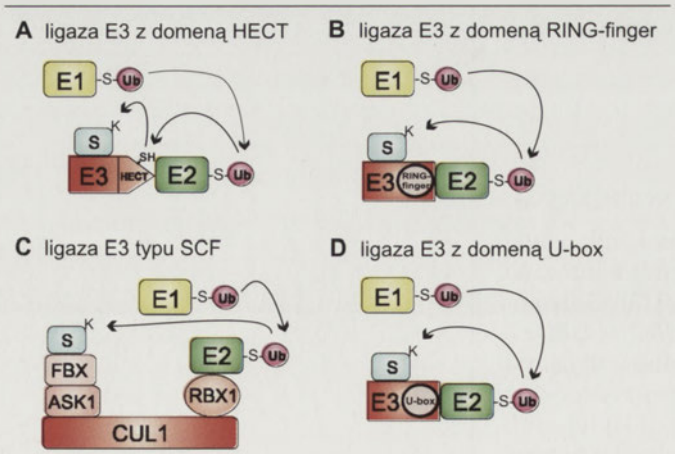
niczące w regulacji aktywności ligazy ubikwitynowej SCF. Produktami genów ubikwitynowych trzeciej podrodziny są polipeptydy, z których odcinana jest ubikwityna oraz małe białka rybosomalne [13,16]. Wszystkie czternaście genów *UBQ A. thaliana* zawiera w sumie 30 jednostek kodujących ubikwitynę, chociaż na razie nie wiadomo, czy wszystkie jednostki ulegają ekspresji.

Ubikwityna charakteryzuje się globularną strukturą stabilizowaną wiązaniami wodorowymi, z wystającym poza kłębuszek fragmentem C-końcowym, w którym końcowa reszta glicyny tworzy wiązanie izopeptydowe z grupą aminową położoną przy węglu ε lizyny w białku substratowym lub z resztą lizyny w innej cząsteczce ubikwityny. Bardzo podobną strukturę ma także wspomniane białko RUB1 oraz różniące się od niego tylko jedną resztą aminokwasową białko RUB2 kodowane przez jedno z powtórzeń genu *UBQ15* [13,15]. Białko RUB3, identyczne tylko w 77% z pozostałymi dwoma białkami RUB, kodowane jest przez odrębny gen [15,17]. Na razie jedynie funkcja RUB1 została częściowo poznana, a hipotezy dotyczące funkcji białek RUB2 i RUB3 oczekują na doświadczalną weryfikację.

ENZYMY UCZESTNICZĄCE W UBIKWITYLACJI BIAŁEK

Przyłączenie ubikwityny do białka substratowego poprzedzone jest reakcją aktywacji ubikwityny katalizowaną przez enzym aktywujący E1. W pierwszym etapie dochodzi do utworzenia ubikwitylo-adenylanu (Ub-AMP), a następnie powstaje wiązanie tioestrowe między ubikwityną a resztą zachowanej w ewolucji cysteiny w centrum katalitycznym E1. Ubikwityna, która uległa aktywacji, zostaje przeniesiona na resztę cysteiny w enzymie koniugującym E2, skąd ligaza ubikwitynowo-białkowa E3 przenosi ją na białko substratowe [2,18].

Genom *A. thaliana* zawiera dwa geny (*UBA1*, *UBA2*) kodujące izoformy enzymu aktywującego E1, których sekwencja aminokwasowa jest identyczna w 81% [19]. Wykazano, że ekspresja obu genów *UBA* zachodzi we wszystkich badanych tkankach. Izoformy enzymu koniugującego E2, kodowane przez 37 genów *UBC*, można zidentyfikować na podstawie zachowanej w ewolucji, zbudowanej ze 150 reszt aminokwasowych domeny katalitycznej UBCC z resztą cysteiny w centrum aktywnym [17,20]. Niektóre z enzymów UBC mają tylko domenę UBCC (podklasa 1). Inne w części C-końcowej mają dodatkowo domenę transbłonową, o charakterze kwaśnym bądź zasadowym (podklasa 2), a pozostałe UBC mają zróżnicowanej długości rejon w N-końcu (podklasa 3) lub krótkie fragmenty po obu stronach domeny UBCC (podklasa 4) [17]. Zróżnicowanie izoform E2 pozostaje w związku z ogromną różnorodnością ligaz ubikwitynowych, z którymi E2 musi swoiście oddziaływać podczas przenoszenia ubikwityny na białko substratowe. Brak mutantów *A. thaliana* z defektami w genach *UBC* utrudnia badanie szczegółowej roli poszczególnych izoform E2. Tylko jedno doniesienie wiąże funkcję UBC19 i UBC20 z ubikwitylacją białek regulujących mitozę przez kompleks ligazy APC/C (ang. *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) [21].



Rysunek 1. Schemat działania ligaz ubikwitynowo-białkowych. A – ligaza z domeną HECT; B – ligaza z domeną RING-finger; C – ligaza typu SCF; D – ligaza z domeną U-box. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [8-10,22--25,27,39,40]).

Najliczniejszą i najbardziej zróżnicowaną grupę enzymów kaskady ubikwitynowej tworzą ligazy ubikwitynowo-białkowe E3. Genom *A. thaliana* zawiera około 1300 genów kodujących białka, które bądź same są ligazami, bądź razem z innymi białkami współtworzą wielopodjednostkowe kompleksy ligaz E3. Więcej niż połowa spośród tych genów koduje białka z tzw. kasetą F, które rozpoznają białka przeznaczone do degradacji i wiążą je do kompleksu ligazy E3 [9-10]. W pracy przeglądowej opublikowanej w Postępach Biologii Komórki omówiono sposób działania oraz funkcje różnych typów ligaz E3 w komórkach zwierzęcych [4]. Podobne zróżnicowanie ligaz ubikwitynowo-białkowych spotykamy także w roślinach.

Najmniej liczną grupę ligaz E3 w *A. thaliana* stanowią białka z domeną HECT (ang. *Homology to E6AP C Terminus*) kodowane przez siedem genów określanych akronimem *UPL* z numeracją od 1 do 7 (ang. *Ubiquitin Protein Ligase*) [22]. We wszystkich ligazach UPL zbudowana z 350 reszt aminokwasowych domena HECT położona jest w części C-końcowej białka, natomiast w rejonie centralnym i w N--końcu występują różne motywy tworzące struktury pośredniczące w rozpoznaniu i wiązaniu białka przeznaczonego do ubikwitylacji [22,23]. W *A. thaliana* wyodrębniono cztery podrodziny ligaz z domeną HECT. Białka UPL1 i UPL2 charakteryzują się występowaniem pojedynczych domen UBA (ang. *Ubiquitin-Associated*) i UIM (ang. *Ubiquitin-Interacting Motif*) w rejonie centralnym cząsteczki, zaś białka UPL3 i UPL4 zawierają domenę utworzoną przez cztery powtórzenia motywu ARM (ARMADILLO). W białku UPL5 występuje domena UBL (ang. *Ubiquitin-Like*) i rejon homologiczny z domeną wiążącą lektynę, podczas gdy w białkach UPL6 i 7 występują domeny wiążące kalmodulinę i domeny transbłonowe [22]. Ligazy UPL jako jedyne tworzą przejściowe wiązanie tioestrowe pomiędzy ubikwityną a resztą zachowanej w ewolucji cysteiny położoną w obrębie domeny HECT (Rys. 1A).

Najliczniejszą i najbardziej zróżnicowaną grupę ligaz E3 stanowią białka z domeną RING-finger (ang. *real Interesting New Gene*) zbudowaną z 70 reszt aminokwasowych, z resztami cysteiny i histydyny wiążącymi dwa jony cynku. Domena RING-finger, pośrednicząca w wiązaniu enzymu E2 (Rys. 1B), różni się od motywu palca cynkowego tym, że tworzą go cztery, a nie dwie pary ligandów wiążących jony

http://rcin.org.pl

cynku. W domenie RING-finger, w której znajduje się tylko jedna reszta histydyny (konfiguracja $C_3H_1C_4$ - RING-HC), jest ona zawsze zlokalizowana w pozycji 4, natomiast w domenie z dwiema resztami histydyny (konfiguracja $C_3H_2C_3$ - RING-H2), występują one w pozycjach 4 i 5 [24]. Genom *A. thaliana* koduje co najmniej 387 białek z typową domeną RING-finger, z czego 111 posiada motyw RING-HC, 214 motyw RING-H2, a w pozostałych białkach domena RING-finger ma zmienioną strukturę [24]. Dzięki wyselekcjonowaniu mutantów *A. thaliana* z defektami w genach kodujących białka z domeną RING-finger poznano funkcję kilku monomerycznych ligaz ubikwitynowych (COP1, CIP8, SINAT5, HOS1, PRT1) [8,9].

Oddzielną grupę ligaz E3 tworzą kompleksy białkowe typu SCF (ang. *Skp1-Cullin-F-box proteins*) złożone co najmniej z czterech podjednostek (Rys. 1C). Rusztowanie dla całego kompleksu tworzy kulina, z której globularnym rejonem C-końcowym wiąże się białko RBX zawierające domenę RING-finger, natomiast z wydłużonym rejonem N-końcowym oddziałuje białko SKP1 wiążące białko z kasetą F [25]. Genom *A. thaliana* zawiera 10 genów kodujących kuliny (*AtCUL*) [26,27], dwa geny *RBX* [28,29], 21 genów *SKP* określanych w przypadku *A. thaliana* akronimem *ASK* [27,30,31] i około 700 genów kodujących białka z kasetą F [27,32].

Rola genów *AtCUL* w cyklu rozwojowym rośliny wydaje się zróżnicowana [26]. Wykazano na przykład, że *AtCUL1* komplementuje mutację *cdc53* w drożdżach, podczas gdy *AtCUL4* nie może zastąpić zmutowanego drożdżowego genu. Ponadto w *A. thaliana* mutacja w *AtCUL1* prowadzi do zatrzymania embriogenezy, co może świadczyć o braku zdolności zastąpienia funkcji AtCUL1 przez pozostałe kuliny [26].

Białko RBX1 z domeną RING-H2 wiąże enzym koniugujący E2, umożliwiając jego kontakt z białkiem substratowym związanym z ligazą SCF poprzez białko z kasetą F. Ponadto przypuszcza się, że RBX1 allosterycznie aktywuje enzym koniugujący E2 oraz prawdopodobnie pełni funkcję ligazy E3 w kaskadzie enzymów odpowiedzialnych za tzw. rubinylację/nedylację kuliny [29,33].

Białka ASK/SKP odgrywają rolę adaptorową, łącząc kulinę z jednym z wielu białek z kasetą F (FBX, ang. *F-box*). Genom *A. thaliana* zawiera 21 genów *ASK* (ang. *Arabidopsis-SKP1-like*), które podzielono na siedem klas w oparciu o pierwszorzędową strukturę kodowanych przez nie białek [30]. Dla porównania, drożdże mają 1 gen *SKP*, *D. melanogaster* - 7, *C. elegans* - 21 i człowiek - 1 [34]. Wydaje się, że tylko geny *ASK1* i *ASK2* ulegają ekspresji we wszystkich badanych tkankach, podczas gdy pozostałe geny *ASK* charakteryzują się zróżnicowanymi wzorcami ekspresji [30,31]. Dzięki wyselekcjonowaniu mutanta *ask1-1* częściowo poznano funkcję tylko ASK1 [35,36].

Białka FBX charakteryzują się występowaniem w N-końcu białka zbudowanej z 60 reszt aminokwasowych kasety F, a w rejonie C-końcowym wielu motywów tworzących domeny odpowiedzialne za swoiste wiązanie białka przeznaczonego do ubikwitylacji [37]. Pierwszych 40 reszt aminokwasowych w kasecie F tworzy domenę oddziałującą z białkiem ASK, a pozostałe 20 reszt przypuszczalnie decyduje o swoistości wiązania z odpowiednim białkiem ASK [32]. Zachowana w ewolucji sekwencja kasety F umożliwiła zidentyfikowanie w genomie *A. thaliana* około 700 genów *FBX*. W ten sposób białka FBX są obecnie uważane za najliczniejszą rodzinę białek *A. thaliana* (2,7% białek kodowanych przez genom) [27,32]. Dla porównania, drożdże mają 14 genów *FBX*, *D. melanogaster* - 24, *C. elegans* - 337, człowiek - 38. Nadrodzina białek z kasetą F w *A. thaliana* obejmuje pięć rodzin (A do E) dzielących się dalej na szereg grup w zależności od tego jaka domena występuje w rejonie C-końcowym białka. 42 białka z pierwszej grupy mają typową sekwencję LRR (ang. *Leucine-rich repeat*), a kolejne 160 białek ma charakterystyczny dla białek roślinnych motyw LRR-PD z resztą cysteiny [27,32]. Powtórzenia motywu KELCH występują w 100 białkach [38], a 10 białek ma domenę TUBBY. W nielicznych białkach FBX występują domeny WD-40 (2), ARMADILLO (2), powtórzenia TPR (ang. *tetratricopeptide repeats*) czy sekwencja podobna do lektyn [27,32,37]. W wielu białkach z kasetą F nie znaleziono żadnego poznanego dotąd motywu odpowiedzialnego za oddziaływania białko-białko, chociaż szczegółowa analiza sekwencji aminokwasowej pozwoliła wyodrębnić trzy nowe domeny występujące tylko w białkach z kasetą F [37]. Techniką drożdżowego systemu dwuhybrydowego wykazano, że białka FBX oddziałują z niektórymi białkami ASK.

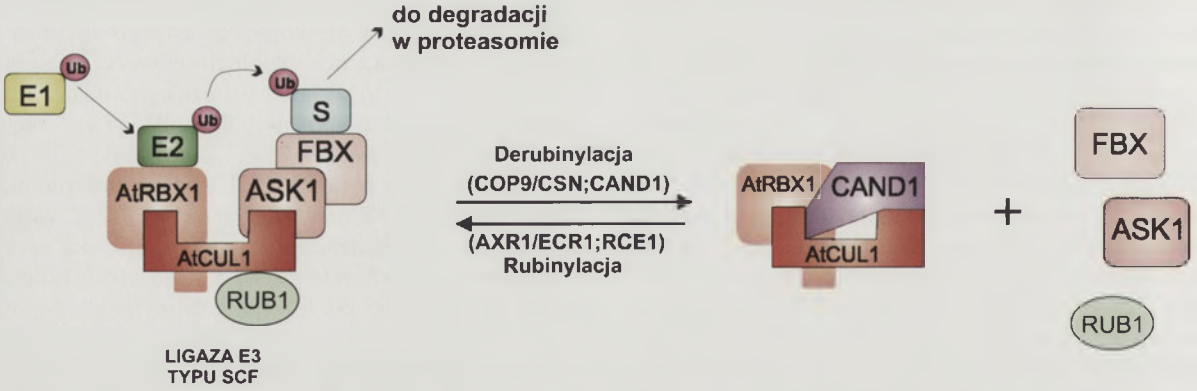
Wielopodjednostkową ligazą E3 zbudowaną co najmniej z 11 podjednostek jest kompleks APC/C (ang. *anaphase promoting complex/cyclosome*). Podobnie jak ligazy typu SCF, również kompleks APC/C zawiera białko podobne do kuliny, do którego dołączają się inne podjednostki, w tym również białko z domeną RING-finger [8-10]. Substratami dla APC/C są białka bezpośrednio zaangażowane w przebieg mitozy.

Kolejną grupę ligaz tworzą białka z domeną U-box, która mimo że nie zawiera jonów cynku, to strukturalnie przypomina domenę RING-finger [39]. Białka PUB (ang. *plant U-box protein*) koduje w *A. thaliana* około 40 genów podzielonych na pięć klas na podstawie występujących w nich charakterystycznych motywów tworzących domeny wiążące białka [40,41]. Roślinnymi ligazami typu PUB są białka ARC1, PHOR1 i AtCHIP. Białko ARC1 odgrywa ważną rolę w mechanizmie samoniezgodności sporofitowej [8], białko PHOR1 pośredniczy w sygnalizacji giberelinowej, a AtCHIP funkcjonuje w warunkach stresu termicznego oraz katalizuje ubikwitylację nieprawidłowo sfałdowanych białek [42].

ROLA BIAŁKA UBIKWITYNOPODOBNEGO RUB1, SYGNAŁOSOMU COP9 I BIAŁKA CAND1 W REGULACJI AKTYWNOŚCI LIGAZ TYPU SCF

W drugiej połowie lat 90-tych XX wieku w badaniach prowadzonych na drożdżach ustalono, że białko ubikwitynopodobne RUB1 przenoszone jest na resztę lizyny w białku Cdc53p (drożdżowa kulina w ligazie SCF^{Grr1}) przez enzymy tworzące kaskadę analogiczną do systemu ubikwitylacji [43]. W badaniach mutantów *A. thaliana* niewrażliwych na auksynę zidentyfikowano i sklonowano gen *AXR1* (ang. *auxin-Resistant 1*) kodujący białko homologiczne z drożdżową podjednostką heterodimerycznego enzymu aktywującego RUB1 [44]. W miarę postępu badań okazało się, że również

http://rcin.org.pl



Rysunek 2. Rubinylacja i derubinylacja kuliny, mechanizmem regulującym aktywność ligazy E3 typu SCF. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [43,47-49,54,55]).

w *A. thaliana* AXR1 razem z białkiem ECR1 tworzą heterodimer – enzym aktywujący RUB1 [45]. Enzymem koniugującym jest białko RCE1 (ang. *RUB-conjugating enzyme 1*) [46], a ligazą przenoszącą RUB1 z RCE1 na kulinę jest przypuszczalnie białko AtRBX1, podjednostka ligazy SCF (Rys. 2) [29,33]. Rubinylacja nazywana także nedylacją (NEDD8 jest homologiem RUB1 występującym u ludzi) aktywuje ligazę SCF ułatwiając, jak się przypuszcza, asocjację enzymu koniugującego E2 z białkiem RBX1.

W reakcji derubinylacji/denedylacji kuliny pośredniczy wielopodjednostkowy i wielofunkcyjny kompleks białkowy COP9 poznany po raz pierwszy u mutantów fotomorfogenetycznych *cop/det/fus A. thaliana*, a później także w innych organizmach wielokomórkowych [47,48]. Kompleks COP9, nazywany także sygnałosomem COP9 lub określany akronimem CSN, zbudowany jest z ośmiu polipeptydów AtCSN1-8. Sygnałosom COP9 wiąże się z kuliną za pośrednictwem podjednostki CSN2, a poprzez CSN1 i CSN6 z białkiem RBX1. Podjednostka CSN5 z charakterystycznym motywem JAMM katalizuje hydrolityczne rozszczepienie wiązania amidowego między kuliną a RUB1. Białko AtCSN5 może występować samodzielnie, przede wszystkim w cytosolu, jednak jego aktywność izopeptydazowa ujawnia się jedynie wówczas, gdy wchodzi w skład kompleksu COP9 [43,49]. W doświadczeniach *in vitro* COP9 odszczepia RUB1 od kuliny i hamuje aktywność ligazy SCF, chociaż analiza zmian fenotypowych mutantów dowodzi, że *in vivo* sygnałosom COP9 raczej promuje zależną od ligazy SCF ubikwitylację białek [49,50]. Kompleks COP9/CSN funkcjonuje także w innych, pozornie niezwiązanych ze sobą procesach. Wiadomo, że kompleks ten odgrywa niewyjaśnioną do końca rolę w zależnej od światła migracji ligazy COP1 z cytoplazmy do jądra komórkowego oraz reguluje jej aktywność katalityczną [8,51].

Kolejnym białkiem zaangażowanym w regulację ligaz SCF jest białko CAND1 (ang. *cullin associated and neddylation dissociated1*) określane również akronimem TIP120A [52,53]. Wyniki badań prowadzonych na liniach komórek ludzkich sugerują, że CAND1 może współzawodniczyć z białkiem SKP1 o miejsce wiążące na kulinie, wpływając w ten sposób hamująco na aktywność ligazy SCF [52,53]. Rubinylacja kuliny lub asocjacja SKP1/ASK1 powoduje oddysocjowanie CAND1 z kompleksu CUL1-RBX1, prowadząc do aktywacji ligazy SCF (Rys. 2) [43,52]. Wnioski wynikające z tych badań nie zyskały doświadczalnego potwierdzenia, bowiem mutant *eta2 A. thaliana* z defektem w *CAND1* wykazuje obniżoną aktywność ligazy SCF, a zmiany fenotypowe mutanta świadczą o zaburzeniach szlaków sygnałowych aktywowanych przez fitohormony oraz szlaków zależnych od ligazy ubikwitynowej COP1 regulowanych przez światło [54-56]. Na tej podstawie można przypuszczać, że białko CAND1 jest jednym z elementów skomplikowanego mechanizmu regulującego aktywność ligaz SCF, w którym podstawową rolę gra rubinylacja/derubinylacja kuliny. Wydaje się również, że funkcja regulacyjna CAND1 nie ogranicza się tylko do wielopodjednostkowych ligaz zawierających kulinę [55].

PROTEASOMY 26S I ENZYMY DEUBIKWITYLUJĄCE (DUB)

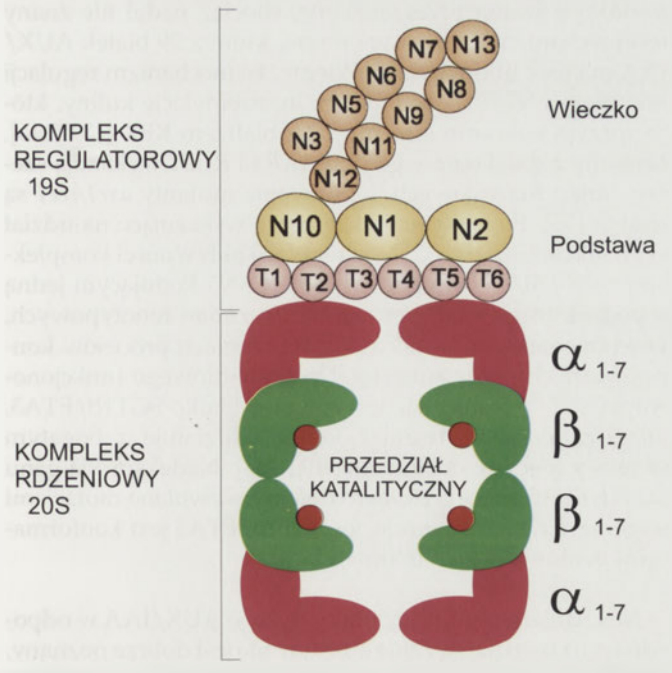
Proteasom 26S jest wielopodjednostkową proteazą o masie cząsteczkowej około 2,5 MDa, funkcjonującą w zależnej od ATP degradacji poliubikwitylowanych białek. W pełni aktywny proteasom jest zbudowany co najmniej z 32 różnych polipeptydów tworzących kompleks rdzeniowy (CP) o współczynniku sedymentacji 20S oraz kompleks regulatorowy (RP lub PA700) o współczynniku 19S [10,57,58]. Cylindryczny kompleks rdzeniowy tworzą cztery współosiowe pierścienie, z których każdy jest zbudowany z siedmiu polipeptydów. Dwa zewnętrzne pierścienie są utworzone przez podjednostki α, zaś pierścienie wewnętrzne zbudowane są z polipeptydów β. W sumie cały kompleks rdzeniowy ma konfigurację $\alpha_{1-7}/\beta_{1-7}/\beta_{1-7}/\alpha_{1-7}$ (Rys. 3). Dostęp do wnętrza kompleksu 20S jest regulowany przez pierścienie α, w których rejony N-końcowe polipeptydów umożliwiają zmianę średnicy kanału wejściowego prowadzącego do wnętrza proteasomu [58]. Aktywność proteolityczna kompleksu rdzeniowego jest związana z podjednostkami β_1, β_2, i β_5 obu pierścieni β, które tworzą wewnątrz cylindra przestrzeń katalityczną (Rys. 3) [57]. Rozfałdowane białko we wnętrzu kompleksu rdzeniowego zostaje pocięte na małe fragmenty dzięki zdolności podjednostek β hydrolizy wiązań peptydoglutamylo-peptydowych oraz ich aktywności proteolitycznej wykazującej podobieństwa do trypsyny i chymotrypsyny [57,58].

Kompleks regulatorowy (RP) rozpoznaje i wiąże ubikwitylowane substraty, uwalnia cząsteczki ubikwityny z kompleksów z substratami, indukuje zmiany konformacyjne w pierścieniach α powodując otwieranie kanałów wejścio-

http://rcin.org.pl

wych, rozfałdowuje oraz współuczestniczy w translokacji łańcuchów polipeptydowych do wnętrza proteasomu, aktywuje proteolizę poprzez allosteryczne oddziaływanie z centrum katalitycznym kompleksu 20S oraz współuczestniczy w usuwaniu produktów proteolizy [57,58]. W kompleksie regulatorowym utworzonym przez 18 podjednostek wyróżnia się dwie części: podstawę i wieczko (Rys. 3). Podstawa kompleksu regulatorowego, przylegająca do zewnętrznego pierścienia α w kompleksie rdzeniowym, zbudowana jest z sześciu podjednostek RPT (RPT1-RPT6) oraz trzech podjednostek RPN1, RPN2 i RPN10. Polipeptyd RPT5 wydaje się współuczestniczyć w rozpoznaniu poliubikwitylowanego substratu [57], a sześcioczłonowy pierścień RPT1-6, dzięki aktywności ATPazowej tworzących go białek, uczestniczy w wiązaniu i rozfałdowywaniu ubikwitylowanego białka i translokacji łańcucha polipeptydowego do wnętrza proteasomu [57-59]. Podjednostka RPN10 zawierająca domenę UIM (ang. *ubiquitin-interacting motif*) pośredniczy w wiązaniu łańcucha poliubikwitynowego, a ponadto łączy podstawę z wieczkiem [58,59]. Polipeptyd RPN1 współuczestniczy w rozpoznawaniu białek ubikwitynopodobnych, a razem z RPN2 kooperuje w rozfałdowywaniu substratu i wspomaga translokację polipeptydu do wnętrza proteasomu. Wieczko proteasomu jest zbudowane z dziewięciu polipeptydów (RPN3, RPN5-RPN9, RPN11--RPN13), których budowa pierwszorzędowa sugeruje ewolucyjne pokrewieństwo z sygnałosomem COP9 i kompleksem eIF3 inicjującym translację w organizmach eukariotycznych [59]. Ponadto białka RPN11 i RPN13 prawdopodobnie uczestniczą w odcinaniu łańcucha poliubikwitynowego od białka substratowego [57].

W komórkach *A. thaliana*, w przeciwieństwie do drożdży, większość polipeptydów tworzących kompleksy rdzeniowy i regulatorowy kodowana jest przez pary genów [60,61]. Polipeptydy budujące kompleks rdzeniowy są kodowane przez 23 geny, z tego 13 genów koduje 7 podjednostek *a*, a pozostałe 10 genów koduje 7 podjednostek *β* [61]. Polipeptydy kompleksu regulatorowego 19S są kodowane przez 31 genów, z tego każdy z pięciu polipeptydów RPT, z wyjątkiem RPT3, jest kodowany przez dwa geny [62]. Podobna sytuacja zachodzi w przypadku polipeptydów RPN1-3, RPN5, RPN8, RPN9 i RPN12, a tylko peptydy RPN6-7 i RPN10-11 są kodowane przez pojedyncze geny [60]. Wyniki tych badań dowodzą, że w komórkach *A. thaliana* występuje heterogenna pula proteasomów 26S, podobnie jak w komórkach ryżu [63].



Rysunek 3. Schemat budowy proteasomu 26S. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [10,57,60-62]).

Łańcuchy poliubikwitynowe odcięte od białek są następnie degradowane przez enzymy deubikwitylujące (DUB), które są proteazami cysteinowymi obejmującymi dwie odrębne rodziny UBP (ang. *Ub-specific processing protease*) i UCH (ang. *Ub carboxy-terminal hydrolase*) [64]. Rodzina proteaz UBP uczestniczy w odcinaniu cząsteczek ubikwityny od poliubikwitynowych łańcuchów, a także hydrolizuje wiązanie izopeptydowe pomiędzy ubikwityną a białkiem ubikwitylowanym. Rodzina hydrolaz UCH obejmuje stosunkowo małe białka (o masie cząsteczkowej 20-30 kDa), które odcinają od ubikwityny małe fragmenty polipeptydowe od C-końca, a niektóre uwalniają monomery ubikwityny z wolnego końca łańcucha poliubikwitynowego [64]. Do tej pory w genomie *A. thaliana* zidentyfikowano około 30 genów kodujących enzymy deubikwitylujące, z tego 27 koduje białka należące do grupy proteaz UBP, a dwa białka hydrolaz UCH [57,65].

UKŁADY UBIKWITYLACJI I DEGRADACJI BIAŁEK FUNKCJONUJĄCE W SZLAKACH SYGNAŁOWYCH AKTYWOWANYCH PRZEZ FITOHORMONY

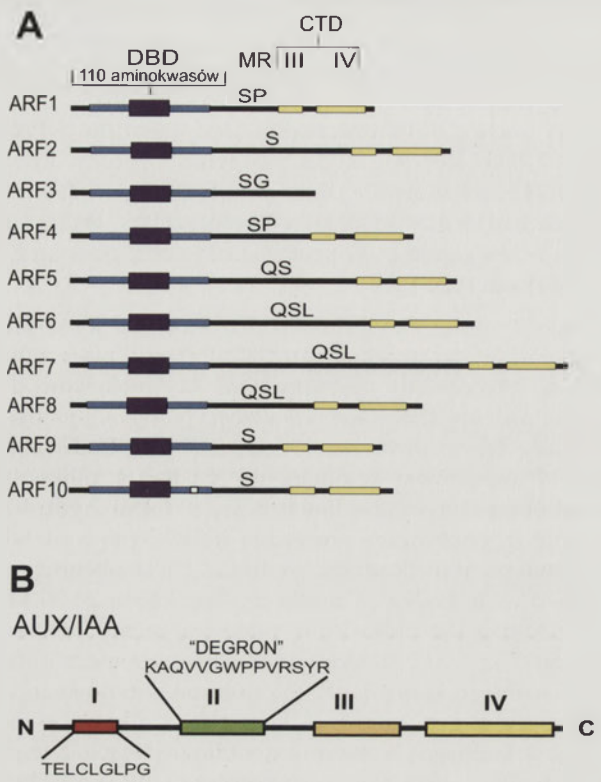
SELEKTYWNA DEGRADACJA BIAŁEK W SYGNALIZACJI AUKSYNOWEJ

Auksyny grają kluczową rolę w regulacji wielu procesów związanych ze wzrostem i rozwojem roślin. Jedna z nich, kwas indolilo-3-octowy, uczestniczy w regulacji embriogenezy i podziałów komórkowych, kontroluje wydłużanie i różnicowanie komórek, formowanie korzeni bocznych, dominację wierzchołkową i grawitropizm. W pracy przeglądowej opublikowanej w Postępach Biologii Komórki podsumowano najważniejsze osiągnięcia w poszukiwaniach pierwotnych mechanizmów działania auksyn [44]. Zasygnalizowane wówczas nowatorskie badania wiążące sygnalizację auksynową z ubikwitylacją białek stały się z czasem wiodącym kierunkiem poszukiwań związanych z badaniami auksyn. Potwierdza to m. in. liczba prac przeglądowych opublikowanych na ten temat w literaturze ogólnoświatowej [66-70].

CZYNNIKI ODPOWIEDZI AUKSYNOWYCH ARF I BIAŁKA AUX/IAA

Poznanie sekwencji promotorowych genów tzw. pierwotnych odpowiedzi auksynowych i zidentyfikowanie tzw. elementów odpowiedzi auksynowych AuxRE (ang. *auxin response elements*) umożliwiło poznanie i sklonowanie genów kodujących czynniki odpowiedzi auksynowej ARF (ang. *auxin response factor*) [44]. Genom *A. thaliana* zawiera 22 geny *ARF* i jeden pseudogen *ARF23* kodujące białka o masie cząsteczkowej 67-129 kDa. Wszystkie ARF łączy obecność N-końcowej domeny wiążącej DNA (DBD), dzię-

http://rcin.org.pl



Rysunek 4. Schemat budowy wybranych czynników odpowiedzi auksynowych (ARF) i białek represorowych AUX/IAA. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [71-76]).

ki której białka te wiążą się z sekwencją TGTCTC w AuxRE (Rys. 4A) [71,72]. Polipeptydy ARF mają w części środkowej fragmenty bogate w reszty seryny, a niektóre zawierają dodatkowo reszty glutaminy, leucyny lub proliny tworzące domenę MR (ang. *middle region*) [73]. W doświadczeniach prowadzonych na transgenicznych roślinach wykazano, że niektóre ARF są represorami genu reporterowego GUS pod promotorem AuxRE, podczas gdy ARF zawierające w części środkowej reszty glutaminy, aktywują ekspresję genu reporterowego [71-73]. C-koniec ARF zawiera domenę CTD (ang. *carboxyl-terminal domain*) z dwoma charakterystycznymi motywami (III i IV) odpowiedzialnymi za dimeryzację [71,72]. Niektóre białka ARF mają typowe sekwencje NLS kierujące białko do jądra, w innych sekwencja NLS jest zlokalizowana w domenie DBD, a jeszcze inne są transportowane do jądra jako heterodimery z innym białkiem. Ekspresja genów *ARF* zachodzi we wszystkich dojrzałych organach i nie jest aktywowana przez auksyny [74].

Spośród genów regulowanych przez auksyny specjalne zainteresowanie budzą geny pierwotnych odpowiedzi na auksyny. Najlepiej poznaną klasę w *A. thaliana* tworzy grupa 29 genów *AUX/IAA* [74,75]. Hydrofilowe białka AUX/IAA o masie cząsteczkowej 19-36 kDa charakteryzuje obecność czterech zachowanych w ewolucji domen I- IV (Rys. 4B), z których domeny III i IV są podobne do domen III i IV w ARF [74,75]. Domena I AUX/IAA, zawierająca sekwencję LXLXL, pełni przypuszczalnie funkcję domeny represorowej wobec czynników ARF [76]. Domena II utworzona przez 13 reszt aminokwasowych jest nazywana „degronem", ponieważ odgrywa kluczową rolę w regulowanej przez auksynę degradacji białek AUX/IAA [77]. W komórkach mutantów *axr3/iaa17*, *shy2/iaa3*, *axr2/iaa7* z defektami w domenie II stwierdzono wielokrotnie wyższy poziom odpowiednich białek AUX/IAA, a zmiany fenotypowe towarzyszące tym mutacjom jednoznacznie wskazują, iż białka AUX/IAA są elementami szlaków sygnalizacji auksynowej [67,68,74]. Krótki okres półtrwania białek AUX/IAA, wydłużający się w obecności inhibitorów proteasomów, dodatkowo potwierdza funkcjonowanie regulowanego przez auksynę precyzyjnego mechanizmu selektywnej degradacji tych białek w proteasomach [78]. Do podobnych wniosków prowadzą również wyniki doświadczeń, w których z zastosowaniem sekwencji antysensownych obniżono poziom mRNA kodującego jedną z podjednostek *a* proteasomu [79].

ZALEŻNA OD AUKSYNY UBIKWITYLACJA BIAŁEK AUX/IAA

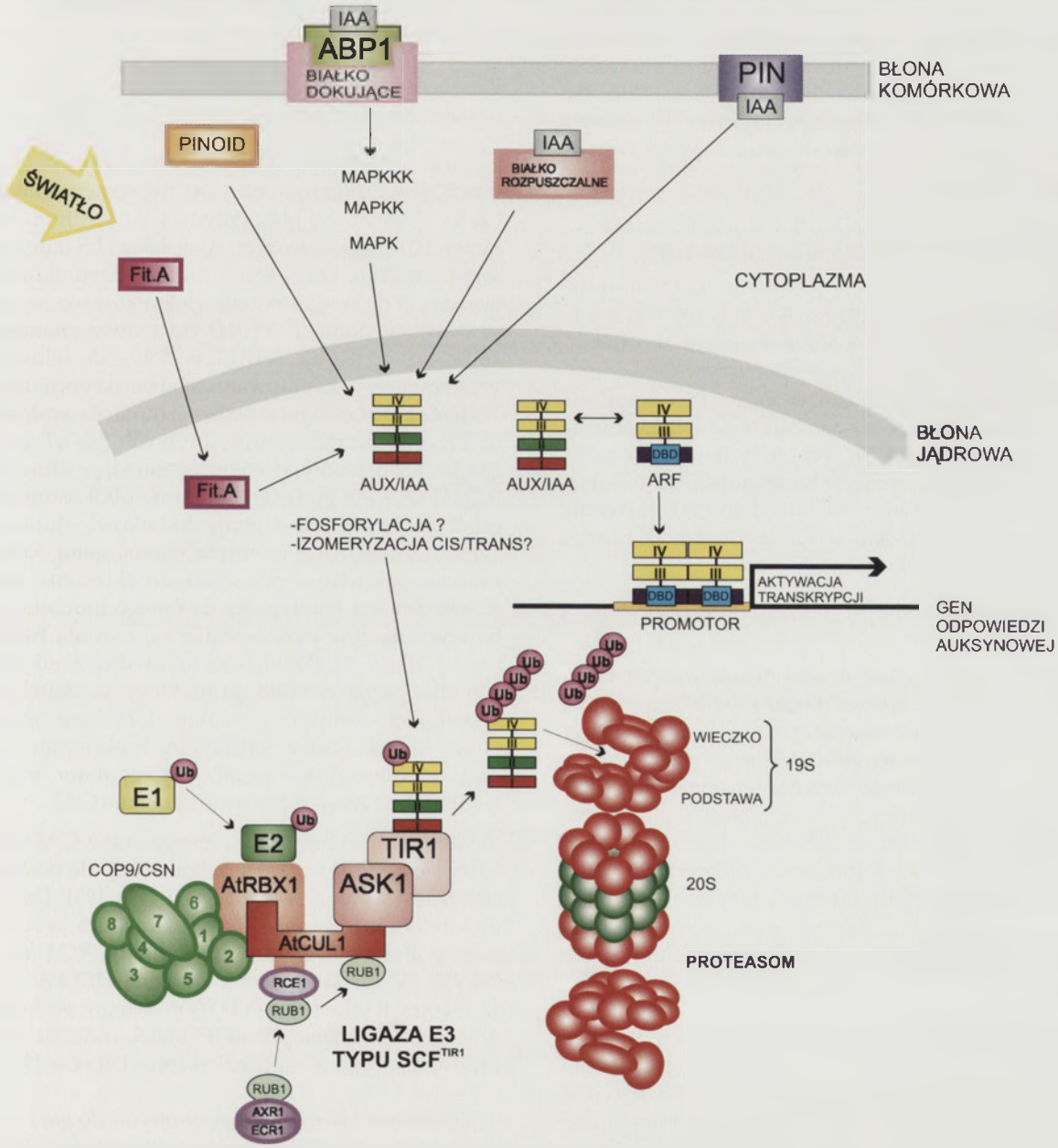
Pierwsze przypuszczenia na temat związków mechanizmu regulującego ubikwitylację i degradację białek z sygnalizacją auksynową opierają sie na wynikach badań mutantów *axr1* (ang. *auxin-resistant1*), *tir1* (ang. *transport inhibitor response1*), a także białka ubikwitynopodobnego RUB1 *A. thaliana* [44]. Gen *AXR1* koduje białko homologiczne do enzymu aktywującego ubikwitynę E1, pozbawione jednak w C-końcu zachowanej w ewolucji reszty cysteiny [44,69]. Gen *ECR1* koduje białko tworzące z AXR1 dimer - enzym aktywujący RUB1 [45,46]. Sklonowanie genu *TIR1* kodującego białko zawierające kasetę F stało się impulsem do poszukiwań związków między sygnalizacją auksynową a ubikwitylacją białek [80]. Ostatecznych dowodów potwierdzających rolę kompleksu ligazy SCF^{TIR1} w ubikwitylacji białek AUX/IAA dostarczyły badania, w których wykazano, że białka AXR2/IAA7 i AXR3/IAA17 oddziałują fizycznie za pośrednictwem domeny II z białkiem TIR1, a mutacje w obrębie tej domeny blokują lub znacząco ograniczają oddziaływania z SCF^{TIR1} [78,81,82]. Obecnie wiadomo jest, że wiązanie białek AUX/IAA z TIR1, a w konsekwencji ich ubikwitylacja i proteolityczna degradacja w proteasomach jest aktywowana przez auksynę, chociaż nadal nie znany jest mechanizm decydujący o tym, które z 29 białek AUX/IAA ma ulec ubikwitylacji. Wiemy, że mechanizm regulacji kompleksu SCF^{TIR1} obejmuje m. in. rubinylację kuliny, która sprzyja wiązaniu enzymu E2 z białkiem RBX [43,45,46]. Mutanty z defektem w genach *AXR1* i *RCE1* wykazują szereg zmian rozwojowych, a podwójne mutanty *axr1/rce1* są letalne [33]. Pojawiły się także prace wskazujące na udział sygnałosomu COP9/CSN w regulacji aktywności kompleksów SCF [50,51]. Mutacja w genie *CSN5* kodującym jedną z podjednostek COP9 prowadzi do zmian fenotypowych, których charakter świadczy o zaburzeniach procesów kontrolowanych przez auksyny. Do prawidłowego funkcjonowania SCF^{TIR1} konieczne jest również białko SGT1b/ETA3, które za pośrednictwem C-końca oddziałuje z bogatym w reszty leucyny odcinkiem TIR1 [83]. Nadekspresja genu *SGT1b/ETA3* znosi częściowo defekty wywołane mutacjami w genie *TIR1*, co sugeruje, że SGT1b/ETA3 jest konformacyjnym aktywatorem ubikwitylacji.

Mechanizm regulujący ubikwitylację AUX/IAA w odpowiedzi na rosnące stężenie auksyny nie jest dobrze poznany, ponieważ dotyczy zjawiska percepcji sygnału auksynowego i wymaga znajomości wszystkich elementów szlaku sygna-

http://rcin.org.pl

łowego położonych między receptorami a białkami AUX/IAA. Główny nurt badań związanych z identyfikacją białek receptorowych skupiał się od wielu lat na rozpuszczalnym białku ABP1 (ang. *auxin binding protein 1*), w przypadku którego wiązanie auksyny może mieć charakter oddziaływań typu ligand-receptor [44]. Rozwój badań nad białkami nośnikowymi pozwolił na wysunięcie przypuszczenia, że niektóre z tych błonowych transporterów auksyn mogą pełnić funkcję białek wrażliwych na zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia hormonu [70]. Warto również zaznaczyć, iż w wielu roślinach zidentyfikowano szereg rozpuszczalnych białek charakteryzujących się wysokim powinowactwem względem auksyn [44,69].

Wcześniejsze wyniki badań prowadzonych głównie na drożdżach sugerowały, że rosnące stężenie auksyny mogłoby wpływać na selektywną fosforylację białek AUX/IAA rozpoznawanych następnie przez kompleks ligazy SCF^{TIR1}. Nawiązując do tych sugestii niektórzy autorzy proponują, że w fosforylacji AUX/IAA może brać udział aktywowana przez auksyny kaskada kinaz białkowych MAP lub serynowo/treoninowa kinaza białkowa PINOID (PID) (Rys. 5) [84]. Fosforylację niektórych białek AUX/IAA obserwowano w doświadczeniach z fitochromem A, który, jak wiadomo, posiada aktywność serynowo/treoninowej kinazy białkowej [84]. Jednak wyniki najnowszych badań prowadzonych w ekstrakcie komórkowym pozbawionym błon dowodzą, iż w modyfikacji białek AUX/IAA promującej ich wiązanie do ligazy SCF^{TIR1} nie uczestniczą receptory błonowe, w tym również ABP1, ani żaden z błonowych elementów szlaków sygnałowych [85]. Wydaje się również, że do ubikwitylacji AUX/IAA nie jest konieczna fosforylacja, ani hydroksylacja proliny w domenie II, natomiast może jej sprzyjać izomeryzacja *cis-trans* wiązania peptydowego położonego za



Rysunek 5. Regulowana przez auksynę ubikwitylacja białek represorowych AUX/IAA. Schemat obejmuje proponowane elementy szlaków sygnałowych mogące uczestniczyć w fosforylacji AUX/IAA. Modyfikacja AUX/IAA lub aktywacja kinazy SCF^{TIR1}, indukowane przez auksynę, promują ubikwitylację białek represorowych AUX/IAA. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [66-68,76,78,82,84,86]).

http://rcin.org.pl

jedną z dwóch konserwatywnych reszt proliny w domenie II [85].

Na podstawie dotychczasowych wyników można zaproponować następujący mechanizm regulacji ekspresji genów przez auksynę (Rys. 5). W warunkach braku lub niskiego stężenia auksyny białka AUX/IAA tworzą heterodimery z czynnikami odpowiedzi auksynowej ARF blokując w ten sposób ich działanie aktywujące lub hamujące na ekspresję odpowiednich genów. Wzrost stężenia auksyny prowadzi do modyfikacji odpowiedniego białka AUX/IAA promującej jego ubikwitylację bądź wpływa aktywująco na ligazę SCF regulowaną przez układ rubinylacji/derubinylacji kuliny oraz przez białka CAND1 i SGT1b [86]. Degradacja białka AUX/IAA prowadzi do uwolnienia z heterodimeru AUX/IAA-ARF odpowiedniego białka ARF, które może aktywować lub hamować ekspresję genów pierwotnych odpowiedzi auksynowych (w tym również genów *AUX/IAA*), a produkty tych genów z kolei regulują aktywność genów zaangażowanych w procesy wzrostowe i rozwojowe rośliny. Spadek stężenia auksyny prowadzi do wzrostu poziomu białek AUX/IAA w jądrze, które „wyłączają" białka ARF tworząc z nimi nieaktywne heterodimery. W ten sposób komórka staje się gotowa do odbioru kolejnego sygnału auksynowego.

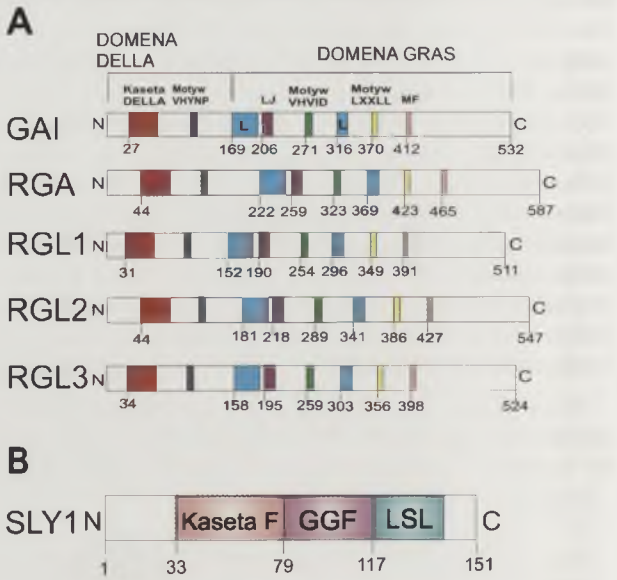
ROLA UKŁADÓW UBIKWITYNA/PROTEASOM 26S W GIBERELINOWYCH SZLAKACH SYGNAŁOWYCH

W cyklu rozwojowym rośliny gibereliny (GA) kontrolują cały ciąg procesów poczynając od kiełkowania i wzrostu wydłużeniowego hypokotyla, poprzez indukcję kwitnienia, rozrost liści, wzrost wydłużeniowy międzywęźli, a kończąc na rozwoju kwiatów i dojrzewaniu owoców. Pierwotne mechanizmy działania giberelin, pozostające od lat w centrum uwagi wielu zespołów badawczych, były tematem opublikowanej przed kilku laty pracy przeglądowej [87]. Zainteresowanemu Czytelnikowi polecamy najnowsze artykuły monograficzne opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym [88-91].

ZALEŻNA OD GIBERELINY DEGRADACJA BIAŁEK DELLA

Postępy w badaniach giberelinowych szlaków przekazywania sygnału stały się możliwe dzięki wyselekcjonowaniu szeregu mutantów giberelinowych *A. thaliana*, a szczególnie mutantów należących do dwóch odrębnych grup określanych jako mutanty „karłowate" i mutanty „wysmukłe" [87]. Mutanty „karłowate" fenotypowo przypominają mutanta *ga1-3* z defektem w biosyntezie giberelin, chociaż w odróżnieniu od niego po aplikacji gibereliny nie osiągają nigdy rozmiarów roślin linii dzikich. Mutanty „wysmukłe", mimo że nie zawierają podwyższonego poziomu aktywnych giberelin, są podobne do roślin normlanych traktowanych gibereliną.

Mutanty *gai* (ang. *gibberellin insensitive*) i *rga* (ang. *repressor of ga1-3*) z grupy „karłowatych" mają zmienione geny kodujące czynniki transkrypcyjne (Rys. 6A). W wyniku delecji 51 par zasad w *GAI* kodowane białko uległo skróceniu w części N-końcowej o 17 reszt aminokwasowych [92]. Skróceniu polipeptydu o rejon DELLA (nazwa pochodzi od pierwszych pięciu reszt aminokwasów w tym rejonie) towarzyszą



Rysunek 6. Schemat budowy polipeptydów DELLA i białka SLY1 z kasetą F funkcjonujących w sygnalizacji giberelinowej. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [92-95,104])

zmiany fenotypowe, których charakter wskazuje na brak wrażliwości mutanta na GA. Sekwencja aminokwasowa części C-końcowej polipeptydu GAI jest homologiczna do białek SCR (ang. *scarecrow*) *A. thaliana* i LS (ang. *lateral supresor*) pomidora, tworzących rodzinę czynników transkrypcyjnych [92]. W tym rejonie zlokalizowana jest zachowana w ewolucji domena VHIID oraz dwie charakterystyczne sekwencje LHKLL i VHALL podobne do sekwencji LXXLL występującej w koaktywatorach transkrypcji u kręgowców. Poddając mutanty *gai* powtórnej mutacji uzyskano kilka podwójnych mutantów supresorowych (*gai-d1*, *gai-d2*, *gai-d5*, *gai-d7*), które fenotypowo przypominają rośliny linii dzikich [92]. Wszystkie podwójne mutanty obok istniejącej mutacji *gai* (brak 51 par zasad) mają dodatkową mutację substytucyjną lub delecyjną w innym rejonie genu, która w większości przypadków prowadzi do skrócenia polipeptydu. Zatem zmiana fenotypu podwójnego mutanta w kierunku fenotypu rośliny dzikiej wiąże się z utratą funkcji skróconego białka GAI. Potwierdza to również zanik karłowatości u podwójnego mutanta *gai-t6*, który na skutek mutacji nie syntetyzuje żadnego produktu. Uzyskane wyniki jednoznacznie dowodzą, że białko GAI funkcjonuje w sygnalizacji giberelinowej jako negatywny regulator oraz wskazują, iż giberelina znosi represyjne działanie GAI.

Gen *RGA* koduje białko identyczne z GAI w 83%, które różni się od GAI w części N-końcowej, ale posiada również charakterystyczną sekwencję DELLA [93]. Dalsze badania dowiodły, że genom *A. thaliana* zawiera jeszcze trzy inne geny podobne do *RGA* – *RGL1*-3 (ang. *RGA-like*) (Rys. 6A) [94,95]. Wszystkie białka z domeną DELLA i zachowaną w ewolucji sekwencją VHYNP tworzą podrodzinę w liczącej w *A. thaliana* ponad 33 białek rodzinie białek GRAS uczestniczących w regulacji ekspresji genów [96].

Roślinami fenotypowo podobnymi do *gai* i *rga* są niskopienne odmiany *d8* kukurydzy i *ht3* pszenicy [97]. W badaniach prowadzonych na odmianach pszenicy *Rht-B1* i *Rht-D1* (ang. *reduced height*) oraz kukurydzy *d8* wykazano, że

http://rcin.org.pl

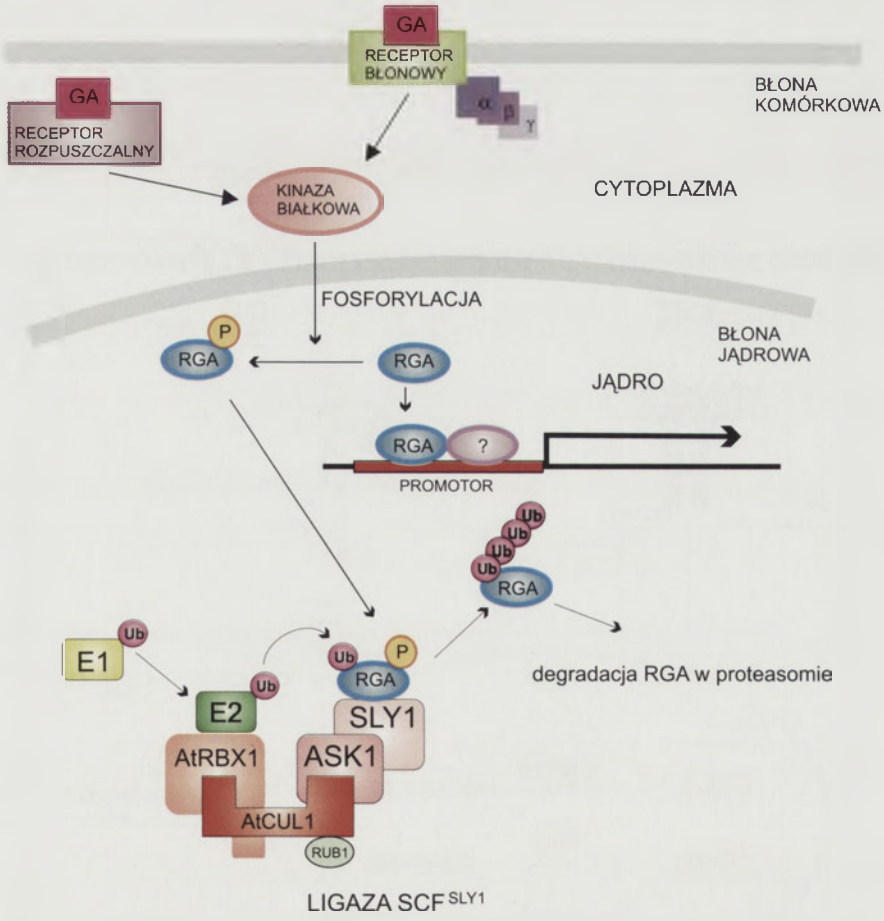
karłowatość tych odmian jest związana z mutacją w genach homologicznych z *GAI/RGA* w zachowanym w ewolucji rejonie N-końcowym polipeptydu. W ostatnich latach geny homologiczne z *GAI* i *RGA* zidentyfikowano także w ryżu (*OsGAI*, *SLR1*) [98], jęczmieniu (*SLN1*) i winorośli (*VvGAI1*) [88-91].

W badaniach lokalizacji białek DELLA z zastosowaniem chimer z GFP wykazano, że białka RGA, RGL1, SLR1 i SLN1 występują na terenie jądra komórkowego [94,99-101]. Zaobserwowano również, że gibereliny znacząco obniżają poziom GFP-RGA i GFP-SLR1 w jądrze [99,100], chociaż sprzeczne wyniki uzyskano w przypadku białek chimerycznych GFP-GAI i GFP-RGL1 [94,102]. Wyniki wskazujące, iż poziom białek GFP-RGA i GFP-SLN1 z mutacjami w domenie DELLA nie zmienia się pod wpływem giberelin, wskazują na udział domeny DELLA w odbiorze sygnału giberelinowego [101,103].

Mechanizm regulowanej przez gibereliny degradacji białek DELLA został już częściowo wyjaśniony dzięki wyselekcjonowaniu mutanta *sly1* (ang. *sleepy 1*) i sklonowaniu zmutowanego genu [104]. Okazało się, że *SLY1* koduje stosunkowo krótki polipeptyd, który w części N-końcowej ma typową kasetę F, a w rejonie centralnym i C-końcu charakterystyczne sekwencje GGF i LSL (Rys. 6B). Mutacja w genie *SLY1* prowadzi do wzrostu poziomu białka RGA, podczas gdy mutacja w genie *RGA* eliminująca syntezę jakiegokolwiek produktu znosi częściowo mutację *sly1* [104]. Przypuszczenie, że białka DELLA są substratami ligazy SCF^{SLY1} zostało ostatecznie potwierdzone w doświadczeniach, w których wykazano, że białka RGA i GAI wiążą się z białkiem SLY1 za pośrednictwem domeny GRAS (Rys. 6A) [105]. W tym miejscu warto podkreślić, że obecna we wszystkich badanych białkach domena DELLA nie oddziałuje bezpośrednio z białkiem SLY, natomiast prawdopodobnie, w wyniku indukowanych przez sygnał giberelinowy zmian konformacyjnych, wpływa na zmiany powinowactwa białek RGA/GAI do ligazy SCF^{SLY1}. Ponadto fosforylacja białek DELLA warunkuje ich wiązanie z białkiem SLY1 [106].

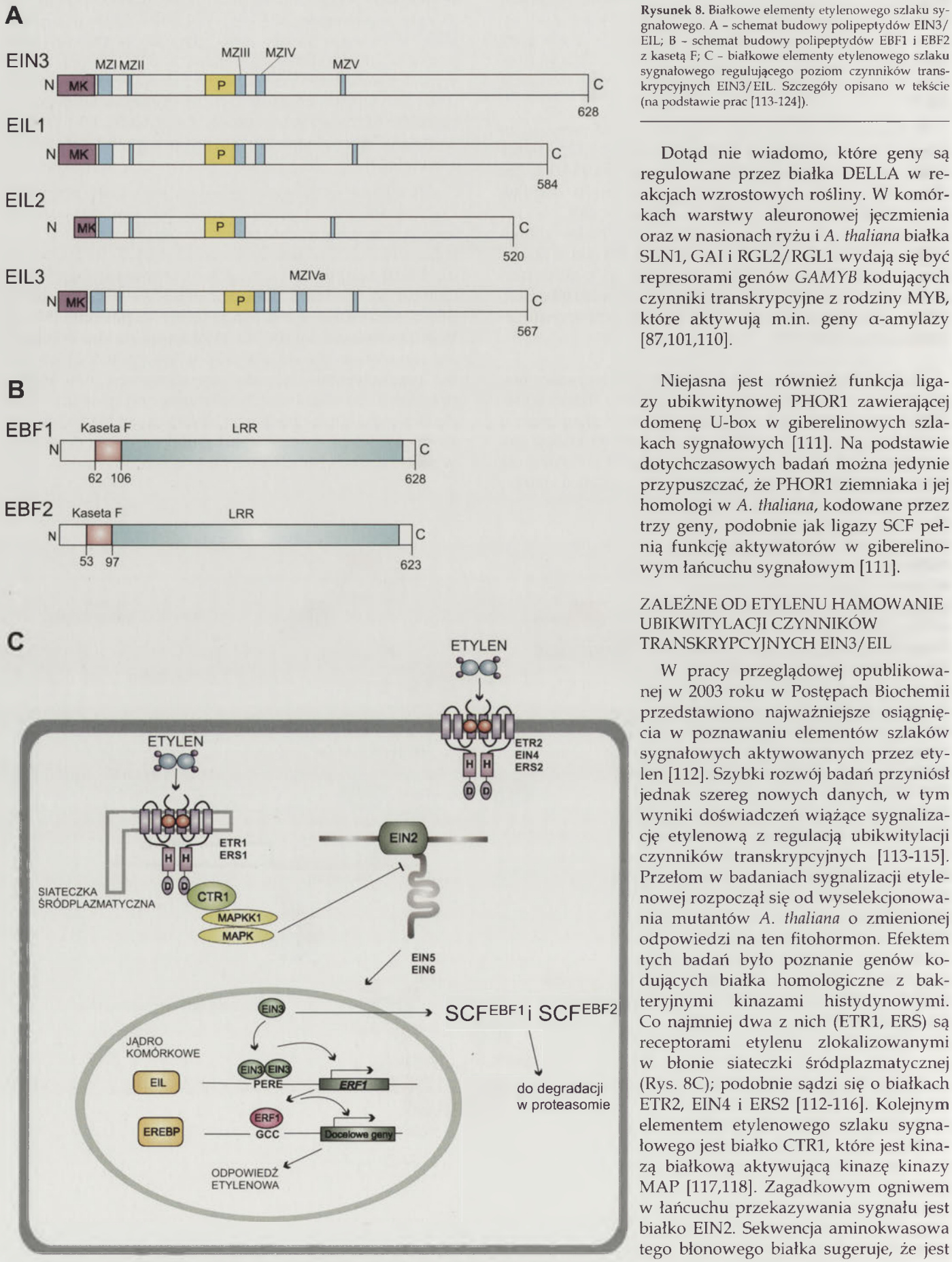
Wyniki badań prowadzonych na *A. thaliana* potwierdzono także w doświadczeniach wykonanych na ryżu [107]. Obecne w komórkach ryżu białko SLR1, homologiczne do RGA/GAI *A. thaliana*, wiązane jest przez białko GID2 (ang. *GA-insensitive dwarf 2*) zawierające kasetę F. Polipeptyd GID2, w 43% identyczny z białkiem SLY1, oddziałuje z OsSKP15, jednym z ortologów ASK1 w ryżu [108]. Mutacji w genie *GID2* towarzyszy w obecności giberelin wyraźny wzrost poziomu ufosforylowanego białka SLR1 [107,108]. Także wyniki doświadczeń prowadzonych na jęczmieniu potwierdzają aktywujące działanie tego fitohormonu na degradację białka SLN1 w proteasomach. Zanik białka DELLA pod wpływem giberelin hamowany jest przez inhibitory proteasomu [109].

Chemiczne właściwości giberelin pozwalają przypuszczać, że miejsce ich percepcji może być zlokalizowane na zewnętrznej powierzchni błony, tak jak w komórkach aleuronowych, bądź wewnątrz komórki (Rys. 7) [87]. Obecnie nie budzi wątpliwości udział heterotrimerycznego białka G w przekazywaniu sygnału giberelinowego, co pośrednio potwierdza błonową lokalizację receptora giberelin [87,88]. W ostatnich latach zwrócono także uwagę na kinazy białkowe aktywowane przez jony wapnia jako potencjalne ogniwa przekazywania sygnału giberelinowego [87]. Można przypuścić, że wiązanie giberelin przez receptor prowadzi do aktywacji kinazy białkowej fosforylującej białka DELLA kierując je w ten sposób na drogę ubikwitylacji i degradacji w proteasomach [98,107,109].



Rysunek 7. Aktywowana przez gibereliny ubikwitylacja białek represorowych DELLA. Schemat przedstawia proponowane elementy szlaku transdukcji sygnału uczestniczące w regulowanej przez gibereliny fosforylacji białek DELLA promującej ich ubikwitylację i degradację w proteasomach. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [88-91,98]).

http://rcin.org.pl



Rysunek 8. Białkowe elementy etylenowego szlaku sygnałowego. A – schemat budowy polipeptydów EIN3/EIL; B – schemat budowy polipeptydów EBF1 i EBF2 z kasetą F; C – białkowe elementy etylenowego szlaku sygnałowego regulującego poziom czynników transkrypcyjnych EIN3/EIL. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [113-124]).

Dotąd nie wiadomo, które geny są regulowane przez białka DELLA w reakcjach wzrostowych rośliny. W komórkach warstwy aleuronowej jęczmienia oraz w nasionach ryżu i *A. thaliana* białka SLN1, GAI i RGL2/RGL1 wydają się być represorami genów *GAMYB* kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny MYB, które aktywują m.in. geny α-amylazy [87,101,110].

Niejasna jest również funkcja ligazy ubikwitynowej PHOR1 zawierającej domenę U-box w giberelinowych szlakach sygnałowych [111]. Na podstawie dotychczasowych badań można jedynie przypuszczać, że PHOR1 ziemniaka i jej homologi w *A. thaliana*, kodowane przez trzy geny, podobnie jak ligazy SCF pełnią funkcję aktywatorów w giberelinowym łańcuchu sygnałowym [111].

ZALEŻNE OD ETYLENU HAMOWANIE UBIKWITYLACJI CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH EIN3/EIL

W pracy przeglądowej opublikowanej w 2003 roku w Postępach Biochemii przedstawiono najważniejsze osiągnięcia w poznawaniu elementów szlaków sygnałowych aktywowanych przez etylen [112]. Szybki rozwój badań przyniósł jednak szereg nowych danych, w tym wyniki doświadczeń wiążące sygnalizację etylenową z regulacją ubikwitylacji czynników transkrypcyjnych [113-115]. Przełom w badaniach sygnalizacji etylenowej rozpoczął się od wyselekcjonowania mutantów *A. thaliana* o zmienionej odpowiedzi na ten fitohormon. Efektem tych badań było poznanie genów kodujących białka homologiczne z bakteryjnymi kinazami histydynowymi. Co najmniej dwa z nich (ETR1, ERS) są receptorami etylenu zlokalizowanymi w błonie siateczki śródplazmatycznej (Rys. 8C); podobnie sądzi się o białkach ETR2, EIN4 i ERS2 [112-116]. Kolejnym elementem etylenowego szlaku sygnałowego jest białko CTR1, które jest kinazą białkową aktywującą kinazę kinazy MAP [117,118]. Zagadkowym ogniwem w łańcuchu przekazywania sygnału jest białko EIN2. Sekwencja aminokwasowa tego błonowego białka sugeruje, że jest

http://rcin.org.pl

ono transporterem jonów lub pełni funkcję czujnika wrażliwego na zmiany stężenia jonów [112-115]. Analiza epistazy pomiędzy mutantami *ctr1* i *ein2*, a pozostałymi znanymi mutantami *ein3*, *ein5* i *ein6* (ang. *ethylene-insensitive*) w różnym stopniu niewrażliwymi na etylen, lokuje produkty tych ostatnich genów w łańcuchu sygnałowym poniżej CTR1 i EIN2 (Rys. 8C) [112].

Po sklonowaniu genu *EIN3* okazało się, że w *A. thaliana* jest on jednym z sześciu genów z rodziny *EIN3/EIL* (ang. *EIN-like*) kodujących czynniki transkrypcyjne [119,120]. Białko EIN3 w formie homodimeru wiąże się z sekwencją PERE (ang. *Primary Ethylene Response Element*) w promotorze genu *ERF1* (ang. *Ethylene Responsive Factor1*) należącego do licznej rodziny genów kodujących czynniki transkrypcyjne (Rys. 8C) [121]. Białko EIN3 aktywuje gen *ERF1*, a nadekspresja *ERF1* u mutanta *ein3* prowadzi do zmian fenotypowych, jakie zwykle indukuje etylen [121]. Z sekwencją PERE genu *ERF1* wiąże się także białko EIL1, podobne do EIN3 [120]. Pozostałe białka EIL zawierają wszystkie charakterystyczne motywy występujące w EIN3, w tym m. in. sekwencje tworzące w części N-końcowej motyw o charakterze kwasowym (MK) oraz pięć motywów zasadowych (MZ) (Rys. 8A) [119]. Geny *EIL1* i *EIL2* komplementują mutację *ein3*, a ich nadekspresja u osobników linii dzikiej, podobnie jak u mutanta *ein2*, prowadzi do wystąpienia konstytutywnych odpowiedzi na etylen [119]. Geny homologiczne z *EIN3/EIL* sklonowano także w tytoniu, pomidorze i fasoli [113].

Białko ERF1, biorące udział w kaskadzie czynników transkrypcyjnych EIN3/EIL→EFR1, należy do rodziny białek EREBP (ang. *Ethylene Response Element Binding Protein*) wiążących się z białkami odpowiedzi etylenowych [112,113]. Genom *A. thaliana* zawiera co najmniej 125 genów z rodziny *EREBP* kodujących białka aktywujące lub hamujące ekspresję genów. Sekwencje wiążące EREBP zawierają kasetę GCC, występującą w promotorach genów indukowanych przez etylen, w tym również genów, których produkty uczestniczą w reakcjach obronnych przeciw patogenom [112,113].

Wyniki najnowszych badań dowodzą, że poziom białka EIN3 rośnie bardzo szybko w odpowiedzi na etylen, a zmiany te zależą od „sprawności" wszystkich poznanych elementów łańcucha przekazywania sygnału. W warunkach braku etylenu poziom EIN3 gwałtownie spada, lecz inhibitory proteasomów hamują degradację EIN3 [122]. Z zastosowaniem techniki drożdżowego systemu dwuhybrydowego wyselekcjonowano, a następnie sklonowano dwa geny *EBF1* i *EBF2* (ang. *EIN3-Binding F box protein 1 and 2*) kodujące białka z kasetą F [122,123]. Obydwa białka obok kasety F mają po 18 powtórzeń sekwecji LRR tworzących domenę pośredniczącą w wiązaniu C-końcowego rejonu białka EIN3 (Rys. 8B) [122]. Efektem mutacji w obu genach *EBF* jest wzrost poziomu EIN3 i wyraźny wzrost wrażliwości na etylen. Podwójna mutacja *ebf1/ebf2* indukuje typowe reakcje na etylen w warunkach braku fitohormonu, natomiast nadekspresja genów *EBF1* i *EBF2* prowadzi do spadku wrażliwości roślin na etylen [122-124].

Podsumowując można stwierdzić, że w warunkach braku etylenu białko EIN3, a przypuszczalnie także białka EIL, są ubikwitylowane przez kompleksy SCF^{EBF1} i SCF^{EBF2} i w efekcie ulegają degradacji w proteasomach. Wzrost stężenia etylenu w komórce obniża powinowactwo EIN3/EIL do $SCF^{EBF1/EBF2}$ lub destabilizuje kompleksy ligazy SCF, czego efektem jest wyraźny wzrost poziomu EIN3/EIL w jądrze komórkowym. Rosnący poziom czynników transkrypcyjnych EIN3/EIL prowadzi do aktywacji genu *ERF1* i innych genów *ERBP*, których produkty regulują ekspresję genów wtórnych odpowiedzi na etylen.

ROLA UKŁADU UBIKWITYNA/PROTEASOM 26S W SZLAKU SYGNAŁOWYM AKTYWOWANYM PRZEZ KWAS ABSCYSYNOWY

Kwas abscysynowy (ABA) uczestniczy w regulacji wielu procesów cyklu rozwojowego roślin, w tym również w reakcjach adaptacyjnych na warunki stresogenne środowiska. Dzięki wyselekcjonowaniu mutantów *A. thaliana* niewrażliwych na kwas abscysynowy poznano szereg genów kodujących białkowe elementy łańcuchów sygnałowych pośredniczące w przekazywaniu sygnału odbieranego przez dotąd nie poznany receptor fitohormonu. W promotorach genów indukowanych przez kwas abscysynowy zidentyfikowano zachowaną w ewolucji sekwenncję ACGT, tzw. sekwencję ABRE (ang. *ABA -Response Element*), która wraz z innymi sekwencjami regulatorowymi tworzy kompleks odpowiedzi na ABA - ABRC (ang. *ABA Response Complex*). Poznanie sekwencji promotorowych umożliwiło m.in. zidentyfikowanie szeregu białek regulujących ekspresję genów zaangażowanych w odpowiedzi na kwas abscysynowy. Wyniki powyższych badań omówiono w pracy przeglądowej opublikowanej w Postępach Biologii Komórki [125], a osiągnięcia ostatnich lat prezentowane są w artykułach przeglądowych zamieszczonych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym [126-128].

Jednym z czynników transkrypcyjnych z rodziny bZIP, kodowanym przez gen sklonowany u mutanta *A. thaliana* niewrażliwego na kwas abscysynowy, jest białko ABI5 (ang. *ABA Insensitive 5*) [129]. ABI5 ma zachowaną w ewolucji domenę zawierającą reszty aminokwasów o charakterze zasadowym, kilka sekwencji zamka leucynowego, rejon bogaty w reszty proliny oraz sześć potencjalnych miejsc fosforylacji (Rys. 9A). Genom *A. thaliana* zawiera 13 genów podobnych do *ABI5*, których produkty wiążą się z sekwencją ABRE zlokalizowaną w promotorach wielu genów [130]. Homodimery ABI5 oddziałują fizycznie z białkiem ABI3, czynnikiem transkrypcyjnym wiązanym przez sekwencje regulatorowe [126]. Synergizm lub antagonizm we współdziałaniu obu białek przejawia się w hamowaniu lub aktywacji różnych genów [126,130].

Najnowsze wyniki badań wskazują, że kwas abscysynowy aktywuje transkrypcję genu *ABI5* oraz wpływa na wzrost stabilności i akumulację ufosforylowanej formy białka ABI5 [131,132]. W *A. thaliana* kwas abscysynowy aktywuje kinazę białkową MAP (AtMPK3), która przypuszczalnie uczestniczy w fosforylacji ABI5 [133], natomiast w nasionach pszenicy fitohormon aktywuje gen kinazy białkowej PKABA1 z rodziny SnRK, która fosforyluje białko TaABF, homolog ABI5 (Rys. 9B) [134]. W ostatnim czasie w *A. thaliana* zidentyfikowano gen kodujący białko AFP (ang. *ABI*

http://rcin.org.pl

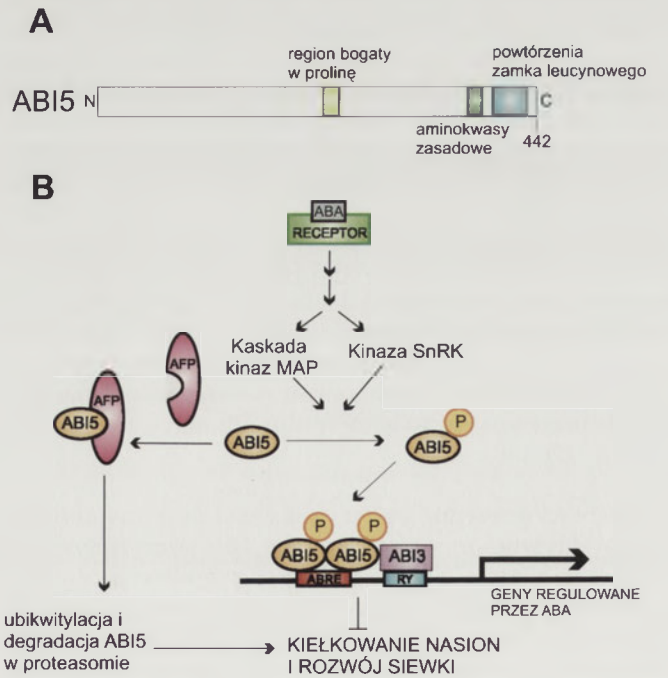
Five binding Protein), które pośredniczy w ubikwitylacji i degradacji ABI5 w proteasomach [135,136]. Wielkocząsteczkowe kompleksy ABI5-AFP stwierdzono w ziarnistościach jądrowych, z zastosowaniem metod immunochemicznych zlokalizowano także ligazę ubikwitynową COP1 z domeną RING-finger.

Ochronny wpływ kwasu abscysynowego na stabilność ABI5, przeciwdziałający jego proteolizie, jest ważnym elementem mechanizmu hamującego post-embrionalny rozwój nasion. Wysoki poziom kwasu abscysynowego promuje fosforylację ABI5, stabilizując w ten sposób jego poziom, co w efekcie prowadzi do zahamowania kiełkowania nasion. W warunkach braku lub obniżonego poziomu tego fitohormonu, nieufosforylowane białko ABI5 tworzy kompleksy z AFP kierujące ABI5 na drogę proteolitycznej degradacji. Spadek poziomu ABI5 znosi hamowanie rozwoju post-embrionalnego i umożliwia kiełkowanie nasion (Rys. 9B) [126,128].

KOMPLEKS LIGAZY SCF^{COI1} W REGULACJI ODPOWIEDZI NA JASMONIANY

Kwas jasmonowy (JA) oraz jego ester metylowy (MeJA) są naturalnymi substancjami, powstającymi z kwasu linolenowego, regulującymi wiele procesów związanych ze wzrostem i rozwojem rośliny. Do odpowiedzi na jasmoniany należą m.in. reakcje obronne roślin przeciw patogenom, owadom oraz różnym czynnikom abiotycznym. Ponadto jasmoniany hamują wzrost poszczególnych organów i całych roślin, hamują kiełkowanie i kwitnienie niektórych gatunków roślin, przyspieszają starzenie i opadanie liści oraz wpływają na dojrzewanie owoców [137,138].

W badaniach poświęconych odbiorowi i przekazywaniu sygnału jasmonianowego udało się wyselekcjonować



Rysunek 9. Schemat budowy polipeptydu ABI5 oraz jego miejsce w szlaku sygnałowym aktywowanym przez kwas abscysynowy. A – schemat budowy polipeptydu ABI5; B – białkowe elementy szlaku sygnałowego uczestniczące w regulowanej przez ABA ubikwitylacji białka ABI5. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [126-129,133-135]).

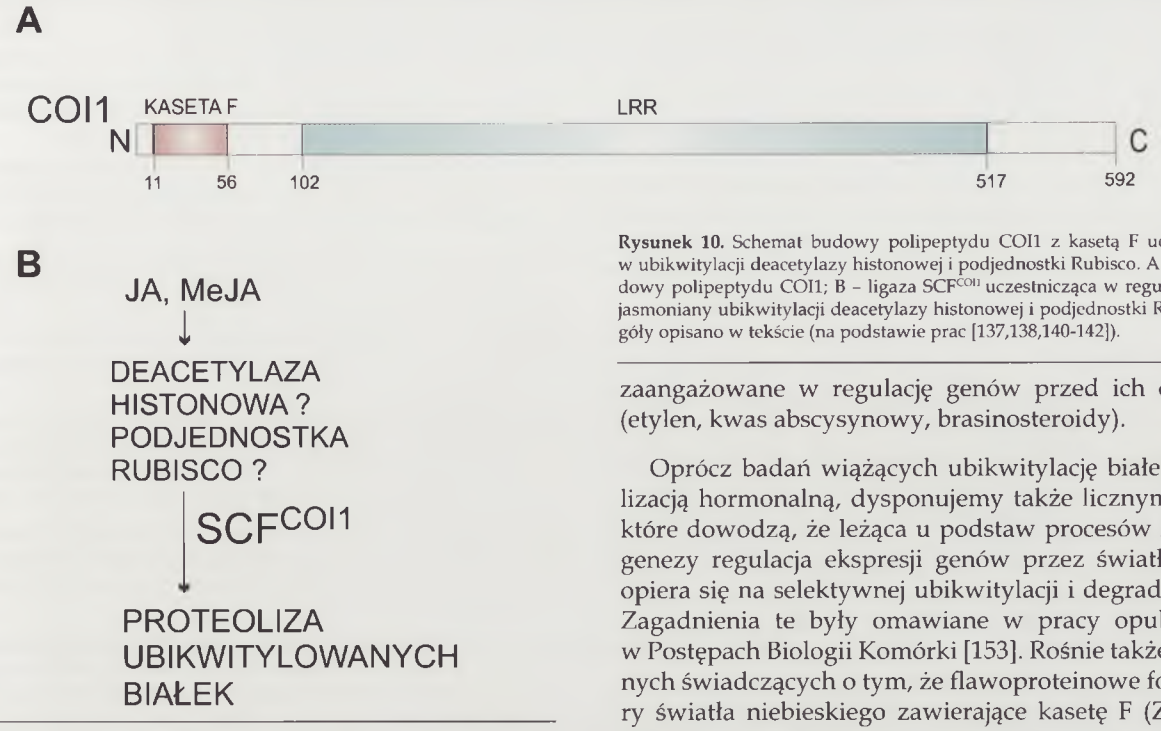
szereg mutantów *A. thaliana* niewrażliwych na ten fitohormon (*coi1*, *jin1* i *jar1*) [139]. Mutant *coi1* (ang. *coronatine insensitive 1*) jest niewrażliwy na ester metylowy kwasu jasmonowego oraz koronatynę, toksynę podobną do jasmonianu, syntetyzowaną przez bakterie *Pseudomonas syringae* [139,140]. *COI1* koduje polipeptyd o masie cząsteczkowej 66 kDa, który w części N-końcowej zawiera kasetę F, a w części C-końcowej 16 powtórzeń sekwencji LRR (Rys. 10A) [140]. Z zastosowaniem techniki drożdżowego systemu dwuhybrydowego oraz metody wytrącania w obecności specyficznych przeciwciał wykazano, że COI1 oddziałuje fizycznie z białkami ASK1 i ASK2 oraz deacetylazą histonową [141], a poprzez ASK wiąże się także z kuliną (AtCUL1) i białkiem AtRBX1 [141,142]. Mutacja w obrębie kasety F, uniemożliwiająca wiązanie COI1 z białkiem ASK, objawia się utratą wrażliwości rośliny na jasmonian, a mutacja w sekwencji LRR wpływa na wiązanie deacetylazy histonowej [141,142]. Regulacja szlaku jasmonianowego odbywa się poprzez rubinylację/derubinylację kuliny, mechanizm poznany wcześniej w badaniach nad sygnalizacją auksynową. Mutacja w genie *AXR1*, a także obniżony poziom funkcjonalnego kompleksu COP9 prowadzą do spadku lub całkowitego braku wrażliwości na jasmoniany [141-143]. Białkiem ubikwitylowanym przez ligazę SCF^{COI1} wydaje się być deacetylaza histonowa RPD3b, a także mała podjednostka Rubisco (Rys. 10B) [141]. Acetylacja i deacetylacja histonów w komórkach organizmów eukariotycznych uczestniczy w regulacji transkrypcji genów. Ponadto procesom starzenia towarzyszy m. in. wzrost stężenia jasmonianu, a wprowadzenie tego fitohormonu do liści hamuje ekspresję genu kodującego małą podjednostkę Rubisco oraz przyspiesza jej degradację [137-139].

HAMOWANIE UBIKWITYLACJI BIAŁEK BZR1/BES1 PRZEZ BRASINOSTEROIDY

Brasinosteroidy (Br) są naturalnymi substancjami roślinnymi przypominającymi budową chemiczną hormony steroidowe kręgowców [144]. Białkiem wiążącym te hormony jest zlokalizowana w błonie komórkowej kinaza serynowo/treoninowa BRI1 (ang. *Brassinosteroid Insensitive 1*) tworząca z kinazą białkową BAK1 (ang. *BRI1-Associated Receptor Kinase 1*) funkcjonalny receptor (Rys. 11) [145-147]. Aktywacja receptora przez brasinosteroidy polega przypuszczalnie na dimeryzacji obu kinaz umożliwiającej ich wzajemną transfosforylację [146,147]. Nie jest znane białko, które jest fosforylowane przez kompleks BRI1/BAK1, natomiast elementem szlaku sygnałowego położonym poniżej jest cytoplazmatyczna kinaza białkowa BIN2 (ang. *Brassinosteroid-Insensitive 2*) [148]. Substratami dla BIN2 są dwa białka jądrowe BZR1 (ang. *Brassinazole-Resistant 1*) i BES1 (ang. *BRI1-Suppressor 1*), które po ufosforylowaniu ulegają ubikwitylacji, a następnie są degradowane w proteasomie [149-152].

Dotychczasowe wyniki badań sugerują, że aktywacja kinaz białkowych BRI1/BAK1 przez brasinosteroidy uruchamia nieznany mechanizm, który hamuje kinazę białkową BIN2 (Rys. 11). Zahamowaniu fosforylacji białek BZR1/BES1 przez BIN2 towarzyszy wzrost ich stabilności, akumulacja w jądrze komórkowym i aktywacja genów regulowanych przez fitohormon. Dotąd nie wiadomo, czy

http://rcin.org.pl



Rysunek 10. Schemat budowy polipeptydu COI1 z kasetą F uczestniczącego w ubikwitylacji deacetylazy histonowej i podjednostki Rubisco. A – schemat budowy polipeptydu COI1; B – ligaza SCF^{COI1} uczestnicząca w regulowanej przez jasmoniany ubikwitylacji deacetylazy histonowej i podjednostki Rubisco. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [137,138,140-142]).

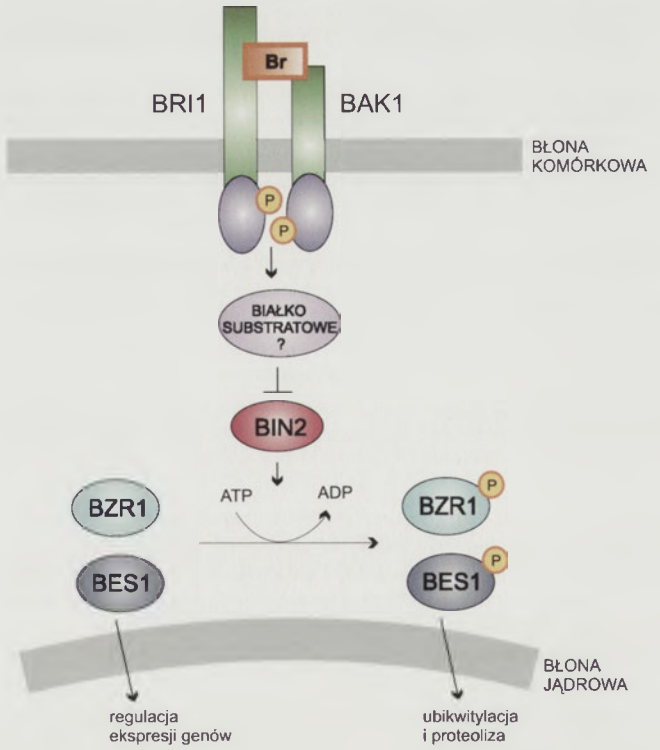
białka BZR1 i BES1 bezpośrednio oddziałują z DNA, czy też współdziałają z innymi białkami zaangażowanymi w regulację ekspresji genów. W warunkach braku brasinosterydu następuje aktywacja (odblokowanie) kinazy BIN2 i fosforylacja BZR1 i BES1 prowadząca do ich ubikwitylacji i proteolitycznej degradacji w proteasomach.

UWAGI KOŃCOWE

Przegląd wyników badań poświęconych roślinnym systemom ubikwitylacji i degradacji białek w proteasomach skłania do wniosku, że geny roślin kodujące ubikwitynę, enzymy kaskady ubikwitylacji białek, białka budujące proteasom, enzymy deubikwitylujące i białka regulatorowe tworzą jeden z najbardziej rozbudowanych i zróżnicowanych systemów komórkowych. Szacuje się, że w *A. thaliana* białka układu ubikwityna/proteasom 26S stanowią około 5% całego proteomu [8-12]. Większość elementów tego układu ma swoje ortologi w innych organizmach, ale budowa wielu innych elementów wskazuje na swoistość funkcji związanych tylko z biologią roślin [8,57]. Warto w tym miejscu także zwrócić uwagę na fakt, że w badaniach prowadzonych na materiale roślinnym brakuje jak na razie danych na temat mono- i diubikwitylacji, która jak wiadomo nie kieruje białka do proteolizy, ale odgrywa krańcowo odmienną rolę w procesach komórkowych.

Regulowana przez sygnały hormonalne selektywna ubikwitylacja i proteoliza białek zajmuje kluczowe miejsce w skomplikowanym mechanizmie regulującym ekspresję genów, który polega m. in. na wzajemnych oddziaływaniach między podstawowymi czynnikami transkrypcyjnymi, białkami aktywującymi transkrypcję, białkami koaktywującymi oraz białkami represorowymi. Sygnały hormonalne w roślinach mogą aktywować proteolityczną degradację białek represorowych (auksyny, gibereliny), ale mogą także w wyniku odpowiednich modyfikacji chronić określone białka zaangażowane w regulację genów przed ich degradacją (etylen, kwas abscysynowy, brasinosteroidy).

Oprócz badań wiążących ubikwitylację białek z sygnalizacją hormonalną, dysponujemy także licznymi danymi, które dowodzą, że leżąca u podstaw procesów fotomorfogenezy regulacja ekspresji genów przez światło również opiera się na selektywnej ubikwitylacji i degradacji białek. Zagadnienia te były omawiane w pracy opublikowanej w Postępach Biologii Komórki [153]. Rośnie także liczba danych świadczących o tym, że flawoproteinowe fotoreceptory światła niebieskiego zawierające kasetę F (ZTL, FKF1, LKP2) regulują ubikwitylację niektórych elementów zegara biologicznego [154]. Ponadto najnowsze badania związane z poznawaniem molekularnych mechanizmów samoniezgodności dowodzą, iż kluczowe miejsce w tych procesach zajmuje także układ selektywnej ubikwitylacji i degradacji białek [8]. W samoniezgodności gametofitowej zależna od ubikwityny proteoliza gra podstawową rolę już na etapie reakcji rozpoznania pyłku, a w samoniezgodności sporofitowej pośredniczy w reakcji odrzucenia pyłku o niewła-



Rysunek 11. Receptorowe kinazy białkowe oraz białkowe elementy zależnego od brasinosterydów szlaku sygnałowego regulującego poziom białek BZR1/BES1. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [145-147,149-152]).

http://rcin.org.pl

ściwym haplotypie. Również w badaniach mechanizmów obronnych przeciw patogenom pojawiły się doniesienia wskazujące na udział układu ubikwityna/proteasom 26S w indukowaniu charakterystycznych dla roślin reakcji obronnych [8,11,12]. Degradacja białek regulatorowych gra także ważną rolę w szlakach sygnałowych aktywowanych przez fitochromy, w fotoperiodycznej indukcji kwitnienia i regulacji rozwoju kwiatu, embriogenezie i procesach starzenia rośliny. Wszystkie wymienione zagadnienia oraz problemy związane z integracją szlaków sygnałowych na poziomie ubikwitylacji białek mogłyby być tematem odrębnej pracy.

PIŚMIENNICTWO

1. Sun L, Chen ZJ (2004) The novel functions of ubiquitination in signaling. Curr Opin Cell Biol 16: 119-126
2. Passmore LA, Barford D (2004) Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitynation. Biochem J 379: 513-525
3. Hicke L, Dunn R (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. Annu Rev Cell Dev Biol 19: 141-172
4. Grzelakowska-Sztabert B (2004) Oligo- i monomeryczne ligazy ubikwitynowe E3 z domeną *RING FINGER* – budowa i działanie. Post Biol Kom 31: 373-392
5. Grzelakowska-Sztabert B (2002) Proteoliza białek regulujących przebieg cyklu komórkowego – udział ubikwitynacji. Post Biochem 48: 34-47
6. Staszczak M, Zdunek E (1999) Proteoliza wewnątrzkomórkowa. Post Biochem 45: 32-41
7. Tobiasz A, Żołądek T (1997) System ubikwitynacji i jego rola u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Post Biochem 43: 91-97
8. Moon J, Parry G, Estelle M (2004) The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. Plant Cell 16: 3181-3195
9. Schwechheimer C, Calderón Villalobos LIA (2004) Cullin-containing E3 ubiquitin ligases in plant development. Curr Opin Plant Biol 7: 677-686
10. Vierstra RD (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. Trends Plant Sci 8: 135-142
11. Sullivan JA, Shirasu K, Deng XW (2003) The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. Nature Rev 4: 948--958
12. Hare PD, Seo HS, Yang J-Y, Chua N-H (2003) Modulation of sensitivity and selectivity in plant signaling by proteasomal destabilization. Curr Opin Plant Biol 6: 453-462
13. Callis J, Carpenter T, Sun C-W, Vierstra RD (1995) Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. Genetics 139: 921-939
14. Sun C-W, Griffen S, Callis J (1997) A model for the evolution of polyubiquitin genes from the study of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. Plant Mol Biol 34: 745-758
15. Rao-Naik C, delaCruz W, Laplaza JM, Tan S, Callis J, Fisher AJ (1998) The Rub family of ubiquitin-like proteins. J Biol Chem 273: 34976-34982
16. Callis J, Raasch JA, Vierstra RD (1990) Ubiquitin extension proteins of *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 265: 12486-12493
17. Bachmair A, Novatchkova M, Potuschak T, Eisenhaber F (2001) Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification. Trends Plant Sci 6: 463-470
18. Pickart CM (2004) Back to the future with ubiquitin. Cell 116: 181--190
19. Hatfield PM, Gosink MM, Carpenter TB, Vierstra RD (1997) The ubiquitin-activating enzyme (E1) gene family in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 11: 213-226
20. Hamilton KS, Ellison MJ, Barber KR, Williams RS, Huzil JT, McKenna S, Ptak C, Glover M, Shaw GS (2001) Structure of a conjugating enzyme-ubiquitin thiolester intermediate reveals a novel role for the ubiquitin tail. Structure 9: 897-904
21. Criqui MC, Engler J de A, Camasses A, Capron A, Parmentier Y, Inzé D, Genschik P (2002) Molecular characterization of plant ubiquitin-conjugating enzymes belonging to the UbcP4/E2-C/UBCx/UbcH10 gene family. Plant Physiol 130: 1230-1240
22. Downes BP, Stupar RM, Gingerich DJ, Vierstra RD (2003) The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in *Arabidopsis*: UPL3 has a specific role in trichome development. Plant J 35: 729-742
23. Bates PW, Vierstra RD (1999) UPL1 and 2, two 405 kDa ubiquitin--protein ligases from *Arabidopsis thaliana* related to the HECT-domain protein family. Plant J 20: 183-195
24. Kosarev P, Mayer KFX, Hardtke CS (2002) Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the *Arabidopsis* genome. Genome Biol 3: 1-12
25. Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, Chu C, Koepp DM, Elledge SJ, Pagano M, Conaway RC, Conaway JW, Harper JW, Pavletich NP (2002) Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F box^{Skp2} SCF ubiquitin ligase complex. Nature 416: 703-709
26. Shen W-H, Parmentier Y, Hellmann H, Lechner E, Dong A, Masson J, Granier F, Lepiniec L, Estelle M, Genschik P (2002) Null mutation of *AtCUL1* causes arrest in early embryogenesis in *Arabidopsis*. Mol Biol Cell 13: 1916-1928
27. Risseeuw EP, Daskalchuk TE, Banks TW, Liu E, Cotelesage J, Hellmann H, Estelle M, Somers DE, Crosby WL (2003) Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from *Arabidopsis*. Plant J 34: 753-767
28. Lechner E, Xie D, Grava S, Pigaglio E, Planchais S, Murray JAH, Parmentier Y, Mutterer J, Dubreucq B, Shen W-H, Genschik P (2002) The AtRbx1 protein is part of plant SCF complexes, and its down--regulation causes severe growth and developmental defects. J Biol Chem 277: 50069-50080
29. Gray WM, Hellmann H, Dharmasiri S, Estelle M (2002) Role of the Arabidopsis RING-H2 protein RBX1 in RUB modification and SCF function. Plant Cell 14: 2137-2144
30. Zhao D, Ni W, Feng B, Han T, Petrasek MG, Ma H (2003) Members of the *Arabidopsis-SKP1-like* gene family exhibit a variety of expression patterns and may play diverse roles in Arabidopsis. Plant Physiol 133: 203-217
31. Marrocco K, Lecureuil A, Nicolas P, Guerche P (2003) The *Arabidopsis* SKP1-like genes present a spectrum of expression profiles. Plant Mol Biol 52: 715-727
32. Gagne JM, Downes BP, Shiu S-H, Durski AM, Vierstra RD (2002) The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 99: 11519--11524
33. Dharmasiri S, Dharmasiri N, Hellmann H, Estelle M (2003) The RUB/Nedd8 conjugation pathway is required for early development in *Arabidopsis*. EMBO J 22: 1762-1770
34. Yamanaka A, Yada M, Imaki H, Koga M, Ohshima Y, Nakayama K-I (2002) Multiple Skp1-related proteins In *Caenorhabditis elegans*: diverse patterns of interaction with cullins and F-box proteins. Curr Biol 12: 267-275
35. Yang M, Hu Y, Lodhi M, McCombie WR, Ma H (1999) The *Arabidopsis SKP1-LIKE1* gene is essential for male meiosis and may control homologue separation. Proc Natl Acad Sci USA 96: 11416-11421
36. Zhao D, Yang M, Solava J, Ma H (1999) The *ASK1* gene regulates development and interacts with the *UFO* gene to control floral organ identity in *Arabidopsis*. Dev Genet 25: 209-223
37. Kuroda H, Takahashi N, Shimada H, Seki M, Shinozaki K, Matsui M (2002) Classification and expression analysis of *Arabidopsis* F-box-containing protein genes. Plant Cell Physiol 43: 1073-1085
38. Andrade MA, González-Guzmán M, Serrano R, Rodríguez PL (2001) A combination of the F-box motif and kelch repeats defines a large *Arabidopsis* family of F-box proteins. Plant Mol Biol 46: 603-614
39. Aravind L, Koonin EV (2000) The U box is a modified RING finger – a common domain in ubiquitination. Curr Biol 10: R132-R134

http://rcin.org.pl

40. Azevedo C, Santos-Rosa MJ, Shirasu K (2001) The U-box protein family in plants. Trends Plant Sci 6: 354-358

41. Mudgil Y, Shiu S-H, Stone SL, Salt JN, Goring DR (2004) A large complement of the predicted Arabidopsis ARM repeat proteins are members of the U-box E3 ubiquitin ligase family. Plant Physiol 134: 59-66

42. Yan J, Wang J, Li Q, Hwang JR, Patterson C, Zhang H (2003) AtCHIP, a U-box-containing E3 ubiquitin ligase, plays a critical role in temperature stress tolerance in *Arabidopsis*. Plant Physiol 132: 861--869

43. Parry G, Estelle M (2004) Regulation of cullin-based ubiquitin ligases by the Nedd8/RUB ubiquitin-like proteins. Sem Cell Dev Biol 15: 221-229

44. Zielińska E, Kowalczyk S (2000) Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego. Post Biol Kom 27: 155-183

45. Del Pozo JC, Dharmasiri S, Hellmann H, Walker L, Gray WM, Estelle M (2002) AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the Arabidopsis cullin AtCul1 is required for auxin response. Plant Cell 14: 421-433

46. Del Pozo JC, Estelle M (1999) The *Arabidopsis* cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin -related protein RUB1. Proc Nat Acad Sci USA 96: 15342-15347

47. Wei N, Deng XW (2003) The COP9 signalosome. Annu Rev Cell Dev Biol 19: 261-286

48. Serino G, Deng X-W (2003) The COP 9 signalosome: regulating plant development through the control of proteolysis. Annu Rev Plant Biol 54: 165-182

49. Cope GA, Deshaies RJ (2003) COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. Cell 114: 663-671

50. Schwechheimer C, Serino G, Callis J, Crosby WL, Lyapina S, Deshaies RJ, Gray WM, Estelle M, Deng X-W (2001) Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCF^{TIR1} in mediating auxin response. Science 292: 1379-1382

51. Schwechheimer C, Serino G, Deng X-W (2002) Multiple ubiquitin ligase-mediated processes require COP 9 signalosome and AXR1 function. Plant Cell 14: 2553-2563

52. Zheng J, Yang X, Harrell JM, Ryzhikov S, Shim E-H, Lykke-Andersen K, Wei N, Sun H, Kobayashi R, Zhang H (2002) CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. Mol Cell 10: 1-20

53. Liu J, Furukawa M, Matsumoto T, Xiong Y (2002) NEDD8 modification of CUL1 dissociates $p120^{CAND1}$, an inhibitor of CUL1-SKP1 binding and SCF ligases. Mol Cell 10: 1511-1518

54. Chuang H-w, Zhang W, Gray WM (2004) Arabidopsis *ETA2*, an apparent ortholog of the human cullin-interacting protein CAND1, is required for auxin responses mediated by the SCF^{TIR1} ubiquitin ligase. Plant Cell 16: 1883-1897

55. Feng S, Shen Y, Sullivan JA, Rubio V, Xiong Y, Sun T-p, Deng XW (2004) Arabidopsis CAND1, an unmodified CUL1-interacting protein, is involved in multiple developmental pathways controlled by ubiquitin/proteasome-mediated protein degradation. Plant Cell 16: 1870-1882

56. Cheng Y, Dai X, Zhao Y (2004) AtCAND1, a HEAT-repeat protein that participates in auxin signaling in Arabidopsis. Plant Physiol 135: 1020-1026

57. Smalle J, Vierstra RD (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. Annu Rev Plant Biol 55: 555-590

58. Hartmann-Petersen R, Seeger M, Gordon C (2003) Transferring substrates to the 26S proteasome. Trends Biochem Sci 28: 26-31

59. Fu H, Reis N, Lee Y, Glickman MH, Vierstra RD (2001) Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. EMBO J 20: 7096-7107

60. Yang P, Fu H, Walker J, Papa CM, Smalle J, Ju Y-M, Vierstra RD (2004) Purification of the *Arabidopsis* 26S proteasome. J Biol Chem 279: 6401-6413

61. Fu H, Doelling JH, Arendt CS, Hochstrasser M, Vierstra RD (1998) Molecular organization of the 20S proteasome gene family from *Arabidopsis thaliana*. Genetics 149: 677-692

62. Fu H, Doelling JH, Rubin DM, Vierstra RD (1999) Structural and functional analysis of the six regulatory particle triple-A ATPase subunits from the *Arabidopsis* 26S proteasome. Plant J 18: 529-539

63. Shibahara T, Kawasaki H, Hirano H (2002) Identification of the 19S regulatory particle subunits from the rice 26S proteasome. Eur J Biochem 269: 1474-1483

64. Wing SS (2003) Deubiquitinating enzymes – the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway. Int J Biochem Cell Biol 35: 590-605

65. Yan N, Doelling JH, Falbel TG, Durski AM, Vierstra RD (2000) The ubiquitin-specific protease family from Arabidopsis. *At*UBP1 and 2 are required for the resistance to the amino acid analog canavanine. Plant Physiol 124: 1828-1843

66. Vogler H, Kuhlemeier C (2003) Simple hormones but complex signalling. Curr Opin Plant Biol 6: 51-56

67. Dharmasiri N, Estelle M (2004) Auxin signaling and regulated protein degradation. Trends Plant Sci 9: 302-308

68. Berleth T, Krogan NT, Scarpella E (2004) Auxin signals – turning genes on and turning cells around. Curr Opin Plant Biol 7: 553-563

69. Leyser O (2002) Molecular genetics of auxin signaling. Annu Rev Plant Biol 53: 377-398

70. Kepinski S, Leyser O (2002) Ubiquitination and auxin signaling: a degrading story. Plant Cell S81-S95

71. Guilfoyle TJ, Hagen G (2001) Auxin response factors. J Plant Growth Regul 20: 281-291

72. Hagen G, Guilfoyle T (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. Plant Mol Biol 49: 373-385

73. Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle T (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. Plant Cell 15: 533--543

74. Liscum E, Reed JW (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. Plant Mol Biol 49: 387-400

75. Remington DL, Vision TJ, Guilfoyle TJ, Reed JW (2004) Contrasting modes of diversification in the *Aux/IAA* and *ARF* gene families. Plant Physiol 135: 1738-1752

76. Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. Plant Cell 16: 533-543

77. Park J-Y, Kim H-J, Kim J (2002) Mutation in domain II of IAA1 confers diverse auxin-related phenotypes and represses auxin-activated expression of *Aux/IAA* genes in steroid regulator-inducible system. Plant J 32: 669-683

78. Zenser N, Ellsmore A, Leasure C, Callis J (2001) Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. Proc Natl Acad Sci USA 98: 11795-11800

79. Bahrami AR, Bastow R, Rolfe S, Price C, Gray JE (2002) A role for nuclear localised proteasomes in mediating auxin action. Plant J 30: 691-698

80. Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M (1998) The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. Genes Dev 12: 198-207

81. Gray WM, Del Pozo JC, Walker L, Hobbie L, Risseeuw E, Banks T, Crosby WL, Yang M, Ma H, Estelle M (1999) Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. Genes Dev 13: 1678-1691

82. Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M (2001) Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. Nature 414: 271-276

83. Gray WM, Muskett PR, Chuang H-w, Parker JE (2003) Arabidopsis SGT1b is required for SCF^{TIR1}- mediated auxin response. Plant Cell 15: 1310-1319

84. DeLong A, Mockaitis K, Christensen S (2002) Protein phosphorylation in the delivery of and response to auxin signals. Plant Mol Biol 49: 285-303

http://rcin.org.pl

85. Dharmasiri N, Dharmasiri S, Jones AM, Estelle M (2003) Auxin action in a cell-free system. Curr Biol 13: 1418-1422

86. Kepinski S, Leyser O (2004) Auxin-induced SCF^{TIR1} - Aux/IAA interaction involves stable modification of the SCF^{TIR1} complex. Proc Natl Acad Sci USA 101: 12381-12386

87. Kowalczyk S, Jakubowska A (2000) Gibereliny - percepcja i transdukcja sygnalu. Post Biol Kom 27: 397-423

88. Thomas SG, Sun T-p (2004) Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. Plant Physiol 135: 668-676

89. Itoh H, Matsuoka M, Steber CM (2003) A role for the ubiquitin - 26S--proteasome pathway in gibberellin signaling. Trends Plant Sci 8: 492-497

90. Gomi K, Matsuoka M (2003) Gibberellin signalling pathway. Curr Opin Plant Biol 6: 489-493

91. Hussain A, Peng J (2003) DELLA proteins and GA signalling in *Arabidopsis*. J Plant Growth Regul 22: 134-140

92. Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP (1997) The *Arabidopsis GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. Gen Dev 11: 3194-3205

93. Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T-p (1998) The Arabidopsis *RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. Plant Cell 10: 155-169

94. Wen C-K, Chang C (2002) Arabidopsis *RGL1* encodes a negative regulator of gibberellin responses. Plant Cell 14: 87-100

95. Lee S, Cheng H, King KE, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J, Harberd NP, Peng J (2002) Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA*-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. Gen Dev 16: 646-658

96. Bolle C (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. Planta 218: 683-692

97. Hedden P (2003) The genes of the Green Revolution. Trends Genet 19: 5-9

98. Ashikari M, Hironori I, Miyako U-T, Sasaki A, Gomi K, Kitano H, Matsuoka M (2003) Gibberellin signal transduction in rice. J Plant Growth Reg 22: 141-151

99. Silverstone AL, Jung H-S, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun T-p (2001) Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. Plant Cell 13: 1555-1565

100. Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sato Y, Ashikari M, Matsuoka M (2002) The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. Plant Cell 14: 57--70

101. Gubler F, Chandler PM, White RG, Llewellyn DJ, Jacobsen JV (2002) Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. Plant Physiol 129: 191-200

102. Fleck B, Harberd NP (2002) Evidence that the *Arabidopsis* nuclear gibberellin signalling protein GAI is not destabilised by gibberellin. Plant J 32: 935-947

103. Dill A, Jung H-S, Sun T-p (2001) The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. Proc Natl Acad Sci USA 98: 14162-14167

104. McGinnis KM, Thomas SG, Soule JD, Strader LC, Zale JM, Sun T-p, Steber CM (2003) The Arabidopsis *SLEEPY1* gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. Plant Cell 15: 1120-1130

105. Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM, Sun T-p (2004) The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. Plant Cell 16: 1392-1405

106. Fu X, Richards DE, Fleck B, Xie D, Burton N, Harberd NP (2004) The Arabidopsis mutant $sleepy1^{gar2-1}$ protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. Plant Cell 16: 1406-1418

107. Sasaki A, Itoh H, Gomi K, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Jeong D-H, An G, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M (2003) Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. Science 299: 1896-1898

108. Gomi K, Sasaki A, Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M (2004) GID2, an F-box subunit of the SCFE3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. Plant J 37: 626-634

109. Fu X, Richards DE, Ait-ali T, Hynes LW, Ougham H, Peng J, Harberd NP (2002) Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor. Plant Cell 14: 3191-3200

110. Tyler L, Thomas SG, Hu J, Dill A, Alonso JM, Ecker JR, Sun T-p (2004) DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. Plant Physiol 135: 1008--1019

111. Monte E, Amador V, Russo E, Martínez-García J, Prat S (2003) PHOR1: a U-box GA signaling component with a role in proteasome degradation? J Plant Growth Regul 22: 152-162

112. Kowalczyk S, Hetmann A (2003) Roślinne receptorowe kinazy histydynowe i wielostopniowy przepływ fosforanu do regulatorów odpowiedzi. Post Biochem 49: 298-318

113. Guo H, Ecker JR (2004) The ethylene signaling pathway: new insights. Curr Opin Plant Biol 7: 40-49

114. Klee HJ (2004) Ethylene signal transduction. Moving beyond Arabidopsis. Plant Physiol 135: 660-667

115. Grefen C, Harter K (2004) Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. Planta 219: 733-742

116. Chen Y-F, Randlett MD, Findell JL, Schaller GE (2002) Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. J Biol Chem 277: 19861-19866

117. Gao Z, Chen Y-F, Randlett MD, Zhao X-C, Findell JL, Kieber JJ, Schaller GE (2003) Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. J Biol Chem 278: 34725-34732

118. Huang Y, Li H, Hutchison CE, Laskey J, Kieber JJ (2003) Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. Plant J 33: 221-233

119. Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker JR (1997) Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. Cell 89: 1133-1144

120. Alonso JM, Stepanova AN, Solano R, Wisman E, Ferrari S, Ausubel FM, Ecker JR (2003) Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for *weak ethylene-insensitive* mutants in *Arabidopsis*. Proc Nat Acad Sci USA 100: 2992-2997

121. Solano R, Stepanova A, Chao Q, Ecker JR (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. Gen Dev 12: 3703-3714

122. Guo H, Ecker JR (2003) Plant responses to ethylene gas are mediated by $SCF^{EBF1/EBF2}$-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. Cell 115: 667-677

123. Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C, Genschik P (2003) EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F box proteins: EBF1 and EBF2. Cell 115: 679-689

124. Gagne JM, Smalle J, Gingerich DJ, Walker JM, Yoo S-D, Yanagisawa S, Vierstra RD (2004) *Arabidopsis* EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. Proc Nat Acad Sci USA 101: 6803-6808

125. Jakubowska A, Kowalczyk S (2000) Kwas abscysynowy - percepcja i transdukcja sygnału. Post Biol Kom 27: 633-656

126. Himmelbach A, Yang Y, Grill E (2003) Relay and control of abscisic acid signaling. Curr Opin Plant Biol 6: 470-479

127. Nambara E, Marion-Poll A (2003) ABA action and interactions in seeds. Trends Plant Sci 8: 213-217

128. Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. Plant Cell S15-S45

http://rcin.org.pl

129. Finkelstein RR, Lynch TJ (2000) The Arabidopsis abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. Plant Cell 12: 599-609

130. Suzuki M, Ketterling MG, Li Q-B, McCarty DR (2003) Viviparous1 alters global gene expression patterns through regulation of abscisic acid signaling. Plant Physiol 132: 1664-1677

131. Lopez-Molina L, Mongrand S, Chua N-H (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. Proc Nat Acad Sci USA 98: 4782-4787

132. Lopez-Molina L, Mongrand S, McLachlin DT, Chait BT, Chua N-H (2002) ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. Plant J 32: 317-328

133. Lu C, Han M-H, Guevara-Garcia A, Fedoroff NV (2002) Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. Proc Nat Acad Sci USA 99: 15812-15817

134. Johnson RR, Wagner RL, Verhey SD, Walker-Simmons MK (2002) The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed--specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. Plant Physiol 130: 837-846

135. Lopez-Molina L, Mongrand S, Kinoshita N, Chua N-H (2003) AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. Gen Dev 17: 410-418

136. Smalle J, Kurepa J, Yang P, Emborg TJ, Babiychuk E, Kushnir S, Vierstra RD (2003) The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in Arabidopsis growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling. Plant Cell 15: 965--980

137. Devoto A, Turner JG (2003) Regulation of jasmonate-mediated plant responses in Arabidopsis. Ann Bot 92: 329-337

138. Turner JG, Ellis C, Devoto A (2002) The jasmonate signal pathway. Plant Cell S153-S164

139. Berger S (2002) Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as a tools for studying stress signaling. Planta 214: 497-504

140. Xie D-X, 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

141. Devoto A, Nieto-Rostro M, Xie D, Ellis C, Harmston R, Patrick E, Davis J, Sherratt L, Coleman M, Turner JG (2002) COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. Plant J 32: 457-466

142. 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

143. Feng S, Ma L, Wang X, Xie D, Dinesh-Kumar SP, Wei N, Deng XW (2003) The COP9 signalosome interacts physically with SCF^{COI1} and modulates jasmonate responses. Plant Cell 15: 1083-1094

144. Back TG, Pharis RP (2003) Structure-activity studies of brassinosteroids and the search for novel analogues and mimetics with improved bioactivity. J Plant Growth Regul 22: 350-361

145. Wang Z-Y, He J-X (2004) Brassinosteroid signal transduction – choices of signals and receptors. Trends Plant Sci 9: 91-96

146. Li J (2003) Brassinosteroids signal through two receptor-like kinases. Curr Opin Plant Biol 6: 494-499

147. Peng P, Li J (2003) Brassinosteroid signal transduction: a mix of conservation and novelty. J Plant Growth Reg 22: 298-312

148. Li J, Nam KH (2002) Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. Science 295: 1299-1301

149. Yin Y, Wang Z-Y, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. Cell 109: 181-191

150. Wang Z-Y, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T, Chory J (2002) Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. Dev Cell 2: 505-513

151. He J-X, Gendron JM, Yang Y, Li J, Wang Z-Y (2002) The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. Proc Nat Acad Sci USA 99: 10185-10190

152. Zhao J, Peng P, Schmitz RJ, Decker AD, Tax FE, Li J (2002) Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling. Plant Physiol 130: 1221-1229

153. Hetmann A, Kowalczyk S (2004) Szlaki sygnałowe aktywowane przez fitochromy, roślinne receptory światła czerwonego i dalekiej czerwieni. Post Biol Kom 31: 155-176

154. Hetmann A, Kowalczyk S (2004) Roślinne receptory światła niebieskiego i UV-A pośredniczące w reakcjach fototropicznych, fotomorfogenezie i nastawianiu zegara biologicznego. Post Biol Kom 31: 441-463

Plant ubiquitylation and proteolytic systems, the key elements in hormonal signaling pathways

Stanisław Kowalczyk, Emilia Hadowska✉, Anna Piekarska

Department of Biochemistry, Nicolaus Copernicus University, 7 Gagarin St., 87-100 Toruń, Poland
✉ e-mail: hadowska@uni.torun.pl

Key words: ubiqutin ligases E3, proteasome 26S, proteolysis, phytohormones, hormone signalling

ABSTRACT

The general function of the ubiquitylation systems is to conjugate ubiquitin to lysine residues within substrate proteins, thus targeting them for degradation by the proteasome. In *Arabidopsis thaliana* more than 1300 genes (~5% of the proteome) encode components of the ubiquitin/26S proteasome pathway. Approximately 90% of these genes encode subunits of the E3 ubiquitin ligases, which confer substrate specificity to the ubiquitin/26S proteasome pathway. The plant E3 ubiquitin ligases comprise a large and diverse family of proteins or protein complexes containing either a HECT domain, a RING-finger or U-box domain. The SCF class of E3 ligases is the most thoroughly studied in plants because some of them participate in regulation of hormone signaling pathways. The role of the SCF is to ubiquitylate repressors of hormone response (auxin, gibberellins), whereas in response to ethylene, abscisic acid and brassinosteroids the SCF participate in degradation of positive regulators in the absence of the hormone.

http://rcin.org.pl

Roślinne kinazy białkowe stymulowane wapniem

Krzysztof Jaworski
Adriana Szmidt-Jaworska
Jan Kopcewicz

Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Ogólnej I Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; e-mail: jaworski@biol.uni.torun.pl; tel. (56) 611 44 56; faks: (56) 611 47 72

Artykuł otrzymano 28 października 2004
Artykuł zaakceptowano 13 stycznia 2005

Słowa kluczowe: wapń, kalmodulina, CDPK, kinaza

Wykaz skrótów: ACS – syntaza 1-amino-cyklopropano-1-karboksylazowa (ang. *1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase*); CaM – kalmodulina (ang. *calmodulin*); CaMK – kinaza zależna od kalmoduliny (ang. *calmodulin dependent protein kinase*); CBK – kinazy białkowe wiążące kalmodulinę (ang. *calmodulin binding protein kinase*); CBL – białka podobne do kalcyneuryny B (*ang. calcineurin B like proteins);* CCaMK – kinaza zależna od Ca^{2+} i kalmoduliny (ang. *$Ca^{2+}$and CaM-dependent protein kinase*); CDPK – kinaza białkowa zależna od wapnia (ang. *calcium-dependent protein kinase*); CRK – kinazy białkowe spokrewnione z CDPK (ang. *CDPK-related kinase*); SnRK – kinaza spokrewniona z kinazami SNF-1 (ang. *SNF-related kinase*); SOC3 – (ang. *salt overaly sensitive 3*)

STRESZCZENIE

Wapń jest uniwersalnym wtórnym przekaźnikiem informacji i odgrywa znaczącą rolę w wielu aspektach wzrostu i rozwoju roślin, obejmujących odpowiedzi roślin na czynniki biotyczne i abiotyczne. Wewnątrzkomórkowy sygnał wapniowy powstaje w komórkach roślinnych w odpowiedzi na różnorodne czynniki takie jak zmiany warunków środowiska, atak patogenu czy procesy wzrostu i rozwoju. Zmiany stężenia Ca^{2+} są charakterystyczne dla czynnika go wywołującego, a tym samym każdy z sygnałów daje reakcje odpowiednie do działającego bodźca. Specyficzna sygnatura wapnia jest rozpoznawana przez różne „czujniki wapniowe", takie jak np. kinazy białkowe. U roślin do tej pory zidentyfikowano pięć klas białkowych kinaz (CDPK, CRK, CCaMK, CaMK, SnRK3), których aktywność jest regulowana wapniem. Niniejszy artykuł przeglądowy podsumowuje dotychczasową wiedzę dotyczącą struktury, regulacji i funkcji roślinnych kinaz białkowych stymulowanych jonami wapnia.

WPROWADZENIE

Szlak przekazywania sygnału wapniowego jest jednym z najlepiej poznanych. Uczestniczy w licznych procesach biologicznych od podziałów komórki do odpowiedzi na szeroką gamę czynników wewnętrznych i zewnętrznych odgrywając rolę mediatora na drodze od stymulatora do odpowiedzi, regulując różnorodne procesy komórkowe [1,2]. Stąd też, wapń zyskał miano głównego wtórnego przekaźnika wewnątrzkomórkowego w komórkach roślinnych i zwierzęcych. Komórka roślinna jest wrażliwa na zmiany zachodzące w jej otoczeniu, co warunkuje istnienie receptorów oraz dróg przekazywania informacji do miejsc regulujących funkcjonowanie komórki. Jednym z ważniejszych zjawisk, które jest istotnym etapem wielu kaskad sygnałowych jest zmiana stężenia jonów wapnia w cytosolu. Wiadomo, że indukowane bodźcami zewnątrzkomórkowymi zmiany $[Ca^{2+}]_c$, mają określony charakter. Mogą one przybierać formę pojedynczych, krótkotrwałych wzrostów $[Ca^{2+}]_c$, oscylacji wapniowych lub powtarzalnych szczytów Ca^{2+}. Ta czasoprzestrzenna charakterystyka sygnału wapniowego, specyficzna względem stymulatora, określana jest jako „sygnatura wapniowa" [3]. Do najistotniejszych bodźców należy światło, temperatura, zranienie, atak patogenu, stres hiperosmotyczny i oksydacyjny, elicitory grzybowe, bodźce mechaniczne czy fitohormony. Pod wpływem tych czynników następuje wytworzenie sygnału wapniowego poprzez nagłe zwiększenie cytoplazmatycznego stężenia wapnia, po którym następuje również szybki powrót do stanu wyjściowego [2].

Inaczej niż większość jonów, wapń skupiony jest głównie tylko w niektórych częściach komórki. Komórki roślinne zawierają liczne magazyny wapnia, obejmujące apoplast, wakuolę, otoczenie jądrowe, siateczkę śródplazmatyczną i mitochondria. Zatem każdy bodziec może wywoływać charakterystyczną falę Ca^{2+} przez specyficzne zwiększanie aktywności rozmaicie zlokalizowanych kanałów Ca^{2+}, wymieniaczy H^+/Ca^{2+} i pomp wapniowych oraz protonowych (Ca^{2+}- oraz H^+-ATPaz) [4]. Różne „czujniki wapnia", takie jak białka wiążące wapń, rozpoznają specyficzną „sygnaturę" wapnia i przenoszą niesioną informację na kolejne elementy poprzez zmieniającą się fosforylację i defosforylację białek oraz zmiany we wzorze ekspresji genów [5].

„CZUJNIKI" SYGNAŁU WAPNIOWEGO

Początkowa percepcja sygnału wapniowego odbywa się poprzez wiązanie Ca^{2+} przez jego wielu odbiorców tzw. „czujniki wapnia", które są zdolne do rejestrowania zmian stężenia jonów wapniowych. Czujniki te są w stanie rozszyfrować niesioną informację i same lub też przez modyfikacje innych białek bądź czynników transkrypcyjnych, prowadzić do wywołania końcowej odpowiedzi rośliny na zmiany zachodzące w jej otoczeniu [6]. „Czujniki wapnia" można

http://rcin.org.pl

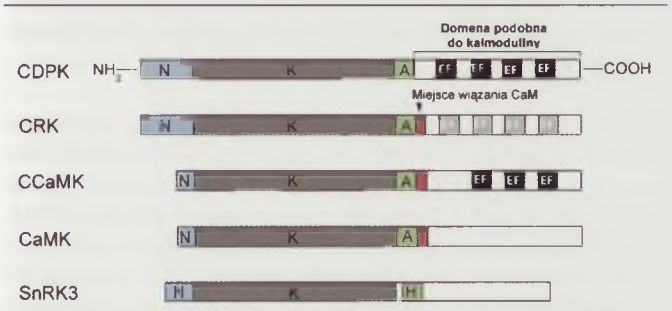
podzielić na dwa typy, tzw. czujniki przekaźnikowe (ang. *sensor relay*) i czujniki odpowiadające (ang. *sensor responder*). Do czujników przekaźnikowych należą takie białka jak kalmodulina (CaM), białka podobne do kalmoduliny, białka podobne do kalcyneuryny B (CBL), czy białka SOS3 (ang. *salt overaly sensitive 3*). Białka te wiążą jony wapnia dzięki obecności w ich cząsteczkach struktur zwanych „dłoniami EF" (ang. *EF-hands*) i ulegają konformacyjnym zmianom stając się w ten sposób cząsteczkami zdolnymi do oddziaływania z innymi białkami strukturalnymi, jak i enzymatycznymi, powodując zmiany w ich strukturze lub aktywności (np. kalmodulina stymuluje aktywność pomp wapniowych) [2,6,7].

Czujniki odpowiadające są zarówno receptorami jak i przekaźnikami sygnału wapniowego. Są to kinazy białkowe, które ulegają bezpośrednim konformacyjnym zmianom wywoływanym poprzez wiązanie jonów wapnia, które w ten sposób wpływają na zmianę własnej struktury i aktywności (np. zmiana aktywności kinazy białkowej zależnej od wapnia) lub pośrednio wiążąc białka przekaźnikowe (np. kinazy wiążące kalmodulinę) [6]. Enzymy te łączy się w pięć klas kinaz należących do rodziny kinaz CDPK/SnRK, których cząsteczki zawierają strukturę „dłoni EF" wewnątrz, bądź oddziałują z białkami posiadającymi taką strukturę. Należą do nich kinazy regulowane bezpośrednim wiązaniem jonów wapnia (CDPK), kinazy spokrewnione z kinazami CDPK (CRK), kinazy wiążące kalmodulinę (CaMK), kinazy aktywowane zarówno poprzez wiązanie wapnia i kalmoduliny (CCaMK), oraz kinazy (SnRK3) wiążące białka podobne do kalcyneuryny B czy SCaBP (Rys. 1) [8-10].

CDPK - KINAZY BIAŁKOWE ZALEŻNE OD WAPNIA

Najliczniejszą i najlepiej poznaną grupą kinaz są kinazy zależne od jonów wapnia, a niezależne od kalmoduliny, tzw. CDPK (ang. *calcium-dependent protein kinase*) [11]. Ten rodzaj kinaz został zidentyfikowany tylko w komórkach roślinnych oraz u niektórych pierwotniaków (*Paramecium caudatum, Plasmodium falciparum*), podczas gdy nie stwierdzono ich obecności u grzybów i zwierząt [3,11,12].

Kinazy (CDPK) są białkami monomerycznymi o masie cząsteczkowej wahającej się od 40 do 90 kDa, składającymi się z 4 oddzielnych domen: N-końcowej domeny, domeny kinazowej, autoinhibitorowej domeny łącznikowej oraz podobnej do kalmoduliny domeny regulatorowej wiążącej wapń (Rys. 1) [3,9,13]. Rejon N-końcowy cechuje duża zmienność zarówno pod względem długości (od 21 do 185 aminokwasów), jak i składu aminokwasowego [3]. Poza tą różnorodnością w rejonie N-końcowym znajduje się przypuszczalne miejsce mirystoilacji (reszta glicyny - Gly, która ulega modyfikacji poprzez kowalencyjne przyłączenie kwasu mirystylowego) [9,14]. Mirystoilacja w innych układach umożliwia wiązanie się białka z błoną, czy oddziaływanie białko-białko. Często dodatkowa modyfikacja przez kwasy tłuszczowe, taka jak palmitoilacja, jest potrzebna do stabilizacji oddziaływań białka z błoną [3]. U zbadanych kinaz CDPK, które podlegają procesowi mirystoilacji, w N-końcu stwierdzono również występowanie co najmniej jednej reszty cysteinowej, będącej potencjalnym miejscem palmitoilacji [9,14]. Ponadto w rejonie N-końcowym niektórych CDPK zlokalizowano zachowaną w ewolucji sekwencję PEST (rejon bogaty w reszty proliny, glutaminy, seryny i treoniny), która występuje w białkach ulegających szybkiej degradacji proteolitycznej.



Rysunek 1. Domenowa budowa kinaz regulowanych wapniem u roślin. N - domena zmienna, K - domena kinazowa, A - domena łącznikowa z autoinhibitorem, H - domena NAF/FILS, C - domena regulatorowa, czerwony prostokąt - miejsce wiązania kalmoduliny [na podstawie 9, zmodyfikowane].

Domenę łącznikową tworzy 31 reszt aminokwasów. Pełni ona funkcję autoinhibitorową, gdyż zawiera sekwencje pseudosubstratu i w ten sposób blokuje miejsca katalityczne enzymu pod nieobecność Ca^{2+} [13,15]. Region autoinhibitorowy jest silnie konserwowany, wykazuje nawet 100% zgodności w sekwencji aminokwasowej pomiędzy poszczególnymi izoenzymami CDPK *Arabidopsis thaliana* [3].

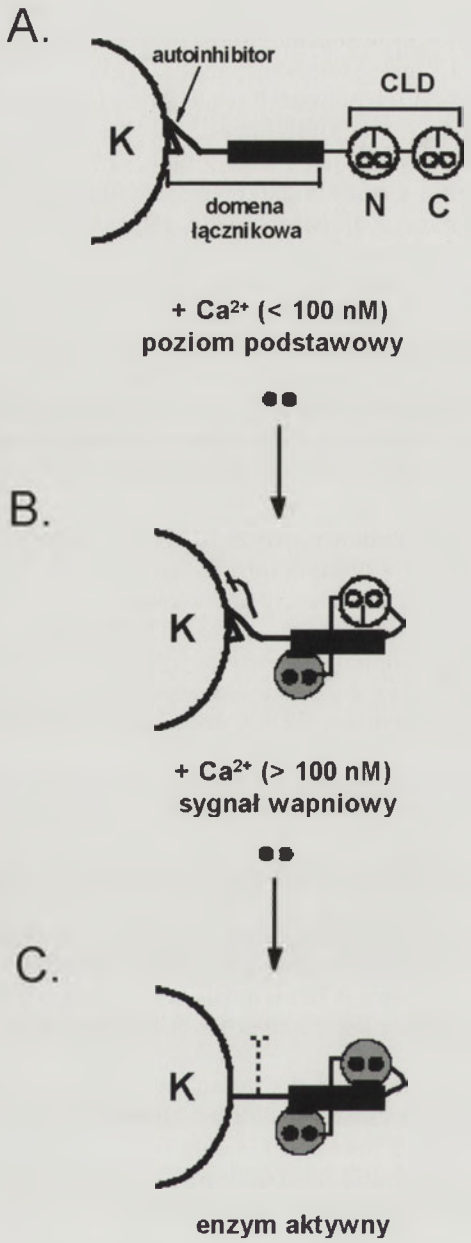
Domena kinazowa zawiera 12 poddomen o wysoko zachowanej w ewolucji strukturze pierwszorzędowej, typowych dla eukariotycznych kinaz serynowo-treoninowych. Poznanie genomu rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) wykazało prawie 100% identyczność miejsca aktywnego w tej domenie u wszystkich 34 izoform CDPK. Zachowana w ewolucji reszta lizyny w poddomenie II jest miejscem wiązania ATP, a mutacja prowadząca do zamiany tej reszty na inną znosi aktywność katalityczną [3].

Domena podobna do kalmoduliny (ang. CLD-*calmodulin-like domain*) zawiera 4 struktury „dłoni EF" (nota bene ich liczba może być różna od 4 w zależności od izoformy) wiążące Ca^{2+}, pozwalając tym samym na funkcjonowanie białka jako czujnika wapnia. Odcinek ten stanowi domeną regulatorową enzymu, a jego obecność wyjaśnia zdolność CDPK do bezpośredniego wiązania wapnia. Ostatecznie związanie Ca^{2+} wywołuje zmiany konformacyjne i w konsekwencji stymuluje enzym [3].

Mechanizm regulujący aktywność CDPK jest kontrolowany w wyniku wewnętrznych oddziaływań pomiędzy domenami kinazową, autoinhibitorową i wiążącą wapń (CLD). W warunkach bardzo niskiego stężenia Ca^{2+} w cytosolu, autoinhibitor zlokalizowany w domenie łącznikowej związany jest z domeną kinazową, utrzymując aktywność fosforylacyjną na niskim poziomie (Rys. 2a).

Domena łącznikowa hamuje aktywność zarówno niezmienionego genetycznie jak i konstytutywnie aktywnego enzymu w sposób kompetycyjny względem substratu białkowego. Wzrost stężenia Ca^{2+} powoduje związanie jonów wapnia w domenie CLD, w następstwie czego kinaza CDPK ulega konformacyjnym zmianom uwalniając autoinhibitor od miejsca katalitycznego i aktywując enzym. Sugeruje to,

http://rcin.org.pl



Rysunek 2. Model regulacji aktywności CDKP. W obecności niskich stężeń Ca^{2+} CDPK podlega autoinhibicji, poprzez oddziaływanie sekwencji pseudosubstratu w domenie łącznikowej z miejscem aktywnym w domenie kinazowej (A). Wzrost stężenia Ca^{2+} do poziomu występującego w cytoplazmie (tzw. poziom podstawowy) powoduje wiązanie się kationów wapnia z domeną C rejonu CLD i wytworzenie kompleksu z domeną inhibitorową (B). Aktywacja domeny kinazowej następuje w wyniku dalszego zwiększenia stężenia jonów wapnia i wysycenia miejsc wiążących Ca^{2+} w domenie N. Prowadzi to do konformacyjnych zmian wewnątrz CLD i w efekcie uwolnienie inhibitora. Czarnymi punktami oznaczono jony wapnia [na podstawie 17, zmodyfikowane].

że sekwencje autoinhibitorowe funkcjonują poprzez mechanizm analogiczny do proponowanego dla typowej kinazy CaMK występującej u kręgowców, w którym zaktywowana wapniem kalmodulina wiąże się do miejsca leżącego bezpośrednio za domeną łącznikową, znosząc efekt hamowania enzymu [3,13,15-17].

Wyniki najnowszych badań dotyczące biofizycznej analizy domeny CLD i jej oddziaływań z domeną łącznikową rzuciły nowe światło na wewnątrzmolekularny mechanizm aktywacji CDPK [17]. Podobnie jak kalmodulina region CLD zbudowany jest z dwóch strukturalnych domen określanych, jako N i C (ang. *N-lobe* i *C-lobe*), z których każda zawiera parę miejsc wiążących Ca^{2+} (dłonie EF). Analiza z zastosowaniem metody NMR wykazała, że te dwie domeny nie są równocenne, wykazując różne powinowactwo do jonów wapnia, co wskazuje na ich oddzielne funkcje. Poza tym, domena C-końca rejonu CLD wiąże się do domeny łącznikowej nawet w fizjologicznych (niskich) stężeniach Ca^{2+} w cytosolu, jednakże w tym przypadku kinaza wciąż pozostaje w stanie nieaktywnym (autoinhibicji) (Rys. 2b). Aktywacja enzymu następuje dopiero w wyniki wzrostu stężenia jonów wapnia i wysyceniu dwóch miejsc wiązania Ca^{2+} w N-domenie, wykazującej słabsze powinowactwo do tego kationu (Rys. 2c). Sugeruje to, że domena N-końca rejonu CLD funkcjonuje jako faktyczny czujnik wapnia kinaz CDPK. Pomimo tego, że C-domena nie funkcjonuje jako bezpośredni czujnik wapnia, to występujące w niej dwie struktury „dłoni EF" charakteryzują się sekwencją zachowaną w ewolucji u większości CDPK. Można zatem przypuszczać, że wcześniejsze wiązanie się domeny C z domeną łącznikową jest ogólną cechą kinaz CDPK [17]

To odkrycie jest zgodne z wcześniejszymi doświadczeniami z izoformami CDPK z *Plasmodium falciparum* [18]. Badania z wykorzystaniem mutanta kinazy PfCPK1, u którego każdy z motywów dłoni nie był w stanie wiązać wapnia wykazały, że dla funkcjonowania tego enzymu tylko pierwszy motyw dłoni (N-domena) jest znaczący dla zależnej od wapnia aktywacji enzymu.

Yoo i Harmon [16] sugerują, że wiązanie się domeny CLD do domeny łącznikowej jest niewystarczające do aktywacji enzymu. Prawdopodobnie w celu aktywacji wymagana jest interakcja CLD z dodatkowymi regionami na powierzchni enzymu. Wiadomo, że w kinazie CaMK zwierząt wapń łącząc się z kalmoduliną powoduje natychmiastowe przyłączanie się tego kompleksu do miejsca poniżej sekwencji autoinhibitorowej. To wywołuje bliżej nieznane zmiany w domenie autoinhibitorowej, skutkiem czego jest zniesienie hamowania. W przypadku kinaz CDPK konieczne jest wytworzenie się wewnątrzmolekularnego wiązania w domenie kalmodulino-podobnej. Stąd też, słuszne wydają się być sugestie odnośnie bliskiej analogi między CDPK, a CaMK zwierząt. Jedną z nich jest obserwacja, że aktywność kinazy, która pozbawiona została domeny CLD, może być częściowo stymulowana zarówno przez kalmodulinę, jak i wyizolowaną domenę kalmodulino-podobną. Przypuszcza się jednak, że mechanizm aktywacji enzymu w komórce jest bardziej złożony niż tylko oddziaływanie trzech domen [16].

Innym niuansem pojawiającym się w regulacji CDPK jest zależna od rodzaju substratu różna wrażliwość na Ca^{2+}. Pod nieobecność jakiegokolwiek substratu CDPKα z soi (*Glycine max*) wiąże wapń ze stałą dysocjacji wynoszącą 2×10^{-6} M, jednakże w jego obecności wrażliwość na wapń może wzrosnąć ponad 10-krotnie. Zastosowanie syntydu-2 i histonu III jako substratów dla CDPKα pozwoliło wykazać, że stężenie wapnia, przy którym enzym charakteryzuje się połową aktywności maksymalnej, w przypadku syntydu-2 wynosiło 6×10^{-8} M, podczas gdy w obecności histonu 4×10^{-6} M. Te

http://rcin.org.pl

różnice wrażliwości na wapń wskazują, że każda izoforma CDPK odpowiada na specyficzny sygnał wapniowy różniący się częstotliwością oscylacji, wielkością i czasem trwania zależnym od działającego czynnika. Jednakże pytanie, w jaki sposób sprawdzić *in vivo* różnice w aktywności specyficznych izoform, pozostaje wciąż bez odpowiedzi [10, 13].

Poza jonami wapnia, wiele kinaz aktywowanych jest poprzez proces fosforylacji: autofosforylacji czy kaskadę kinaz [10]. W przypadku CDPK zarówno natywna jak i zmieniona genetycznie kinaza podlegają autofosforylacji. Jednakże do tej pory nie udało się zidentyfikować miejsc autofosforylacji i ustalić jaką rolę pełni ten proces w aktywacji tych enzymów [3,13]. Wiele izoform CDPK posiada potencjalne miejsce autofosforylacji (Lys-Gln-Phe-Ser) w ich domenach autoinhibitorowych. Ponieważ autofosforylacja CaMKII występująca w podobnym miejscu powoduje aktywację enzymu, wydawać by się mogło, że kinazy CDPK są potencjalnie aktywowane poprzez podobny mechanizm. Jednakże, obecne dowody nie potwierdzają tej możliwości. CDPKα z soi (*Glycine max*) nie fosforyluje peptydów odpowiadających w sekwencji domenie autoinhibitorowej [13,19]. W przypadku CDPK z orzechów ziemnych (*Arachis hypogea*) i soi autofosforylacja nie ma wpływu na wapniowo-zależną aktywność tego enzymu [13], natomiast aktywność CDPK ze szpinaku (*Spinacia oleracea*) nie różni się po inkubacji enzymu w warunkach sprzyjających procesowi fosforylacji oraz po potraktowaniu fosfatazami [20]. Mimo to w kilku pracach pojawiły się informacje świadczące o tym, że proces autofosforylacji może wpływać na aktywność niektórych CDPK. Autofosforylacja CDPK z orzechów ziemnych *in vitro* jest wymagana do jej aktywacji, lecz ujawnia się ona jedynie w niskich stężeniach Ca^{2+} i może nie odgrywać roli regulatorowej *in vivo* [21] w przeciwieństwie do autofosforylacji CDPK z łustu głąbigroszka (*Psophocarpus tetragonalobus*) [22], gdzie proces ten powoduje zahamowanie aktywności. Aktywacja CDPK może być również modulowana przez inne kinazy, jak to ma miejsce w przypadku CDPK (NtCDPK2) z tytoniu (*Nicotiana tabacum*), która do pełnej aktywacji wymaga zarówno jonów wapnia jak i fosforylacji [13,23,24]. W kontrolowaniu szlaków sygnałowych procesy defosforylacji odgrywają równie ważną rolę jak fosforylacja. Fosfataza fosfoseryny z pędów łustu głąbigroszka defosforyluje nieaktywną kinazę CDPK (WbCDPK1) *in vitro*, znosząc hamujący wpływ autofosforylacji [25].

Analizy biochemiczne wykazały, że w obecności Ca^{2+} fosforylacja substratu przez niektóre CDPK może być wzmacniana przez pewne fosfolipidy. Fosfatydyloseryna (PS) i fosfatydyloinozytol (PI) stymulowały DcCDPK1 z marchwi (*Daucus carota*) [26] oraz jedną z izoform CDPK u kukurydzy (*Zea mays*) [27]. Rekombinowana DcCPK1 podlegała dodatkowej stymulacji przez kwas fosfatydowy w warunkach *in vitro* [26]. Lizo-fosfatydylocholina (LysoPC) i PI zwiększały natomiast fosforylację substratu przez kinazę AtCPK1 z rzodkiewnika [28]. Analiza sekwencji AtCPK1 wykazała obecność w N-końcu przypuszczalnego miejsca wiązania PI. Okazało się jednak, że fosfolipid wciąż był w stanie aktywować kinazę nawet wtedy, gdy enzym ten był pozbawiony miejsc jego wiązania. Nasuwa się zatem przypuszczenie, że CDPK posiada więcej niż jedno miejsce wiążące fosfatydyloinozytol [28]. Regulacja poprzez lipidy wydaje się być jednym z ważniejszych procesów, gdyż może ona stanowić punkt wspólny pomiędzy wieloma szlakami przekazywania sygnałów, a także powodować zmiany aktywności poprzez odwracalne wiązanie do błon.

Białka 14-3-3 działają zarówno jako białka dokujące jak i regulujące aktywność wielu enzymów komórkowych, nie wyłączając kinaz. Kinazy CDPK także wiążą białka 14-3-3. *In vitro* trzy różne izoformy białek 14-3-3 specyficznie wiążą i aktywują AtCPK1 z rzodkiewnika w obecności Ca^{2+}, a u dwóch innych (AtCPK24, AtCPK28) znaleziono przypuszczalne miejsca wiążące białka 14-3-3 [29]. Wapń może być potrzebny w części do indukcji autofosforylacji CDPK, gdyż białka 14-3-3 typowo regulują wiele enzymów poprzez wiązanie się do specyficznie ufosforylowanych reszt aminokwasowych [29]. Białka 14-3-3 także wiążą się z białkami fosforylowanymi przez CDPK np. z miejscami fosforylacji w reduktazie azotanowej. Wiele innych białek, włączając w to syntazę sacharozy czy też syntazę glutaminianu, wiąże białka 14-3-3 w sposób zależny od fosforylacji. Zaproponowano również, że 14-3-3 mogą łączyć razem enzymy, które są włączone w dwa kolejne szlaki metaboliczne.

FUNKCJE FIZJOLOGICZNE, REGULACJA EKSPRESJI GENU I AKTYWNOŚĆ KINAZY CDPK

Pomimo niezaprzeczalnej roli CDPK jako kluczowego regulatora w wielu biochemicznych szlakach sygnałowych, dotychczas bardzo mało wiadomo, która z izoform CDPK odgrywa rolę czujnika wapniowego w poszczególnych procesach. Brak specyficznego inhibitora dla CDPK, dominujących negatywnych konstruktów oraz funkcjonowanie w różnych obszarach komórki powoduje, że trudno jest poznać funkcję poszczególnych kinaz CDPK. Podczas gdy, regulacja ekspresji genów CDPK wywołana różnymi czynnikami zewnętrznymi i wewnętrznymi została opisana u licznych gatunków roślin, biochemiczna charakterystyka białek jest poznana fragmentarycznie [46]. Pomimo tego, poczyniono znaczące postępy w zrozumieniu fizjologicznej roli tych kinaz u wielu gatunków roślin [3].

ŚWIATŁO

Istnieje szereg prac wskazujących na rolę światła w aktywacji pewnych kinaz zależnych od wapnia. Wpływ światła na ekspresję izoform CDPK odkryto początkowo w przypadku rzodkiewnika (*AtCDPK9*) i kukurydzy (*ZmCDPK9*) [30]. Następnie Barker i wsp. [31] stwierdzili, że w dojrzałych, całkowicie rozwiniętych liściach kukurydzy rosnących na świetle aktywność kinazy zależnej od wapnia ($p67^{cdpk}$) jest słabo wykrywalna, podczas gdy w rozwijających się zielonych liściach, tkankach etiolowanych i korzeniach obserwuje się wysoki poziom aktywności tego enzymu. Dalsze badania wykazały, że rozwijające się tkanki, takie jak wierzchołek wzrostu, szybko rozwijające się liście i koleoptyle mają szczególnie wysoki poziom aktywności $p67^{cdpk}$, podczas gdy dojrzałe, etiolowane tkanki wykazują mniejszą aktywność, chociaż jest ona wciąż znacznie wyższa niż w dojrzałych liściach rosnących na świetle.

W badaniach nad kinazą pochodzącą z ryżu (*Oryza sativa*) stwierdzono, że zarówno poziom mRNA dwóch izoform *OsCDPK2* i *OsCDPK11*, jak również poziom enzymów

http://rcin.org.pl

zwiększa się podczas rozwoju kwiatów. Ekspresja *OsCDPK2* jest ściśle związana z percepcją światła. Enzym wykazuje niską aktywność w zielonych liściach wystawionych na światło, podczas gdy poziom białka zwiększa się gwałtownie, kiedy rośliny są przeniesione do ciemności. Nie stwierdzono takich prawidłowości w ilości kinazy w innych organach po wystawieniu roślin na światło. W przypadku *OsCDPK11* światło nie ma żadnego wpływu na transkrypcję i translację [32]. Dalsze badania prowadzone nad transgenicznym ryżem z nadekspresją genu *OsCDPK2* wykazały, że akumulacja kinazy w zielonych liściach u roślin wstawionych do ciemności wzrastała znacznie już po dwóch godzinach. Autorzy sugerują możliwość udziału specyficznych receptorów światła (np. fitochromu A) w regulacji poziomu kinazy zależnej od wapnia [33]. W przypadku prac nad genem *CpCPK1* z cukini (*Cucurbita pepo*) stwierdzono specyficzną organowo i zależną od światła ekspresję genu z najwyższym poziomem mRNA w etiolowanych hypokotylach i zakrzywiających się częściach podliścieniowych siewki (ang. *hook*). Również aktywność kinazy koreluje z ekspresją badanego genu [34].

W 1989 roku Friedman i wsp. [35] opublikowali pracę, w której zaproponowali udział jonów wapnia w indukcji kwitnienia u wilca wielkokwiatowego (*Pharbitis nil*). Od tego czasu ukazało się szereg prac potwierdzających tę hipotezę. Stwierdzono, że egzogenne podawanie wapnia i jego modulatorów na liścienie wpływa na wewnątrzkomórkową homeostazę tego kationu, co ma bezpośredni wpływ na kwitnienie [36]. Podczas indukcji wilca pojawiają się fale wapniowe, a obniżenie poziomu wapnia poprzez podanie chelatorów tego związku hamuje proces kwitnienia. W chwili obecnej możemy przypuszczać, że kinazy zależne od Ca^{2+} są jednymi z odbiorców i przekaźników sygnału wapniowego u tej rośliny. Potwierdzeniem mogą być badania prowadzone na siewkach wilca poddanych warunkom indukcyjnym i nieindukcyjnym. Wykazano, że u roślin poddanych działaniu 16 godzinnej nocy indukcyjnej następuje wzrost fosforylacji 82 kDa białka, w sposób zależny od wapnia. [37].

CHŁÓD, SUSZA I STRES SOLNY

Ekspozycja na niską temperaturę powoduje wzrost ekspresji genów CDPK u wielu roślin. Chłód indukuje transkrypcję genów kukurydzy *ZmCDPK1* [38], ryżu *OsCDPK7* [39]. U lucerny siewnej (*Medicago sativa*) dwa geny *MsCK1* i *MsCK2* podlegają różnej ekspresji pod wpływem niskiej temperatury. Podczas gdy gen *MsCK1* jest aktywowany w odpowiedzi na chłód, to ekspresja genu *MsCK2* jest wtedy hamowana [40]. Enzymatyczna aktywność CDPK wzrasta również w odpowiedzi na ten rodzaj stresu. Zaobserwowano, że traktowanie chłodem wzmacnia wiązanie się kinazy CDPK z ryżu do błony komórkowej [41].

Stres solny i susza także podnoszą poziom transkrypcji genów CDPK. U rzodkiewnika zarówno susza, jak i wystawienie na działanie wysokiego stężenia NaCl indukują geny *AtCPK10* i *AtCPK11* [42]. Traktowanie NaCl silnie indukuje ekspresję genu *VrCDPK1* u fasoli (*Vigna radiata*) już po 2 godzinach [43]. Podobną odpowiedź na suszę i wysokie stężenie soli obserwowano dla genu *McCDPK1* u kryształki lśniącej (*Mesembrynatheum cristallinum*) [44] jak i genu *OsCDPK7* u ryżu [39].

W celu aktywacji szlaków pod nieobecność wapnia użyto konstytutywnie aktywnych izoform CDPK. Wykazano, że dwa z nich (AtCDPK10 i AtCDPK30) prowadzą do uruchomienia promotorów genów odpowiedzi na Ca^{2+}, stres i kwas abscysynowy (ABA). Te rezultaty wskazują na związek poszczególnych izoform CDPK ze specyficznymi szlakami sygnałowymi *in vivo* [45].

FITOHORMONY

Od czasu, gdy stwierdzono udział fitohormonów w szlaku sygnałowym w odpowiedzi na suszę i stres solny, badano ekspresję genu CDPK po traktowaniu roślin hormonami roślinnymi, takimi jak giberelina (GA), auksyna (IAA), kwas abscysynowy (ABA), cytokininy czy kwas jasmonowy (JA). Traktowane gibereliną oraz brasinolidem siewki ryżu wykazują wzrost aktywności CDPK [46]. Stwierdzono również wpływ hormonów na regulację CDPK na poziomie transkrypcji. GA, ABA i cytokininy indukują ekspresję genu *NtCPDK1* w liściach tytoniu [47], podczas gdy IAA stymuluje ekspresję genu *VrCPK1* u fasoli [43] oraz genu w komórkach lucerny [48]. Traktowanie cytokininą indukuje ekspresję genu *CsCDPK3* ogórka (*Cucumis sativus*) [49] i *NtCDPK1* tytoniu [47], podczas gdy podawany JA hamuje aktywność enzymatyczną i redukuje poziom mRNA genu *StCDPK2* ziemniaka (*Solanum tuberosum*) [50]. Wykazano także, iż CDPK fosforyluje ACS, enzym szlaku biosyntezy etylenu u pomidora (*Lycopersicon esculentum*). Fosforylacja LeACS2 stabilizuje enzym, zapobiegając w ten sposób przyłączeniu się białka ETO1, które uruchamia degradację ACS [51]

PROCESY FIZJOLOGICZNE, W KTÓRYCH UCZESTNICZĄ KINAZY ZALEŻNE OD JONÓW WAPNIA

Wiele procesów wzrostu i rozwoju roślin regulowanych przez zmiany stężenia jonów wapnia w komórce [2]. Jednym z nich, w którym uczestniczy CDPK jest wzrost łagiewki pyłkowej. U kukurydzy ekspresja genu kinazy CDPK specyficznej dla woreczków pyłkowych jest ograniczona do późnych etapów rozwoju pyłku. Dodanie antagonisty CaM, inhibitora CDPK lub antysensownych oligonukleotydów skierowanych przeciwko mRNA kinazy CDPK osłabia wzrost łagiewki i kiełkowanie pyłku. Wykazano również, że lokalny wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie prowadzi do reorientacji łagiewki pyłkowej u lilii afrykańskiej (*Agapanthus umbellatus*) zwiększając również aktywność CDPK [52]. U tytoniu CDPK reguluje proces samozapylenia poprzez fosforylację odpowiedniej RNAzy [53]. Natomiast we wczesnych etapach rozwoju bulw ziemniaczanych zaobserwowano korelację pomiędzy akumulacją mRNA genu *StCDPK1*, a zwiększeniem aktywności białka [54]. Dodatkowo CDPK moduluje tworzenie brodawek u soi fosforylując dwa specyficzne białka nodulin-26 (kanał jonowy wrażliwy na zmiany napięcia) i nodulin-100 (syntaza sacharozy – SUS) uczestniczące w tym procesie [55]. Aktywność CDPK zanotowano również w embriogenezie, podczas rozwoju i kiełkowania nasion u drzewa sandałowego (*Santalum album*) [56] oraz rozwoju organów generatywnych u przylaszczki wiosennej (*Concephalum conicum*) [57].

http://rcin.org.pl

Oscylacje stężenia jonów wapnia regulują przepływ jonów z komórek szparkowych potrzebny do kierowania ruchami szparek. Podczas indukowanego przez ABA zamykania szparek, wapń zwiększa wypływ jonów K^+ poprzez zahamowanie kanałów potasowych zlokalizowanych w błonie. CDPK z komórek szparkowych bobu (*Vicia faba*) fosforyluje *in vitro* w sposób zależny od wapnia kanał KAT1 (K^+ rektyfikator bramkowany napięciem) [58]. Sugeruje to, że przepływ wapnia w komórkach szparkowych może aktywować CDPK, która fosforylując kanały potasowe reguluje ich aktywność w wyniku czego następuje wypływ jonów potasu z komórek i zamknięcie szparek [3].

CDPK mogą być również ważnym odbiorcą wapnia podczas napływu Ca^{2+} w indukowanym hormonami i światłem niebieskim otwieraniu szparek. Podczas otwierania szparek napływ anionów do wakuoli potrzebny jest do zbalansowania napływu K^+. Kanały chlorkowe zlokalizowane w wakuoli u bobu są silnie aktywowane przez AtCPK1 w odpowiedzi na zmiany stężenia jonów wapnia. Stwierdzono także, iż AtCPK1 promuje podniesienie zawartości jabłczanu w wakuolach komórek szparkowych bobu oraz jonów Cl^- w wakuolach korzenia buraka czerwonego (*Beta vulgaris*) [59]. Sugeruje to ważną role CDPK w ogólnej regulacji wakuolarnego stężenia anionów w roślinach. Nie wiadomo jednak, czy AtCPK1 fosforyluje kanały bezpośrednio, czy też stanowi białko pośredniczące [3].

Podczas procesów wzrostu i rozwoju, jak również w odpowiedzi na liczne zmiany środowiskowe rośliny modyfikują metabolizm węgla i azotu. Dwa kluczowe enzymy w biosyntezie sacharozy, syntaza sacharozowa (SUS) i syntaza fosfosacharozowa (SPS) są modulowane przez CDPK. CDPK fosforyluje Ser w N-końcu enzymu SUS, która wraz z otaczającymi ją aminokwasami tworzy miejsce wysoce konserwowane, co sugeruje, że fosforylacja tego enzymu może być istotna w regulacji metabolizmu sacharozy [60]. Fosforylacja ta zmniejsza wiązanie się enzymu z błoną, zwiększając tym samym ilość enzymu w cytoplazmie.

Syntaza fosfosacharozowa (SPS) oraz reduktaza azotanowa (NR), enzym biorący udział w przyswajaniu azotu z azotanów są fosforylowane przez CDPK *in vitro*. Oba enzymy ulegają fosforylacji w ciemności, co powoduje ich inhibicję. SPS jest bezpośrednio hamowana poprzez fosforylację Ser 158, a reduktaza azotanowa jest hamowana w dwuetapowym mechanizmie polegającym na uprzedniej fosforylacji Ser 543 [61], a następnie wiązaniu się białka 14-3-3 do ufosforylowanego miejsca. Oba enzymy w ich miejscach regulacyjnych fosforyluje ta sama 45 kDa kinaza CDPK, zidentyfikowana jako homolog kinazy AtCPK3 [62].

Te obserwacje wskazują na duże znaczenie CDPK w koordynowaniu metabolizmu węgla i azotu w roślinach [3]. Hipoteza, iż CDPK ma wpływ na działanie reduktazy azotanowej oraz SPS w ciemności jest zgodna z obserwacjami, że stężenie cytoplazmatycznego wapnia jest wyższe w nocy niż podczas dnia. Jednakże należy pamiętać, że kinazy niezależne od Ca^{2+} o cechach kinaz spokrewnionych z SNF-1 (SnRK1) także fosforylują Ser 153 SPS oraz Ser 543 reduktazy azotanowej [62]. Istnieje więc możliwość, że oba typy kinaz włączają się do szlaku SPS i reduktazy *in vivo* ale w odpowiedzi na inne czynniki sygnałowe. Kinaza ta może być także zaangażowana w aktywację SPS poprzez fosforylacje reszty Ser 424 [13]. Ta zależna od fosforylacji aktywacja pojawia się w odpowiedzi na stres osmotyczny i przypuszczalnie powoduje wzrost stężenia sacharozy w cytoplazmie, przez co zmniejsza się potencjał wody w komórce i zahamowana jest dalsza jej utrata. Te interesujące wyniki sugerują, że dwa różne szlaki, w których doniosłą rolę odgrywa CDPK, biorą udział w przeciwstawnej regulacji SPS.

ZRANIENIE I OBECNOŚĆ PATOGENU

CDPK uczestniczy także w szlakach przekazywania sygnału w odpowiedzi na zranienie i obecność patogenu. Intensywne badania różnych układów roślina–patogen wykazały, że napływ wapnia do cytosolu jest bardzo istotnym, wczesnym etapem niezbędnym do aktywacji kaskad przekazywania sygnału indukowanego patogenem [3,5]. Szlaki odpowiedzi na patogen są często aktywowane poprzez oddziaływanie pomiędzy elicitorem kodowanym przez patogen (takim jak białko Avr9 z *Cladosporium fulvum*), a odpowiadającym receptorem kodowanym przez roślinę (takim jak białko odpornościowe Cf-9 z pomidora). Ostatnio wykazano aktywację CDPK *in vivo* po interakcji Cf-9/Avr9 (gen-gen) w transgenicznych roślinach tytoniu *Cf-9* co sugeruje, że CDPK są ważnymi czujnikami wapniowymi indukowanymi w odpowiedziach obronnych [23,24]. Doświadczenia z wyciszaniem genów *NtCDPK2* i *NtCDPK3* pokazały, że CDPK są czynnikami pośredniczącymi w indukowanej Cf-9/Avr9 odpowiedzi w roślinie [24]. Podobne rezultaty były również obserwowane dla interakcji Cf-4/Avr9 (gen-gen), wskazując na bardziej ogólną rolę CDPK na szlaku sygnałowym po zadziałaniu patogenu. Dodatkowo zaobserwowano odgórną regulację mRNA w odpowiedzi na stres osmotyczny w przypadku *NtCDPK2* i *NtCDPK3* [24]. Wzrost ekspresji CDPK w wyniku zranienia i po pojawieniu się elicitora grzybowego zaobserwowano również dla genów *LeCDPK1* z pomidora [63] i *NtCDPK1* z tytoniu [47]. Gen z tytoniu dawał także pozytywną odpowiedź na chitosan i metylową pochodną kwasu jasmonowego, hormonów związanych z odpornością na choroby i zranienia. Innym przykładem CDPK biorącej udział w obronnym szlaku sygnałowym jest kinaza kodowana przez gen *ZmCDPK10* z kukurydzy, który ulega ekspresji w wyniku infekcji grzyba i po traktowaniu elicitorami grzybowymi [64].

Aktywowane przez elicitory patogenu CDPK mogą również inicjować wczesny wypływ innych jonów. Mogą być odpowiedzialne za zmiany w wypływie H^+ na skutek aktywacji PM-H^+-ATPazy, enzymu zależnego od wapnia i fosforylacji. Badania wykazały, że CDPK może fosforylować PM-H^+-ATPazę *in vitro*. Bardziej szczegółowe badania wykazały, że kinaza z kukurydzy fosforyluje PM-H^+-ATPazę na jej C-końcu, w miejscu istotnym dla oddziaływania ATPazy z białkiem 14-3-3 [65]. Innym procesem będącym następstwem wypływu jonów wapnia i aktywacji CDPK we wczesnych etapach reakcji obronnej na patogen jest tworzenie aktywnych form tlenu przez oksydazę NADPH, która jest zależna od wapnia i fosforylacji [66]. Pomimo tego, że oksydaza NADPH może być bezpośrednio regulowana przez jony wapnia, to zastosowanie inhibitora CaM/CDPK hamowało fosforylację, a w następ-

http://rcin.org.pl

stwie wpływało na obniżenie ilości aktywnych form tlenu [23]. Ostatnie dane potwierdziły, że ekspresja *AtCDPK1* wzmacnia aktywność oksydazy NADPH w protoplastach pomidora, potwierdzając pośrednią regulację przez ten enzym [23].

CRK – KINAZY SPOKREWNIONE Z CDPK

Kinazy z rodziny CRK (ang. *CDPK–related kinase*) posiadają strukturę podobną do kinaz z rodziny CDPK, z wyjątkiem domeny regulatorowej, w której miejsca wiązania wapnia EF uległy degeneracji i są niefunkcjonalne [8-10]. CRK mają masę cząsteczkową od 64,3 do 68 kDa i podobnie jak CDPK mają potencjalne miejsca palmitoilacji i mirystoilacji. Badania biochemiczne nad rekombinantami kinaz CRK z marchwi i kukurydzy wykazały, że enzymy te nie wiążą Ca^{2+} i nie ulegają aktywacji przez wapń [67,7], stąd też wydaje się prawdopodobne, że kinazy te nie mają funkcjonalnej domeny autoinhibitorowej [67]. Badania ostatnich lat wykazały jednak, że CaM może aktywować niektóre izoformy CRK [7,68]. Przemawia za tym obecność miejsca wiążącego CaM, które opisano dla OsCBK1 z ryżu [69] oraz NtCaMK1 [7] i NtCaMK2 z tytoniu [68]. NtCaMK1 fosforyluje siebie i swoje substraty tylko w obecności Ca^{2+}-CaM. OsCBK1 z ryżu wiąże kalmodulinę w sposób zależny od wapnia, jednakże kompleks Ca^{2+}/CaM nie wpływa ani na proces autofosforylacji ani fosforylacji histonu przez OsCBK1 [69]. Tak więc rola wiązania CaM do OsCBK1 pozostaje wciąż nieokreślona, jednakże autorzy sugerują że wiązanie kalmoduliny może odgrywać inną rolę niż regulacja aktywności kinazy, takich jak lokalizacja czy regulacja specyficzności substratowej [69]. Natomiast autofosforylacja NtCaMK1 wymaga obecności kompleksu Ca^{2+}/CaM. Jej skutkiem jest aktywacja enzymu, którego aktywność enzymatyczna jest niezależna od wapnia i kalmoduliny [7]. MCK1 z kukurydzy również wiąże kalmodulinę w sposób zależny od wapnia. Ta kinaza początkowo była klasyfikowana jako CaMK, ponieważ wiąże CaM oraz KN-93, specyficzny inhibitor zwierzęcej CaMK2. Analiza sekwencji genu wykazała jednak, że enzym ten należy do klasy kinaz CRK. Ponieważ KN-93 hamował zależny od światła geotropizm korzeni kukurydzy, proponuje się rolę pośrednika MCK1 w tym procesie [11,70]. Stwierdzono także możliwy udział tego enzymu w regulacji procesu kwitnienia, gdyż nadprodukcja MCK1 prowadzi do zaniku zawiązków kwiatów na osi głównej pędu i wydłużenia fazy wegetatywnej u tytoniu [7]. Na udział w procesie kwitnienia wskazują również doświadczenia z NtCBK1, w których nadprodukcja NtCBK1 powoduje opóźnienie kwitnienia u tytoniu [7].

Kinazy AtCBK1 z rzodkiewnika i NtCBK2 z tytoniu mogą być również stymulowane jonami wapnia. Białka te ulegają autofosforylacji i fosforylują substraty w sposób zależny od wapnia, a dodatkowe wiązanie kalmoduliny zwiększa ich aktywność 4-5-krotnie [7]. Kinazy te różnią się zarówno od kinazy ZmCCaMK z kukurydzy, gdzie CaM nie wpływa na aktywność procesu autofosforylacji, jak również są odmienne od CCaMK z lilii i tytoniu, u których autofosforylacja jest hamowana w obecności kalmoduliny [71].

CCaMK I CaMK

Kinazy z rodziny CCaMK (ang. *$Ca^{2+}$and CaM-dependent protein kinase*) oraz CaMK (ang. *calmodulin dependent protein kinase*) należą do grupy kinaz określanych CBK (ang. *calmodulin binding protein kinase*), których aktywność zależna jest od kalmoduliny [7,13]. Kinazy z rodziny CCaMK z lilii i tytoniu stanowią dwa przykłady CCaMK u roślin, które zostały dobrze scharakteryzowane zarówno pod względem biochemicznym jak i molekularnym, a ich aktywność zależy zarówno od obecności jonów Ca^{2+} jak i CaM. Ogólna struktura budowy C-końcowej domeny kinazy CCaMK podobna jest do zwierzęcego białka visininy, której cząsteczka zawiera tylko trzy motywy EF wiążące Ca^{2+} oraz oddzielną domenę wiążącą CaM, jak to ma miejsce w zwierzęcych kinazach z rodziny CaMK (Ryc. 1). Autofosforylacja CCaMK zachodzi w sposób zależny od jonów Ca^{2+} i jest hamowana w obecności CaM, zaś fosforylacja substratu jest zależna od kompleksu Ca^{2+}-CaM [71]. W przeciwieństwie do CCaMK z lilii i tytoniu, ZmCCaMK z kukurydzy nie ulega autofosforylacji zależnej od CaM. Do tej pory nie sklonowano genu kodującego tę kinazę, co uniemożliwia poznanie różnic pomiędzy tymi enzymami [72]. Ostatnio został zidentyfikowany immunohomolog ZmCCaMK z grochu (PsCCaMK) (*Pisum sativum*), wskazując że ten typ kinaz z rodziny CBK może być reprezentowany również w innych roślinach. Obecność domeny wiążącej wapń w kinazach CCaMK stanowi więc dodatkowy mechanizm wrażliwości na Ca^{2+} nieznany dotychczas w regulowanej kompleksem Ca^{2+}-CaM kaskadzie sygnałowej u roślin [73].

Udział kinaz z rodziny CBK stwierdzono w regulowanej jonami wapnia fosforylacji białek w odpowiedzi na światło. Reakcjom tym towarzyszy zmiana cytosolowego stężenia Ca^{2+} i kalmoduliny [7]. Wykazano, że ZmCCaMK jest regulowana przez światło czerwone, wskazując na możliwy udział tej kinazy w świetlnym szlaku transdukcji sygnału. Nie zaobserwowano zmian w ilości ZmCCaMK w odpowiedzi na światło niebieskie, tak więc wydaje się być specyficznie zależna jedynie od światła czerwonego [72]. Ekspresja CCaMK z tytoniu jest obserwowana w komórkach wierzchołka korzenia, jak również w komórkach tapetum i komórkach macierzystych pyłku podczas mikrosporogenezy. Sugeruje to, że CCaMK może odgrywać rolę w procesie mitozy i mejozy [2]. Udział kinaz CBK, PsCCaMK z grochu i NtCaMK1 z tytoniu, stwierdzono również w odpowiedzi na stres, gdyż wzrost stężenia NaCl indukował wzmożoną syntezę tych kinaz [7]. Jedyny potencjalny enzym mający właściwości kinaz z rodziny CaMK (CB1) został zidentyfikowany u jabłoni [74]. W tym przypadku analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej wykazała, że enzym ten jest bardzo blisko spokrewniony z roślinnymi kinazami z rodziny CCaMK. Jednocześnie analiza genomu rzodkiewnika wykazała brak u tej rośliny potencjalnych reprezentantów kinaz z rodzin CaMK i CCaMK [9].

SnRK3

Analiza genomu rzodkiewnika pozwoliła zidentyfikować kolejną grupę kinaz, w których aktywność zaangażowany jest wapń. Kinazy SnRK (ang. *SNF related kinase*) nazywane również CIPK (ang. *calcineurin B-like interacting protein kinase*), SOS2 (ang. *salt overaly sensitive 2*), SIP (ang. *SOS3-interacting protein*) czy PKS (ang. *protein kinase related to SOS2*) stanowią grupę bardzo blisko spokrewnioną z kinazami SNF1 z drożdży i kinazami aktywowanych AMP (AMPK) ze

http://rcin.org.pl

zwierząt [9,10,75]. Wykazano, że niektóre kinazy z podrodziny SnRK2 i SnRK3 wydają się występować tylko u roślin [76]. Kinazy z podrodziny SnRK3 nie zawierają w odcinku C-końcowym motywów EF odpowiedzialnych za wiązanie jonów wapnia, a aktywność tych kinaz stymulowana jest poprzez oddziaływanie z białkami wiążącymi wapń takimi jak CBL (ang. *calcineurin B-like protein*) czy SCaBP (ang. *SOS3-like calcium-binding proteins*), posiadającymi motyw wiązania EF. Białka te spokrewnione są z czujnikami wapnia w komórkach nerwowych zwierząt oraz z regulatorową podjednostką białkowej fosfatazy kalcyneuryny [9,10,75]. Wszystkie kinazy z rodziny SnRK3 zawierają domenę wiążącą NAF lub FISL w C-końcu domeny kinazowej (Rys. 1), pokrywającą się z domeną autoinhibitorową. Przyłączenie białek wiążących jony wapnia do domeny NAF/FISL nie zawsze zależy od Ca^{2+}, co wynika z różnych właściwości kinaz [10,75] Aktywacja przypuszczalnie zachodzi w następstwie przyłączenia białek CLB/SCaBP i odłączenia autoinhibitora [10]. Badania domeny NAF/FISL wykazały, iż jest ona sama w sobie autoinhibitorem [75]. Kinazy, z których usunięto domenę FISL wykazują w obecności wapnia i odpowiednich białek CLB/SCaBP większą aktywność niż enzym niezmieniony [8].

Aczkolwiek dotychczasowe badania podkreślą potencjalną role białek CLB/SCaBP w wapniowej aktywacji, ostatnie badania sugerują inny model, który może okazać się równie istotny. Dwa dowody świadczą o tym, iż SnRK3 mogą być aktywowane na drodze fosforylacji. Po pierwsze, wszystkie SnRK3 zawierają miejsca aktywne tak samo zlokalizowane i zdolne do fosforylacji Ser/Thr. Po drugie, „stan aktywny" jest obserwowany u przedstawicieli SnRK3, u których w wyniku mutacji zastąpiono Ser/Thr asparaginą (Asp), naśladowując tym samym stan ufosforylowany [10]. Tak zmieniona kinaza (SnRK3.11) wykazuje względnie wysoką, stałą aktywność, która nie jest dalej aktywowana przez Ca^{2+} i CLB/SCaBP. Jednocześnie aktywność ta jest 10 razy wyższa niż ta obserwowana u kinazy nie zmienionej. Do tej pory udział kinaz z rodziny SnRK3 stwierdzono jedynie w odpowiedzi na stres solny oraz na szlaku sygnałowym ABA i sacharozy [10,75].

PODSUMOWANIE

W celu utrzymania w cytoplazmie komórki stężenia Ca^{2+} w tolerowanych przez organizm granicach, w toku ewolucji powstała grupa wyspecjalizowanych białek wiążących wapń. Białka te umożliwiają jonom wapnia odgrywanie roli przekaźnika informacji w wielu szlakach przekazywania sygnałów, poprzez konformacyjne zmiany białek efektorowych, z którymi oddziałują. W komórkach roślinnych najlepiej poznane są kinazy białkowe, których aktywność zależna jest od jonów wapnia. Obecność w nich domeny podobnej do kalmoduliny (CLD), jest najważniejszą cechą odróżniającą je od zwierzęcych kinaz zależnych od wapnia i kalmoduliny. Występowanie wielu izoform CDPK, ich specyficzna lokalizacja zarówno tkankowa jak i komórkowa, może świadczyć o odmiennej roli w regulacji podstawowych funkcji. Bardzo prawdopodobny staje się również udział CDPK w wielu zachodzących na siebie szlakach przekazywania sygnału. Obecnie wiele laboratoriów na świecie zajmuje się wyjaśnieniem funkcji poszczególnych enzymów i izoform CDPK oraz określeniem ich udziału w szlakach sygnałowych. Wydaje się, iż zastosowanie nowych technologii, na przykład mikromacierzy, pozwoli sprawdzić i skutecznie umiejscowić zmiany poziomu białka na podstawie profilu ekspresji mRNA. Wyniki tych badań umożliwią lepsze zrozumienie oddziaływań pomiędzy szlakami sygnałowymi u roślin.

PIŚMIENNICTWO

1. Charpenteau M, Jaworski K, Ramirez BC, Tretyn A, Ranjeva R, Ranty B (2004) A receptor-like kinase from *Arabidopsis thaliana* is a calmodulin-binding protein. Biochem J 379: 841-8
2. Yang T, Poovaiah BW (2003) Calcium/calmodulin mediated signal network in plants. Trends Plant Sci 8: 505-12.
3. Cheng S-H, Willmann RM, Chen H-C, Sheen J (2002) Calcium signalling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. Plant Physiol 129: 469-485
4. Harper JF (2001) Dissecting calcium oscillators in plant cells. Trends plants Sci 6: 395-397
5. Rudd JJ, Fanklin-Tong VE (2001) Unravelling response-specific in Ca^{2+} signalling in plants cell. New Phytol 151: 7-33
6. Sanders D, Pelloux J, Browneel C, Harper JF (2002) Calcium crossroads of signalling. Plant Cell 14(Suppl): S401-417
7. Zhang L, Lu YT (2003) Calmodulin-binding protien kinases in plants. Trends Plant Sci 8: 123-127
8. Harmon AC (2003) Calcium-regulated protein kinases of plants. Grav Space Biol Bull 16: 83-90.
9. Hrabak EM, Chan CWM, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu J-K., Harmon AC (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. Plant Physiol 132: 666-80
10. Harper JF, Ghislain G, Harmon A (2004) Decoding Ca^{2+} signals through plant protein kinases. Annu Rev Plant Biol 55: 263-88.
11. Harmon AC, Gribskov M, Gubrium E, Harper JF (2001) The CDPK superfamily of protein kinases. New Phytol 151: 175-183
12. Szczegielniak J, Muszyńska G (2000) Kinazy białkowe zależne od wapnia. Postępy Biochemii 46(1) 85-98
13. Harmon AC, Gribskov M, Harper JF (2001) CDPKs – a kinase for every Ca^{2+} signal? Trends Plant Sci 6: 395-397
14. Dammann C, Ichida A, Hong B, Romanowsky SM, Hrabak EM, Harmon AC, Pickard BG, Hraper JF (2003) Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from Arabidopsis. Plant Physiol 132: 1840-56
15. Harper JF, Huang J-F, Lloyd SJ (1994) genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. Biochem 33: 7267-7277
16. Yoo BC, Harmon AC (1996) Intramolecular binding contributes to the activation of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. Biochem 35: 12029-12037
17. Christodoulou J, Malmendal A, Harper JF, Chazin WJ (2004) Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase. J Biol Chem 279: 29092-29100.
18. Pical C, Westergren T, Dove S K, Larsson C, Sommarin M (1999) Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in *Arbidopsis thaliana* cells. J Biol Chem 274: 38232-38240
19. Allen GA, Kwak JM, Chu SP, Lopis J, Tsien RY, Harper JF, Schroeder JI (1999) Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells. Plant J 19: 735-747
20. Bush DS, Jones RL (1988) Measurement of cytoplasmic calcium in aleurone protoplasts using indo-1 and fura-2. Cell Calcium 8: 455-72
21. Gilroy S, Johnes R L (1992) Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts. Proc.Natl Acad Sci USA 89: 3591-3595

http://rcin.org.pl

22. Saha P, Singh M (1995) Chracterization of a winged bean *(Psophocarpus-tetragonolobus)* protein-kinase with calmodulin-like domain regulation by authophosphorylation. Biochem J 305: 205-10

23. Romeis T, Piedras P, Jones JDG (2000) Resistance gene-dependent activation of calcium-dependent protein kinase (CDPK) in the plant defence. Plant Cell 12: 803-815

24. Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones JDG (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. EMBO J 20: 5556-5567

25. Ganguly S, Singh M (1999) Purification and characterization of a protein phosphatase from winged bean. Phytochem 52: 239-246

26. Farmer PK, Choi JH (1999) Calcium and phospholipid activationot of a recombinant calcium-dependent protein kinase (DcCPK1) from carrot (*Daucus carota* L.). Biochim Biophys Acta 1434: 6-17

27. Szczegielniak J, Liwosz A, Jurkowski I, Loog M, Dobrowolska G, Ek P, Harmon AC, Muszynska G (2000) Calcium-dependent protein kinase from maize seedlings activated by phospholipids. Eur J Biochem 267: 3818-27

28. Binder BM, Harper JF, Sussman MR (1994) Charecterization of an *Arabidopsis* calmodulin-like domain protein kinase purified from *Escherichia coli* using an affinity sandwich technique. Biochem 33: 2033-2041

29. Comoni L, Harper JF, Pelmagren MG (1998) 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). FEBS Lett 430: 381-384

30. Breviario D, Morello L, Giani S. (1995) Molecular cloning of two novel rice cDNA sequences encoding putative calcium-dependent protein kinases. Plant Mol Biol 27: 953-67

31. Barker LDP, Templeton MD, Ferguson IB (1998) A 67-kDa plasma--membrane-bound Ca^{2+}-stimulate protein kinase active in sink tissue of higher plants. Planta 205: 197-204

32. Frattini M, Morello L, Breviario D (1999) Rice calcium-dependent protein kinase isoforms OsCDPK2 and OsCDPK11 show different response to light and different expression patterns during seed development. Plant Mol Biol 41: 753-764

33. Morello L, Frattini M, Giani S, Christou P, Breviario D (2000) Overexpression of the calcium-dependent protein kinase OsCDPK2 in transgenic rice is repressed by light in leaves and disrupts seed development. Transgenic Res 9: 453-462

34. Ellard–Ivey M, Hopkins M R, White T, Lomax T L (1999) Cloning, expression and N-terminal myristoylation of CpCPK1, a calcium-dependent protein kinase from zucchini (*Cucurbita pepo* L.). Plant Mol Biol 39: 199-208

35. Friedman H, Goldschmidt EE, Halevy AH (1989) Involvement of signal transduction pathway of photoperiodic flower induction process in *Pharbitis nil*. Plant Physiol 89: 530-534

36. Tretyn A, Czaplewska J, Cymerski M, Kopcewicz J, Kendrick R E (1994) The mechanism of calcium action on flower induction in *P.nil*. J Plant Physiol 144: 562-568

37. Jaworski K, Szmidt-Jaworska A, Tretyn A, Kopcewicz J (2003) Biochemical evidences for a calcium-dependent protein kinase in *Pharbitis nil* and its involvement in photoperiodic flower induction. Phytochem 62 :1047-55

38. Berberich T, Kusano T (1997) Cycloheximide induces a subset of low temperature-inducible genes in maize. Mol Gen Genet 254: 275-83

39. Saijo Y, Hata S, Kyozuuka J, Shimamoto K, Izui K (2000) Over-expression of a single Ca^{2+}-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. Plant J 23: 319-327

40. Monroy AF, Dhindsa RS (1995) Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 degrees C. Plant Cell 7: 321-331

41. Martin ML, Busconi L (2001) A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. Plant Physiol 125: 1442-1449

42. Urao T, Katigiri T, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Shinozaki K (1994) Two genes that encode Ca^{2+}-dependent protein kinase are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. Mol Gene Genet 244: 331-340

43. Botella JR, Arteca JM, Somodevilla M, Arteca RN (1996) Calcium-dependent protein kinase gene expression in response to physical and chemical stimuli in mungbean (*Vigna radiata*). Plant Mol Biol 30: 1129--37

44. Sheen J (1996) Ca^{2+} dependent protein kinase and stress signal transduction in plants. Science 274: 1900-1902.

45. Patharkar OR, Cushman JC (2000) A stress-induced calcium-dependent protein from *Mesembtyanthemum crystallinum* phosphorylates a two-component pseudo-response regulator. Plant J 24: 679-691

46. Yang W, Komatsu S (2001) Involvement of calcium-dependent protein kinase in rice lamina inclination caused by brassinolide. Plant Cell Physiol 41: 1243-1250

47. Yoon GM, Cho HS, Ha HJ, Liu JR, Lee HS (1999)) Characterization of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein. Plant Mol Biol 39: 991--1001

48. Davletova S, Meszaros T, Miskolczi P, Oberschall A, Torok K, Magyar Z, Dudits S, Deak M (2001) Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. J Exp Bot 52: 215-221

49. Ullanat R, Jayabaskaran C (2002) Distinct light-, cytokinin- and tissue--specific regulation of calcium dependent protein kinase gene expression in cucumber (*Cucumis sativus*). Plant Sci 162: 153-163

50. Ulloa RM, Raíces M, MacIntosh G, Tellez-Iñón MT (2002) Jasmonnic acid affects plant morphology and expression and activity of a calcium-dependent protein kinase in *Solanaum tuberosum*. Physil Plant 115: 417-427

51. Sebastia CH, Hardin SC, Clouse SD, Kieber JJ, Huber SC (2004) Investugation of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that sugests ACC synthase may be a CDPK substrate. Arcg Biochem Biophys 428: 81-91

52. Moutinnho A, Trewavas A J, Malhó R (1998) Relocation of a Ca2+-dependent protein kinase activity during tube reorientation. Plant Cell 10: 1499-1509

53. Kunz C, Chang A, Faure J D, Clarke A E, Polya G M, Anderson M A (1996) Phosphorylation of style S-RNases by Ca^{2+}-dependent protein kinases from pollen tubes. Sex Plant Reprod 9: 25-34

54. Raíces M, Chico J, Tellez-Iñón MT, Ulloa RM (2001) Molecular characterization of StCDPK1, a calcium-dependent protein kinase of *Solanum Tuberosum* that is induced at the onset of tuber development. Plant Mol Biol 46: 591-601

55. Zhang H-Q, Chollet R (1997) Seryl-phosphorylation of soybean nodule sucrose synthase (nodulin 100) by a Ca^{2+}- dependent protein kinase. FEBS Lett 410: 126-130

56. Anil VS, Harmon AC, Rao KS (2000) Spatio-temporal accumulation and activity of calcium-dependent protein kinases during embryogenesis, seed development, and germination in sandalwood. Plant Physiol 122: 1035-43

57. Nishiyama R, Mizuno H, Okada S, Yamaguchi T, Takenaka M, Fukuzawa H, Ohyama K (1999) Two mRNA species encoding calcium-dependent protein kinase are differentially expressed in sexual organs of *Marchanita polymorpha* through alternative splicing. Plant Cell Physiol 40: 205-112

58. Li J, Lee YRJ, Assmann SM (1998) Guard cells possess a calcium - dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. Plant Physiol 116: 785-795

59. Pei ZM, Ward JM, Harper JF, Schroeder JI (1996) A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by serine/threonine kinase CDPK. EMBO J 15: 6564-6574

60. Hardin SC, Winter H, Huber SC (2004) Phosphorylation of amino terminus of maize sucrose synthase in relatin to membrane association and enzyme activity. Plant Phisol 134: 1427-1438.

61. Kaiser WM, Huber SC (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. J Exp Bot 52: 1981-1989

http://rcin.org.pl

62. Douglas P, Moorhead G, Hong Y, Morrice N, MacKintosh C (1998) Purification of a nitrate reductase kinase from *Spinacea oleracea* leaves, and its identification as calmodulin-domain protein kinase. Planta 206: 435-442

63. Chico JM, Raíces M, Téllez-Iñón MT, Ulloa RM (2002) A calcium-dependent protein kinase is systematically induced upon wounding in tomato plants. Physiol. Plant 128: 256-270

64. Murillo I, Jaeck E, Cordero MJ, Segundo BS (2001) Transcriptional activation of a maize calcium-dependent protein kinase gene in response to fungal elicitors and infection. Plant Mol Biol 45: 145-158

65. Morsomme P, Boutry M (2000) The plant plasma membrane H_-ATPase: structure, function, and regulation. Biochim Biophys Acta 1465: 1-16.

66. Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield A (2000) The *RPM1* plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. Plant J 23: 441-450

67. Furumoto T, Ogawa N, Hata S Izui K (1996) Plant calcium-dependent protein kinase-related kinases (CRKs) do not require calcium for their activities. FEBS Lett 396: 147-51

68. Hua W, Liang S, Lu Y (2003) A tobacco calmodulin-binding protein kinase differentially regulated by calmodulin isoforms. Biochem J 376: 291-302

69. Zhang L, Liu BF, Liang S, Jones RL, Lu YT (2002) Molecular and biochemical characterization of a calcium/calmodulin-binding protein kinase from rice. Biochem J 368: 145-157

70. Lu YT, Hidaka H, Feldman LJ (1996) Characterization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase homolog from maize roots showing light-regulated gravitropism. Planta 199: 18-24

71. Liu Z, Xia M, Pooviah BW (1998) Chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase In tobacco: differentia regulation by calmodulin isoforms. Plant Mol Biol 38: 889-97

72. Pandey S, Sopory SK (2001) Zea mays CCaMK: autophosphorylation-dependent substrate phosphorylation and down-regulation by red light. J Exp Bot 52: 691-700

73. Sathyanarayanan PV, Cremo CR , Poovaiah BW (2000) Ca^{2+}/Calmodulin-dependent protein kinase. Role of the neural visinin-like domain in regulating autophosphorylation and calmodulin affinity. J Biol Chem 275: 30417-30422

74. Watillon B, Kettmann R, Boxus P, Burny A (1995) Structure of a calmdulin-binding protein kinase gene from apple. Plant Physiol 108:847-48

75. Guo Y, Xiong L, Song C P, Gong D, Halfter U, Zhu J K (2002) A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic signalling in *Arabidopsis*. Dev Cell 3: 233-244

76. Halford N G, Bouly J P, Thomas M (2000) SNF-related protein kinases (SnRKs): regulators at the heart of the control of carbon metabolism and pertitoning. Adv Bot Res 32: 405-434

Plant protein kinases stimulated by calcium

Krzysztof Jaworski✉, Adriana Szmidt-Jaworska, Jan Kopcewicz

Departament of Physiology and Molecular Biology of Plants, Nicolaus Copernicus University, 9 Gagarina St., 87-100 Toruń, Poland
✉ e-mail: jaworski@biol.uni.torun.pl

Key words: calcium, calmodulin, CDPK, kinase

ABSTRACT

Calcium signals play an important role in many aspects of plant growth and development, including plant response to biotic and abiotic stress. The stimulus characteristic intracellular Ca^{2+} signals are generated in plant cells by a variety of stimuli, including changes in environmental conditions, interaction with microbes and growth and development processes. Cytoplasmatic calcium brings about responses by interacting with target proteins, like calcium-dependent kinases. In plant there are at least five classes of protein kinases (CDPK, CRK, CCaMK, CaMK and SnRK3), which activity is regulated by calcium ions. In this article the structure, regulation and function of calcium stimulated protein kinases are briefly reviewed.

http://rcin.org.pl

Mechanizmy i regulacja przyswajania żelaza i hemu przez bakterie gramujemne

Katarzyna Siudeja

Teresa Olczak✉

Zakład Biochemii, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

✉Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Wrocławski, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław, e-mail: grabska@bf.uni.wroc.pl; tel. (71) 375 26 12; faks: (71) 375 26 08

Artykuł otrzymano 23 września 2004
Artykuł zaakceptowano 28 grudnia 2004

Słowa kluczowe: Bakterie gramujemne, transport żelaza/hemu, białka wiążące żelazo/hem, receptory błony zewnętrznej, transportery ABC, regulacja przyswajania żelaza/hemu

STRESZCZENIE

Zdolność pozyskiwania żelaza i hemu jest jednym z podstawowych elementów warunkujących patogenność mikroorganizmów. Jako źródła żelaza i hemu bakterie gramujemne wykorzystują kompleksy sideroforów z żelazem, białka transportujące żelazo (transferyna, laktoferyna), wolny hem lub hemoproteiny (hemoglobina, haptoglobina, hemopeksyna). Organizacja transportu żelaza i hemu jest ściśle związana z budową błon komórkowych tych mikroorganizmów. W wiązaniu żelaza lub hemu udział biorą siderofory, hemofory oraz receptory błony zewnętrznej. W transport ligandów przez błonę zewnętrzną zaangażowane są odpowiednie receptory. Energia niezbędna do aktywnego transportu przez błonę zewnętrzną bakterii gramujemnych dostarczana jest przez wewnątrzbłonowe systemy TonB-ExbB-ExbD. W transport przez błonę cytoplazmatyczną zaangażowane są systemy białek peryplazmatycznych i transbłonowych należące do rodziny transporterów ABC, wykorzystujących energię pochodzącą z hydrolizy ATP. Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za utrzymanie homeostazy żelazowej jest represor Fur-Fe^{2+}.

WPROWADZENIE

Charakterystyczna morfologia zewnętrznych błon komórkowych bakterii gramujemnych ma istotne znaczenie w oporności tych mikroorganizmów na czynniki obronne gospodarza oraz antybiotyki, ale jednocześnie wymusza istnienie wyszukanych systemów niezbędnych do transportu składników odżywczych do wnętrza komórki [1]. Zewnętrzną monowarstwę błony tworzą lipopolisacharydy będące przyczyną istnienia wypadkowego ładunku ujemnego powierzchni komórki. Obecność licznych poryn umożliwia bierną dyfuzję cząsteczek nie większych niż 600 Da [2], a transport aktywny możliwy jest dzięki sprzężeniu odpowiednich receptorów z białkami błony wewnętrznej [3-5]. Wewnętrzna błona cytoplazmatyczna bakterii gramujemnych przypomina w swej budowie błonę bakterii gramdodatnich [1]. Dwuwarstwa lipidowa błony zbudowana jest przede wszystkim z fosfolipidów, natomiast liczne białka integralne i powierzchniowe biorą udział w transporcie związków odżywczych i produktów metabolizmu, reakcjach na bodźce chemiczne oraz w metabolizmie energetycznym. Istotnym zjawiskiem jest występowanie gradientu stężenia H^+ w poprzek błony cytoplazmatycznej, odpowiedzialnego za wytwarzanie siły protonomotorycznej niezbędnej w anabolicznych procesach komórkowych, włączając w to zależny od energii transport aktywny [6]. Przestrzeń występująca pomiędzy błonami nazywana jest przestrzenią peryplazmatyczną. Znajdują się w niej białka uczestniczące w transporcie substancji odżywczych oraz białka pełniące funkcję enzymów chroniących komórkę przed szkodliwymi związkami [6].

Zdolność pozyskiwania żelaza, a w przypadku niektórych bakterii także hemu, jest jednym z podstawowych elementów warunkujących patogenność mikroorganizmów. Ograniczona dostępność żelaza jest dla licznych bakterii chorobotwórczych sygnałem, iż znalazły się w organizmie gospodarza. W wielu przypadkach sygnał ten stymuluje syntezę czynników wirulencji, do których zalicza się między innymi siderofory, hemolizyny, transportery żelaza i hemu, ale także wiele egzotoksyn bakteryjnych [7]. W środowisku życia bakterii stężenie dostępnego żelaza jest dużo niższe (10^{-18} M) niż wymagane do wzrostu (10^{-6} – 10^{-8} M) [8]. Stąd bakterie zamieszkujące organizmy swych gospodarzy zmuszone są do korzystania z wyszukanych systemów pozyskiwania tego pierwiastka. Opierają się one na bezpośrednim wykorzystaniu jonów żelaza, białek wiążących jony żelaza (transferyna, laktoferyna) oraz białek hemowych (głównie hemoglobina) [8]. Większość żelaza w organizmach ssaków związana jest w hemie lub białkach żelazowo-siarkowych, a wewnątrzkomórkowym białkiem stanowiącym rezerwuar tego metalu jest ferrytyna [8,9]. Śladowe ilości żelaza zewnątrzkomórkowego kompleksowane są z dużym powinowactwem w osoczu przez transferynę (Tf) i w płynach wydzielniczych przez laktoferynę (Lf), a także przez kwas cytrynowy [10]. Hem, główne źródło żelaza, w roztworach wodnych wy-

http://rcin.org.pl

stępuje jako mieszanina form monomerycznych (utleniona hemina z jonami Cl^- lub OH^- stanowiącymi aksjalny ligand) oraz μ-oksodimerów powstałych poprzez połączenie mostkiem tlenowym dwóch jonów żelaza wbudowanych w pierścień protoporfiryny IX [11]. U ssaków białkiem wiążącym większość hemu jest hemoglobina, natomiast haptoglobina i hemopeksyna są odpowiedzialne za wiązanie i usuwanie z obiegu odpowiednio zewnątrzkomórkowej hemoglobiny i hemu [12,13]. Wolny hem jest wiązany także przez albuminę i lipoproteiny [14,15].

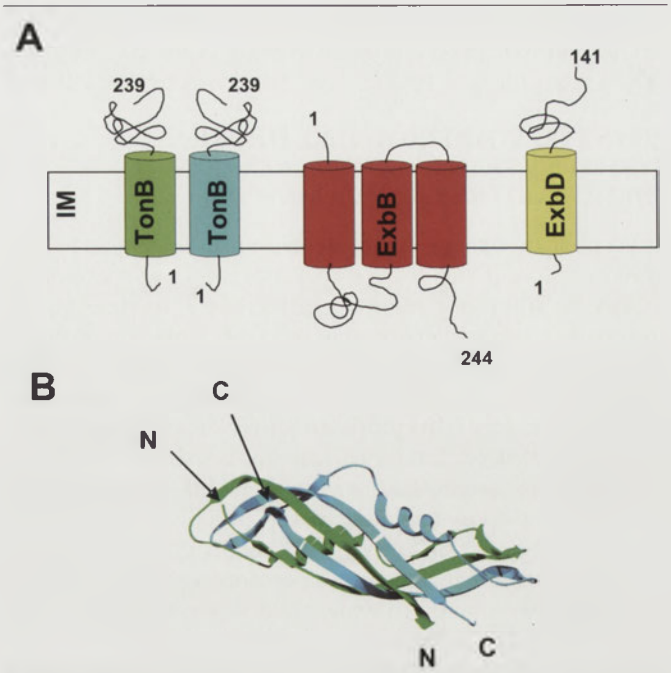
WYMAGANIA ENERGETYCZNE TRANSPORTU PRZEZ BŁONY BAKTERII GRAMUJEMNYCH

Energia niezbędna do aktywnego transportu przez błonę zewnętrzną bakterii gramujemnych dostarczana jest przez wewnątrzbłonowe systemy TonB-ExbB-ExbD [16]. Umożliwiają one wykorzystanie siły protonomotorycznej błony cytoplazmatycznej do transportu związków przez błonę zewnętrzną do przestrzeni peryplazmatycznej. W transport przez błonę wewnętrzną zaangażowane są systemy białek peryplazmatycznych i transbłonowych należących do nadrodziny transporterów ABC (ang. *ATP binding cassette-type transport*), wykorzystujących energię pochodzącą z hydrolizy ATP [6,17].

KOMPLEKS TonB-ExbB-ExbD

System zaangażowany w przenoszenie energii pomiędzy błonami bakterii gramujemnych składa się z białek TonB, ExbB i ExbD (Rys. 1A) [16]. TonB jest właściwym białkiem oddziałującym z obydwiema błonami i przenoszącym energię. Uważa się, że ExbB i ExbD wspomagają zmiany konformacyjne TonB zachodzące pod wpływem siły protonomotorycznej. Białko ExbB wydaje się stabilizować zarówno TonB jak i ExbD [18-21]. Analiza struktury krystalicznej domeny C-końcowej TonB sugeruje, że białko to może funkcjonować jako dimer [22-24]. Wyniki dotychczasowych badań wykazały, że białka TonB, ExbD i ExbB występują w komórce w stosunku molowym 1:2:7 [25], brak jest jednak danych eksperymentalnych potwierdzających sugerowaną obecność oligomerycznych form ExbD i ExbB [26].

Białko TonB z *Escherichia coli* jest polipeptydem o masie 26 kDa, w którym można wyróżnić domeny zawierające zachowane w ewolucji sekwencje aminokwasowe. N-końcowa domena transbłonowa jest prawdopodobnie kluczowym rejonem w prawidłowym funkcjonowaniu TonB. Wykazano, że reszty aminokwasowe Ser16 i His20, występujące w tej części TonB, są niezbędne w zależnych od energii zmianach konformacyjnych białka oraz w transporcie ligandów przez błonę zewnętrzną z udziałem odpowiednich receptorów [27]. Delecja obejmująca rejon transbłonowy powoduje całkowitą utratę aktywności białka [28,29]. Domena N-końcowa poprzedza charakterystyczny rejon bogaty w reszty proliny, zawierający serie powtórzeń Pro-Glu i Pro-Lys, o niewyjaśnionej jak dotąd funkcji [30]. C-końcowa peryplazmatyczna domena TonB, którego strukturę krystaliczną niedawno rozwiązano (Rys. 1B; kody PDB: 1IHR, 1QXX) [22,23], bierze udział w asocjacji TonB z błoną zewnętrzną i receptorami zależnymi od TonB.



Rysunek. 1. Schemat kompleksu przenoszącego energię z błony cytoplazmatycznej do receptorów błony zewnętrznej. (A) Białko TonB zawiera jeden segment transbłonowy [18] i funkcjonuje jako dimer [24]. Białko ExbD także posiada jeden segment transbłonowy [19], podczas gdy białko ExbB aż trzy takie segmenty [20]. (B) Peryplazmatyczny C-końcowy rejon białka TonB przedstawiony został w oparciu o jego strukturę krystaliczną (kod PDB: 1IHR) [22]. Rozwiązanie struktury dimerycznego rejonu (reszty aminokwasowe 164-239) białka TonB ujawniło nowy rodzaj fałdowania, nie posiadający odpowiednika wśród innych białek. Struktury krystaliczne wszystkich prezentowanych białek dostępne są w bazie Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB, http://www.pdb.org/) [93]. Rysunki przedstawiające struktury białek wykonano wykorzystując programy Swiss-PdbViewer 3.7 oraz POV-Ray 3.5.

U bakterii *E. coli* zidentyfikowano także homologiczny system kodowany przez geny *tol*, jednak funkcja jego pozostaje nadal nieznana [31,32]. Przy braku funkcjonalnych białek ExbB i ExbD, białka TolQ i TolR przywracają około 10% normalnej aktywności TonB [16,31]. Białko TolA, podobnie jak TonB, przechodzi zmiany konformacyjne w odpowiedzi na siłę protonomotoryczną, ale natura tych zmian wydaje się być odmienna [33].

MODELE PRZEKAZYWANIA ENERGII MIĘDZY BŁONAMI

Dokładny mechanizm przekazywania energii między błonami u bakterii gramujemnych nie jest znany. Model „śmigła" (z ang. *the propeller model*) zakłada, iż białko TonB pozostaje cały czas związane z błoną cytoplazmatyczną, a zmiany konformacyjne inicjowane przez ExbB, ExbD i siłę protonomotoryczną powodują obrotowy ruch części C-końcowej białka oddziałującej z receptorem błony zewnętrznej [22]. Ruch ten umożliwia uwolnienie transportowanej substancji z receptora i przeniesienie do peryplazmy. Model ten został zaproponowany między innymi na podstawie wysokiej homologii ExbB i ExbD do białek MotA i MotB, które przenoszą protony w ciałku podstawowym bakteryjnych wici [34]. Punktem wyjścia do stworzenia innego modelu funkcjonowania systemu TonB-ExbB-ExbD były badania nad dystrybucją TonB pomiędzy błoną wewnętrzną i zewnętrzną. Frakcjonowanie lizatów komórkowych *E. coli* w gradiencie gęstości sacharozy wykazało podobne występowanie TonB we frakcjach obydwu błon. Zaproponowano

http://rcin.org.pl

więc model „czółna" (ang. *the shuttle model*), w którym TonB jest ruchomym przekaźnikiem energii pomiędzy błonami [35].

ZEWNĄTRZKOMÓRKOWE SKŁADNIKI SYSTEMÓW TRANSPORTU ŻELAZA I HEMU BAKTERII GRAMUJEMNYCH

W obliczu bardzo małej dostępności żelaza w formie łatwo przyswajalnej, a więc rozpuszczalnej w roztworach wodnych, mikroorganizmy syntetyzują i wydzielają do środowiska związki chemiczne lub białka mające zdolność do wychwytywania jonów żelaza lub hemu (Rys. 2). Bakterie gramujemne aktywnie przenoszą czynniki chelatujące żelazo (siderofory) do cytoplazmy przez specyficzne systemy transportujące. Inne mechanizmy pozyskiwania hemu wykorzystują zewnątrzkomórkowe białka rozpuszczalne (hemofory), odpowiedzialne za wychwytywanie wolnego hemu ze środowiska lub z hemoprotein gospodarza. Hemofory, w przeciwieństwie do sideroforów, nie są transportowane do peryplazmy, a wiązanie do specyficznego receptora poprzedza uwolnienie i przeniesienie przez błonę zewnętrzną samego hemu. Receptory błony zewnętrznej mają zdolność bezpośredniego wiązania oraz transportu hemu uwolnionego z hemoprotein.

SIDEROFORY

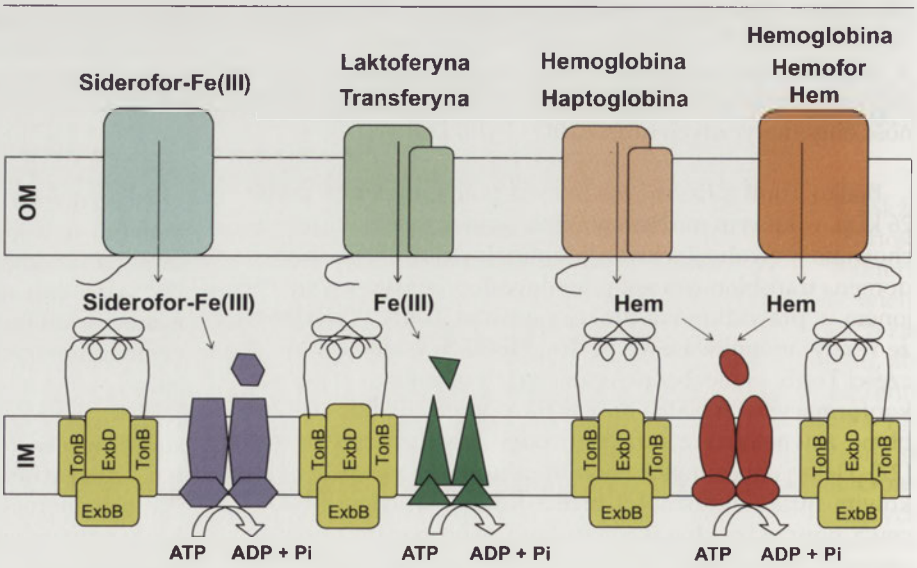
Siderofory są drobnocząsteczkowymi chelatorami żelaza syntetyzowanymi przez bakterie i grzyby, a następnie wydzielanymi do środowiska. Poprzez wiązanie jonu żelazowego, czynią go rozpuszczalnym i możliwym do pobrania przez mikroorganizmy. W organizmie gospodarza siderofory produkowane przez patogeny wychwytują także żelazo związane w białkach takich jak hemoglobina, transferyna lub laktoferyna [36].

Do znacznego postępu w badaniach nad wykorzystaniem sideroforów przez mikroorganizmy przyczyniło się odkrycie chelatorów syntetyzowanych przez bakterie rodzaju *Pseudomonas*, zawierających grupy chromoforowe odpowiedzialne za fluorescencję sideroforów w kompleksie z jonem żelaza [37]. Na podstawie chemicznej struktury grup biorących udział w wiązaniu metalu siderofory można podzielić na dwa główne typy: pochodne fenoli i kwasy hydroksamowe. Najbardziej powszechnymi przedstawicielami tych grup są odpowiednio enterobaktyna i ferrichrom [38]. Zwykle konkretny mikroorganizm syntetyzuje tylko nieliczne rodzaje sideroforów, ale bardzo często wytwarza systemy transportujące dla wielu innych typów chelatorów. *E. coli* produkuje tylko enterobaktynę wiązaną przez receptor FepA, ale posiada również specyficzne receptory błony zewnętrznej dla ferrichromu (FhuA), dihydroksybenzoiloseryny (Cir) oraz cytrynianu żelaza (FecA) [39].

Siderofory w połączeniu z żelazem przenoszone są zarówno przez błonę zewnętrzną jak i wewnętrzną aż do cytoplazmy (Rys. 2). Tam dochodzi do uwolnienia jonu poprzez jego redukcję, prowadzącą do zmniejszenia powinowactwa między metalem a chelatorem lub poprzez hydrolizę całego kompleksu. Większość sideroforów (m.in. piowerdyna, aerobaktyna) wraca z cytoplazmy na zewnątrz komórki i wykorzystywana jest do transportu kolejnego jonu żelaza [40]. Inne siderofory ulegją w cytoplazmie modyfikacji chemicznej lub hydrolizie. Ferrichrom po uwolnieniu żelaza jest inaktywowany w cytoplazmie przez acetylację reszty kwasu hydroksamowego, a transport enterobaktyny ze skompleksowanym żelazem kończy się całkowitą hydrolizą kompleksu przenoszącego żelazo [40].

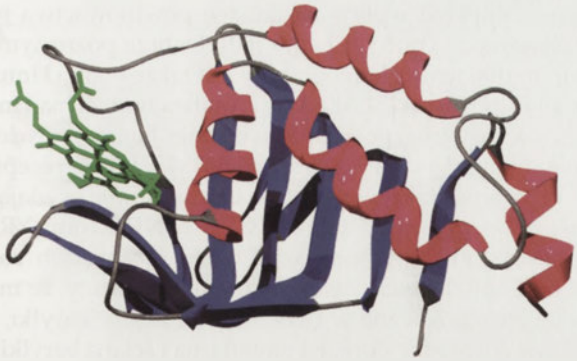
HEMOFORY

Hemofory to małe, zewnątrzkomórkowe białka bakteryjne wydzielane do środowiska. Ich rolą jest wiązanie hemu i dostarczanie go do specyficznych receptorów w błonie zewnętrznej (Rys. 2). Dotychczas scharakteryzowano hemofory HuxA z *Haemophilus influenzae*, wykorzystywane do pozyskiwania hemu z hemopeksyny [41] oraz hemofory HasA wydzielane przez *Serratia marcescens* [42], *Pseudomonas aeruginosa* [43], *P. fluorescens* [44], czy *Yersinia pestis* [45], wykorzystywane do pozyskiwania hemu głównie z hemoglobiny. Hemofory HasA (z ang. *heme acquisition system*) stanowią niezależną rodzinę białek wiążących hem obecny w różnych hemoproteinach. Dostarczają one hem do receptorów HasR odpowiedzialnych za transport tej cząsteczki przez zewnętrzną błonę bakteryjną. Struktura krystaliczna kompleksu HasA-hem z bakterii *S. marcescens* (Rys. 3; kod PDB: 1B2V) [46] wykazała, że białko to jest monomerem o masie 19 kDa. Nie posiada ono typowego N-końcowego peptydu sygnałowego, a jedynie C-końcową sekwencję cha-



Rysunek. 2. Mechanizmy transportu żelaza i hemu bakterii gramujemnych. Jako źródło żelaza lub hemu bakterie wykorzystują różne związki. Receptory błony zewnętrznej, specyficzne wobec jednego lub więcej substratów, transportują substancje do peryplazmy przy współudziale wewnątrzbłonowego kompleksu TonB-ExbB-ExbD. Kompleks ten funkcjonuje jako przekaźnik energii między błonami. W skład transporterów typu ABC (na rysunku: niebieskie dla sideroforów, zielone dla jonów żelaza, czerwone dla hemu), przenoszących substraty do wnętrza komórki, wchodzą rozpuszczalne białka peryplazmatyczne wiążące substrat, błonowe permeazy i ATPazy.

http://rcin.org.pl



Rysunek. 3. Struktura krystaliczna hemoforu HasA z *S. marcescens* (kod PDB: 1B2V) [46]. Na czerwono przedstawiono α-helisy, na niebiesko łańcuchy β, a na zielono hem wiązany przez hemofor.

rakterystyczną dla białek zewnątrzkomórkowych wydzielanych z udziałem transporterów ABC. Stwierdzono, że hem jest wiązany z dużym powinowactwem przez reszty His32 i Tyr75 (K_d<10^{-8} M) białka HasA [46].

Mechanizm uwalniania hemu z hemoglobiny przez hemofor nie jest znany. Dane eksperymentalne nie wskazują na tworzenie bezpośrednich oddziaływań HasA z hemoglobiną, co sugeruje wiązanie tylko hemu wolnego lub też powstawanie jedynie przejściowego kompleksu, trudnego do udowodnienia badaniami biochemicznymi [47]. Bezpośrednie oddziaływania białko-białko wykazano natomiast dla kompleksów hemofor HasA-receptor HasR. Prawdopodobnie receptor wiąże *in vitro* zarówno holo-HasA (hemofor w kompleksie z hemem) jak i apo-HasA (hemofor bez związanego hemu) [47]. Mechanizm przekazywania hemu na receptor nie został jednak do tej pory w pełni wyjaśniony. Z licznych badań wynika, że hemofory nie są niezbędne do przyswajania hemu przez bakterie, zwiększają jednak wydajność transportu hemu.

BAKTERYJNE PROTEAZY

Dodatkowym mechanizmem pozyskiwania hemu wykształconym przez niektóre bakterie patogenne, jest produkcja zewnątrzkomórkowych proteaz degradujących białka gospodarza, w tym także hemoproteiny. Enzymy mające zdolność do wiązania i trawienia hemoglobiny oraz innych białek wiążących hem najlepiej scharakteryzowano u bakterii *Porphyromonas gingivalis* [48,49] oraz patogennych szczepów *E. coli* [50]. Do hydrolizy hemoprotein *P. gingivalis* wykorzystuje głównie proteazy cysteinowe nazywane gingipainami [49]. Na podstawie miejsca cięcia łańcucha polipeptydowego za resztą argininy lub lizyny, wyróżnia się odpowiednio proteazy Rgp oraz Kgp. Oba enzymy syntetyzowane są w formie prepropeptydów, zawierających obok domeny katalitycznej domenę hemaglutyninową oraz peptyd sygnałowy. Zarówno Kgp jak i Rgp występują w postaci związanej z zewnętrzną błoną bakteryjną oraz jako zewnątrzkomórkowe białka rozpuszczalne. Dotychczasowe badania wykazały, że Kgp prawdopodobnie oddziałuje z zewnątrzbłonowym receptorem hemu i hemoglobiny (HmuR), co sugeruje istotną funkcję tej proteazy w wiązaniu i wykorzystaniu hemoprotein przez bakterie *P. gingivalis* [51]. U patogennych szczepów *E. coli* zewnątrzkomórkowe białko Hbp (z ang. *hemoglobin-binding protein*) funkcjonuje także jako białko wiążące heminę oraz jako proteaza hemoglobiny. Białko Hbp jest syntetyzowane w formie wielodomenowego prekursora, a odpowiednie rejony propeptydu odpowiedzialne są za jego translokację na zewnątrz komórki [50].

TRANSPORT ŻELAZA I HEMU PRZEZ BŁONĘ ZEWNĘTRZNĄ BAKTERII GRAMUJEMNYCH

W ostatnich latach zidentyfikowano wiele receptorów błony zewnętrznej bakterii gramujemnych, wytwarzanych w warunkach ograniczonej dostępności żelaza lub hemu. Receptory te wiążą ligandy z wysokim powinowactwem i dużą specyficznością oraz promują transport aktywny przy współudziale wewnątrzbłonowego kompleksu TonB--ExbB-ExbD [16]. Ponieważ zarówno hem jak i siderofory występują w środowisku w niewielkich stężeniach oraz są zbyt duże, aby mogły dyfundować do peryplazmy przez otwarte kanały poryn błonowych, rolą specyficznych receptorów błony zewnętrznej jest wiązanie i transport tych związków do wnętrza komórki. Jednocześnie synteza receptorów o dużym powinowactwie, występujących w błonie zewnętrznej, staje się jedną ze strategii we współzawodnictwie między mikroorganizmami o żelazo. Receptory dla laktoferyny, transferyny lub hemoprotein powodują rekrutację tych białek na powierzchni komórki, ekstrakcję hemu lub jonu żelaza i ich transport do wnętrza komórki (Rys. 2).

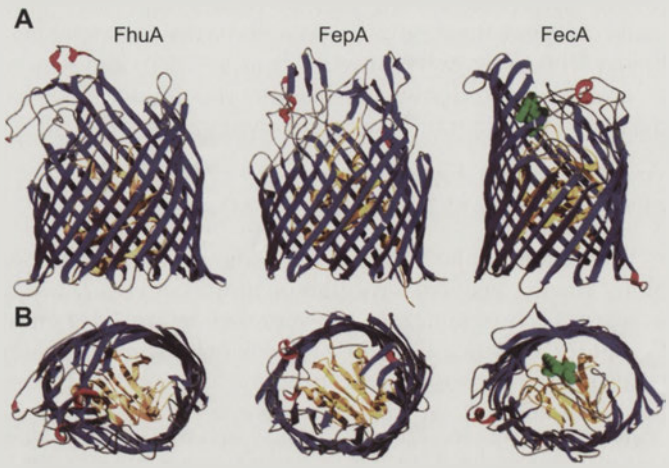
BIAŁKA RECEPTOROWE BŁONY ZEWNĘTRZNEJ

Około 50% masy błony zewnętrznej bakterii gramujemnych stanowią zakotwiczone w niej białka. Zależne od TonB receptory zaangażowane w transport żelaza i hemu stanowią tylko niewielką część tych białek. Bardzo często również ich synteza indukowana jest dopiero warunkami ograniczonego dostępu żelaza lub hemu. Architektura białek błony zewnętrznej jest bardzo charakterystyczna i uważa się, iż może być ona związana z ich biogenezą. Łańcuchy polipeptydowe nie mogą być zbyt hydrofobowe, gdyż muszą przedostać się przez warstwę błony wewnętrznej nim zostaną wbudowane w swoje docelowe miejsce funkcjonowania [5]. Dlatego, w przeciwieństwie do w większości białek błony wewnętrznej o strukturze α-helisy, receptory błony zewnętrznej charakteryzują się strukturą β-baryłki. Receptory te różnią się wielkością i liczbą monomerów tworzących jednostkę funkcjonalną.

RECEPTORY SIDEROFORÓW

Dotychczas opublikowano struktury krystaliczne trzech receptorów *E. coli* związanych z transportem sideroforów: FhuA (kody PDB: 1FCP, 2FCP, 1QFF, 1QJQ) [52,53], FepA (kod PDB: 1FEP) [54] i FecA (kody PDB: 1KMO, 1KMP, 1PO3) [55,56] (Rys. 4). FhuA jest białkiem błony zewnętrznej transportującym ferrichrom, białko FepA odpowiedzialne jest głównie za przenoszenie enterobaktyny, a FecA za transport cytrynianu żelaza. Receptory FepA i FhuA biorą także udział w przenoszeniu antybiotyków (albomycyny i rifamycyny) oraz zawierają miejsca przyłączania toksyn (kolicyny M i mikrocyny J25) i fagów (T1, T5, UC1) [40]. Struktura β-baryłki tych transporterów składa się z 22 ułożonych antyrównolegle łańcuchów β (Rys. 4). Badania

http://rcin.org.pl



Rysunek 4. Struktury krystaliczne receptorów błony zewnętrznej zaangażowanych w transport żelaza u *E. coli*. FhuA – transporter ferrichromu (kod PDB: 2FCP) [52]; FepA – transporter enterobaktyny (kod PDB: 1FEP) [54]; FecA – transporter cytrynianu żelaza (kod PDB: 1KMP) [55]. (A) Widok z boku (z płaszczyzny błony) pokazuje typową architekturę β-baryłki bakteryjnych białek błony zewnętrznej (kolor niebieski). (B) Widok z góry (z zewnątrz komórki) pokazuje zamknięcie kanału przez N-końcową domenę globularną (kolor żółty). Kolorem czerwonym zaznaczono rejony o strkturze α-helikalnej, kolorem zielonym cytrynian żelaza związany przez receptor FecA.

krystalograficzne wykazały, że N-koniec łańcucha polipeptydowego tych receptorów tworzy globularną domenę, zamykającą kanał tworzony przez β-baryłkę od strony peryplazmy. Część receptora usytuowana jest ponad powierzchnią błony zewnętrznej, gdzie zlokalizowane jest również miejsce wiązania sideroforów. Wydaje się, że domena globularna zwiększa wydajność wiązania sideroforów, jednak nie jest konieczna do zachowania specyficzności receptora [57]. Podczas oddziaływania części N-końcowej receptorów z kompleksem TonB-ExbB-ExbD dochodzi do zmian konformacyjnych tej domeny, co pozwala na odsłonięcie kanału we wnętrzu receptora i transport ligandów do peryplazmy [58].

RECEPTORY HEMU I HEMOPROTEIN

Ogólna architektura receptorów hemu jest prawdopodobnie bardzo zbliżona do struktury transporterów sideroforów. Podobna wydaje się być organizacja β-baryłki oraz N-końcowej domeny zamykającej kanał od strony peryplazmatycznej i oddziałującej z kompleksem TonB. Do tej pory jednak nie opublikowano struktury krystalicznej żadnego z tych receptorów. Dużą podgrupę transporterów hemu (Rys. 2) stanowią receptory hemoglobiny i hemu bakterii z rodzajów *Yersinia* i *Shigella* [59]. Badania biochemiczne i genetyczne receptora HemR z *Y. enterocolitica* wskazują, że białka tej grupy mogą wykorzystywać jako źródło żelaza różne hemoproteiny. Wykazano, że HemR może wiązać heminę, mioglobinę, hemoglobinę, kompleks hemu z albuminą, hemopeksynę i katalazę [60]. Zestawienie sekwencji różnych receptorów hemu i hemoglobiny wykazało obecność zachowanych w ewolucji sekwencji aminokwasowych FRAP i NPNL oraz reszt histydyny i kwasu glutaminowego, które mogą brać udział w wiązaniu i transporcie hemu [60--62]. Hipotetyczny model transportu hemu poprzez HemR u bakterii *Y. enterocolitica* postuluje transfer hemu z położonej zewnętrznie His461, poprzez kanał β-baryłki, na His128 znajdującą się w obrębie N-końcowej domeny globularnej. Oddziaływanie receptora z białkiem TonB umożliwiałoby transport poprzez wpływ na zmianę powinowactwa reszt histydynowych TonB do hemu [60]. Dobrze poznanym receptorem dla hemu i hemoglobiny jest także białko HmuR z bakterii *P. gingivalis* [51,61,63,64]. Analiza mutacyjna HmuR wykazała, że w bezpośrednie wiązanie hemu prawdopodobnie zaangażowane są reszty His434 i His95 receptora [62]. W procesie aktywnego transportu istotne wydają się być także reszty Glu427, Glu448, Glu458, NPDL oraz YRAP, tworzące rejony występujące w wielu receptorach zależnych od TonB. Dotychczasowe badania wykazały, że mogą być one zaangażowane w tworzenie struktury baryłki, oddziaływanie między domeną globularną i ścianą baryłki lub wchodzić w skład rejonów tworzących zewnątrzkomórkowe pętle biorące udział w wiązaniu hemu na powierzchni receptora [K. Tamioła, T. Olczak, dane nieopublikowane].

Odrębną podgrupą transporterów hemu są receptory bakterii z rodzajów *Vibrio* [65], *Neisseria* [66] i *Haemophilus* [67]. Białka te są specyficzne wobec jednego lub dwóch źródeł hemu (hemoglobina lub hemoglobina w kompleksie z haptoglobiną) (Rys. 2). Ich zewnątrzbłonowe fragmenty zawierają domeny wiążące daną hemoproteinę z dużym powinowactwem. Szczególny przypadek wśród znanych receptorów hemu stanowi transporter HpuAB odkryty u bakterii *Neisseria meningitidis*, oddziałujący z hemoglobiną i haptoglobiną [68]. Receptor ten składa się z białek HpuA (42 kDa) i HpuB (89 kDa). HpuB wykazuje zależność od TonB i jest odpowiednikiem innych znanych receptorów hemu, natomiast HpuA jest lipoproteiną błony zewnętrznej. Obydwa składniki kompleksu HpuAB są niezbędne do wiązania hemoglobiny oraz haptoglobiny (zarówno apojak i holo-haptoglobiny) do powierzchni komórek bakteryjnych.

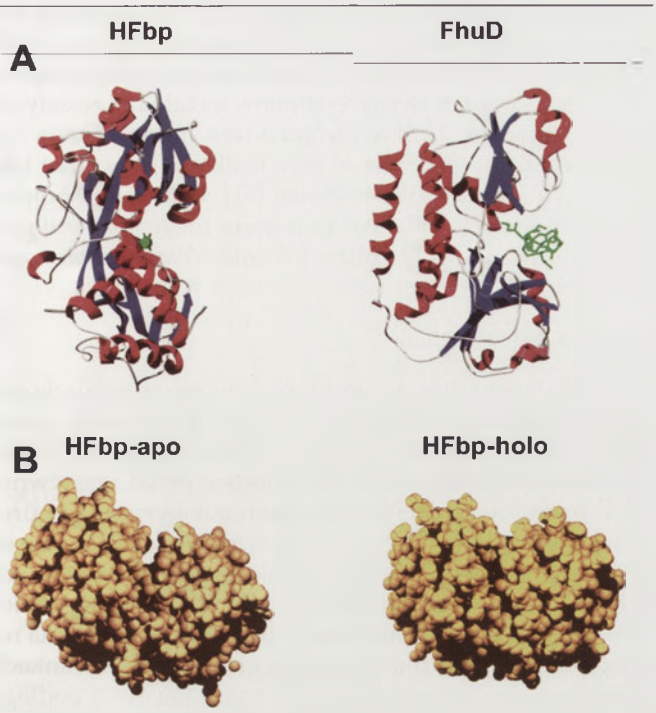
RECEPTORY BIAŁEK WIĄŻĄCYCH ŻELAZO

Dwuskładnikowe systemy receptorowe dla transferyny i laktoferyny (Rys. 2) zidentyfikowano u bakterii z rodzaju *Neisseria* [69]. Badania białek Tbp1 i Tbp2 z *N. gonorrhoeae* wskazują, iż razem tworzą one funkcjonalny receptor, chociaż każde z tych białek może wiązać transferynę samodzielnie. Tbp1, poprzez analogię do innych transporterów zależnych od TonB, tworzy kanał, przez który odbywa się transport żelaza. Obecność Tbp2, choć nie jest niezbędna do wzrostu bakterii w obecności transferyny jako jedynego źródła żelaza, prawdopodobnie zwiększa specyficzność receptora.

TRANSPORTERY ABC – TRANSPORT PRZEZ BŁONĘ WEWNĘTRZNĄ

Systemy ABC czyli systemy zależnego od ATP transportu związków przez błonę są zaangażowane nie tylko w transport żelaza i jego kompleksów, ale również w transport aminokwasów, peptydów, cukrów oraz innych składników niezbędnych do utrzymania życia mikroorganizów [17,39]. Transportery te składają się z jednego lub większej liczby peryplazmatycznych białek wiążących transportowaną substancję, ponadto jednego lub dwóch białek tworzących kanał w błonie cytoplazmatycznej oraz jednej lub dwóch hydrolaz ATP (ATPaz) zakotwiczonych w błonie (Rys. 2).

http://rcin.org.pl



Rysunek 5. Typowe struktury peryplazmatycznych białek wiążących, wchodzących w skład transporterów typu ABC. (A) hFbp – białko wiążące jon Fe^{3+} z *H. influenzae* (kod PDB: 1MRP) [71] – reprezentuje typową organizację strukturalną z dwiema domenami połączonymi łańcuchem β; FhuD – białko wiążące siderofory z *E. coli* (kod PDB: 1ESZ) [72] – w białku tym połączenie między domenami stanowi długa α-helisa. Na czerwono zaznaczono α-helisy, na niebiesko łańcuchy β, a na zielono jon żelaza lub hem. **(B)** Porównanie struktur krystalicznych apo-hFbp (kod PDB: 1D9V) [71] i holo-hFbp z *H. influenzae* (kod PDB: 1MRP) [71]. Wraz ze związaniem Fe^{3+} następuje zmiana wzajemnego ułożenia domen i przejście białka w konformację zamkniętą.

Spośród systemów biorących udział w zaopatrywaniu komórki w żelazo, wyróżnia się trzy podstawowe grupy odpowiedzialne za transport sideroforów/hemu/witaminy B_{12}, za transport jonów żelaza oraz za transport różnych metali, w tym żelaza. Niektóre bakterie, takie jak *H. influenzae*, posiadają systemy ABC wszystkich trzech typów, co jest zgodne z ich umiejętnością wykorzystywania do wzrostu różnych źródeł żelaza.

PERYPLAZMATYCZNE BIAŁKA WIĄŻĄCE

Jakkolwiek peryplazmatyczne składniki różnych systemów ABC nie wykazują większego podobieństwa w sekwencji aminokwasowej oraz rozpoznają różne ligandy, ich struktury drugo- i trzeciorzędowe są często bardzo zbliżone. Większość tego typu białek zbudowana jest z dwóch globularnych domen połączonych krótkim fragmentem tworzonym zwykle przez dwa lub trzy łańcuchy β, które umożliwiają zawiasowy ruch domen względem siebie (Rys. 5A). W konformacji otwartej domeny pozostają oddalone od siebie, natomiast związanie ligandu powoduje ich zbliżenie i przejście do konformacji zamkniętej [70]. Przykładami tego typu topologii są homologiczne białka wiążące Fe^{3+}, czyli FbpA (*N. gonorrhoeae*) i hFbp (*H. influenzae*). Rozwiązanie struktury krystalicznej hFbp (kody PDB: 1MRP, 1D9V) [71] wykazało różnicę między apo- i holo-hFbp, polegającą na przesunięciu domen globularnych względem siebie o około 20° (Rys. 5B). Domeny te przypominają w swej budowie podjednostki transferyny człowieka, jednak reszty aminokwasowe koordynujące jon żelaza są w obu przypadkach tylko częściowo zgodne.

W przeciwieństwie do białek wiążących Fe^{3+}, białka wychwytujące siderofory/hem/witaminę B_{12} wykazują odmienną, nietypową budowę. Przedstawicielem tej grupy jest białko FhuD wiążące siderofory hydroksamowe w kompleksie z żelazem. Struktura krystaliczna FhuD z *E. coli* (kod PDB: 1ESZ) [72] wykazała obecność dwóch domen połączonych stosunkowo długą (23 reszty aminokwasów) α-helisą (Rys. 5A). Miejsce wiązania ligandu znajduje się w zagłębieniu pomiędzy tymi domenami. Zmiany konformacyjne połączone z przejściem z formy otwartej białka do formy zamkniętej wydają się być znacznie mniejsze niż dla innych białek peryplazmatycznych. W porównaniu z receptorem błony zewnętrznej FhuA, białko FhuD wykazuje znacznie mniejszą specyficzność i wychwytuje również żelazowe kompleksy innych sideroforów hydroksamowych, takich jak koprogen, ferrioksyamina lub kwas rodotorulowy. Ogólnie tendencja do mniej specyficznego transportu przez błonę wewnętrzną w stosunku do błony zewnętrznej jest zachowana także dla sideroforów u innych gatunków bakterii.

PERMEAZY BŁONY WEWNĘTRZNEJ

Większość permeaz przenoszących siderofory tworzy prawdopodobnie funkcjonalne heterodimery, podczas gdy w przypadku transportu hemu i witaminy B_{12}, bardziej prawdopodobne wydaje się być powstawanie homodimerów [6]. Białko FhuB z *E. coli*, odgrywające główną rolę w transporcie sideroforów ze skompleksowanym żelazem do cytoplazmy, jest hydrofobowym, integralnym białkiem błony cytoplazmatycznej. Osiągając masę 70 kDa, białko to jest około dwa razy większe niż odpowiadające mu komponenty znanych systemów ABC, przenoszących składniki inne niż hem lub żelazo. Białko FhuB zbudowane jest z dwóch podobnych domen, z których każda zawiera 10 transbłonowych helis [73]. Porównanie sekwencji tych białek sugeruje podobną organizację strukturalną dla wszystkich permeaz transportujących kompleksy sideroforów z żelazem. W strukturach pierwszorzędowych permeaz wyróżnia się zachowane w ewolucji sekwencje z resztą glicyny umiejscowioną średnio około 100 reszt aminokwasowych od C-końca łańcucha polipeptydowego [74]. Rejon ten jest powtórzony w sekwencji FhuB i odgrywa prawdopodobnie istotną rolę w oddziaływaniu permeazy z ATPazą.

BIAŁKA HYDROLIZUJĄCE ATP

ATPazy są białkami o najsilniej zachowanej w ewolucji sekwencji spośród wszystkich składników systemów ABC [17]. Cechuje je obecność klasycznych sekwencji, charakterystycznych dla wielu białek wiążących ATP lub GTP, nazywanych sekwencjami Walkera A i B, które tworzą miejsce wiązania ATP lub GTP. Obecne są także inne specyficzne rejony, takie jak rejon zawierający sekwencję LSGGQ lub reszta histydyny w odległości około 25 reszt aminokwasów poniżej sekwencji Walkera B. FhuC oraz inne podobne ATPazy dostarczają energię niezbędną do transportu przez błonę wewnętrzną, prawdopodobnie poprzez indukowa-

http://rcin.org.pl

nie zmian konformacyjnych oddziałujących z nimi integralnych białek błonowych. Badania nad transporterami ABC dla histydyny i maltozy wykazały jednak, że wiązanie przez składniki błonowe sytemu ABC białka peryplazmatycznego w kompleksie z ligandem inicjuje hydrolizę ATP [72]. Odkrycie to wskazuje na konieczność istnienia drogi przekazywania sygnału od białka wiążącego substrat w peryplazmie do ATPazy, co zapobiegałoby hydrolizie nukleotydu wtedy, gdy energia nie jest wymagana.

REGULACJA PRZYSWAJANIA ŻELAZA

Wobec, jak dotąd, niezidentyfikowanych mechanizmów usuwania żelaza poza komórkę bakteryjną, uważa się, że regulacja komórkowego stężenia tego metalu odbywa się poprzez kontrolę transportu oraz odpowiedni poziom syntezy białek koordynujących metal. Większość genów zaangażowanych w utrzymanie homeostazy żelaza wydaje się pozostawać pod kontrolą głównego czynnika regulacyjnego, czyli represora Fur (z ang. *ferric uptake regulator*).

ORGANIZACJA BAKTERYJNYCH GENÓW POZYSKIWANIA ŻELAZA

Lokalizacja genów kodujących komponenty bakteryjnych systemów transportu żelaza zwykle nie jest przypadkowa. Skupienie genów odpowiedzialnych za jeden system transportu w spójny operon znajduje uzasadnienie w łatwiejszej regulacji na poziomie genetycznym oraz zagwarantowaniu odpowiedniej stechiometrii składników tworzących dany mechanizm transportujący. Przykładem organizacji genów związanych z wykorzystaniem sideroforów może być operon *fhu* z *E. coli* [39]. Gen *fhuA*, kodujący receptor błony zewnętrznej dla ferrichromu, poprzedza geny składników transportera ABC: *fhuC*, *fhuD* i *fhuB*. Takie łączenie genów odpowiedzialnych za transport przez obydwie błony pod wspólnym promotorem jest stosunkowo częste, przy czym różną kolejność obserwuje się w poszczególnych *loci*. W skład podobnych operonów wchodzić mogą też geny szlaków syntezy sideroforów lub inne geny regulacji homeostazy żelazowej. Zbliżoną organizację obserwuje się także dla systemów transportu hemu i jonów Fe^{3+} [6]. Niektóre składniki mechanizmów pozyskiwania żelaza kodowane są na ruchomych elementach genetycznych (np. na tzw. wyspach patogenności) zintegrowanych z chromosomem lub z episomalnym DNA. Są to najczęściej geny syntezy sideroforów [75].

GEN fur I BIAŁKO Fur

W 1981 roku opisano mutanty bakterii *E. coli*, u których wytwarzanie niektórych białek należących do szlaków produkcji sideroforów lub biosyntezy specyficznych receptorów błony zewnętrznej, w normalnym przypadku hamowane przez żelazo, było ciągłe i niezależne od obecności metalu w pożywce - mutanty *fur* [76]. Nieco później zidentyfikowano gen *fur* [77], a jego produkt białkowy oczyszczono w celu poznania właściwości biochemicznych [78]. Białko Fur z *E. coli* jest polipeptydem o masie 17 kDa i występuje w formie dimeru, niezależnie od obecności lub braku związanego Fe^{2+}. Rozwiązanie struktury krystalicznej białka Fur z *P. aeruginosa* pozwoliło na jego dokładną analizę (kod PDB: 1MZB) [79]. Część N-końcowa białka zawiera charakterystyczną dla białek wiążących DNA strukturę helisa-skręt-helisa, natomiast rejon C-końcowy bierze udział w dimeryzacji białka [79,80]. Dokładne miejsca przyłączania dwóch koordynowanych atomów metalu nie zostały do tej pory poznane. U *E. coli* jedno z tych miejsc zajmowane jest przez Zn^{2+}, natomiast *in vitro* białko może wiązać także inne kationy dwuwartościowe [81]. Represory homologiczne do Fur z *E. coli* odkryto u wielu innych bakterii gramujemnych, m.in. z rodzajów *Yersinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas* i *Neisseria* [82].

ROLA REPRESORA Fur

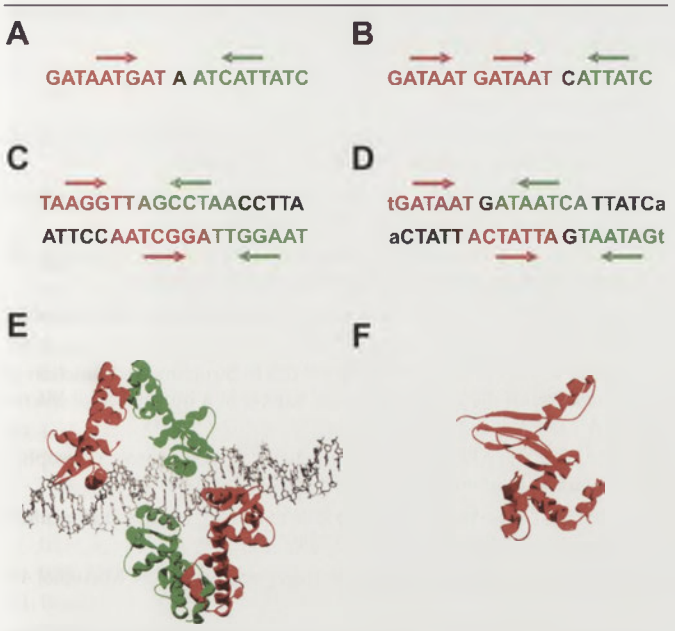
Białko Fur wydaje się być zaangażowane w regulację dużej liczby genów, związanych nie tylko z wykorzystaniem żelaza. Stwierdzono również jego wpływ na odpowiedź komórki na niskie pH środowiska, obronę przed reaktywnymi formami tlenu, chemotaksję, bioluminescencję, czy produkcję toksyn i innych czynników wirulencji [81]. Znane są przypadki zarówno negatywnej jak i pozytywnej regulacji ekspresji genów z udziałem tego białka. Najlepiej wyjaśnionym mechanizmem funkcjonowania Fur jest negatywna regulacja na poziomie transkrypcyjnym [81,82]. W warunkach dużej dostępności żelaza represor wiąże jon Fe^{2+} i podlega zmianom konformacyjnym, które umożliwiają jego oddziaływanie z DNA. Wiązanie kompleksu Fur-Fe^{2+} do specyficznej sekwencji w rejonie promotorowym nie pozwala na przyłączenie polimerazy RNA i hamuje transkrypcję genów znajdujących się pod kontrolą danego promotora. W ten sposób represor Fur hamuje ekspresję takich czynników, bezpośrednio związanych z transportem żelaza lub hemu, jak receptory błonowe czy enzymy syntezy sideroforów [83]. Z drugiej strony, znane są przykłady negatywnej regulacji pośredniej. W takich wypadkach represor Fur hamuje ekspresję innego regulatora, który z kolei wpływa na geny transportu żelaza do komórki. Przykładami tego typu czynników pozostających pod kontrolą Fur są regulatory syntezy i wykorzystania sideroforów AraC oraz alternatywne czynniki sigma polimerazy RNA [84].

Znacznie słabiej poznanym mechanizmem jest pozytywna regulacja genów przez kompleks Fur-Fe^{2+}. Przykładami białek podlegających takiej regulacji są dysmutaza ponadtlenkowa SodA i SodB u *E. coli*, białka tolerancji na obniżone pH u *Salmonella typhimurium*, bakteryjne ferrytyny Bfr i Ftn, czy akonitaza AcnA z *E. coli* [81]. W żadnym z tych przypadków nie zidentyfikowano jednak sekwencji rozpoznawanej przez Fur w rejonach promotorowych. Dotychczasowe badania nad genem *sodB* wykazały, że pozytywna regulacja wiąże się z przedłużeniem czasu półtrwania mRNA, a więc odbywa się raczej na poziomie potranskrypcyjnym, aniżeli na poziomie DNA [81].

ROZPOZNAWANIE DNA PRZEZ BIAŁKO Fur

Większość prokariotycznych białek oddziałujących z DNA poprzez motyw helisa-skręt-helisa rozpoznaje sekwencje palindromowe o długości około 12 par zasad [85]. Klasycznie pojmowany region wiążący Fur stanowi 19-nukleotydowy fragment GATAATGATAATCATTATC (Rys. 6A) [86]. Jednakże sekwencja ta może być również interpretowana jako potrójnie powtórzony heksamer GA-

http://rcin.org.pl



Rysunek 6. Model wiązania DNA przez Fur oraz jego porównanie ze strukturą krystaliczną kompleksu DtxR-DNA. (A) Klasycznie definiowana sekwencja 19--nukleotydowego palindromu, mająca oddziaływać z pojedynczym dimerem Fur [86]. (B) Alternatywny model wiązania represora do powtórzonych heksamerów GATAAT [87]. (C) Dwa zachodzące na siebie odwrócone powtórzenia $(7\text{-}1\text{-}7)_2$ oddziałujące z dwoma dimerami Fur, analogicznie do oddziaływania DtxR-DNA [89]. (D) Sekwencja rozpoznawana przez represor DtxR. (E) Struktura represora DtxR związanego z operatorem genu *tox* (kod PDB: 1DDN) [88]. Dwa dimery DtxR oddziałują z większym rowkiem helisy DNA. (F) Struktura monomeru białka Fur z *P. aeruginosa* (kod PDB: 1MZB) [79]. Wiązanie Fur do helisy DNA jest podobne do oddziaływania DtxR z DNA.

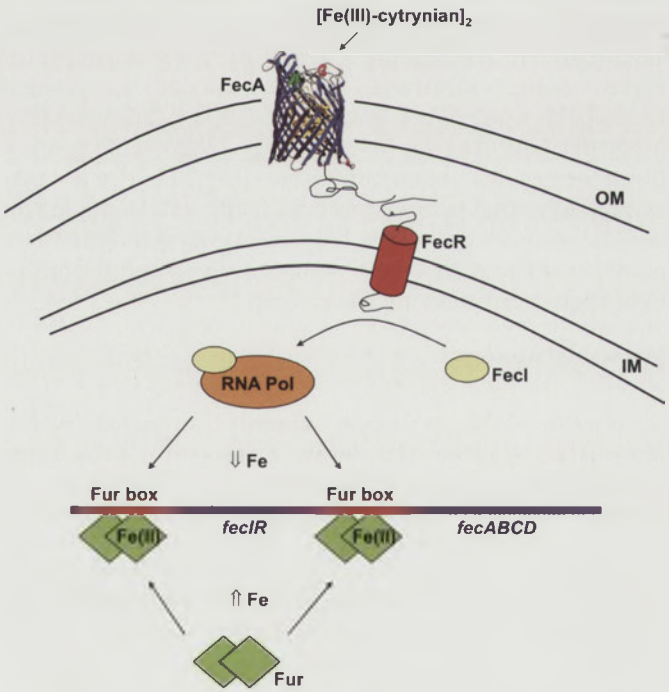
TAAT w konfiguracji „głowa-głowa-ogon" (Rys. 6B). Dotychczas wykazano wiązanie białka Fur do sekwencji zawierających przynajmniej trzy takie 6-nukleotydowe motywy [87]. Wyniki te zasugerowały, że to właśnie heksamer GATAAT jest jednostką rozpoznawaną przez represor. Taki sposób wiązania DNA przez kompleks Fur-Fe^{2+} jest niezgodny z teorią przyjętą dla podobnych regulatorów prokariotycznych, a przypomina raczej wiązanie kwasu nukleinowego poprzez motywy palca cynkowego, występujące w systemach eukariotycznych. Ostatnia hipoteza dotycząca oddziaływania Fur z DNA powstała w oparciu o analizę sekwencji rozpoznawanych przez represor Fur z *Bacillus subtilis* oraz struktury krystaliczne białka DtxR z *Corynebacterium diphtheriae* (kod PDB: 1DDN) [88] (Rys. 6E) i białka Fur z *P. aeruginosa* (kod PDB: 1MZB) [79] (Rys. 6F). Represor DtxR, podobnie jak Fur, funkcjonuje jako dimer i oddziałuje z rozpoznawaną sekwencją po związaniu jonu żelaza. Hipoteza ta zakłada, iż pierwotnie rozpoznana 19-nukleotydowa sekwencja stanowi w rzeczywistości dwa zachodzące na siebie odwrócone powtórzenia, z których każdy wiązany jest przez dimer DtxR (Rys. 6C) lub Fur (Rys. 6D) [89,90].

POZYTYWNA REGULACJA POZYSKIWANIA ŻELAZA

Represor Fur jest odpowiedzialny za hamowanie syntezy białek związanych z pobieraniem żelaza w warunkach, gdy wewnątrzkomórkowe stężenie tego metalu jest wystarczające. Utrzymanie homeostazy żelazowej wymaga jednak istnienia mechanizmów regulacyjnych działających także wtedy, gdy potrzebny jest wzmożony transport żelaza do komórki. W rzeczywistości mechanizmy te pozostają także pod kontrolą represora Fur-Fe^{2+}, co zapewnia swego rodzaju podwójną regulację: indukcję transportu przy niewystarczającej ilości żelaza w komórce i zahamowanie pobierania metalu, zapobiegające jego szkodliwemu nagromadzeniu.

U bakterii *E. coli* indukcja genów transportu kwasu cytrynowego w kompleksie z żelazem, skupionych w operonie *fecABCDE*, uwzględnia kaskadę przekazywania sygnału zapoczątkowaną na powierzchni komórki i prowadzącą aż do cytoplazmy [84] (Rys. 7). W proces ten zaangażowane są trzy białka: receptor FecA w błonie zewnętrznej, białko FecR w błonie wewnętrznej oraz cytoplazmatyczne białko FecI. Wiązanie cytrynianu żelaza powoduje zmiany strukturalne FecA, inicjujące przekazywanie sygnału do wnętrza komórki. Część N-końcowa receptora jest wydłużona w porównaniu ze strukturą podobnych transporterów błony zewnętrznej [55,56]. Dodatkowy odcinek, poprzedzający miejsce oddziaływania z dostarczającym energii kompleksem TonB-ExbB-ExbD, bierze udział w przekazywaniu sygnału inicjacji transportu na białko błony wewnętrznej FecR. FecR następnie aktywuje cytoplazmatyczny czynnik sigma FecI, który wiąże się do kompleksu polimerazy RNA, umożliwiając inicjację transkrypcji operonu *fecABCDE*. Transkrypcja genów *fecIR* pozostaje pod bezpośrednią kontrolą represora Fur (Rys. 7).

FecI należy do rodziny czynników sigma szeroko rozpowszechnionych wśród różnych bakterii gramujemnych.



Rysunek 7. Model regulacji transportu cytrynianu żelaza. Receptor błony zewnętrznej FecA zawiera wydłużony rejon N-końcowy o nieznanej konformacji, nieobecny w strukturze krystalicznej białka (kod PDB: 2FCP) [52]. Rejon ten, po związaniu cytrynianu żelaza, oddziałuje z „suwakiem leucynowym" białka FecR zakotwiczonego w błonie wewnętrznej. FecR przekazuje sygnał do cytoplazmy aktywując czynnik sigma FecI, który następnie łączy się z kompleksem polimerazy RNA (RNA Pol), co umożliwia transkrypcję genów znajdujących się pod kontrolą odpowiedniego promotora. W ten sposób indukowana jest ekspresja genów odpowiedzialnych za transport cytrynianu żelaza w odpowiedzi na jego dostępność w środowisku życia bakterii. W obecności niskich stężeń żelaza w komórce bakteryjnej (⇓Fe) dochodzi do syntezy białek transportujących (FecABCD) oraz białek regulatorowych (FecRI) i zwiększonego przyswajania tego pierwiastka. W warunkach nadmiaru żelaza w komórce bakteryjnej (⇑Fe) geny te podlegają represji przez białko Fur.

http://rcin.org.pl

Systemy regulatorowe analogiczne do kaskady FecAIR zostały zidentyfikowane także u innych bakterii. U *P. aeruginosa* synteza i transport piowerdyny są kontrolowane przez czynnik sigma PvdS aktywowany przez integralne białko błony wewnętrznej FpvR [90]. Analogiem receptora FecA jest tu FpvA. Pod kontrolą tej kaskady przekazywania sygnału pochodzącego od związanej piowerdyny ze skompleksowanym żelazem pozostaje także synteza takich czynników wirulencji jak egzotoksyna A czy endoproteinaza.

ŻELAZO A PATOGENEZA - ASPEKT MEDYCZNY

Zainteresowanie wykorzystaniem sideroforów, zarówno naturalnych jak i syntetycznych, do celów medycznych jest obecnie bardzo duże. Drobnocząsteczkowe chelatory żelaza mają w praktyce zastosowanie w leczeniu chorób objawiających się niebezpiecznie wysokim stężeniem żelaza w osoczu (głównie talasemia) oraz jako leki antybakteryjne [10]. Szczegółowe poznanie systemów aktywnego transportu sideroforów do wnętrza komórek bakterii gramujemnych pomogło w stworzeniu licznych koniugatów sideroforów lub ich fragmentów z antybiotykami [40,55]. Kompleksy takie są aktywnie przenoszone przez błony bakteryjne z udziałem specyficznych systemów transportujących, co znacznie obniża minimalne stężenie leku wykazujące działanie antybakteryjne. Jednocześnie kompleksy sideroforów z antybiotykami często nie są rozpoznawane i inaktywowane przez typowe enzymy komórkowe gwarantujące oporność bakterii na antybiotyki, takie jak β-laktamaza. Przykładem powszechnie wykorzystywanego kompleksu jest albomycyna. Lek ten, zbudowany z grupy przypominającej ferrichrom i części o aktywności antybiotyku, podlega enzymatycznej aktywacji w cytoplazmie komórki bakteryjnej [91], a jego działanie destrukcyjne polega na blokowaniu syntezy tRNA seryny i hamowaniu translacji [92]. Możliwe jest także projektowanie koniugatów wykazujących działanie wobec konkretnych gatunków bakterii i będących ogromnym ułatwieniem w planowaniu skutecznych terapii o obniżonym zagrożeniu efektami ubocznymi.

PODSUMOWANIE

Jako źródło żelaza i hemu bakterie gramujemne wykorzystują kompleksy sideroforów z żelazem, białka transportujące żelazo (transferyna, laktoferyna), wolny hem lub hemoproteiny (hemoglobina, haptoglobina, hemopeksyna), a organizacja transportu żelaza i hemu jest ściśle związana z budową błon komórkowych tych mikroorganizmów. Ważnym osiągnięciem ostatnich lat było poznanie struktury krystalicznej niektórych białek zaangażowanych w transport żelaza. Wydaje się, że istotne znaczenie w diagnostyce i terapii może mieć poznanie budowy i funkcji receptorów błony zewnętrznej, dostarczających żelazo i hem do wnętrza komórki oraz białek transportujących żelazo lub hem. W oparciu o ich strukturę opracowano leki stosowane w leczeniu nie tylko zakażeń bakteryjnych, ale także chorób związanych z nadmiernym poziomem żelaza w organizmie człowieka. Intensywne badania dotyczące przyswajania żelaza i hemu przez bakterie gramujemne koncentrują się obecnie nie tylko na dalszym poznaniu mechanizmów transportu tych ligandów, ale także na regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na poziom obydwu składników w środowisku życia bakterii.

PIŚMIENNICTWO

1. Beveridge TJ (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. J Bacteriol 181: 4725-4733
2. Nikaido H (1994) Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. J Biol Chem 269: 3905-3908
3. Kadner RJ (1990) Vitamin B_{12} transport in *Escherichia coli*: energy coupling between membranes Mol Microbiol 4: 2027-2033
4. Postle K (1990) TonB and the gram-negative dilemma. Mol Microbiol 4: 2019-2025
5. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. Mol Microbiol 37: 239-253
6. Koster W (2001) ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B_{12}. Res Microbiol 152: 291-301
7. Litwin CM, Calderwood SB (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. Clin Microbiol Rev 6: 137-149
8. Guerinot, ML (1994) Microbial iron transport. Annu Rev Microbiol 48: 743-772
9. Harrison PM, Arosio P (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochim Biophys Acta 1275: 161-203
10. Marx JJM (2002) Iron and infection: competition between host and microbes for a precious element. Best practice & Res Clin Haematol 2: 411-426
11. Miller JR, Taies JA, Silver J (1987) Mossbauer and spectroscopic studies on substituted tetraphenylporphyrinato iron (III) complexes in aqueous solutions and the formation of the μ-oxo-bridged species. Inorg Chim Acta 138: 205-214
12. Van Vlierberghe H, Langlios M, Delanghe J (2004) Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease. Clin Chim Acta 345: 35-42
13. Tolosano E, Altruda F (2002) Hemopexin: structure, function, and regulation. DNA Cell Biol 21: 297-306
14. Zunszain PA, Ghuman J, Komatsu T, Tsuchida E, Curry S (2003) Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. BMC Struct Biol 3: 6-14
15. Miller YI, Felikman Y, Shaklai N (1995) The involvement of low-density lipoprotein in hemin transport potentiates peroxidative damage. Biochim Biophys Acta 1272: 119-127
16. Skare JT, Ahmer BMM, Seachord CL, Darveau RP, Postle K (1993) Energy transduction between membranes. TonB, a cytoplasmic membrane protein, can be chemically cross-linked in vivo to the outer membrane receptor FepA. J Biol Chem 268: 16303-16308
17. Nikaido H, Hall JA (1998) Overview of bacterial ABC transporters. Methods Enzymol 292: 3-20
18. Roof SK, Allard JD, Bertrand KP, Postle K (1991) Analysis of *Escherichia coli* TonB membrane topology using PhoA fusions. J Bacteriol 173: 5554-5557
19. Kampfenkel K, Braun V (1992) Membrane topology of the *Escherichia coli* ExbD protein. J Bacteriol 174: 5485-5487
20. Kampfenkel K, Braun V (1993) Topology of the ExbB protein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. J Biol Chem 268: 6050-6057
21. Skare JT, Postle K (1991) Evidence for a TonB-dependent energy transduction complex in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 5: 2883-3890
22. Chang C, Mooser A, Pluckthun A, Wlodawer A (2001) Crystal structure of the dimeric C-terminal domain of TonB reveals a novel fold. J Biol Chem 276: 27535-27540
23. Koedding J, Polzer P, Kiling F, Howard SP, Gerber K, Seige P, Diederichs K, Welte W (2004) Crystallization and preliminary X-ray analysis of a C-terminal TonB fragment from *Escherichia coli*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60: 1281-1283

http://rcin.org.pl

24. Sauter A, Howard SP, Braun V (2003) In vivo evidence for TonB dimerization. J Bacteriol 185: 5747-5754

25. Higgs PI, Larsen RA, Postle K (2002) Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. Mol Microbiol 44: 271-28

26. Higgs PI, Myers PS, Postle K (1998) Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers.J Bacteriol 180: 6031-6038

27. Larsen RA, Postle K (2001) Conserved residues Ser(16) and His(20) and their relative positioning are essential for TonB activity, cross-linking of TonB with ExbB and the ability of TonB to respond to proton motive force. J Biol Chem 276: 8111-8117

28. Karlsson M, Hannavy K, Higgins CF (1993) A sequence-specific function of the N-terminal signal-like sequence of the TonB protein. Mol Microbiol 8: 379-388

29. Jaskula JC, Letain TE, Roof SK, Skare JT, Postle K (1994) Role of the TonB amino terminus in energy transduction between membranes. J Bacteriol 176: 2326-2338

30. Larsen RA, Wood GE, Postle K (1993) The conserved proline-rich motif is not essential for energy transduction by *Escherichia coli* TonB protein. Mol Microbiol 10: 943-953

31. Bradbeer C (1993) The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. J Bacteriol 175: 3146-3150

32. Kampfenkel K, Braun V (1993) Membrane topologies of the TolQ and TolR proteins of *Escherichia coli*: inactivation of TolQ by a missense mutation in the proposed first transmembrane segment. J Bacteriol 175: 4485

33. Germon P, Ray MC, Vianney A, Lazzaroni JC (2001) Energy-dependent conformational change in the TolA protein of *Escherichia coli* involves its N-terminal domain, TolQ and TolR. J Bacteriol 183: 4110-4114

34. Cascales E, Lloubes R, Sturgis JN (2001) The TolQ-TolR proteins energize TolA and share homologies with the flagellar motor proteins MotA-MotB. Mol Microbiol 42: 795-807

35. Letain TE, Postle K (1997) TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 24: 271-283

36. Faraldo-Gómez JD, Sansom MSP (2003) Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. Nature 4: 105-116

37. Cornelis P, Matthijs S (2002) Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. Environ Microbiol 4: 787-798

38. Chimiak A (1984) Siderofory - nośniki jonu żelazowego. Postepy Biochem 30: 435-460

39. Clarke TE, Tari LW, Vogel HJ (2001) (2001) Structural biology of bacterial iron uptake systems. Curr Top Med Chem 1: 7-30

40. Braun V, Braun M (2002) Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. FEBS Lett 529: 78-85

41. Cope LD, Thomas SE, Hrkal Z, Hansen EJ (1998) Binding of heme-hemopexin complexes by soluble HxuA protein allows utilization of this complexed heme by *Haemophilus influenzae* type b. Infect Immun 66: 4511-4516

42. Ghigo JM, Letoffe S, Cecile W (1997) A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. J Bacteriol 179: 3572-3579

43. Letoffe S, Redeker V, Wandersman C (1998) Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares functional and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. Mol Microbiol 28: 1223-1234

44. Letoffe S, Omori K, Wandersman C (2000) Functional characterization of the HasA (PF) hemophore and its truncated and chimeric variants: determination of a region involved in binding to the hemophore receptor. J Bacteriol 182: 4401-4405

45. Rossi MS, Fetherston JD, Letoffe S, Carniel E, Perry RD, Ghigo JM (2001) Identification and characterization of the hemophore-dependent heme acquisition system of *Yersinia pestis*. Infect Immun 69: 6707-6717

46. Arnoux P, Haser R, Izadi N, Lecroisey A, Wandersman C, Czjzek M (1999) The crystal structure of a HasA, a hemophore secreted by *Serratia marcescens*. Nat Struct Biol 6: 516-520

47. Letoffe S, Nato F, Goldberg ME, Wandersman C (1999) Interactions of HasA, a bacterial haemophore, with haemoglobin and its outer membrane receptor HasR. Mol Microbiol 33: 546-555

48. Olczak T, Simpson W, Liu X, Genco CA (2004) Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol Rev 29: 119-144

49. Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis J (2003) Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of Porphyromonas gingivalis: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. Curr Protein Pept Sci 4: 397-407

50. Otto BR, van Dooren SJM, Nuijens JH, Lurink J, Oudega B (1998) Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. J Exp Med 188: 1091-1103

51. Olczak T, Dixon DW, Genco CA (2001) Binding specificity of the *Porphyromonas gingivalis* heme and hemoglobin receptor HmuR, gingipain K, and gingipain R1 for heme, porphyrins, and metalloporphyrins. J Bacteriol 183: 5599-5608

52. Ferguson AD, Hofmann E, Coulton JW, Diederichs K, Welte W (1998) Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. Science 282: 2215-2220

53. Locher KP, Rees B, Koebnik R, Mitschler A, Moulinier L, Rosenbusch JP, Moras D (1998) Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. Cell 95: 771-778

54. Buchanan SK, Smith BS, Venkatramani L, Xia D, Esser L, Palnitkar M, Chakraborty R, van der Helm D, Deisenhofer J (1999) Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from Escherichia coli. Nat Struct Biol 6: 56-63

55. Ferguson AD, Chakraborty R, Smith BS, Esser L, Van Der Helm D, Deisenhofer J (2002) Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. Science 295: 1715-1719

56. Yue WW, Grizot S, Buchanan SK (2003) Structural evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrane transporter FecA. J Mol Biol 332: 353-368

57. Scott DC, Cao Z, Qi Z, Bauler M, Igo JD, Newton SMC, Klebba PE (2001) Exchangeability of N termini in the ligand-gated porins of *Escherichia coli*. J Biol Chem 276: 13025-13033

58. Ferguson AD, Deisenhofer J (2002) TonB-dependent receptors-structural perspectives. Biochim Biophys Acta 1565: 318-332

59. Stojiljkovic I, Hantke K (1992) Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other Ton-B dependent systems in Gram-negative bacteria. EMBO J 11: 4359-4367

60. Bracken CS, Baer MT, Abdur-Rashid A, Helms W, Stojiljkovic I (1999) Use of heme-protein complexes by the *Yersinia enterocolitica* HemR receptor: histidine residues are essential for receptor function. J Bacteriol 181: 6063-6072

61. Simpson W, Olczak T, Genco CA (2000) Characterization and expression of HmuR, a TonB-dependent hemoglobin receptor of *Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol 182: 5737-5748

62. Liu X, Olczak T, Guo HC, Dixon DW, Genco CA (2004) Identification of specific amino acid residues for hemoprotein utilization in the *Porphyromonas gingivalis* heme receptor HmuR. J Bacteriol (praca w druku)

63. Simpson W, Wang CY, Bond V, Potempa J, Mikolajczyk-Pawlinska J, Travis J, Genco CA (1999) Transposition of the endogenous insertion sequence element IS1126 modulates gingipain expression in *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 67: 5012-5020

64. Simpson W, Olczak T, Genco CA (2004) Lysine-specific gingipain K and heme/hemoglobin receptor HmuR are involved in heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. Acta Biochim Pol 51: 253-262

65. Henderson DP, Payne SM (1994) *Vibrio cholerae* iron transport system: roles of heme and siderophore iron transport in virulence and identification of a gene associated with multiple iron transport system. Infect Immun 62: 5120-5125

http://rcin.org.pl

66. Stojiljkovic I, Larson J, Hwa V, Anic S, So M (1996) HmbR outer membrane receptors of pathogenic *Neisseria* spp.: iron-regulated hemoglobin-binding proteins with a high level of primary structure conservation. J Bacteriol 178: 4670-4678

67. Maciver I, Latimer JL, Liem HH, Muller-Eberhard U, Hrkal Z, Hansen EJ (1996) Identification of an outer membrane protein involved in utilization of hemoglobin-haptoglobin complexes by non typeable *Haemophilus influenzae*. Infect Immun 64: 3703-3737

68. Lewis L.A, Gray E, Wang YP, Roe BA, Dyer DW (1997) Molecular characterization of hpuAB, the hemoglobin-haptoglobin utilization operon of *Neisseria meningitidis*. Mol Microbiol 23: 737-749

69. Cornelissen CN, Sparling PF (1996) Binding and surface exposure characteristics of the gonococcal transferrin receptor are dependent on both transferrin-binding proteins. J Bacteriol 178: 1437-1444

70. Quiocho FA, Ledvina PS (1996) Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. Mol Microbiol 20: 17-25

71. Bruns CM, Nowalk AJ, Arvai AS, McTigue MA, Vaughan KG, Mietzner TA, McRee DE (1997) Structure of *Haemophilus influenzae* Fe^{3+}-binding protein reveals convergent evolution within a superfamily. Nat Struct Biol 4: 919-924

72. Clarke TE, Braun V, Winkelmann G, Tari LW., Vogel HJ (2002) X-ray crystalographic structures of the *Escherichia coli* periplasmic protein FhuD bound to hydroxamate-type siderophores and the antibiotic albomycin. J Biol Chem 277: 13966-13972

73. Groeger W, Koster W (1998) Transmembrane topology of the two FhuB domains representing the hydrophobic components of bacterial ABC transporters involved in the uptake of siderophores, haem and vitamin B_{12}. Microbiology 144: 2759-2769

74. Saurin W, Koster W, Dassa E (1994) Bacterial binding protein-dependent permeases: characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membrane proteins. Mol Microbiol 12: 993-1004

75. Crosa JH (1997) Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. Mol Biol Rev 61: 319-336

76. Hantke K (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. Mol Gen Genet 182: 288-292

77. Schaffer S, Hantke K, Braun V (1985) Nucleotide sequence of the iron regulatory gene *fur*. Mol Gen Genet 201: 204-212

78. Wee S, Neilands JB, Bittner ML, Hemming BC, Haymore BL, Seetharam R (1988) Expression, isolation and properties of Fur (ferric uptake regulation) protein of *Escherichia coli* K12. Biol Metals 1: 62-68

79. Pohl E, Haller JC, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Garman E, Vasil ML (2003) Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. Mol Microbiol 47: 903-915

80. Coy M, Neilands JB (1991) Structural dynamics and functional domains of the Fur protein. Biochemistry 30: 8201-8210

81. Hantke K (2001) Iron and metal regulation in bacteria. Curr Opin Microbiol 4: 172-177

82. Escolar L, Perez-Martin J, de Lorenzo V (1999) Opening the iron box: trancriptional metalloregulation by the Fur protein. J Bacteriol 181: 6223-6229

83. Lavrrar JL, Christoffersen CA, McIntosh MA (2002) Fur-DNA interactions at the bidirectional fepDGC-entS promoter region in *Escherichia coli*. J Mol Biol 322: 983-995

84. Braun V, Mahren S, Ogierman M (2003) Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. Curr Opin Microbiol 6: 173-180

85. Harrison SC, Aggarwal AK (1990) DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. Annu Rev Biochem 59: 933-969

86. de Lorenzo V, Wee S, Herrero M, Neilands JB (1987) Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor. J Bacteriol 169: 2624-2630

87. Escolar L, Perez-Martin J, de Lorenzo V (1998) Binding of the Fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. J Mol Biol 283: 537-547

88. White A, Ding X, van der Spek JC, Murphy JR, Ringe D (1998) Structure of the metal-ion-activated diphtheria toxin repressor/tox operator complex. Nature 394: 502-506

89. Baichoo N, Helmann JD (2002) Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. J Bacteriol 184: 5826-5832

90. Visca P, Leoni L, Wilson MJ, Lamont IL (2002) Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. Mol Microbiol 45: 1177-1190

91. Braun V, Gunthner K, Hantke K, Zimmermann L (1983) Intracellular activation of albomycin in *Escherichia coli* and *Salmonalla typhimurium*. J Bacteriol 156: 308-315

92. Stefanska AL, Fulston M, Houge-Frydrych CSV, Jones JJ, Warr SR (2000) A potent seryl tRNA synthetase inhibitor SB-217452 isolated from a *Streptomyces* sp. J Antibiot 53: 1346-1353

93. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. Nucleic Acids Res 28: 235-242

Mechanisms and regulation of iron and heme utilization in Gram-negative bacteria

Katarzyna Siudeja, Teresa Olczak✉

Laboratory of Biochemistry, Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Wroclaw University, 2 Tamka St., 50-137 Wroclaw, Poland
✉e-mail: grabska@bf.uni.wroc.pl

Keywords: Gram-negative bacteria, iron/heme transport, iron/heme binding proteins, outer membrane receptors, ABC transporters, regulation of iron/heme utilization

ABSTRACT

Iron and heme are essential nutrients for most pathogenic microorganisms and play a pivotal role in microbial pathogenesis. To survive within the iron-limited environment of the host, bacteria utilize iron-siderophore complexes, iron-binding proteins (transferrin, lactoferrin), free heme and heme bound to hemoproteins (hemoglobin, haptoglobin, hemopexin). A mechanism of iron and heme transport depends on the structures of Gram-negative bacterial membranes. Siderophores, hemophores and outer membrane receptors take part in iron or heme binding. The transport of these ligands across the outer membrane involves outer membrane receptors. The energy for this transport is delivered from the inner membrane by a TonB-ExbB-ExbD complex. The transport across the cytoplasmic membrane involves periplasmic and inner membrane proteins comprising the ABC systems, which utilize the energy derived from ATP hydrolysis. The major regulatory role in iron homeostasis plays a Fur-Fe^{2+} repressor.

http://rcin.org.pl

Charakterystyka antygenów i czynników wzrostu śródbłonka limfatycznego

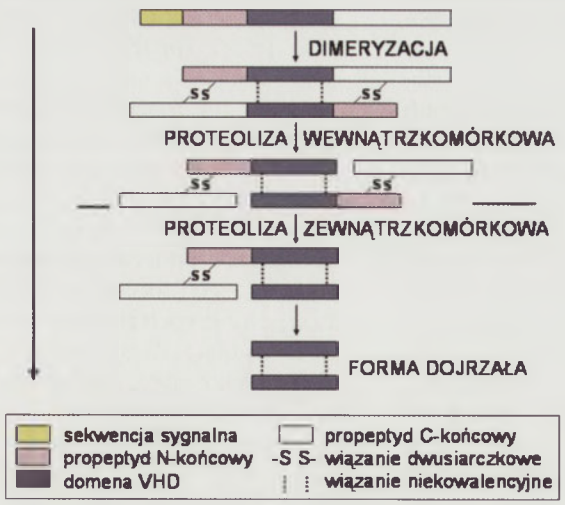
STRESZCZENIE

Odkrycie białek ulegających specyficznej ekspresji w śródbłonku naczyń limfatycznych umożliwiło postęp w zrozumieniu limfangiogenezy - procesu powstawania nowych naczyń limfatycznych. Pierwszym z nich był receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyń VEGFR-3. Ulega on aktywacji i indukuje limfangiogenezę pod wpływem dwóch czynników z rodziny VEGF: VEGF-C i VEGF-D. Oprócz VEGFR-3 opisano inne białka ulegające specyficznej ekspresji w komórkach śródbłonka limfatycznego. Należą do nich: homeotyczny czynnik transkrypcyjny Prox-1, który zaangażowany jest we wzrost i wydłużanie się kapilar limfatycznych, receptor LYVE-1, transportujący hialuronian w poprzek naczyń limfatycznych oraz mukoproteina zwana podoplaniną, której rola nie jest do końca poznana. Scharakteryzowanie tych białek doprowadziło nie tylko do opracowania lepszych metod służących identyfikacji naczyń limfatycznych, ale również do zaproponowania zupełnie nowych podejść terapeutycznych opartych na modyfikacji procesu limfangiogenezy w chorobach, które są związane z nieprawidłową budową bądź funkcjonowaniem naczyń limfatycznych.

WPROWADZENIE

Układ limfatyczny został odkryty w 1627 roku przez Gasparo Aselliusa, mniej więcej w tym samym czasie, kiedy William Harvey opisywał krążenie krwi. Minęło prawie 300 lat zanim Florence Rena Sabin zaproponowała, w jaki sposób może dochodzić do wytworzenia się tego układu we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego. Otóż, według jej teorii, prymitywne pęcherzyki limfatyczne powstają na skutek wypączkowywania komórek śródbłonka żylnego. Z kolei z tych prymitywnych pęcherzyków w wyniku rozgałęziania się (ang. *sprouting*) komórek śródbłonka powstaje obwodowy układ limfatyczny [1] (Rys. 1). W 1908 roku przedstawiono alternatywny model zakładający, że prekursorami pierwotnych pęcherzyków limfatycznych są komórki wywodzące się ze wczesnej mezodermy tzw. limfangioblasty. Do tej pory obecność limfangioblastów wykazano jednak tylko u ptaków, podczas gdy niedawno opublikowane wyniki potwierdzają teorię Sabin [1].

Układ limfatyczny stanowi integralną część układu odpornościowego [2] i główną drogę transportu tłuszczów z jelit [3]. Co więcej, podobnie jak system krwionośny, pełni istotną rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu [2]. Ważnym elementem układu limfatycznego są naczynia limfatyczne. Swoją budową częściowo przypominają naczynia krwionośne [1]. Ich wewnętrzną powierzchnię wyściela śródbłonek, ściany większych naczyń wzmocnione są przez mięśnie gładkie, posiadają też *vasa vasorum*, czyli sieć odżywiających je naczyń krwionośnych. Duże naczynia podobnie jak żyły posiadają zastawki. Ale istnieje również wiele różnic pomiędzy jednym, a drugim typem naczyń [1]. Układ limfatyczny to system niskociśnieniowy i wolnoprzepływowy. Naczynia limfatyczne rzadziej niż krwionośne rozgałęziają się



Rysunek 1. Alternatywne modele tłumaczące, w jaki sposób układ limfatyczny może tworzyć się we wczesnych etapach rozwoju zarodkowego. A.) Model Sabin zakłada, że komórki śródbłonka żylnego są bipotencjalne i dopiero pewna ich pula rozwija się w śródbłonek limfatyczny. B.) Model Huntigtona i McClure'a sugeruje, że śródbłonek limfatyczny powstaje bezpośrednio z mezenchymalnego prekursora (limfangioblastu).

Halina Waś✉

Zakład Biochemii Komórki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

✉Zakład Biochemii Komórki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; e-mail: halacomeon@interia.pl

Artykuł otrzymano 11 października 2004
Artykuł zaakceptowano 13 stycznia 2005

Słowa kluczowe: limfangiogeneza, śródbłonek limfatyczny, VEGFR-3, Prox-1, LYVE-1, podoplanina

Wykaz skrótów: CD – antygen powierzchniowy (ang. *cluster of differentiation*); E12 – dwunasty dzień po zapłodnieniu (ang. *embryonic day*); EGF – nabłonkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor*); HA – hialuronian (ang. *hyaluronan*); HARE – receptor hialuronianu (ang. *HA receptor for endocytosis*); LYVE-1 – receptor hialuronianu zlokalizowany na śródbłonku naczyń limfatycznych (ang. *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*); Prox-1 – antygen śródbłonka limfatycznego (ang. *prospero-like protein, homeobox*); VEGF – czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (ang. *vascular endothelial growth factor*); VEGFR – receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (ang. *vascular endothelial growth factor receptor*); VHD – domena homologiczna w stosunku do czynników z rodziny VEGF (ang. *VEGF homology domain*)

Podziękowanie: Pani doktor Alicji Józkowicz autorka składa serdeczne podziękowania za wszelkie uwagi, które były pomocne przy napisaniu niniejszej pracy.

http://rcin.org.pl

i zespalają, mają mniejszą tendencję do kurczenia się i rzadziej dochodzi do zmian w ich wielkości i kształcie. Z kolei kapilary limfatyczne są większe niż krwionośne, charakteryzują się nieregularnym światłem, brakiem lub nieciągłą błoną podstawną oraz nie posiadają pericytów [2, 3].

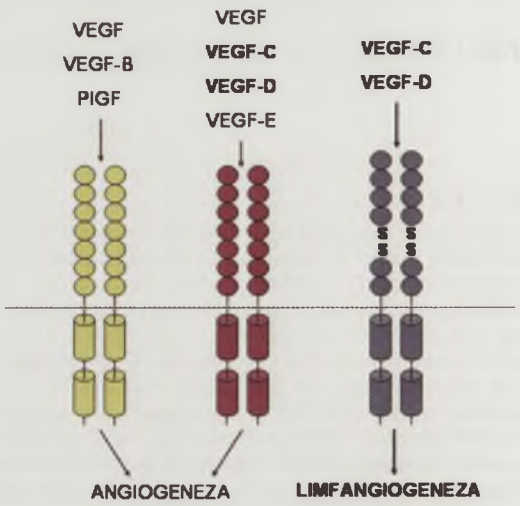
Dysfunkcje naczyń limfatycznych prowadzą do wielu chorób, m.in. do zapalenia i filariozy, z kolei ich przerost towarzyszy np. niektórym nowotworom (naczyniakowi chłonnemu, czy mięsakowi Kaposiego). Nadmierna limfangiogeneza wydaje się również sprzyjać pojawianiu się przerzutów [1]. Szereg badań podjętych w ostatnim dziesięcioleciu dotyczył poznania mechanizmów kontrolujących powstawanie i funkcjonowanie naczyń limfatycznych. Naukowcy zidentyfikowali grupę cząsteczek, która najprawdopodobniej odpowiada za różne aspekty tego procesu. Do najistotniejszych należą: receptor VEGFR-3 i jego ligandy VEGF-C i VEGF-D, homeotyczny czynnik transkrypcyjny Prox-1, receptor hialuronianu LYVE-1 oraz glikoproteina transbłonowa o nazwie podoplanina (Tabela 1). Poznanie budowy i funkcji tych cząsteczek stało się podstawą m.in. dla badań mających na celu zahamowanie limfangiogenezy w niektórych nowotworach.

BUDOWA ORAZ WŁASNOŚCI ANTYGENÓW I CZYNNIKÓW WZROSTU ŚRÓDBŁONKA LIMFATYCZNEGO

VEGFR-3

Pierwszym sklonowanym antygenem śródbłonka limfatycznego był receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyń typu 3 VEGFR-3 (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3*) [1, 4]. Pełni on funkcję receptora czynników wzrostu śródbłonka naczyń VEGF-C i VEGF-D [4, 5] (Rys. 2).

VEGFR-3 należy do III klasy receptorów tyrozynowych [4]. Posiada siedem domen immunoglobulinopodobnych w części zewnątrzkomórkowej, pojedynczą domenę transbłonową i rejon cytoplazmatyczny [4, 6, 7]. W wyniku alternatywnego składania pierwotnego transkryptu (dwa ostatnie eksony 30a i 30b) genu kodującego VEGFR-3 powstają dwie izoformy receptora różniące się o 65 reszt aminokwasowych: długa i krótka [7-10]. Forma długa dominuje w większości tkanek ludzkich i stanowi 100% puli VEGFR-3 u myszy. Podejrzewa się, że izoforma krótka powstała w wyniku integracji retrowirusa z genomem człowieka [1, 7, 8]. VEGFR-3 bierze udział w rozwoju układu sercowo-naczyniowego oraz w fizjologicznej i patologicznej limfangiogenezie i angiogenezie [4, 6, 7, 11, 12]. Ekspresja receptora rozpoczyna się u myszy w śródbłonku żylnym w 8 dniu po zapłodnieniu (E8), a od E12 zostaje ograniczona do śródbłonka limfatycznego [4, 7, 13]. U dorosłych zwierząt obecność receptora stwierdzono również na hematopoetycznej linii monocytarnej [1], śródbłonku żył w kanałach chrząstki, trzonach kręgów, rdzeniu nadnerczy oraz w zatokach śledziony i wątroby, a także na powierzchni mikronaczyń przyległych do nabłonka w oku, śluzowce przewodu pokarmowego i cebulkach włosowych [4, 12, 13]. Wysoka ekspresja VEGFR-3 może świadczyć o jego roli w transporcie substancji przez nieciągły śródbłonek tych organów, jak również w regulacji krwiotworzenia i wędrówki komórek krwi [1, 5, 7]. Dodatkowo, do aktywacji VEGFR-3 dochodzi



Rysunek 2. Oddziaływania pomiędzy członkami rodziny VEGF, a receptorami VEGFR. VEGF (VEGF-A) wiąże się do VEGFR-1 i VEGFR-2. PlGF czyli czynnik wzrostu łożyska (ang. *Placenta Growth Factor*) i VEGF-B są specyficznymi ligandami dla VEGFR-1. VEGF-E, który do tej pory zlokalizowano tylko u wirusa *orf*, aktywuje VEGFR-2. VEGF-C i VEGF-D oddziałują z VEGFR-2 i VEGFR-3. Aktywacja VEGFR-2 prowadzi do angiogenezy, a VEGFR-3 do limfangiogenezy. Zmodyfikowane [1].

w trakcie gojenia się ran [1, 5], a do wzrostu ekspresji w naczyniach krwionośnych w nowotworach naczyniowych [5, 7, 13].

VEGF-C

Ligandem VEGR-3 jest czynnik wzrostu śródbłonka naczyń typu C VEGF-C (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor C*) [14, 15, 16]. Od E12.5 lokalizacja tego czynnika ogranicza się do miejsc, gdzie powstają naczynia limfatyczne czyli do okolic okołonerkowej, pachowej i szyjnej [7, 17]. W organizmach dorosłych VEGF-C ulega silnej ekspresji w sercu, łożysku, mięśniach, jajnikach, jelicie i w niektórych nowotworach [16, 18, 19]. Ekspresja VEGF-C wzrasta w odpowiedzi na płytkopochodny czynnik wzrostu PGDF (ang. *Platelet-Derived Growth Factor*), nabłonkowy czynnik wzrostu EGF (ang. *Epidermal Growth Factor*) [8] oraz interleukinę IL-1β (ang. *Interleukin 1β*) i czynnik martwicy nowotworów TNF (ang. *Tumor Necrosis Factor*) [1, 19, 20]. Natomiast aktywność VEGF-C może być regulowana w wyniku wiązania się czynnika do macierzy zewnątrzkomórkowej. Wskazuje na to obecność tandemowo powtórzonych sekwencji bogatych w cysteinę oraz krótkich odcinków homologicznych do domen EGF-podobnych w propeptydach czynnika, które są usuwane podczas jego syntezy [21]. Pierwszym etapem podczas tego procesu jest powstanie dimeru VEGF-C. Składa się on z dwóch zorientowanych antyrównolegle polipeptydów, połączonych mostkami dwusiarczkowymi i wiązaniami niekowalencyjnymi. W wyniku proteolizy dochodzi do odcięcia propeptydów od C- i N-końca od domeny homologicznej dla czynników z rodziny VEGF prekursora VHD (ang. *VEGF homology domain*) i utworzenia dojrzałej formy VEGF-C o masie 21 kDa [4, 6, 21]. Stopniowa obróbka proteolityczna odpowiada m.in. za specyficzność substratową VEGF-C. Kolejno powstające formy czynnika charakteryzują się rosnącym powinowactwem do VEGFR-3, natomiast VEGFR-2 aktywowany jest tylko przez dojrzałą postać VEGF-C [14, 21] (Rys. 3). Szereg niezależnych badań

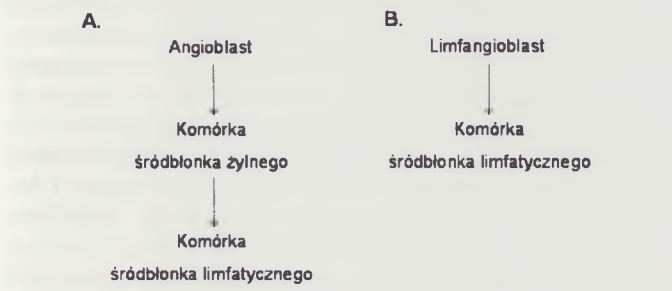
http://rcin.org.pl

potwierdza, że VEGF-C jest wysoce selektywnym czynnikiem limfangiogennym jeśli aktywuje VEGFR-3 [4, 14, 15, 18, 21]. Najistotniejszą rolą czynnika jest wtedy indukcja proliferacji i migracji komórek śródbłonka limfatycznego, która prowadzi do wzrostu naczyń [4, 6, 14, 15]. Dodatkowo VEGF-C zwiększa przeżywalność komórek śródbłonka i stymuluje je do tworzenia tubul *in vitro* [9]. Poza tym, powoduje wzrost przepuszczalności oraz średnicy naczyń limfatycznych [15].

Drugim receptorem uczestniczącym w przekazywaniu sygnału niesionego przez VEGF-C jest VEGFR-2 [4, 21]. Za jego pośrednictwem czynnik stymuluje proliferację i migrację komórek śródbłonka krwionośnego oraz zwiększa przepuszczalność naczyń układu sercowo-naczyniowego [14, 19, 22]. Postuluje się kooperację VEGF-C z VEGF-A w waskulo- i angiogenezie [14, 18, 23]. Poza tym VEGF-C pełni rolę chemoatraktanta dla makrofagów [14].

VEGF-D

Drugim ligandem VEGFR-3 jest czynnik wzrostu śródbłonka naczyń typu D VEGD-F (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor D*) [1, 4, 24, 25]. Ulega on ekspresji głównie w płucach [7, 26] i skórze [7], a także w sercu, mięśniach szkieletowych, nadnerczach, przewodzie pokarmowym [5] oraz niektórych nowotworach [25]. Ekspresja VEGF-D pozostaje pod kontrolą protoonkogenu *c-fos* [5, 20], wzrasta również w wyniku nadekspresji kadheryny 11, a w glejaku wielopostaciowym pod wpływem czynnika transkrypcyjnego AP-1 (ang. *Activator Protein 1*) [20]. Podobnie jak w przypadku VEGF-C proteoliza propeptydów z C- i N--końca jest mechanizmem modulacji struktury i specyficzności receptorowej VEGF-D [24]. Czynnik syntetyzowany jest jako prekursor, który zawiera oprócz domeny VHD propeptydy na N- i C-końcu. Dojrzałą formę VEGF-D stanowi natomiast dimer zbudowany z dwóch domen VHD, które zawierają epitopy wiążące receptory [4, 25]. Tylko taka postać VEGF-D aktywuje VEGFR-2, podczas gdy powinowactwo do VEGFR-3 rośnie w miarę proteolizy czynnika [4, 24, 25]. Funkcje, jakie spełnia VEGF-D są ściśle zdeterminowane przez jego specyficzność receptorową. Oddziałując z VEGFR-2, czynnik indukuje angiogenezę [4, 5, 24, 25, 27], natomiast w wyniku interakcji z VEGFR-3 aktywuje proces limfangiogenezy [4, 7, 24, 25, 28]. VEGF-D przede wszystkim stymuluje proliferację [25], ale także wzrost i migrację komórek śródbłonka limfatycznego oraz przeciwdziała ich apoptozie [4, 24]. Co więcej, reguluje odpowiedź naczyń limfatycznych w procesach zapalnych i podczas regeneracji po urazach, działa na dynamikę płynu w naczyniach, indukuje powstawanie zastawek i przyciąganie komórek mięśni gładkich do tworzących się naczyń limfatycznych [1]. Wydaje się, że VEGF-D podobnie jak VEGF-C działa w sposób parakrynny [1, 25].



Rysunek 3. Schemat proteolitycznej obróbki VEGF-C. Podczas pierwszego etapu proteolizy dochodzi do antyrównoległej dimeryzacji propeptydów wspomaganej przez wiązania niekowalencyjne i dwusiarczkowe. Następnie odcinany jest propeptyd z C-końca bogaty w reszty cysteiny, który prawdopodobnie może wiązać się do macierzy zewnątrzkomórkowej. W kolejnym etapie, odbywającym się już poza komórką, usuwany jest propeptyd N-końcowy i VEGF-C przyjmuje swoją dojrzałą postać – dimeru o masie 21 kDa. Kolejne formy pośrednie charakteryzują się coraz większym powinowactwem do VEGF-3, co symbolizuje strzałka umieszczona po lewej stronie rysunku. Do VEGFR-2 wiąże się wyłącznie dojrzała postać VEGF-C.
Dla przejrzystości schematu nie uwzględniono kilku form pośrednich powstających podczas proteolizy czynnika. Zmodyfikowane [21].

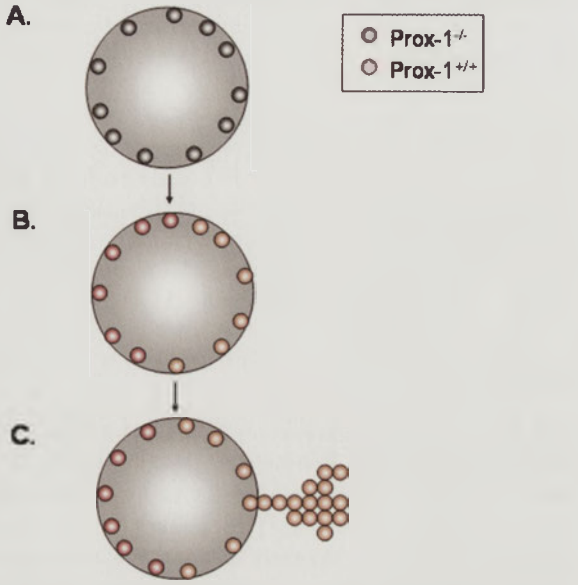
PROX-1

Jednym z innych genów poza VEGFR-3 ulegających specyficznej ekspresji w komórkach śródbłonka limfatycznego jest gen kodujący czynnik transkrypcyjny Prox-1 (ang. *Prospero-like protein, Homeobox*) [29]. Posiada on tzw. homeodomenę czyli zbudowaną z 60 reszt aminokwasowych sekwencję wiążącą DNA, która zawiera strukturę: helisa-skręt-helisa. Po raz pierwszy obecność czynników homeotycznych wykazano u *Drosophila melanogaster*. Wprowadzenie mutacji w genach kodujących te białka prowadziło do zastąpienia jednej części ciała owada przez inną. Dalsze badania pozwoliły stwierdzić, że czynniki te regulują różnicowanie, proliferację i migrację komórek również u kręgowców [30]. Homolog Prox-1 występujący u człowieka zidentyfikowano w 1999 roku [13]. Obecność Prox-1 zaobserwowano w wielu typach komórek wywodzących się ze wszystkich listków zarodkowych, szczególnie jednak silną ekspresją czynnika charakteryzował się śródbłonek limfatyczny [31].

Jak przekonuje Wigle i współpracownicy pierwszym wskaźnikiem rozpoczęcia limfangiogenezy jest specyficzna ekspresja Prox-1 w subpopulacji komórek śródbłonka górnej żyły głównej (9E). W 10 dniu po zapłodnieniu rozpoczyna się wypączkowywanie komórek śródbłonka z wnętrza żył. Od 12 dnia życia ekspresja Prox-1 zostaje ograniczona do komórek śródbłonka limfatycznego, natomiast zupełnie zanika w śródbłonku żylnym. W krótkim czasie dochodzi do ekspresji dalszych antygenów na powierzchni śródbłonka (tj. LYVE-1 i VEGFR-3). Sugeruje to, że komórki śródbłonka żylnego są bipotencjalne i dopiero w wyniku ekspresji czynnika Prox-1 przyjmują fenotyp śródbłonka limfatycznego. Poza tym, że Prox-1 determinuje los pączkujących komórek śródbłonka, wpływa również na kierunkowość ich migracji, różnicowanie i dojrzewanie [13] (Rys. 4). Dodatkowo, Prox-1 zwiększa ilość matrycowego RNA cyklin E1 i E2 oraz aktywuje promotor cykliny E w różnych typach komórek, co oznacza, że działa jako induktor proliferacji [3].

Wyniki uzyskane z badań prowadzonych na myszach z wyłączonym jednym lub dwoma allelami genu Prox-1 stanowią niezaprzeczalny dowód na to, że Prox-1 jest niezbędny w procesie embriogenezy. U myszy pozbawionych czynnika obserwowano zatrzymanie procesu pączkowania komórek śródbłonka limfatycznego i zaburzenia w kierunkowości ich migracji. W efekcie nie dochodziło do powstania unaczynienia limfatycznego i zwierzęta umierały [13]. Z kolei niedobór Prox-1 w układzie heterozygotycznym prowadził do śmierci zaraz po urodzeniu [1]. Jest to o tyle

http://rcin.org.pl



Rysunek 4. Ekspresja Prox-1 we wczesnym rozwoju embrionalnym. A.) Śródbłonek limfatyczny tworzy się na bazie śródbłonka żylnego. B.) W E9.5 dochodzi do specyficznej ekspresji Prox-1 w ograniczonej subpopulacji komórek śródbłonka żyły głównej (Prox-1^{+}/$^{+}$). C.) Od E10.5 rozpoczyna się proces spolaryzowanego pączkowania komórek śródbłonka, dzięki któremu powstają pierwotne pęcherzyki limfatyczne, będące zaczątkiem układu limfatycznego.

warte podkreślenia, że do tej pory zidentyfikowano tylko dwa geny, których brak w układzie heterozygotycznym jest letalny. Produktem drugiego takiego genu jest białko VEGF, będący głównym czynnikiem proangiogennym [32].

LYVE-1

Kolejnym antygenem charakterystycznym dla śródbłonka limfatycznego jest integralny polipeptyd błonowy - LYVE-1 (ang. *Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor* 1) [2, 4, 33, 34]. Zaobserwowano u myszy, że wzór ekspresji LYVE-1 przypomina wzór ekspresji Prox-1. W 10 dniu po zapłodnieniu obecność białka zaobserwowano w pączkujących komórkach śródbłonka żylnego, a już od E12.5 wyłącznie w komórkach śródbłonka limfatycznego. Z kolei u heterozygot jego obecność odnotowano między innymi w makrofagach, a w homozygotach wyłącznie w tych komórkach [13]. LYVE-1 należy, podobnie jak CD44, do nadrodziny białek Link, charakteryzujących się tzw. *modułem Link*, czyli 100-aminokwasową domeną wykazującą powinowactwo do jednostek hialuronianu HA_{6-8} (ang. *Hyaluronan*) [4, 13, 34]. Z kolei HA jest dużym glikozoaminoglikanem występującym w macierzy zewnątrzkomórkowej kręgowców, który bierze udział w migracji i różnicowaniu się komórek oraz utrzymaniu integralności tkanek [33, 34]. W związku z tym stanowi element regulujący chondrogenezę, miogenezę, gojenie się ran, zapalenie i angiogenezę [4, 34]. Powinowactwo LYVE-1 do HA drastycznie spada wraz ze wzrostem biotynylacji liganda. Wydaje się, że receptor może wiązać większe jednostki hialuronianu niż HA_6. LYVE-1 nie wykazuje powinowactwa do innych glikozoaminoglikanów i nie ulega alternatywnemu splicingowi [34]. Główny obrót HA (80-90%) w skórze i jelicie ma miejsce w drenujących węzłach chłonnych. Zarówno w zatokach rdzeniowych węzłów chłonnych, jak i w zatokach wątroby i w śledzionie, gdzie zlokalizowany jest LYVE-1, występuje również inny receptor HA - oligomeryczny HARE (ang. *HA Receptor for Endocytosis*) [35, 36]. Z porównania kinetyki i specyficzności wobec liganda wynika jasno, że to jednak HARE pełni rolę głównego receptora HA zaangażowanego w degradację glikozoaminoglikanu w węzłach chłonnych [35]. LYVE-1 wydaje się natomiast uczestniczyć w transporcie hialuronianu w poprzek naczyń limfatycznych, szczególnie z tkanki śródmiąższowej do limfy [4, 35]. Może też regulować wejście leukocytów i komórek nowotworowych do światła aferentnych kapilar limfatycznych w wyniku pośredniczenia w interakcji HA - CD44 [4, 34, 35].

PODOPLANINA

Obecność podoplaniny po raz pierwszy wykazano w kłębkowatych komórkach nabłonkowych (podocytach) u szczurów. Drugim miejscem silnej ekspresji białka jest śródbłonek naczyń limfatycznych [4, 22, 37]. Podoplanina (43 kDa) należy do grupy mukoprotein [2, 4, 38]. Pojedynczy łańcuch tego polipeptydu (166 aminokwasów) zawiera dużą domenę zewnątrzkomórkową z sześcioma potencjalnymi miejscami O-glikozylacji, krótką domenę transbłonową i równie krótki ogon cytoplazmatyczny, posiadający dwa miejsca fosforylacji [37]. Ekspresja podoplaniny w komórkach śródbłonka naczyń limfatycznych jest regulowana przez Prox-1. Glikoproteina pojawia się u myszy w 11 dniu po zapłodnieniu. Brak obu alleli genu kodującego podoplaninę powoduje śmierć gryzoni podczas porodu wynikającą z niewydolności oddechowej i defektów w obrębie układu limfatycznego [38]. Rola biologiczna podoplaniny w naczyniach limfatycznych nie jest do końca jasna. Wyniki ostatnio przeprowadzonych badań *in vitro* wskazują, że glikoproteina ta może promować adhezję, migrację i tworzenie tubul przez komórki śródbłonka limfatycznego [38]. Dane uzyskane z innych eksperymentów, sugerują, że podoplanina może działać jako koreceptor dla selektyn i w ten sposób pośredniczyć w adhezji komórek zapalnych do śródbłonka limfatycznego [22]. W podocytach odpowiedzialna jest za utrzymanie kształtu komórek [4].

UWAGI KOŃCOWE

Postęp w zrozumieniu anatomii i funkcjonowania układu limfatycznego był niemożliwy przez wiele lat z powodu braku wiedzy, pozwalającej na odróżnienie naczyń krwionośnych i limfatycznych [20]. W przeszłości wizualizacja naczyń limfatycznych ograniczała się do technik obrazowania wykorzystujących barwniki przyżyciowe specyficznie wychwytywane przez naczynia limfatyczne takie jak błękit Evans'a, błękit trypanu, błękit Patent oraz koniugaty o dużej masie i własnościach flurescencyjnych np. rodamina-dekstran. Co ciekawe, do dziś są one rutynowo stosowane w badaniach na zwierzętach. Inna metoda wykorzystywana do niedawna polegała na barwieniu immunohistochemicznym z użyciem zestawu przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi specyficznemu dla komórek śródbłonka PECAM-1/ CD31 (ang. *Platelet/ Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*) oraz cząsteczkom charakterystycznym dla błony podstawnej - lamininom i kolagenowi IV. Naczynia limfatyczne były to struktury CD31^{+}, pozbawione błony podstawnej i czerwonych krwinek [20]. Metoda ta była jednak niepewna, choćby z tego względu, że naczynia krwionośne

http://rcin.org.pl

nowotworów są częściowo lub zupełnie pozbawione błony podstawnej [39]. Odkrycie cząsteczek ulegających specyficznej ekspresji na śródbłonku limfatycznym, do których należą opisane wyżej: Prox-1, podoplanina, LYVE-1, VEGFR-3 oraz czynniki limfangiogenne: VEGF-C i VEGF-D umożliwiło nie tylko identyfikację naczyń limfatycznych w tkankach prawidłowych i patologicznych [5, 12, 13, 20, 40, 41], ale przede wszystkim poznanie molekularnych mechanizmów zaangażowanych w powstawanie oraz funkcjonowanie naczyń limfatycznych. Jak się okazało, nieprawidłowości tych naczyń mogą prowadzić do wielu poważnych chorób, m.in. immunologicznych, zakaźnych i nowotworowych. Dlatego też identyfikacja i charakterystyka czynników, które odgrywają istotną rolę w sterowaniu procesem limfangiogenezy, być może pozwoli na opracowanie skutecznych strategii terapeutycznych do leczenia tych schorzeń. Szczególnie obiecujące wydają się próby zahamowania limfangiogenezy, polegające na blokowaniu drogi sygnałowej VEGF-C, VEGF-D/ VEGFR-3 w chorobach nowotworowych, gdzie proces ten najprawdopodobniej sprzyja wzrostowi i przerzutowaniu nowotworu [42-45]. Należy mieć nadzieję, że już wkrótce inhibitory limfangiogenezy będą z powodzeniem stosowane w terapii przynajmniej części wyżej wymienionych chorób.

PIŚMIENNICTWO

1. Jussila L, Alitalo K (2002) Vascular growth factors and lymphangiogenesis. Physiol Rev 82: 673-700
2. Podgrabinska S, Braun P, Velasco P, Kloos B, Pepper MS, Skobe M (2002) Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 16069-16074
3. Petrova TV, Makinen T, Makela TP, Saarela J, Virtanen I, Ferrell RE, Finegold DN, Kerjaschki D, Yla-Herttuala S, Alitalo K (2002) Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. EMBO J 21: 4593-4599
4. Karkkainen M, Alitalo K (2002) Lympatic endothelial regulation, lymhoedema, and lymph node metastasis. Semin Cell Dev Biol 13: 9-18
5. White JD, Hewett PW, Kosuge D, McCulloch T, Enholm BC, Carmichael J, Murray JC (2002) Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. Cancer Res 62: 1669-1675
6. Zachary I, Gliki G (2001) Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. Cardiovasc Res 49: 568-581
7. Matsumoto T, Claesson-Welsh L (2001) VEGF receptor signal transduction. Sci STKE 2001: RE21
8. Hughes DC (2001) Alternative splicing of the human VEGFGR-3/FLT4 gene as a consequence of an integrated human endogenous retrovirus. J Mol Evol 53(2): 77-79
9. Iljin K, Karkkainen MJ, Lawrence EC, Kimak MA, Uutela M, Taipale J, Pajusola K, Alhonen L, Halmekyto M, Finegold DN, Ferrell RE, Alitalo K (2001) VEGFR3 gene structure, regulatory region, and sequence polymorphisms. FASEB J 15: 1028-1036
10. Borg JP, deLapeyriere O, Noguchi T, Rottapel R, Dubreuil P, Birnbaum D (1995) Biochemical characterization of two isoforms of FLT4, a VEGF receptor-related tyrosine kinase. Oncogene 10: 973-984
11. Jussila L, Valtola R, Partanen TA, Salven P, Heikkila P, Matikainen MT, Renkonen R, Kaipainen A, Detmar M, Tschachler E, Alitalo R, Alitalo K (1998) Lymphatic endothelium and Kaposi's sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3. Cancer Res 58: 1599-1604
12. Witmer AN, Dai J, Weich HA, Vrensen GF, Schlingemann RO (2002) VEGFR-3 in adult angiogenesis. J Histochem Cytochem 50: 767-777
13. Wigle JT, Oliver G (1999) Prox-1 function is required for the development of the murine lymphatic system. Cell 98: 769-778
14. Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, Detmar M (2001) Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. Am J Pathol 159: 893-903
15. Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, Fushida S, Ninomiya I, Bandou E, Taniguchi K, Miwa K, Ohoyama S, Sugiyama K, Sasaki T (1999) Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. Clin Cancer Res 5: 1823-1829
16. Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, Jaaskela-Saari H, Enholm B, Aase K, von Euler G, Eriksson U, Alitalo K, Joensuu H (1998) Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. Am J Pathol 153: 11-16
17. Achen MG, Williams RA, Baldwin ME, Lai P, Roufail S, Alitalo K, Stacker SA (2002) The angiogenic and lymphangiogenic factor vascular endothelial growth factor-D exhibits a paracrine mode of action in cancer. Growth Factors 20: 99-107
18. Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H (2003) Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and VEGF-D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma. Jpn J Clin Oncol 33: 21-27
19. Ristimaki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K (1998) Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. J Biol Chem 273: 8413-8
20. Stacker S, Baldwin M, Achen M (2002) The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. FASEB J 16: 922-934
21. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K (1997) Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. EMBO J 16: 3898-3911
22. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Horvat R, Amann G, Kowalski H, Kerjaschki D (1999) Podoplanin - a specific marker for lymphatic endothelium expressed in angiosarcoma. Verh Dtsch Ges Pathol 83: 270--275
23. Hamada K, Oike Y, Takakura N, Ito Y, Jussila L, Dumont DJ, Alitalo K, Suda T (2000) VEGF-C signaling pathways through VEGFR-2 and VEGFR-3 in vasculoangiogenesis and hematopoiesis. Blood 96: 3793--3800
24. Baldwin ME, Roufail S, Halford MM, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG (2001) Multiple forms of mouse vascular endothelial growth factor-D are generated by RNA splicing and proteolysis. J Biol Chem 276: 44307-44314
25. Baldwin ME, Catimel B, Nice EC, Roufail S, Hall NE, Stenvers KL, Karkkainen MJ, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG (2001) The specificity of receptor binding by vascular endothelial growth factor-D is different in mouse and man. J Biol Chem 276:19166-19171
26. Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y (1997) Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. Genomics 42: 483-488
27. Achen MG, Williams RA, Minekus MP, Thornton GE, Stenvers K, Rogers PA, Lederman F, Roufail S, Stacker SA (2001) Localization of vascular endothelial growth factor-D in malignant melanoma suggests a role in tumour angiogenesis. J Pathol 193: 147-154
28. Jain RK, Padera TP (2002) Prevention and treatment of lymphatic metastasis by antilymphangiogenic therapy. J Natl Cancer Inst 94: 785--787.
29. Oliver G, Harvey N (2002) A stepwise model of the development of lymphatic vasculature. Ann N Y Acad Sci 979: 159-165
30. Gorski DH, Walsh K (2000) The role of homeobox genes in vascular remodeling and angiogenesis. Circ Res 87: 865-872
31. Rodriguez-Niedenfuhr M, Papoutsi M, Christ B, Nicolaides KH, von Kaisenberg CS, Tomarev SI, Wilting J (2001) Prox1 is a marker of ectodermal placodes, endodermal compartments, lymphatic endothelium and lymphangioblasts. Anat Embryol (Berl) 204: 399-406
32. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Ebenhardt C, Declercq C,

http://rcin.org.pl

Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature 380: 435-439

33. Mouta Carreira C, Nasser SM, di Tomaso E, Padera TP, Boucher Y, Tomarev SI, Jain RK (2001) LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. Cancer Res 61: 8079-8084
34. Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson DG (1999) LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. J Cell Biol 144: 789-801
35. Prevo R, Banerji S, Ferguson DJ, Clasper S, Jackson DG (2001) Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. J Biol Chem 276: 19420-19430
36. Weigel JA, Raymond RC, McGary CT, Singh A, Weigel PH (2003) A blocking antibody to the hyaluronan (HA) receptor for endocytosis (HARE) inhibits HA clearance by perfused liver. J Biol Chem 278: 9808-9812
37. Matsui K, Breitender-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Kerjaschki D (1999) Podoplanin, a novel 43-kDa membrane protein, controls the shape of podocytes. Nephrol Dial Transplant 14: 9-11
38. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Dvorak HF, Oliver G, Detmar M (2003) T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. EMBO J 22: 3546-3556
39. Pepper MS (2001) Lympangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? Clin Cancer Res 7: 462-468
40. Cursiefen C, Schlotzer-Schrehardt U, Kuchle M, Sorokin L, Breitenederer-Geleff S, Alitalo K, Jackson D (2002) Lymphatic vessels in vascularized human corneas: immunohistochemical investigation using LYVE-1 and podoplanin. Invest Ophthalmol Vis Sci 43: 2127-2135
41. Wilting J, Papoutsi M, Christ B, Nicolaides KH, von Kaisenberg CS, Borges J, Stark GB, Alitalo K, Tomarev SI, Niemeyer C, Rossler J (2002) The transcription factor Prox1 is a marker for lymphatic endothelial cells in normal and diseased human tissues. FASEB J 16: 1271-1273
42. He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K (2002) Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. J Natl Cancer Inst 94: 819-825
43. Karpanen T, Alitalo K (2001) Lymphatic vessels as targets of tumor therapy? J Exp Med 194: F37-F42
44. Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K (2002) Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. Nat Cell Biol 1: 2-5
45. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS (2001) Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. EMBO J 20: 672-682

Characterization of markers and growth factors for lymphatic endothelium

Halina Waś✉

Department of Cell Biochemistry, Faculty of Biotechnology, Jagiellonian University, 7 Gronostajowa St., 30-387 Krakow, Poland
e-mail: halacomeon@interia.pl

Key words: lymphangiogenesis, lymphatic endothelium, VEGFR-3, Prox-1, LYVE-1, podoplanin

ABSTRACT

A major advance in the field of lymphangiogenesis has come from the discovery of lymphatic endothelium-specific markers. VEGFR-3 was the first molecule found to be expressed in the lymphatic endothelium. Two members of the VEGF family, VEGF-C and VEGF-D are lymphangiogenic when activate VEGFR-3. In addition to VEGFR-3, some other genes have been shown to be mainly expressed in lymphatic endothelial cells. Prox-1 is a homeobox transcription factor gene product involved in the growth and elongation of the lymphatic vessel sprouts during development. Lymphatic vessel endothelial HA receptor-1 (LYVE-1), is a receptor for extracellular matrix/lymphatic fluid glycosaminoglycan in lymphatic endothelial cells. Finally, podoplanin is a glomerular podocyte membrane mucoprotein, which occurs together with VEGFR-3 in the lymphatic endothelium. The discovery of molecules that are specifically expressed by lymphatic endothelium has made possible more accurate and simplified lymphatic vessel identification and targeting the lymphatic vasculature in the treatment of various diseases.

http://rcin.org.pl

Agregacja a toksyczność białek z powtórzeniami polyQ

STRESZCZENIE

Przyczyną przynajmniej dziewięciu chorób neurodegeneracyjnych jest mutacja polegająca na zwiększeniu liczby powtórzeń tripletu CAG w sekwencjach kodujących odpowiednich genów. Choroby te, dotykające głównie osoby w wieku dojrzałym, są dziedziczone przeważnie w sposób autosomalny dominujący. W wyniku wspomnianej mutacji wytwarzane są białka charakteryzujące się występowaniem w ich strukturze pierwszorzędowej następujących po sobie reszt glutaminy. W większości opisanych przypadków liczba powtórzeń 38 jest liczbą graniczną, przy której rozwija się choroba (wiek pacjenta, u którego rozwija się choroba jest odwrotnie proporcjonalny do długości powtórzeń reszt glutaminy). Białka z powtórzeniami reszt glutaminy agregują, a ich wzajemne oddziaływania mogą wynikać z wytwarzania oddziaływań wodorowych, w które zaangażowane są zmienione sekwencje lub mogą być skutkiem aktywności transglutaminazy. Ekspresja zmutowanych genów prowadzi do upośledzenia funkcjonowania komórki poprzez oddziaływanie agregatów białek z wieloma kluczowymi dla metabolizmu komórki cząsteczkami, np. takimi jak czynniki transkrypcyjne, poprzez zahamowanie działania systemu proteasomalnego i indukcję apoptozy. Wykazano, że w hamowaniu neurodegeneracji i agregacji zmutowanych białek ważną rolę odgrywają białka opiekuńcze, co czyni z nich potencjalny obiekt badań terapeutycznych.

WPROWADZENIE

Niewłaściwe fałdowanie białek, czemu często towarzyszy ich agregacja, jest przyczyną szeregu chorób, między innymi amyloidoz systemowych [1] oraz chorób neurodegeneracyjnych, na przykład choroby Alzheimera [2], choroby Parkinsona [3], chorób prionowych i chorób poliglutaminowych (chorób polyQ). Mechanizmy leżące u podstaw niewłaściwego fałdowania i agregacji białek, występujące w niektórych spośród wymienionych chorób, zostały wcześniej omówione w szeregu prac przeglądowych [4-9]. Dotychczas poznano 9 chorób poliglutaminowych, jednak, porównując ze stanem wiedzy sprzed kilku lat, ich liczba stale rośnie. Do nowo poznanych należą: choroba Huntingtona, atrofia gałki białej i jądra zębatego móżdżku (DRPLA), rdzeniowa i opuszkowa atrofia mięśni (SBMA zwana także chorobą Kennedy'ego) oraz ataksje mózgowo-rdzeniowe typu 1-3, 6, 7 oraz 17 (typ 3 zwany także chorobą Machado - Joseph) [10]. Białka ulegające agregacji w każdej z tych chorób są inne i zupełnie ze sobą niepowiązane funkcjonalnie lub strukturalnie. Jedyną cechą wspólną jest występowanie zwiększonej (w porównaniu z białkami „normalnymi") liczby powtórzeń reszt glutaminowych. Zwiększenie zawartości reszt tego aminokwasu w białkach jest wynikiem mutacji polegającej na zwielokrotnieniu ilości tripletów CAG w częściach kodujących genów odpowiednich białek. Powtórzenia reszt glutaminowych w liczbie 35 lub mniej cechują osoby zdrowe, zaś 40 lub więcej nieuchronnie skazują „posiadacza" na rozwój choroby. Wartości pośrednie świadczą o podwyższonym ryzyku zachorowania [11]. Wyjątkiem jest SCA6, gdzie liczba powtórzeń reszt glutaminowych niezbędnych do wywołania choroby jest mniejsza. Pierwsze symptomy chorób poliglutaminowych pojawiają się zwykle w wieku dojrzałym. Istnienie odwrotnie proporcjonalnej zależności pomiędzy liczbą powtórzeń reszt glutaminowych a wiekiem, w którym rozwija się choroba, może jednak w skrajnych wypadkach powodować wystąpienie objawów już u osób młodych. Choroby polyQ są dziedziczone w sposób autosomalny dominujący (za wyjątkiem SBMA, której dziedziczenie jest związane z chromosomem X). Mimo, że wszystkie produkty genów zmutowanych w tych chorobach zawierają zwiększoną liczbę powtórzeń reszt glutaminowych, zwykle w podobnym zakresie długości, w każdej z nich obserwujemy specyficzną neurodegenerację tylko określonych grup neuronów.

AGREGACJA BIAŁEK Z POWTÓRZENIAMI POLYQ

Na poziomie molekularnym jednym z symptomów chorób poliglutaminowych jest powstawanie wewnątrzkomórkowych agregatów, w których skład wchodzą głównie, choć nie tylko, białka syntetyzowane w wyniku ekspresji

Paweł Leźnicki

Katedra Biologii Molekularnej i Komórkowej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku, Gdańsk

Katedra Biologii Molekularnej i Komórkowej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; e-mail: pleznicki@wp.pl

Artykuł otrzymano 18 listopada 2004
Artykuł zaakceptowano 5 stycznia 2005

Słowa kluczowe: agregaty białkowe, białka opiekuńcze, kaspazy, neurodegeneracja, system proteasomalny, transglutaminaza

Wykaz skrótów: AAA+ - rodzina ATP-az (ang. *ATPases associated with various cellular activities*); DRPLA - atrofia gałki białej i jądra zębatego móżdżku (ang. *dentatorubral-pallidoluysian atrophy*); Hsp - białka szoku cieplnego (ang. *heat-shock proteins*); Htt - huntingtyna, białko zmienione w chorobie Huntingtona; httex1 - pierwszy ekson genu kodującego htt; IT15 - gen kodujący htt; NII - agregaty wewnątrzjądrowe w chorobach poliglutaminowych (ang. *neuronal intranuclear inclusions*); PolyQ - zwiększona (w porównaniu z białkiem „normalnym") liczba powtórzeń reszt glutaminowych; nazwa białek, w których takie patologiczne powtórzenia występują oraz określenie grupy chorób spowodowanych mutacją prowadzącą do powstawania tych sekwencji; SBMA - rdzeniowa i opuszkowa atrofia mięśni (ang. *spinal and bulbar muscular atrophy*); SCA - ataksje mózgowo-rdzeniowe (ang. *spinocerebellar ataxias*)

Podziękowanie: Autor pragnie podziękować Panu prof. dr hab. Krzysztofowi Liberkowi za cenne uwagi w trakcie pisania niniejszego artykułu

http://rcin.org.pl

zmutowanych genów. W zależności od jednostki chorobowej, agregaty te zlokalizowane są w cytoplazmie, jądrze lub znajdują się w obydwu tych przedziałach komórkowych (jak ma to miejsce np. w chorobie Huntingtona). Szczególnie uderzająca jest obecność w wielu spośród tych chorób agregatów wewnątrzjądrowych zwanych NII [12].

Zidentyfikowanie w 1993 roku genu *IT15* [13], którego mutacje są odpowiedzialne za rozwój choroby Huntingtona oraz fakt, że choroba Huntingtona jest najpowszechniejszą ze wszystkich chorób polyQ (częstość około 1 na 10 000) [14], jest przyczyną, dla której choroba ta stanowi dogodny model do badania mechanizmów patogeniczności całej grupy schorzeń. Choroba Huntingtona charakteryzuje się upośledzeniem zdolności poznawczych chorych oraz utratą kontroli nad własnym ciałem, co często przejawia się nieskoordynowanymi ruchami. W chorobie Huntingtona dochodzi do utraty neuronów kory i ciała prążkowanego. DiFiglia i wsp. [15] wykazali, że w jądrach komórkowych neuronów ciała prążkowanego osób zmarłych w wyniku choroby Huntingtona, występują agregaty zbudowane z polipeptydów o masie cząsteczkowej około 40 kDa. Jest to zgodne z wcześniejszymi badaniami [16], pokazującymi, że huntingtyna (Htt - produkt genu *IT15*) może być cięta przez proteazę apopainę, w wyniku czego zostaje uwolniony N--końcowy rejon białka zawierający powtórzenia reszt glutaminowych. Obecnie uznaje się, że do jądra komórkowego dostaje się nie cała cząsteczka huntingtyny, lecz tylko jej N--końcowy rejon bogaty w powtórzenia polyQ, który ulega agregacji wewnątrz jądra [17]. Dowodów na to, że N-końcowy rejon białka Htt jest zdolny do agregacji dostarczyły wyniki licznych badań *in vivo* i *in vitro*. Davies i wsp. [18] uzyskali transgeniczne myszy z wprowadzonym pierwszym eksonem genu *IT15* (*httex1*; w tej części genu zlokalizowane są powtórzenia tripletu CAG). W wyniku ekspresji *httex1* zawierającego od 115 do 156 jednostek CAG dochodziło do wystąpienia objawów neurodegeneracji u badanych myszy oraz do powstawania NII o strukturze włóknistej w jądrach neuronów korowych oraz prążkowia. Stosując specyficzne przeciwciała zidentyfikowano ubikwitynę jako jeden ze składników NII. Późniejsze badania DiFiglia i wsp. [15] pozwoliły stwierdzić, że opisane wyżej cechy są charakterystyczne także dla agregatów występujących u chorych na chorobę Huntingtona.

Badania prowadzone z zastosowaniem hodowli tkankowych pozwoliły poznać kolejne składniki agregatów wewnątrzjądrowych. Stwierdzono, że następuje w nich uwięzienie także podjednostek systemu proteasomalnego: 20S i 19S [19], oraz białek szoku cieplnego [20] i białka CBP [21,22]. W swoich badaniach *in vitro* Scherzinger i wsp. [23] wykazali, że agregacja białka powstającego w wyniku ekspresji *httex1* jest zależna od ilości powtórzeń reszt glutaminowych znajdujących się w cząsteczce. Do agregacji dochodzi, gdy liczba tych reszt przekracza 38, co jest zgodne z danymi uzyskanymi w badaniach chorych na chorobę Huntingtona. Dodatkowo stwierdzono, że stopień agregacji jest zależny również od stężenia zmutowanej formy białka oraz od czasu [24]. Powyższe zależności sugerują istnienie mechanizmu nukleacji, zjawiska polegającego na formowaniu zalążka agregacji (jądra nukleacji), a następnie na szybkim włączaniu kolejnych składników do jądra nukleacji. W procesie tym niezbędne jest osiągnięcie przez agregujące białko określonego stężenia progowego, po którym następuje faza zastoju, w trakcie której dochodzi do formowania jądra nukleacji. Uważa się, że na podobnej zasadzie powstają amyloidy, agregaty zewnątrzkomórkowe tworzące się w chorobie Alzheimera. Za istnieniem zjawiska nukleacji w chorobach polyQ przemawia również fakt, że obserwowana faza zastoju może zostać znacznie skrócona czy nawet pominięta poprzez wzrost liczby powtórzeń reszt glutaminowych, zwiększenie stężenia zmutowanej formy białka, jak również poprzez dodanie już uformowanego agregatu, który zaczyna pełnić rolę jądra nukleacji [24]. Przedstawiony proces może być przyczyną późnego wystąpienia objawów chorób polyQ ze względu na konieczność powstania jądra nukleacji, co w komórkach może trwać dłużej niż w warunkach laboratoryjnych [25, 26].

Stosując barwnik - czerwień Kongo, specyficznie wiążący się do obszarów białek wykazujących konformację β, Scherzinger i wsp. [23, 24] zaobserwowali, że uzyskane przez nich wysokocząsteczkowe agregaty posiadają taką właśnie strukturę. Stanowi to potwierdzenie, zaproponowanego w 1994 roku przez Perutz'a i wsp. [27], mechanizmu agregacji cząsteczek zawierających wielokrotne powtórzenia reszt glutaminowych, zgodnie z którym sekwencje te działają jak swoiste „suwaki polarne", analogicznie do suwaków leucynowych. „Suwaki" takie miałyby tworzyć stabilne struktury β poprzez wytwarzanie wiązań wodorowych między amidami łańcucha głównego i łańcuchów bocznych. Następnie zaproponowano [28], że cząsteczki zawierające ponad 41 powtórzeń reszt glutaminowych łącząc się ze sobą mogą tworzyć stabilne struktury ze względu na wzrost entropii spowodowany uwalnianiem cząsteczek wody w trakcie agregacji takich cząsteczek. Obecnie przyjmowany mechanizm wytwarzania wiązań wodorowych zakłada istnienie równoległych konformacji β układających się cylindrycznie [29]. Dwadzieścia reszt glutaminowych miałoby tworzyć jeden skręt w obrębie cząsteczki białkowej. Ze względu na niewielką stabilność takiej struktury przypuszcza się, że większej trwałość nabiera ona, gdy w cząsteczce znajdzie się około 40 reszt glutaminowych, które tworzą dwa wzajemnie stabilizujące się skręty, do których następnie mogą się przyłączać także inne peptydy.

Obecność konformacji β w obserwowanych agregatach przypomina właściwości amyloidów. Wydaje się jednak, że w przypadku formowania tych ostatnich przeważają oddziaływania hydrofobowe a nie wodorowe. Tanaka i wsp. [30] wysunęli teorię, która jeszcze bardziej zbliża proces agregacji białek polyQ do powstawania amyloidów. Badacze ci wprowadzili do genu mioglobiny sekwencję kodującą 50 reszt glutaminowych, a następnie wykazali, że w początkowym etapie agregacji zmienionego białka dochodzi do utworzenia pseudoagregatów zbudowanych z 80 - 90 monomerów. Na tej podstawie doszli do wniosku, że wprowadzenie dużej ilości powtarzających się reszt glutaminy prowadzi do destabilizacji właściwej struktury białka. Miałoby to skutkować odsłonięciem powierzchni hydrofobowych, których łączenie się prowadziłoby, podobnie jak w przypadku amyloidów, do powstawania agregatów bogatych w struktury β. Poparciem dla tej teorii będzie identyfikacja pośredników agregacji [26], którym przypisuje się

http://rcin.org.pl

kluczową rolę w patogenezie także chorób amyloidowych. Dotychczas zebrane dane zdają się jednak przeczyć istnieniu takich pośredników [25]. Wskazują one raczej na to, że w mechanizmie agregacji białek z powtórzeniami polyQ jądrem nukleacji jest monomer białka o nieprawidłowej konformacji. Pojawiły się także opinie sugerujące udział jeszcze innych czynników w agregacji białek polyQ. Według jednej z propozycji, w komórce dochodzi do łączenia się cząsteczek dzięki reakcji katalizowanej przez transglutaminazę [31, 32], enzym, którego aktywność zależy od Ca^{2+}. Obserwacja, że oligomery, a także częściowo polimery, utworzone przez białka z powtórzeniami polyQ, są odporne na działanie stężonego kwasu formylowego, doprowadziła niektórych badaczy do wniosku, że w tworzeniu oddziaływań pomiędzy monomerami mogą uczestniczyć wiązania kowalencyjne. Reszty glutaminowe miałyby działać jako źródło glutaminy dla transglutaminazy, zaś reszty lizynowe jako źródło aminy. Za takim przypuszczeniem miałby przemawiać fakt, że aktywność transglutaminazy znacznie wzrasta wraz ze wzrostem liczby powtórzeń reszt glutaminy substratu. Stwierdzono także zwiększoną aktywność enzymu w rejonach mózgu uszkodzonych przez chorobę Huntingtona [33]. Według najnowszych badań [34] transglutaminaza, poprzez sieciowanie białek z powtórzeniami polyQ, powoduje powstawanie wysokocząsteczkowych kompleksów, które, w przeciwieństwie do agregatów uformowanych na skutek wytwarzania wiązań wodorowych, są rozpuszczalne. Stwierdzono, że zahamowanie aktywności transglutaminazy w obecności amin pierwszorzędowych (na przykład putrescyny), prowadzi do zablokowania powstawania rozpuszczalnych kompleksów, nie wpływa natomiast na tworzenie się nierozpuszczalnych agregatów.

Bardzo prawdopodobne, że w komórce występują jednocześnie oba konkurujące ze sobą mechanizmy: formowanie nierozpuszczalnych agregatów jako wynik oddziaływań wodorowych, w których uczestniczą sekwencje wielokrotnie powtarzających się reszt glutaminowych oraz tworzenie rozpuszczalnych kompleksów, których powstawanie jest katalizowane przez transglutaminazę w sposób zależny od jonów wapnia. Mechanizmy te nie wykluczają się, a możliwe, że początkowe wytwarzanie wiązań wodorowych umożliwia zbliżenie monomerów białek polyQ na odległość odpowiednią dla działania transglutaminazy [34].

PRZYCZYNY DEGENERACJI KOMÓREK W CHOROBACH POLYQ

Powszechnie uznaje się, że cząsteczki, w których dochodzi do zwiększenia liczby powtórzeń reszt glutaminowych, nabywają nowych cech, które okazują się być toksyczne dla komórek i prowadzą do ich śmierci. Mechanizm tej toksyczności nie jest jednak w pełni poznany, a opinie badaczy są często sprzeczne.

ROZREGULOWANIE TRANSKRYPCJI

Perutz i wsp. [27] wysuwając hipotezę, że agregaty białek polyQ powstają na skutek wytwarzania wiązań wodorowych pomiędzy tymi białkami uznali, że powtórzenia reszt glutaminowych odgrywają również rolę w oddziaływaniach pomiędzy czynnikami transkrypcyjnymi i działają jak swoiste suwaki polarne, przez analogię do roli odgrywanej przez suwaki leucynowe. Wspomniani badacze zauważyli, że w wielu spośród znanych czynników transkrypcyjnych, na przykład w sekwencji czynnika transkrypcyjnego człowieka TFIID, występują zachowane w ewolucji sekwencje zawierające wielokrotne powtórzenia polyQ [35]. Na tej postawie zaproponowali, że w wyniku zwiększenia liczby powtórzeń glutaminowych w białkach powiązanych z chorobami polyQ, białka te uzyskują zdolność do oddziaływania z TFIID i z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, i poprzez wbudowanie tych czynników do agregatów, powodują dysregulację transkrypcji, co prowadzi do śmierci komórek. Dalsze badania potwierdziły obecność czynnika transkrypcyjnego TBP (ang. *TATA-binding protein*) w agregatach utworzonych przez białka polyQ [36, 37]. Stwierdzono także, że do agregatów tych białek włączane są również inne ważne białka zaangażowane w proces transkrypcji, takie jak p53 [21] i CBP [21, 22, 37]. Udowodniono również [37], że włączanie czynników transkrypcyjnych do agregatów białek polyQ jest zależne od obecności powtórzeń glutaminowych w czynnikach transkrypcyjnych. Przykładowo, białko TBP z delecją odcinka, w którym zlokalizowane są powtórzenia reszt glutaminowych, nie agreguje z produktem zmutowanego eksonu 1 genu *IT15*. Ponadto wykazano, że czynniki transkrypcyjne, posiadające powtórzenia reszt glutaminowych, są włączane do agregatów białek polyQ tylko wtedy, gdy następuje jednoczesna ekspresja tych białek i czynników transkrypcyjnych. Fakt, że te ostatnie nie są włączane do już uformowanych agregatów świadczy o tym, że oddziaływanie między czynnikami transkrypcyjnymi a zmienionymi białkami polyQ musi zachodzić na wczesnych etapach agregacji, w obecności monomerów lub niewielkich oligomerów białek polyQ. Oddziaływanie to jest skutkiem zmiany konformacyjnej zmutowanego białka polyQ oraz prowadzi do zmniejszonej stabilności czynników transkrypcyjnych, przez co może powodować między innymi ich łatwiejszą degradację przez proteazy.

Dowiedziono także, że zaburzenia w transkrypcji zachodzą jeszcze przed pojawieniem się jakichkolwiek zmian fenotypowych oraz, że skutki ekspresji w drożdżach białek z powtórzeniami polyQ, posiadającymi sygnał kierujący je do jądra (NLS), są bardzo podobne do defektów obserwowanych w szczepach drożdży mających mutacje w kompleksie acetylotransferazy histonów [38]. U chorych na chorobę Huntingtona stwierdzono zmniejszoną liczbę receptorów neuroprzekaźników, szczególnie dla dopaminy i kwasu glutaminowego [39]. Badania na transgenicznych myszach wykazały zmniejszoną zawartość mRNA tych receptorów, co oznacza, że ekspresja białek z powtórzeniami polyQ zaburza produkcję niektórych, ale nie wszystkich, receptorów neuroprzekaźników na poziomie transkrypcji [39].

Pojawiły się także opinie [40], że do procesu rozregulowania transkrypcji może dochodzić na poziomie RNA a nie białka. Wyniki badań Napierały i Krzyżosiaka [41] dowodzą, że RNA posiadające wielokrotnie powtarzające się sekwencje tripletu CUG mogą tworzyć stabilne struktury „spinki do włosów", przy czym forma taka jest tym trwalsza im większa jest liczba powtarzających się jednostek tripletu. Jeśli tak samo byłoby w przypadku mRNA powstającego w wyniku transkrypcji genów ze zlokalizowanymi w ekso-

http://rcin.org.pl

nach powtórzeniami CAG, to tworzące się struktury „spinki do włosów" mogłyby zaburzać transkrypcję ze względu na swoje duże powinowactwo do białek uczestniczących w tym procesie.

Potwierdzeniem słuszności teorii o dysregulacji na poziomie transkrypcji jako głównej przyczyny rozwoju chorób polyQ są doniesienia o znaczeniu w tym procesie lokalizacji białek polyQ w jądrze komórkowym. Saudou i wsp. [42] udowodnili, że zablokowanie lokalizacji wewnątrzjądrowej zmutowanych form białka Htt zapobiega powstawaniu NII oraz eliminuje toksyczne efekty związane z ekspresją genu ze zwiększoną ilością powtórzeń CAG. Może to wynikać z uniemożliwienia oddziaływań pomiędzy zmutowaną formą białka a czynnikami transkrypcyjnymi w jądrze. Zaskakująco, wspomniani autorzy zaobserwowali, że zablokowanie powstawania agregatów nie tylko nie zmniejsza toksyczności produktów genów z powtórzeniami CAG, ale wręcz odwrotnie, wzmagało ją, prawdopodobnie na skutek wzrostu liczby monomerów białek polyQ. Mogłoby to przejawiać się we wzroście oddziaływań tych białek z czynnikami transkrypcyjnymi. Czy zatem powstawanie agregatów białek polyQ może być korzystne dla komórki i być przejawem swoistej reakcji obronnej? Odpowiedź na to pytanie jest nadal niejednoznaczna [43-45].

ROLA KASPAZ I INDUKCJA APOPTOZY

W komórkach, w których ekspresji ulegały geny zawierające zwiększoną ilością tripletu CAG wykryto liczne zmiany apoptotyczne [42, 46], takie jak kondensacja chromatyny, fragmentacja DNA i uwalnianie cytochromu c z mitochondriów. Może to wskazywać na powiązanie toksyczności białek polyQ z indukcją apoptozy i neurodegeneracją. Wydaje się, że kluczową rolę mogą tu odgrywać kaspazy. Do takiego wniosku prowadzą wyniki badań wskazujące, że zastosowanie inhibitorów kaspaz wpływa korzystnie na przeżywalność komórek, w których zachodzi ekspresja genów z wydłużonymi sekwencjami CAG [47, 48]. Dodatkowym potwierdzeniem tej tezy jest wykazanie, że produkty genów zmutowanych w chorobach polyQ mogą być substratami kaspaz. Świadczy o tym zarówno analiza sekwencji białek polyQ, która doprowadziła do identyfikacji potencjalnych miejsc cięcia przez kaspazy i ich związku z patogenezą takich chorób jak DRPLA, SBMA, choroba Huntingtona czy SCA3 [49], jak również obserwacja, że białka polyQ ulegają degradacji w obecności ekstraktu komórek apoptotycznych oraz oczyszczonych kaspaz [48, 49]. Obserwacja ta ma szczególne znaczenie, gdyż możliwe jest, że to właśnie wytwarzanie toksycznych, N-końcowych fragmentów białek takich jak Htt, może być kluczowym etapem w przemieszczaniu się powstających peptydów do jądra komórkowego i w ich agregacji [17, 42]. Co więcej, wykazano, że ekspresja białek zawierających wydłużone powtórzenia reszt glutaminowych prowadzi do zwiększenia aktywności niektórych rodzin kaspaz [46, 47]. Próby określenia, która dokładnie rodzina kaspaz jest odpowiedzialna za obserwowane zmiany nie dały jednoznacznych rezultatów. Rozważa się dwóch kandydatów.

Pierwszy z nich to kaspaza-3 odgrywająca kluczową rolę w indukcji apoptozy. Zaobserwowano, że białka polyQ mogą być degradowane właśnie przez kaspazę-3 [48, 49]. Ekspresja genu *IT15* ze zwiększoną liczbą powtórzeń CAG oraz zmienionymi miejscami cięcia rozpoznawanymi przez kaspazę-3 i kaspazę-6 prowadzi do zmniejszenia indukcji kaspaz i spadku stopnia agregacji białek polyQ. W procesie tym może również uczestniczyć kaspaza-1 [46]. Li i wsp. zaproponowali, że dostające się do jądra N-końcowe fragmenty białka Htt najpierw indukują kaspazę-1, która następnie aktywuje kaspazę-3, co bezpośrednio prowadzi do apoptozy.

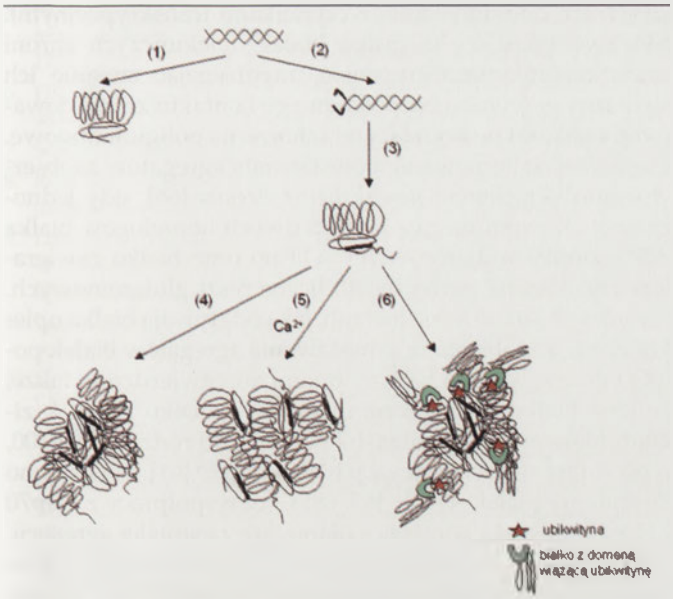
Drugim kandydatem odgrywającym rolę w rozwoju chorób polyQ jest kaspaza-8 [47]. Wykazano na przykład, że fibroblasty myszy w hodowli, pozbawione genu kodującego kaspazę-8, stają się niewrażliwe na ekspresję genu zawierającego sekwencję kodującą 79 reszt glutaminowych. Wykazano także, że kaspaza-8 jest włączana do agregatów polyQ, co może powodować jej oligomeryzację, która jest wystarczająca do aktywacji tego enzymu.

PROTEASOM

Agregaty obserwowane w chorobach poliglutaminowych bardzo często ulegają ubikwitylacji [15, 18]. Ubikwityna jest niewielkim białkiem przyłączanym do reszt lizyny, której zasadniczą funkcją jest „znakowanie" łańcuchów polipeptydowych przeznaczonych do degradacji w proteasomie. Obecność tego białka w agregatach polyQ przypuszczalnie wskazuje na próby degradacji nieprawidłowo sfałdowanych białek zawierających powtórzenia reszt glutaminowych. Zaproponowano jednak także inną funkcję ubikwityny w formowaniu agregatów. Donaldson i wsp. [50] wskazali na fakt, że wiele z białek ulegających agregacji z białkami polyQ posiada domeny wiążące ubikwitynę. Przykładem może być ataksyna-3, której mutacje prowadzą do choroby SCA3, ale której forma niezmutowana występuje także w agregatach powstających w takich chorobach jak SCA1, SCA2 i DRPLA. Niekowalencyjne oddziaływania pomiędzy domenami wiążącymi ubikwitynę obecnymi w różnych białkach a samą ubikwityną miałyby prowadzić do włączania kluczowych białek komórkowych do agregatów polyQ i w ten sposób przyczyniać się do patogenezy (Rys. 1). Przypuszczenie to potwierdzają badania Doi i wsp. [51], którzy wykryli w agregatach N-końcowej części białka Htt ze zwiększoną liczbą powtórzeń reszt glutaminowych, trzy inne białka posiadające domeny oddziałujące z ubikwityną: ubikwilinę 1, ubikwilinę 2 i tolipinę. Włączanie tych białek do agregatów polyQ powoduje zaburzenie ich funkcji, co z kolei może powodować zmianę funkcjonowania systemu proteasomalnego (regulowanego przez ubikwiliny) oraz prowadzić do zaburzeń przyłączania poliubikwitylowanych cząsteczek do klatryny (za co odpowiedzialna jest tolipina), a w konsekwencji hamować transport takich cząsteczek.

Na dużą rolę systemu proteasomalnego w chorobach polyQ mogą wskazywać badania na drożdżach [52], które pokazują, że do ważnych regulatorów agregacji białka htt należą geny związane z katabolizmem białek zależnym od ubikwityny. O tym, że proteasomy działają hamująco na formowanie agregatów może świadczyć także fakt, że zahamowanie tego systemu prowadzi do znaczącego wzrostu

http://rcin.org.pl



Rysunek. 1. Możliwe mechanizmy prowadzące do powstawania agregatów białek polyQ. U zdrowych osobników, w wyniku ekspresji odpowiedniego genu, powstaje funkcjonalne białko (1). Na skutek mutacji (2), prowadzącej do zwiększenia ilości powtórzeń CAG w części kodującej genu, wytwarzane jest białko (3) zawierające zwielokrotnioną liczbę reszt glutaminowych. Białko takie może tworzyć nierozpuszczalne agregaty (4) na skutek wystąpienia oddziaływań wodorowych między amidami łańcuchów głównych i łańcuchów bocznych lub poprzez łączenie się powierzchni hydrofobowych odsłoniętych w wyniku zaburzenia struktury białka. Jako alternatywę do opisanego modelu proponuje się, że niewłaściwie sfałdowane białka mogą stanowić substrat dla transglutaminazy, enzymu zależnego od Ca^{2+}, co prowadzi do wytwarzania rozpuszczalnych kompleksów (5). W wyniku ubikwitylacji, do agregatów białek polyQ mogą być także dołączane białka posiadające domeny wiążące ubikwitynę (6), co powoduje dalszy wzrost wielkości agregatów.

agregacji [19, 53]. Według Waelter i wsp. [53], patogeniczność białek polyQ może wynikać z ich zdolności do agregacji i odporności na działanie systemu proteasomalnego. Włączanie do powstających agregatów składników tego układu (takich jak 20S, 19S czy 11S) prowadzi do upośledzenia funkcji proteasomów i akumulacji różnych nieprawidłowo sfałdowanych białek, co zostało częściowo potwierdzone przez Venkatraman i wsp. [54], którzy to badacze wykazali, że białka polyQ są istotnie odporne na działanie systemu proteasomalnego. Według wspomnianych badaczy proteasomy uwalniają fragmenty cząsteczek białkowych z sekwencjami polyQ, które z kolei mają stanowić substrat dla innych, dotychczas niezidentyfikowanych, proteaz. Zaburzenia w uwalnianiu powstających peptydów prowadzą do upośledzenia działania proteasomów. Wcześniejszy rozwój choroby tłumaczą zwiększonym prawdopodobieństwem wystąpienia takich zaburzeń w miarę wzrostu długości powtórzeń polyQ.

UTRATA FUNKCJI PRZEZ BIAŁKA WSKUTEK EKSPRESJI POWTÓRZEŃ CAG

Chociaż powszechnie przyjmuje się, że neurodegeneracja towarzysząca rozwojowi chorób polyQ zachodzi na skutek nabywania przez białka polyQ nowych, toksycznych właściwości, ostatnio pojawiły się doniesienia o roli jaką w patogenezie może odgrywać utrata funkcji przez te białka. Zuccato i wsp. [55] donoszą, że niezmutowane białko Htt zwiększa produkcję wytwarzanego w neuronach korowych czynnika neurotroficznego BDNF (ang. *brain-derived neurotrophic factor)*, który jest odpowiedzialny za utrzymywanie przy życiu neuronów ciała prążkowanego. Ekspresja zmutowanej formy białka Htt powoduje natomiast zmniejszenie tej syntezy. W takiej sytuacji jedną z przyczyn neurodegeneracji w chorobie Huntingtona, w której dochodzi do upośledzenia m. in. komórek nerwowych prążkowia, może być zmniejszenie ilości BDNF dostarczanego do tego regionu mózgu. Ze względu na fakt, że niezmutowane białko Htt jest włączana do agregatów utworzonych przez formę zmutowaną, może następować dalsza utrata tego ważnego czynnika neurotroficznego także u osobników heterozygotycznych i degeneracja kolejnych neuronów [56]. Najnowsze badania [57] dowodzą, że utrata funkcji przez białko wskutek zwiększenia ilości powtórzeń reszt glutaminowych jest przyczyną ataksji mózgowo-rdzeniowej typu 6. W schorzeniu tym, mutacja pojawia się w genie kodującym podjednostkę $\alpha_1$2.1 kanału wapniowego Ca_v2.1 człowieka. Lokalizacja sekwencji polyQ w C-końcowym rejonie białka prowadzi do zaburzenia jego struktury i do upośledzenia funkcji kanału wapniowego. Skutkuje to zmniejszeniem napływu jonów wapnia do komórek nerwowych, a także ogranicza zbawienną rolę kanału wapniowego w zapobieganiu apoptozie. Przekazywanie choroby w sposób autosomalny dominujący może być wyjaśnione niezwykłą wrażliwością komórek Purkinjego na wahania liczby funkcjonalnych kanałów wapniowych (nawet jej niewielkie zmniejszenie może prowadzić do wystąpienia choroby). Taki mechanizm patogenezy zdają się potwierdzać badania innych jednostek chorobowych wynikające z mutacji w genach kodujących podjednostki kanału wapniowego Ca_v2.1, które także dziedziczone są autosomalnie dominująco. Jednak fakt, że w omówionym schorzeniu liczba reszt glutaminowych niezbędnych do wywołania choroby jest mniejsza niż w pozostałych chorobach polyQ może świadczyć o tym, że mamy tu do czynienia z innym mechanizmem patogeniczności niż w przypadku pozostałych schorzeń z omawianej grupy.

SPECYFICZNOŚĆ DEGENERACJI W CHOROBACH POLIGLUTAMINOWYCH

Mimo, że w chorobach polyQ występuje ta sama mutacja, polegająca na zwiększeniu liczby powtórzeń CAG w odpowiednich genach, obserwowane symptomy chorobowe różnią się znacznie między sobą. Ekspresja zmutowanych genów prowadzi do degeneracji tylko określonych grup neuronów, innych w każdej z badanych pod tym względem chorób. Dlaczego umierają tylko niektóre typy neuronów, mimo że zmutowane geny ulegają ekspresji w całym układzie nerwowym? Odpowiedź na to pytanie nie jest łatwa. Być może odpowiada za to specyfika degradacji zmutowanych form białek, co prowadzi do powstania N-końcowych fragmentów, które mogą być transportowane do jądra komórkowego i tam ulegają agregacji [17]. Mogłoby to wynikać z obecności specyficznych proteaz w określonych grupach neuronów lub zmian w procesie transportu białek do jądra zależnych od typu komórki [23]. Rozważany jest także mechanizm, w którym przyczyną omawianej swoistości byłoby wybiórcze wiązanie się białek polyQ z czynnikami transkrypcyjnymi [22]. Stwierdzono ponadto, że znaczenie w degeneracji może mieć struktura białka w bezpośrednim sąsiedztwie wydłużonych powtórzeń reszt glutaminowych [58]. Sąsiedztwo to może być ważne ze względu na potencjalny wpływ na stabilizację białka zawierającego powtó-

http://rcin.org.pl

rzenia reszt glutaminowych [37]. Dzieje się tak np. w przypadku białek fuzyjnych polyQ z transferazą glutationową. Białka te nie osiągają konformacji potrzebnej do oddziaływania z czynnikami transkrypcyjnymi. Warto zaznaczyć, że z wiekiem zwiększa się prawdopodobieństwo osiągnięcia nieprawidłowej struktury, przy czym jest ono tym większe im dłuższe są powtórzenia polyQ. Ponadto, odcięcie rejonu białka z powtórzeniami polyQ przez proteazy, stymuluje przyjmowanie przez polipeptyd zmienionej konformacji.

ROLA BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH W REGULACJI TOKSYCZNOŚCI BIAŁEK POLYQ

Białka opiekuńcze stanowią kolejną grupę cząsteczek włączanych do agregatów utworzonych z białek polyQ [20]. Białka opiekuńcze uczestniczą w uzyskiwaniu przez inne białka właściwej konformacji, zapobiegają agregacji nieprawidłowo sfałdowanych białek oraz biorą udział w ich degradacji (funkcje różnych grup białek opiekuńczych zostały omówione w artykule przeglądowym [59]). W agregatach złożonych z białek polyQ zidentyfikowano członków dwóch rodzin białek opiekuńczych Hsp70 i Hsp40 [20]. Białka te w komórce współpracują ze sobą. Hsp40 wiąże substrat, a następnie przekazuje go Hsp70, jak również stymuluje aktywność ATPazową drugiego składnika, co prowadzi do związania nieprawidłowo sfałdowanego peptydu przez białko Hsp70 [60]. O roli białek opiekuńczych może świadczyć także fakt, że ulegają one indukcji w trakcie ekspresji genów kodujących białka z powtórzeniami polyQ [20, 38]. Stwierdzono, że nadekspresja homologów Hsp70 oraz Hsp40 prowadzi do znacznego zmniejszenia agregacji białek polyQ [20, 61] oraz określono, że hamuje ona toksyczność indukowaną przez te białka [20, 62]. Interesującym jest fakt, że w niektórych doświadczeniach nie wykazano zależności między tłumieniem agregacji a nadekspresją omówionych grup białek opiekuńczych [62, 63]. Wyjaśnieniem mogą być wyniki badań Muchowskiego i wsp. [63], którzy udowodnili, że Hsp70 i Hsp40 nie tyle zapobiegają powstawaniu agregatów, ile raczej zmieniają ich strukturę z nierozpuszczalnej w detergentach na rozpuszczalną, co wiąże się ze spadkiem ich toksyczności. Wyjaśnienie tego stanu rzeczy przedstawili Sakahira i wsp. [64], którzy uważają, że działanie białek opiekuńczych polega na zaburzaniu powstawania uporządkowanych wiązań wodorowych, w miejsce których wytwarzane są wiązania nieregularne. Białka te nie są jednak w stanie całkowicie zapobiec agregacji, gdyż rozpoznają głównie odsłonięte powierzchnie hydrofobowe, zaś długie powtórzenia reszt glutaminowych, jako polarne, nie są dla nich właściwym substratem. Zahamowanie tworzenia uporządkowanych struktur blokuje oligomeryzację, która jak wykazano [65] może odgrywać kluczową rolę w patogenezie. Sakahira i wsp. [64] proponują także, że w komórce białka opiekuńcze są zdolne do tłumienia toksycznego działania białek polyQ. Z wiekiem jednak dochodzi do zmniejszenia liczby funkcjonalnych białek opiekuńczych, co ostatecznie prowadzi do wystąpienia objawów chorobowych. Dłuższe powtórzenia polyQ miałyby wymagać większej liczby białek opiekuńczych. Przy zmniejszającej się z wiekiem dostępności tych białek mogłoby to powodować wcześniejszy rozwój choroby. Najnowsze badania [37] dowodzą także, że system Hsp70/Hsp40 odgrywa ważną rolę w blokowaniu przyjmowania przez białka polyQ konformacji umożliwiających ich oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi. Możliwe także, że ta grupa białek opiekuńczych chroni same czynniki transkrypcyjne, zapobiegając zmianie ich struktury w wyniku bezpośredniego kontaktu ze zmutowanymi białkami powodującymi schorzenia poliglutaminowe. Częściowe zahamowanie powstawania agregatów zaobserwowano u nicienia *Caenorhabditis elegans* [66], gdy jednoczesnej ekspresji ulegają jeden z dwóch homologów białka p97 (członka rodziny AAA+ ATPaz) oraz białko zawierające zwiększoną (powyżej 40) liczbę reszt glutaminowych. Świadczy to o uniwersalnej roli, jaką odgrywają białka opiekuńcze w zapobieganiu powstawania agregatów białek polyQ bez względu na badany organizm. Stwierdzono także, że inne białko opiekuńcze, mianowicie białko Hsp104, zidentyfikowane w drożdżach i należące do rodziny Hsp100, wpływa na stopień agregacji białek polyQ [61]. Należy ono do rodziny białek AAA+ [67, 68] i, we współpracy z Hsp70 i Hsp40, posiada zdolność cofania już zaistniałej agregacji. Wykazano, że nadekspresja genu HSP104 zmniejsza agregację białek z powtórzeniami reszt glutaminy [61]. Co zaskakujące, delecja genu kodującego Hsp104 przejawia się brakiem zauważalnych agregatów. Uzyskane wyniki sugerują, że w agregacji białek polyQ Hsp104 może pełnić funkcję analogiczną jak w przypadku przenoszenia prionu drożdży, [PSI+] [69, 70]. W warunkach fizjologicznych Hsp104 jest niezbędne do przekazywania prionu [PSI+] do komórek potomnych. Nadekspresja genu HSP104 skutkuje zwiększoną dysocjacją agregatów, jego delecja natomiast powoduje powstawanie struktur o wielkości uniemożliwiającej przenoszenie. Podobna sytuacja może mieć miejsce w przypadku drożdżowego modelu chorób polyQ, gdzie delecja genu HSP104 prawdopodobnie zaburza przekazywanie jądra nukleacji do komórek potomnych. Rola białek opiekuńczych w chorobach polyQ i innych schorzeniach neurodegeneracyjnych, w tym mechanizmy współdziałania białek z rodzin Hsp104, Hsp70 i Hsp40, zostały szczegółowo omówione w opublikowanych już pracach [71-75].

ZAKOŃCZENIE

Wprawdzie ostatnie lata przyniosły znaczne poszerzenie naszej wiedzy na temat molekularnych podstaw rozwoju chorób polyQ, nadal wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Wciąż nie wiemy, jakie mechanizmy rządzą agregacją i toksycznością zagregowanych białek występujących w różnych zespołach chorobowych. Należy równocześnie zauważyć, że prawdopodobnie odpowiada za to szereg nie wykluczających się wzajemnie i działających równolegle mechanizmów. Dokładne poznanie przyczyn neurodegeneracji na poziomie komórki jest niezwykle ważne, bo od naszej znajomości tych przyczyn uzależnione jest ewentualne leczenie tych chorób.

PIŚMIENNICTWO

1. Falk RH, Comenzo RL, Skinner M (1997) The systemic amyloidoses. N Engl J Med 337: 898-909
2. Shastry BS (2001) Molecular and cell biological aspects of Alzheimer disease. J Hum Genet 46: 609-618
3. Kruger R, Eberhardt O, Riess O, Schulz JB (2002) Parkinson's disease: one biochemical pathway to fit all genes? Trends Mol Med 8: 236-240
4. Dobson CM (2001) The Structural Basis of Protein Folding and its Links with Human Disease. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 356: 133-145

http://rcin.org.pl

5. Horwich A (2002) Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. J Clin Invest 110: 1221-1232
6. Ellis RJ, Pinheiro TJT (2002) Danger - misfolding proteins. Nature 416: 483-484
7. Selkoe DJ (2003) Folding proteins in fatal ways. Nature 426: 900-904
8. Ross CA, Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. Nat Med 10 Suppl:S10-7
9. Landles C, Bates GP (2004) Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in Molecular Medicine Review Series. EMBO Rep 5: 958-963
10. Bates G (2003) Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. Lancet 361: 1642-44
11. Rubinsztein DC, Leggo J, Coles R, Almqvist E, Biancalana V, Cassiman J-J, Chotai K, Connarly M, Crauford D, Curtis A, Curtis D, Davidson MJ, Differ AM, Dode C, Dodge A, Frontali M, Ranen NG, Stine OC, Sherr M, Abbott MH, Franz ML, Graham CA, Harper PS, Hedreen JC, Jackson A, Kaplan J-C, Losekoot M, MacMillan JC, Morrison P, Trottier Y, Novelletto A, Simpson SA, Theilmann J, Whittaker JL, Folstein SE, Ross CA, Hayden MR (1996) Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. Am J Hum Genet 59: 16-22
12. Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, Raza AS, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP (1999) From Neuronal Inclusions to Neurodegeneration: Neuropathological Investigations of a Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 354: 971-979
13. The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. Cell 72: 971-983
14. Cattaneo E, Rigamonti D, Zuccato C (2002) The enigma of Huntington's disease. Sci Am 287: 61-65
15. DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. Science 277: 1990-1993
16. Goldberg YP, Nicholson DW, Rasper DM, Kalchman MA, Koide HB, Graham RK, Bromm M, Kazemi-Esfarjani E, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Hayden MR (1996) Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. Nat Genet 13: 442-449
17. Cooper JK, Schilling G, Peters MF, Herring WJ, Sharp AH, Kaminsky Z, Masone J, Khan F, Delanoy M, Borchelt DR, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (1998) Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. Hum Mol Genet 7: 783-790
18. Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. Cell 90: 537-548
19. Chai Y, Koppenhafer SL, Shoesmith SJ, Perez MK, Paulson HL (1999) Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation in vitro. Hum Mol Genet 8: 673-682
20. Chai Y, Koppenhafer SL, Bonini NM, Paulson HL (1999) Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. J Neurosci 19: 10338-10347
21. Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu Y-Z, Gohler H, Wanker EE, Bates GP, Housman DE, Thompson LM (2000) The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 6763-6768
22. Chai Y, Shao J, Miller VM, Williams A, Paulson HL (2002) Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 9310-9315
23. Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H, Wanker EE (1997) Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. Cell 90: 549-558
24. Scherzinger E, Sittler A, Schweiger K, Heiser V, Lurz R, Hasenbank R, Bates GP, Lehrach H, Wanker EE (1999) Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 4604-4609
25. Chen S, Ferrone FA, Wetzel R (2002) Huntington's disease age-of-onset linked to polyglutamine aggregation nucleation. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 11884-11889
26. Poirier MA, Li H, Macosko J, Cai S, Amzel M, Ross CA (2002) Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. J Biol Chem 277: 41032-41037
27. Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, Finch JT (1994) Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 5355-5358
28. Perutz M (1996) Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects. Curr Opin Struct Biol 6: 848-858
29. Perutz MF, Finch JT, Berriman J, Lesk A (2002) Amyloid fibers are water-filled nanotubes. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 5591-5595
30. Tanaka M, Machida Y, Nishikawa Y, Akagi T, Hashikawa T, Fujisawa T, Nukina N (2003) Expansion of polyglutamine induces the formation of quasi-aggregate in the early stage of protein fibrillization. J Biol Chem 278: 34717-34724
31. Green H (1993) Human genetic diseases due to codon reiteration: Relationship to an evolutionary mechanism. Cell 74: 955-956
32. Iuchi S, Hoffner G, Verbeke P, Djian P, Green H (2003) Oligomeric and polymeric aggregates formed by proteins containing expanded polyglutamine. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 2409-2414
33. Karpuj MV, Garren H, Slunt H, Price DL, Gusella J, Becher MW, Steinman L (1999) Transglutaminase aggregates huntingtin into nonamyloidogenic polymers, and its enzymatic activity increases in Huntington's disease brain nuclei. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 7388-7393
34. Lai T-S, Tucker T, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenberg CS (2004) Effect of tissue transglutaminase on the solubility of proteins containing expanded polyglutamine repeats. J Neurochem 88: 1253-1260
35. Gerber HP, Seipel K, Georgiev O, Hofferer M, Hug M, Rusconi S, Schaffner W (1994) Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. Science 263: 808-811
36. Nucifora FC Jr, Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S, Troncoso J, Dawson VL, Ross CA (2001) Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. Science 291: 2423-2428
37. Schaffar G, Breuer P, Boteva R, Behrends C, Tzvetkov N, Strippel N, Sakahira H, Siegers K, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2004) Cellular Toxicity of Polyglutamine Expansion Proteins: Mechanism of Transcription Factor Deactivation. Mol Cell 15: 95-105
38. Hughes RE, Lo RS, Davies C, Strand AD, Neal CL, Olson JM, Fields S (2001) Altered transcription in yeast expressing expanded polyglutamine. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 13201-13206
39. Cha J-H J, Kosinski CM, Kerner JA, Alsdorf SA, Mangiarini L, Davies SW, Penney JB, Bates GP, Young AB (1998) Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 6480-6485
40. Broude NE, Cantor CR (2003) Neurological diseases and RNA-directed gene regulation: prospects for new diagnostics and therapy. Expert Rev Mol Diagn 3: 269-274
41. Napierala M, Krzyżosiak WJ (1997) CUG repeats present in myotonin kinase RNA form metastable "slippery" hairpins. J Biol Chem 272: 31079-31085
42. Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. Cell 95: 55-66
43. Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntigtin and the risk of neuronal death. Nature 431: 805-810
44. Sisodia SS (1998) Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: are they pernicious, coincidental, or beneficial? Cell 95: 1-4

http://rcin.org.pl

45. Lee H, Petersen RB, Zhu X, Honda K, Aliev G, Smith MA, Perry G (2003) Will preventing protein aggregates live up to its promise as prophylaxis against neurodegenerative diseases? Brain Pathol 13: 630-638
46. Li S-H, Lam S, Cheng AL, Li X-J (2000) Intranuclear huntingtin increases the expression of caspase-1 and induces apoptosis. Hum Mol Genet 9: 2859-2867
47. Sanchez I, Xu C-J, Juo P, Kakizaka A, Blenis J, Yuan J (1999) Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. Neuron 22: 623-633
48. Wellington C, Singaraja R, Ellerby L, Savill J, Roy S, Leavitt B, Cattaneo E, Hackam A, Sharp A, Thornberry N, Nicholson DW, Bredesen DE, Hayden MR (2000) Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. J Biol Chem 275: 19831-19838
49. Wellington CL, Ellerby LM, Hackam AS, Margolis RL, Trifiro MA, Singaraja R, McCutcheon K, Salvesen GS, Propp SS, Bromm M, Rowland KJ, Zhang T, Rasper D, Roy S, Thornberry N, Pinsky L, Kakizuka A, Ross CA, Nicholson DW, Bredesen DE, Hayden MR (1998) Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. J Biol Chem 273: 9158-9167
50. Donaldson KM, Li W, Ching KA, Batalov S, Tsai C-C, Joazeiro AP (2003) Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 8892-8897
51. Doi H, Mitsui K, Kurosawa M, Machida Y, Kuroiwa Y, Nukina N (2004) Identification of ubiquitin-interacting proteins in purified polyglutamine aggregates. FEBS Lett 571: 171-176
52. Willingham S, Outeiro TF, DeVit MJ, Lindquist SL, Muchowski PJ (2003) Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein. Science 302: 1769-1772
53. Waelter S, Boeddrich A, Lurz R, Scherzinger E, Lueder G, Lehrach H, Wanker EE (2001) Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. Mol Biol Cell 12: 1393-1407
54. Venkatraman P, Wetzel R, Tanaka M, Nukina N, Goldberg AL (2004) Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. Mol Cell 14: 95-104
55. Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. Science 293: 493-498
56. Cattaneo E, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Squitieri F, Sipione S (2001) Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. Trends Neurosci 24: 182-187
57. Matsuyama Z, Yanagisawa NK, Aoki Y, Black III JL, Lennon VA, Mori Y, Imoto K, Inuzuka T (2004) Polyglutamine repeats of spinocerebellar ataxia 6 impair the cell-death-preventing effect of $Ca_v2.1$ Ca^{2+} channel – loss-of-function cellular model of SCA6. Neurobiol Dis 17: 198-204
58. Marsh JL, Walker H, Theisen H, Zhu Y-Z, Fielder T, Purcell J, Thompson LM (2000) Expanded polyglutamine peptides alone are intrinsically cytotoxic and cause neurodegeneration in Drosophila. Hum Mol Genet 9: 13-25
59. Walter S, Buchner J (2002) Molecular chaperones–cellular machines for protein folding. Angew Chem Int Ed Engl 41: 1098-1113
60. Bukau B, Horwich AL (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell 92: 351-366
61. Krobitsch S, Lindquist S (2000) Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 1589-1594
62. Kazemi-Esfarjani P, Benzer S (2000) Genetic Suppression of Polyglutamine Toxicity in Drosophila. Science 287: 1837-1840
63. Muchowski PJ, Schaffar G, Sittler A, Wanker EE, Hayer-Hartl MK, Hartl FU (2000) Hsp70 and Hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 7841-7846
64. Sakahira H, Breuer P, Hayer-Hartl MK, Hartl FU (2002) Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 16412-16418
65. Sanchez I, Mahlke C, Yuan J (2003) Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. Nature 42: 373--379
66. Yamanaka K, Okubo Y, Suzaki T, Ogura T (2004) Analysis of the two p97/VCP/Cdc48p proteins of *Caenorhabditis elegans* and their suppression of polyglutamine-induced protein aggregation. J Struct Biol 146: 242-250
67. Lee S, Sowa ME, Choi J-M, Tsai FTF (2004) The ClpB/Hsp104 molecular chaperone-a protein disaggregating machine. J Struct Biol 146: 99-105
68. Weibezahn J, Bukau B, Mogk A (2004) Unscrambling an egg: protein disaggregation by AAA+ proteins. Microb Cell Fact 3:1
69. Serio TR, Lindquist SL (2000) Protein-only inheritance in yeast: something to get [PSI+]-ched about. Trends Cell Biol 10: 98-105
70. Jakubiec M, Boguta M (2002) Prion [PSI] i jego wpływ na terminację translacji u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Postepy Biochem 48: 175-181
71. Opal P, Zoghbi HY (2002) The role of chaperones in polyglutamine disease. Trends Mol Med 8: 232-236
72. Muchowski PJ, Wacker JL (2005) Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. Nat Rev Neurosci 6: 11-22
73. Glover JR, Lindquist S (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. Cell 94: 73-82
74. Ben-Zvi AP, Goloubinoff P (2001) Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. J Struct Biol 135: 84-93
75. Ziętkiewicz S, Krzewska J, Liberek K (2004) Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. J Biol Chem 279: 44376-44383

Aggregation and toxicity of the proteins with polyQ repeats

Paweł Leźnicki✉

Department of Molecular and Cellular Biology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdańsk, 24 Kładki St., 80-822 Gdańsk, Poland
✉e-mail: pleznicki@wp.pl

Key words: caspases, molecular chaperones, neurodegeneration, proteasomes, protein aggregates, transglutaminase

ABSTRACT

Expansion of CAG triplet repeats is a cause of at least nine late-onset neurodegenerative disorders. The mutation manifests itself as a long stretch of glutamine repeats. The number of ~ 38 repeats is usually a threshold at which the disease develops and the longer the polyglutamine tract, the earlier the onset of disease. A common feature of these disorders is the presence of protein aggregates which are believed to be formed either by the formation of hydrogen bonds between amide residues or through the action of the enzyme transglutaminase. Mutated proteins may cause neurodegeneration by sequestering vital cellular proteins, inhibiting proteasomal system or by inducing apoptosis. It has been proved that molecular chaperones may block the negative effects of expression of mutated genes and for this reason they are a promising object for various therapeutic research.

http://rcin.org.pl

SPRAWOZDANIE Z PIĄTEJ KONFERENCJI PARNASOWSKIEJ
Kijów 26 - 29 kwietnia 2005

Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
Prof. dr hab. Jolanta Barańska

Piąta Konferencja im. Jakuba Karola Parnasa, zatytułowana „Molecular Mechanisms of Cellular Signaling", odbyła się w Kijowie w dniach 26-29 kwietnia 2005 r (Fot. 1). Konferencje Parnasowskie odbywają się co dwa lata, naprzemiennie, w Polsce i na Ukrainie, organizowane wspólnie przez Polskie i Ukraińskie Towarzystwa Biochemiczne. Pierwsza odbyła się we Lwowie w roku 1996, druga w Gdańsku w 1998 r, trzecia znowu we Lwowie w 2000 r, a czwarta we Wrocławiu w roku 2002. Termin piątej Konferencji przesunięto na rok 2005, ponieważ w 2004 r. odbył się w Warszawie Kongres FEBS.

Fot. 1. Centrum Kijowa-Plac Niepodległości

W skład Komitetu Organizacyjnego piątej Konferencji Parnasowskiej weszli: Sergiy Komisarenko (współprzewodniczący, Ukraina), Jolanta Barańska (współprzewodnicząca, Polska), (Fot. 2) Stefan Angielski, Vasil Chekhun, Lyudmila Drobot, Anna Dygas, Andrzej Dżugaj, Anna El'skaya, Liliana Konarska, Platon Kostyuk, Mukola Kucharenko, Olga Matyshewska, Dmytro Melnychuk, Barbara Parnasowa (członek honorowy), Vitaly Pokhodenko, Andriy Sybirny, Switlana Sidorenko, Rostyslav Stoika, Adam Szewczyk, Włodzimierz Zagórski-Ostoja i Zofia Zielińska (członek honorowy).

Fot 2. Rozpoczęcie konferencji. Przemawiają prof. Jolanta Barańska i prof. Sergiy Komisarenko

Fot. 3. W czasie obrad. Pytanie zadaje prof. Piotr Laider

W konferencji uczestniczyło 264 osoy, nie licząc studentów Uniwersytetu Kijowskiego, którzy w liczbie 50-100 osób mieli wolny wstęp na obrady. Wśród uczestników byli koledzy z Polski (124) i Ukrainy (117), oraz Rosji (5), Białorusi (4), Francji (2), Szwecji (2), USA (2), Włoch (2), Wielkiej Brytanii (2), Iranu (1), Kazahstanu (1) i Niemiec (1). Połowę uczestników stanowili młodzi pracownicy nauki (126 osób, w tym 68 osób z Ukrainy i 46 z Polski).

Wykłady plenarne (5) wygłosili: Jolanta Barańska i Piotr Laidler (Polska), Sergiy Komisarenko i Oleg Kryshtal (Ukraina) oraz Ernesto Carafoli (Włochy). Wykłady sympozjalne (33) wygłoszono na trzech Sesjach: „Membranes, receptors and intracellular signaling", "Enzymes in signaling. Apoptosis" oraz „Regulation of protein expression and modification. Regulation of transcription" (Fot. 3-4). Wykłady te wygłosiło 14 osób z Ukrainy, 13 z Polski, 2 z Wielkiej Brytanii, 2 z USA, 1 z Włoch i 1 osoba ze Szwecji. Wykłady inauguracyjne prof. Barańskiej i prof. Komisarenki, koncert Zespołu Ludowego oraz „Get-together party" odbyły się w dniu 26.04.2005 r. w „Domu Ukraińskim", a wszystkie pozostałe wykłady, sesje plakatowe, oraz zakończenie Konferencji w „Domu Nauczyciela". Poziom wykładów był ogólnie oceniany jako wysoki.

Fot. 4. W czasie obrad: prof. J. Vandenheede i prof. Andrzej Dżugaj

Fot. 5. Sesja plakatowa. Po lewej prof. Jerzy Duszyński

Do sesji plakatowej zgłoszono 208 plakatów, a zaprezentowano 150 (Fot. 5). Zgodnie z oceną wielu młodych ludzi, sesja plakatowa była jedną z najlepszych wśród wielu zagranicznych Konferencji, w których uczestniczyli. Komisja konkursowa, na której czele stał prof. Jerzy Duszyński, a ponadto ze strony polskiej wchodzili: prof., prof. Czesław Cierniewski, Jan Barciszewski i Barbara Zabłocka wybrała pięć najlepszych spośród 49 zgłoszonych do konkursu plakatów. Pierwsze miejsce (wraz z nagrodą pieniężną) uzyskał Serhiy Havrylov z Ukrainy, reprezentujący jako doktorant Instytut Biologii Doświadczalnej

http://rcin.org.pl

im. M. Nenckiego PAN, Warszawa. Drugie miejsce uzyskała Ganna Panasyuk z Kijowa (nagroda pieniężna), a 3 następne: Yevhen Filyak i Rostislav Bilyy ze Lwowa oraz Monika Pietrowska z Gliwic. Trzy ostatnie nagrodzone osoby uzyskały stypendium umożliwiające udział w Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Lublinie, we wrześniu 2005 r. Stypendia, obejmujące wpisowe, pobyt oraz podróż, ufundowali nagrodzonym Dyrektorzy trzech Instytutów Naukowych w Warszawie: prof.prof. Jerzy Duszyński (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN), Włodzimierz Zagórski-Ostoja (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN) i Jacek Kuźnicki (Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN).

Konferencja odbywała się w niezwykle miłej i serdecznej atmosferze (Fot. 6). Organizatorzy Ukraińscy zaprosili wykładowców na przedstawienie baletowe do Opery kijowskiej oraz zorganizowali dla uczestników Konferencji wycieczkę autokarową, aby móc zwiedzić Kijów (Fot. 7).

Na zakończenie Konferencji, prof. Stefan Angielski omówił sylwetkę prof. Parnasa. W tych wspomnieniach uczestniczył także prof. Wacław Szybalski (Madison, USA), który, będąc we Lwowie kolegą gimnazjalnym syna prof. Parnasa, bywał w domu państwa Parnasów w okresie międzywojennym i poznał profesora osobiście. Ponadto, w czasie uroczystości zakończenia Konferencji ogłoszono werdykt Komisji konkursowej na najlepszy plakat oraz wręczono nagrody.

Konferencja w opinii wszystkich uczestników była niezwykle udana. Zakończyła się zaproszeniem do Polski na szóstą Konferencję Parnasowską. Konferencja ta odbędzie się w 2007 r, w Krakowie, a jej głównym organizatorem będzie prof. Piotr Laidler.

Fotografie: prof. A. Dżugaj (1 i 6-7), dr P. Pomorski (2) i prof. A. Szewczyk (3-5)

Fot. 6. Przyjęcie towarzyskie w Instytucie Palladina. Stoją od lewej: prof. Włodzimierz Zagórski-Ostoja, prof. Jolanta Barańska i prof. Rostislav Stoika.

Fot. 7. Oczekiwanie na wycieczkę. Stoją od lewej: prof. Jerzy Duszyński, prof. Jolanta Barańska i prof. Adam Szewczyk.

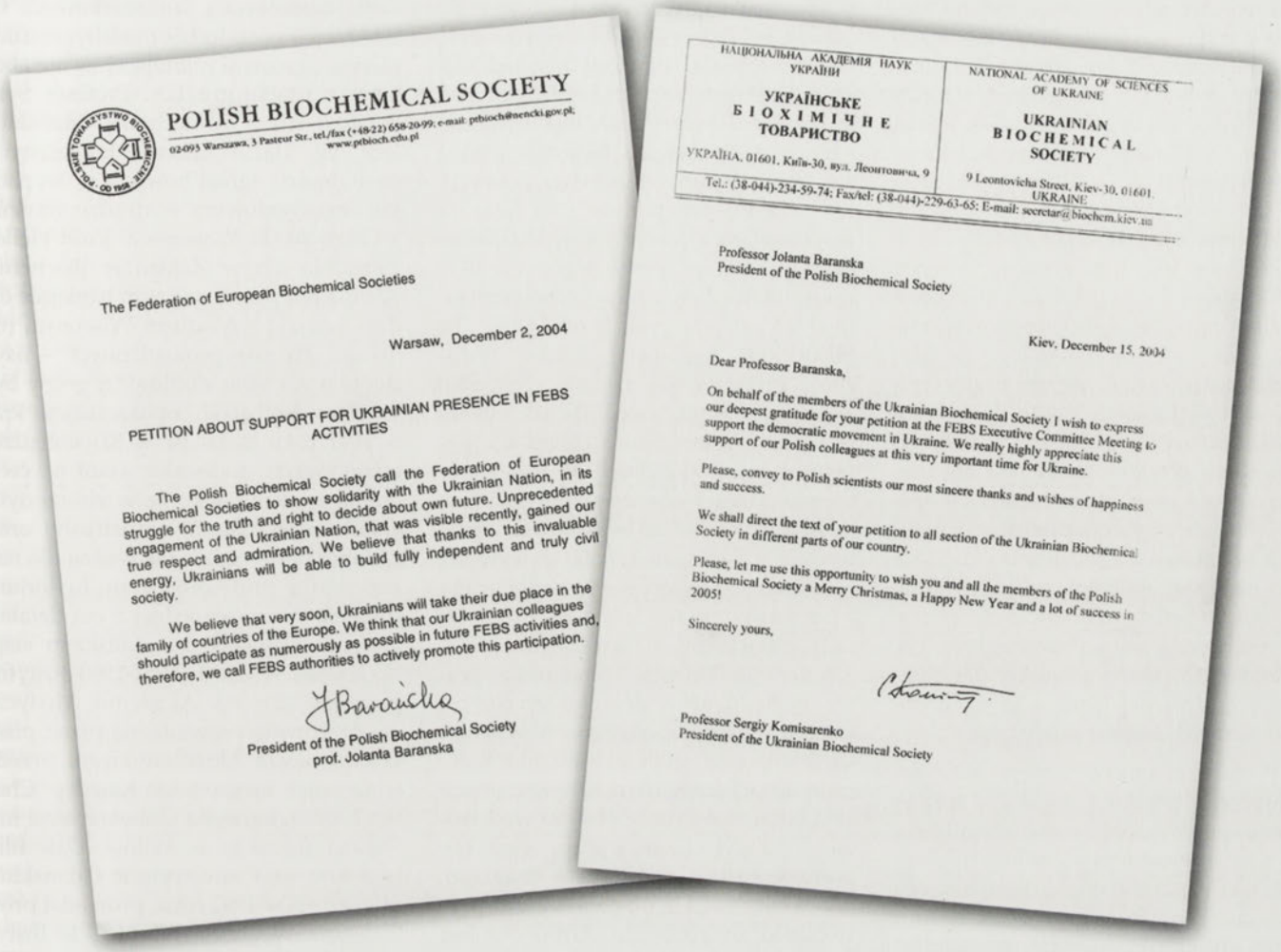
FEBS WSPIERA ORGANIZACJĘ POLSKO-UKRAIŃSKIEJ KONFERENCJI IM. JAKUBA KAROLA PARNASA

prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
prof. dr hab. Jolanta Barańska

Polsko-ukraińskie konferencje im. Jakuba Karola Parnasa maja już długą tradycję. Pierwsza odbyła się w 1996 roku we Lwowie i była połączona z wmurowaniem tablicy pamiątkowej ku czci profesora Parnasa w ścianę gmachu dawnego Wydziału Chemii Lekarskiej Uniwersytetu Jana Kazimierza, w którym profesor Parnas pracował przez cały okres międzywojenny. Profesor Jakub Karol Parnas był twórcą szkoły biochemii, która lwowski ośrodek naukowy rozsławiła w świecie. W laboratorium kierowanym przez niego jako jednym z pierwszych stosowano radioaktywny ortofosforan w badaniach biochemicznych, prowadzacych między innymi do wytłumaczenia anaerobowego metabolizmu glukozy, zwanego szlakiem Embdena-Meyerhoffa-Parnasa. Prof. Parnas był także autorem pierwszego, wydanego w roku 1922, polskiego podręcznika nowoczesnej Chemii Fizjologicznej. Jego działalność naukowa była oparta na szerokich międzynarodowych kontaktach. Profesor Parnas skupił wokół siebie grono młodych ludzi, którzy po II wojnie światowej kontynuowali jego dzieło w wielu ośrodkach w Polsce. Kształcąc młode pokolenie naukowców przekazywali oni wiedzę i atmosferę wyniesioną z laboratorium prof. Parnasa, Profesor Parnas został aresztowany w 1949r i zmarł w tym samym roku w więzieniu na Łubiance w Moskwie.

W trakcie naszego pierwszego spotkania z kolegami ukraińskimi we Lwowie, w 1996 roku ustalono, że wspólnie organizowane konferencje będą odbywać się raz na dwa lata, naprzemiennie w Polsce i na Ukrainie. Organizatorami pierwszej Konferencji byli ze strony polskiej prof., prof. Liliana Konarska i Jolanta Barańska, a ze strony ukraińskiej prof. Rostislav Stoika. Druga konferencja odbyła się w Gdańsku w 1998 roku a jej organizatorem był prof. Stefan Angielski. Trzecią zorganizowali we Lwowie w 2000 roku prof. Rostislav Stoika i Ludmila Drobot. Czwarta konferencja odbyła się w 2002 roku we Wrocławiu. Jej organizatorem był prof. Andrzej Dżugaj. Ze względu na odbywający się w Warszawie Kongres FEBS 2004, zdecydowano by piąta konferencja im. J. K. Parnasa odbyła się w 2005 roku w Kijowie. Głównym organizatorem tej Konferencji był prof. Sergiy Komisarenko. Sytuacja polityczna, a tym samym finansowa na Ukrainie, była jednak niepewna. Nasi koledzy ukraińscy wyrażali obawy, czy będą w stanie zorganizować konferencję w ustalonym terminie. Polskie Towarzystwo Biochemiczne zwróciło się do władz FEBS z petycją o pomoc. Prośba została przedstawiona przez prezesa Polskiego Towarzystwa Biochemicznego na zebraniu komitetu wykonawczego FEBS. Po przedyskutowaniu problemu, władze FEBS zdecydowały się udzielić pomocy finansowej kolegom z Ukrainy organizującym konferencję im. J. K. Parnasa, w wysokości 10 000 euro. Publikujemy petycję Polskiego Towarzystwa Biochemicznego do władz FEBS i odpowiedź, jaką otrzymaliśmy z Ukraińskiego Towarzystwa Biochemicznego.

http://rcin.org.pl



POLISH BIOCHEMICAL SOCIETY

02-093 Warszawa, 3 Pasteur Str., tel./fax (+48-22) 658-20-99; e-mail: ptbioch@nencki.gov.pl; www.ptbioch.edu.pl

The Federation of European Biochemical Societies

Warsaw, December 2, 2004

PETITION ABOUT SUPPORT FOR UKRAINIAN PRESENCE IN FEBS ACTIVITIES

The Polish Biochemical Society call the Federation of European Biochemical Societies to show solidarity with the Ukrainian Nation, in its struggle for the truth and right to decide about own future. Unprecedented engagement of the Ukrainian Nation, that was visible recently, gained our true respect and admiration. We believe that thanks to this invaluable energy, Ukrainians will be able to build fully independent and truly civil society.

We believe that very soon, Ukrainians will take their due place in the family of countries of the Europe. We think that our Ukrainian colleagues should participate as numerously as possible in future FEBS activities and, therefore, we call FEBS authorities to actively promote this participation.

President of the Polish Biochemical Society
prof. Jolanta Baranska

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКЕ БІОХІМІЧНЕ ТОВАРИСТВО
УКРАЇНА, 01601, Київ-30, вул. Леонтовича, 9

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE
UKRAINIAN BIOCHEMICAL SOCIETY
9 Leontovicha Street, Kiev-30, 01601, UKRAINE

Tel.: (38-044)-234-59-74; Fax/tel: (38-044)-229-63-65; E-mail: secretar@biochem.kiev.ua

Professor Jolanta Baranska
President of the Polish Biochemical Society

Kiev, December 15, 2004

Dear Professor Baranska,

On behalf of the members of the Ukrainian Biochemical Society I wish to express our deepest gratitude for your petition at the FEBS Executive Committee Meeting to support the democratic movement in Ukraine. We really highly appreciate this support of our Polish colleagues at this very important time for Ukraine.

Please, convey to Polish scientists our most sincere thanks and wishes of happiness and success.

We shall direct the text of your petition to all section of the Ukrainian Biochemical Society in different parts of our country.

Please, let me use this opportunity to wish you and all the members of the Polish Biochemical Society a Merry Christmas, a Happy New Year and a lot of success in 2005!

Sincerely yours,

Professor Sergiy Komisarenko
President of the Ukrainian Biochemical Society

PIĘĆDZIESIĄT LAT INSTYTUTU BIOCHEMII I BIOFIZYKI PAN

Dyrektor Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN
prof. Włodzimierz Zagórski-Ostoja
ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa
tel: (022) 5922145
e-mail: secretariate@ibb.waw.pl
http://www.ibb.waw.pl/

KILKA SŁÓW O HISTORII

Pisanie historii instytutu naukowego może budzić uczucia ambiwalentne. I to z prostego powodu – teraźniejszość w nauce zwycięża nad przeszłością w sposób bezapelacyjny, nieodwołalny, można nawet powiedzieć, że w sposób z punktu widzenia indywiduum po prostu nieludzki. Jak pisze Florkin: „generally speaking science is the study of an object that has no history that is no history", co znaczy tyle, iż w procesie badawczym stajemy za każdym razem przed problemem, który jest nowy. Jest on do rozwiązania, a to rozwiązanie ma zerwać z uprzednią wiedzą na temat badanego obiektu, inaczej badania podjąć nie warto. Wiemy wszyscy dobrze, jak owo odkrywanie „rzeczywistości" jest jednocześnie trudne i pociągające. Udany eksperyment, ujawniający dotąd nieznane, niesie w sobie demiurgiczne poczucie siły. Owo ujawnienie nowego może być postrzegane jako wydarcie naturze jednej z jej tajemnic, poznawanie preegzystujących porządków (byłaby to wizja platońska) lub jako akt powołania do istnienia elementu rzeczywistości (to wizja właśnie demiurgiczna). Czy opowiemy się za jedną, czy drugą wersją – obie oparte są o ów nieustanny pęd do zajmowania się tym, co jest dotąd niepoznane. I dlatego nauka jest rzeczywiście ahistoryczna. Owo odkrywanie to oczywiście zadanie trudne. Przynajmniej w naszej dziedzinie. Przynajmniej – w jej warstwie eksperymentalnej. Nasze doświadczenia są technicznie bardzo trudne. Oczywiście ze względu na naturę badań nad *bios*, sam bowiem fenomen życia jest i trudno uchwytny, i oparty o wysoce złożone mechanizmy. Ale i doświadczenia są trudne ze względu na dzisiejsze techniczne zaawansowane dziedziny. Przez to jest ona hermetyczna, bowiem zarówno konstrukcja eksperymentu jak i rozumienie wyniku wymaga dziś operowania metajęzykiem, czyli zestawem pojęć wysoce specjalistycznych i – co więcej – solidnej wiedzy matematycznej i fizycznej. Zupełnie nieprawdopodobny rozwój metod analitycznych (zestaw wszystkich – omix) i syntetycznych (inżynierii genetycznej, komórkowej, organizmalnej) wymusza ciągłą rozbudowę warsztatu badawczego. Ogromna złożoność dziedziny prowadzi do tego, że spokojnie można

http://rcin.org.pl

powiedzieć, iż 90 % eksperymentów „nie wychodzi". Zanim się trafi na właściwą drogę, trzeba się liczyć z kolejnymi doświadczeniami, trzeba wykazać - jedni powiedzą wytrwałość, drudzy - ośli upór. Co by się nie działo, trzeba umieć znieść niepowodzenie kolejnego eksperymentu, dowodzące przecież, że to sam eksperymentator jest ułomny. Takie stwierdzenie niweczy (czy może tylko równoważy) owo poczucie mocy wynikające z uczestnictwa w procesie poznawczym. Szczęśliwsi w tym względzie są biolodzy fenomenologowie. Biologia opisowa jest dziedziną bezpieczną zawodowo, bowiem każdy opis dokonany poprawnie a dotyczący nowego zjawiska jest wartościowy. Jest też bezpieczna dla psychologii badacza - opis nie stwarza owych napięć towarzyszących badaniom doświadczalnym. Może być najwyżej niepełny, ale nie niesie ryzyka, że będzie całkowicie niezgodny z istotą rzeczy. Jest wreszcie zawsze potwierdzeniem obowiązującego paradygmatu. A doświadczenia - są nieustannym sprawdzaniem paradygmatu.

W odróżnieniu od samego aktu poznawczego, przebieg ustalania i sprawdzania paradygmatów ma swoją historię i jej fragmentem są dzieje różnych instytucji naukowych, w tym naszego Instytutu. Przyjrzyjmy się tej historii bliżej; formalnie dopiero w dziesięć lat po wojnie poczynając od Zakładu Biochemii PAN, będącego zalążkiem Instytutu. To 10-letnie oczekiwanie na powołanie Instytutu było dziwne. Przecież biochemia w Polsce przed wojną była dziedziną silną, a więc stworzenie takiej placówki powinno właściwie nastąpić szybciej. Środowisko biochemiczne, choć zdziesiątkowane przez wojnę, odtwarzało ośrodki badawcze w kilku uczelniach. Zatem stworzenie mocnego Instytutu badawczego wydawało się po wojnie zgodne z potrzebą chwili. Ale filozofia dominująca w tej części Europy w owych latach, w kondensacie przedstawiona w „Krótkiej historii WKPb", uznająca że prawidła rządzące rzeczywistością są już poznane, właśnie przeciwstawiała się rozwojowi nauk doświadczalnych, niosących zagrożenie, iż dostarczą danych niezgodnych z istniejącą ideologią. Dlatego wśród nauk o życiu tępione były genetyka, biochemia i mikrobiologia. Wszystko, co mogło zrodzić nowe teorie, niespójne z obowiązującym wykładem diamatu spotykało się z oporem struktury systemowo opartym o przekonanie, że cała wiedza jest już osiągnięta. Dopiero w tle „Odwilży" przywrócić można było właściwe miejsce naukom doświadczalnym. W tym samym roku 1956 powstaje Polskie Towarzystwo Biochemiczne i Instytut Biochemii i Biofizyki (rodzą się też „Postępy Biochemii", przyp. red.). Warto przypomnieć, że Katedra Biochemii na Uniwersytecie Warszawskim utworzona zostaje dopiero w 1958 roku, również na fali owych przemian. Instytut zakłada prof. Józef Heller. To piłsudczyk, legionista, doktor medycyny, przed wojną czynny w służbie zdrowia, zajmujący się - tak jak i wielu wówczas biochemików - całym wachlarzem różnych zagadnień. W istocie powinniśmy mu być wdzięczni choćby za to, że między innymi był sprawcą wprowadzenia jodowania soli spożywczej w Polsce. Co to jest wole, to już wielu z nas nawet nie wie, ale ja jeszcze w latach czterdziestych widziałem osoby z wolem na Podhalu. To nie tylko sprawa wyglądu, ale w dodatku ten rozrost tarczycy powoduje otępienie umysłowe. Czas wojny to - o ile rozumiem z korespondencji Jakuba Parnasa - do czerwca 1941 roku okres pracy Hellera we Lwowie. Po zajęciu Lwowa przez Niemców profesor zostaje internowany w oflagu. Jak wielu polskich żołnierzy po wyzwoleniu wstępuje do Armii Polskiej na Zachodzie i zostaje komendantem szpitala wojskowego, po czym wraca do Polski. Tu bierze udział w rekonstrukcji życia akademickiego we Wrocławiu. Według legendy, w 1954 roku minister Eugenia Krassowska zwróciła się do kilku naukowców z zapytaniem o opinię na temat poprawy warunków rozwoju biochemii w Polsce. Ponoć, gdy inni zastanawiali się nad sformułowaniem odpowiedzi, Józef Heller zameldował się rano w Ministerstwie Oświaty i po wejściu do gabinetu pani wiceminister, podziękował jej za nominację na dyrektora przyszłego Instytutu. Zaskoczona minister nie potrafiła odmówić i stało się - ruszyły tryby maszyny administracyjnej doprowadzając do stworzenia IBB PAN. *Si non e vero, e ben trovato.*

W każdym razie w pierwszym zespole przyszłego Instytutu, będącym konfederacją różnych laboratoriów rozrzuconych po Warszawie, znajduje się prof. Ignacy Reifer i wkrótce - będący dziś dalej z nami - prof. Dawid Shugar. W tym pierwszym zespole znajduje się też grupa utworzona przez profesora Ernesta Syma: Przemysław Szafrański, Zofia Lassotowa i Jan Szarkowski. Ci młodzi wówczas ludzie mieli być zatrudnieni w pracowni zajmującej się metabolizmem prątka gruźlicy. Profesor Sym ściągnął ich z Politechniki Gdańskiej, lecz nie zdążył załatwić koniecznych formalności, zginął bowiem w wypadku samochodowym w drodze właśnie z Gdańska do Warszawy. Józef Heller zatrudnia ich w Zakładzie Biochemii PAN, a oni przynoszą nam istniejące do dziś związki z Madison Wisconsin (tu uwaga dla niewprowadzonych - asystentem w czasie studiów tej grupy był Wacław Szybalski, opuszczający kraj w 1947 roku by osiąść w Kopenhadze, gdzie swych studentów woził na ćwiczenia z chemii, jako że w zburzonym Gdańsku laboratoria nie istniały) oraz z Gdańskiem - gdzie tak ważna dla nas przyjaźń z profesorostwem Taylorami stała się podstawą jednej z osi działań Instytutu. Związki z Gdańskiem stają się trwałe, w latach 1957-1963 Instytut posiadał tam na Akademii Medycznej pracownię prowadzoną przez prof. Włodzimierza Mozołowskiego, przedwojennego kierownika Katedry Chemii Fizjologicznej na Uniwersytecie im. Stefana Batorego w Wilnie. Dziś filię Instytutu na Uniwersytecie Gdańskim, utworzoną w 1992 roku, prowadzi prof. Grzegorz Węgrzyn. Wkrótce do Instytutu dołącza prof. Tadeusz Korzybski - asystent prof. Jakuba Parnasa. W Warszawie wokół Instytutu gromadzą się też inni lwowscy egzule wśród nich - prof. Irena Mochnacka. W istocie nad kołyską Instytutu unosi się duch lwowskiej szkoły biochemicznej. Jej podstawową cechą było poszukiwanie mechanizmów badanych przemian metabolicznych a nie tylko ich roli fizjologicznej. To mechanistyczne podejście do reakcji biologicznych - ówczesny paradygmat biochemii trwa zresztą do dziś.

Zespoły Instytutu szybko wchodzą w badania związane z nowym systemem myślenia, z pojawiającą się w biologii kwestią kodowania. Tu wspomnieć należy zasługi obecnego wśród nas prof. Przemysława Szafrańskiego i jego grupy - Jadwigi Chroboczek, Ludwiki Zimniak, Piotra Chomczyńskiego i zmarłych Stefana Klity i Stanisława Perzyńskiego. Bardzo ważne w tej dziedzinie są również prace Włodzimierza Szera, który w związku z antysemickimi hecami z marca 1968 opuścił Polskę na stałe, ale zawsze pozostawał z nami w ścisłym

http://rcin.org.pl

kontakcie przyjacielskim i naukowym. Nowy element wprowadza do badań Instytutu następca Hellera, prof. Wacław Gajewski, w czym wspiera go prof. Władysław Kunicki-Goldfinger. A tym elementem – znów do dziś obecnym w profilu naukowym Instytutu – jest genetyka molekularna. Tadeusz Kłopotowski, Danuta Hulanicka, Michał Bagdasarian, Andrzej Paszewski tworzą grupę rozwijającą tę dziedzinę wspieraną przez prof. Piotra Słonimskiego i Wacława Szybalskiego. Następnym naturalnym etapem związanym z tworzącą się w Instytucie kulturą biofizyczną było skierowanie uwagi na zagadnienia dziś traktowane jak przedmiot biologii strukturalnej. Pod rządami kolejnego dyrektora Instytutu, prof. Kazimierza Lecha Wierzchowskiego, rozwijają się w jego zakładzie metody spektroskopowe. Jest to też okres wytężonej pracy organizacyjnej, związanej z tzw. „węzłowymi problemami badawczymi". Warto pamiętać, że to wówczas prof. Andrzej Rabczenko rozbudowuje metody obliczeniowe w „mózgu IBB", czyli w ulokowanym w suterenie na Rakowieckiej 36 laboratorium, gdzie stała bułgarska maszyna licząca. Następuje wówczas redefinicja profilu badawczego Instytutu. Uznajemy, że ważnym dla nas przedmiotem badań jest metabolizm i struktura kwasów nukleinowych. Te badania przynoszą osiągnięcia w dziedzinie enzymologii kwasów nukleinowych (tu wymienić należy koleżanki i kolegów z pracowni kierowanych przez Monikę Jeżewską, Zofię Lassotową, Halinę Sierakowską i Jana Szarkowskiego). Łączą się też z zainteresowaniami metabolizmem RNA, owocującymi wspaniałym odkryciem ligazy RNA w zespole Witolda Filipowicza, w którym pracowali Magdalena Konarska i Kazimierz Tyc-Tycowski. Biologia strukturalna lipidów – to osobna historia. Analizy struktur poliizoprenoidowych doprowadziły z jednej strony do rozwoju badań nad izoprenylacją białek, czy metablizmem steroidów, a z drugiej – do pojawienia się sprawdzalnego rynkowo projektu biotechnologicznego. Ta pierwsza linia badań nad lipidami dziś wiąże się z genetyką grzybów niższych i Arabidopsis – zagadnieniami wiodącymi w kilku innych grupach instytutowych. Jest to klasyczny przykład tego, co daje współistnienie różnych zespołów w jednej instytucji naukowej. Ta druga – znajduje swoje odbicie w katalogu kolekcji unikalnej izoprenoidów, sprzedawanych przez fimę Larodan w całym świecie. Mówię tu oczywiście o osiągnięciach prof. Tadeusza Chojnackiego, prof. Grażyny Palamarczyk, prof. Ewy Kuli- Świeżewskiej i dr hab. Anny Szkopińskiej.

Dzisiejsze badania Instytutu koncentrują się wokół genomiki. W program sekwencjonowania genomu drożdży weszliśmy w 1992 roku, za pośrednictwem oczywiście Piotra Słonimskiego, wówczas – Dyrektora Centre de Genetique Moleculaire CNRS. Analizę funkcjonalną genów drożdży podjął u nas zespół prof. Joanny Rytki. Dr Marek Zagulski i jego zespół sekwencjonujący genom drożdży, dziś rozpoczął sekwencjonowanie i analizę funkcjonalną genomu *Paramecium* w ramach konsorcjum polsko-francusko-niemieckiego, zaś doc. Piotr Cegłowski rozpoczął program intensywnego poznawania genomów plazmidów i fagów, po jego przedwczesnej śmierci tak wspaniale kontynuowany w Zakładzie Biochemii Drobnoustrojów. Badania Zakładu Biochemii Roślin dziś też są przesycone paradygmatem genomicznym – wystarczy tylko wspomnieć prace zespołów prof. Andrzeja Jerzmanowskiego, prof. Jacka Henniga, prof. Grażyny Muszyńskiej i prof. Agnieszki Sirko. Genomika to *lingua franca* dzisiejszej biologii i tego Instytutu. Dzieje się tak i dzięki temu, że mamy zespół bioinformatyków pod wodzą prof. Piotra Zielenkiewicza, tworzony przy współpracy między innymi Meira Edelmana i goszczącego często u nas Leona Estermana z Instytutu Weizmannna. Szeroko z tego podejścia korzystają znakomite grupy zajmujące się jedną ze specjalności Instytutu – mutagenezą (prof. Jarosław Kuśmierek, doc. Barbara Tudek, zespół prof. Zygmunta Cieśli). Oczywiście intesywnie rozwijamy także podejścia do śledzenia funkcji genomu. I tu pomocą służy nam rozwijający się zespół doc. Michała Dadleza. Wreszcie nie zapominajmy, iż strukturaliści – szczególnie NMR-owcy kierowani przez prof. Andrzeja Bierzyńskiego i prof. Andrzeja Ejcharta - wnoszą w ów lekki chaos genomiczno-proteomiczny nieco porządku, wprowadzając do naszego myślenia niezbędny element ładu opartego o zasady fizyki.

Tak wygląda zarys historii Instytutu. I teraz czas na kilka uwag. Instytut naukowy to po prostu gmach odpowiednio wyposażony, gdzie na kilka czy kilkanaście godzin dziennie schodzą się konkretni ludzie. Nie istnieje nic takiego jak życie Instytutu, jego los, itd. Jest to życie i los jednostek w jednym budynku wymieniających myśli, tworzących społeczność naukową. Wśród takich społeczności nie jesteśmy najmocniejszą na świecie. Istnieją od nas lepsze (ale i gorsze). Tym niemniej myślę, że jesteśmy społecznością specjalną, gdzie jakoś udało się nie wpuścić szczura zawiści, praca jest ceniona a osiągane wyniki pewne. Mało tu hucpy, sporo myślenia o otaczającym świecie i o wartości nauki. To ostatecznie wśród nas jest prof. Magdalena Fikus z jej pasją dzielenia się wiedzą z innymi, na prawdę osadzoną w najlepszych tradycjach inteligencji. Może nie jesteśmy najefektywniejsi z punktu widzenia liczby publikacji, ale czasem lepiej zastanowić się parę razy zanim opublikuje się wynik nie do końca sprawdzony.

Mówiąc o naszych pięćdziesięciu latach trzeba wspomnieć, że ludzie związani z tym Instytutem obecni byli nie tylko przy stołach laboratoryjnych, ale i w życiu kraju. Nie warto wchodzić w kombatanctwo, ale powinien być tu wspomniany choćby śp. Roman Tomasik – szef naszej „Solidarności", w 1989 roku rozliczający się ze zbieranej nielegalnie przez dziewięć lat składki związkowej, której nikt z nas nie odmawiał i powiadamiający, że jej gros szło na stypendia szkolne ufundowane dla dzieci z ubogich rodzin ludzi internowanych. W życiu społecznym jesteśmy dalej obecni. I nikogo w naszym środowisku nie dziwi, że w czasie obchodów naszego jubileuszu (26-29 listopad 2004 roku) niejeden z nas przypiął sobie kokardkę w kolorze pomarańczowym. Piotr Słonimski, rozpoczynając wykład inauguracyjny, założył czapkę akurat w tym kolorze. Przecież nie zostawi nas obojętnymi to, co akurat w tych dniach działo się wokół nas, co poruszało myśli Ukraińców i Polaków.

Mieliśmy i mamy wielu przyjaciół. Nie będę tu wszystkich wymieniać. Ale bez zrozumienia istoty spraw nauki przez prof. Stefana Amsterdamskiego, prof. Witolda Karczewskiego i panią Małgorzatę Kozłowską nasz dzisiejszy warsztat pracy by nie powstał. Pamiętamy życzliwość profesorów Aleksandra Gieysztora, Henryka Samsonowicza, Romualda Klekowskiego, Tadeusza Bielickiego, Jerzego Gąsiorowskiego i Bro-

http://rcin.org.pl

nisława Geremka. Mamy i mieliśmy też i wrogów. Tych wspominać nie warto, jeśli kto ciekaw, to Mieczysław Chorąży przesłał nam niedawno kopię swoich wystąpień na Prezydium PAN, broniących Instytutu i jego ludzi w okresie, w którym to trzeba było robić. Myślę, iż słowa „po owocach ich, poznacie ich" określają najkrócej sposób widzenia świata obowiązujący w naszej społeczności, od początku wdrożony przez tych, co tworzyli jej fundamenty.

GLOSSA DO HISTORII - O PEWNYM OKRESIE

W 1981 roku dyrektorem Instytutu zostaje prof. Andrzej Paszewski, mianując mnie wicedyrektorem ds. ogólnych a prof. Monikę Jeżewską wicedyrektorem ds. naukowych. Paszewski był pierwszym w historii IBB dyrektorem formalnie wybranym przez Radę Naukową i został zatwierdzony przez władze PAN. Był to wyłom w dotychczasowej praktyce i dobrze, że się tak stało, bo wkrótce Instytut stanął przed wyzwaniami stanu wojennego, na które dyrektorowi mającemu wsparcie swojej społeczności łatwiej było odpowiedzieć. A były one liczne, najpierw dotyczyły spraw indywidualnych, internowani zostali prof. Kunicki-Goldfinger, Stanisław Plewako, Jarosław Kosiński, ukrywali się prof. Gajewski i prof. Kłopotowski, w podziemiu działali Michał Dadlez i Grzegorz Boguta. Mimo początkowego wstrząsu „Solidarność" instytutowa nie dała się, spokojnie podjęła działalność nielegalną, wydawnictwa podziemne były kolportowane i składki związkowe zbierane między innymi przez Marka Wełnickiego (więcej nazwisk nie pamiętam, bo też i nie chodziło nigdy o to, by je znać). Potem pojawiły się kwestie ogólniejsze. Członkowie partii, pracujący w Instytucie po 13 grudnia 1981 roku wystąpili z jej szeregów, co oczywiście stawiało ich w sytuacji ludzi z marginesu istniejących struktur aparatu Państwa, za to wspaniale integrowało ich z instytutowymi bezpartyjnymi. Dostąpiliśmy też swoistego wyróżnienia - generał Jaruzelski, w jednym ze swoich przemówień, wymienił Instytut jako gniazdo wrogów państwa i ustroju, pojawiły się propozycje likwidacji IBB, pułkownik Szczygieł z MSW (taki podpis widniał na odpowiedniej decyzji) zlecił wydalenie z Polski prof. Shugara. Nie wiadomo, czym by to się skończyło, gdyby nie interwencja prof. Aleksandra Gieysztora, bezpośrednio u generała. Wypominano potem tę interwencję ówczesnemu Prezesowi Akademii nie wyrażając zgody na jego kolejną kadencję. Wielu naszych kolegów zdecydowało się wówczas pozostać za granicą (Ryszard Kole, Ludwika Zagórska, Jadwiga Chroboczek, Wojciech Rychlik, Magdalena Konarska, Kazimierz Tycowski). Witold i Aleksandra Filipowiczowie zmuszeni zostali w sposób brzydki do ucieczki z kraju, po powrocie z USA, mimo gwarancji nowego Prezesa PAN, odebrano im paszporty i poddano nękającym naciskom. Był to okres, o którym da się powiedzieć jedno: w całym kraju chodziło wówczas o przetrwanie normalnych więzi i struktur społecznych, poddanych atakowi ogłupiałego aparatu władzy. A że jedną z takich struktur są instytucje naukowe, toteż staraliśmy się, by owa zewnętrzna fala głupoty nie wpływała na zasady funkcjonowania Instytutu. Trwały na przykład zaawansowane prace nad genetyką drożdży, toczące się w grupie śp. Aleksandry Putrament. Tu śp. Anna Kruszewska, współpracująca z Piotem Słonimskim, skreowała i scharakteryzowała serię supresorów jądrowych kontrolujących geny mitochondrii (NAM-y) i supresorów mitochondrialnych kontrolujących geny mitochondrialne (MIM-y). Jej kolekcja do dziś jest użyteczna w rozwiązywaniu dwuznaczności odczytu kodu mitochondrialnego. Padło tu nazwisko Piotra Słonimskiego - w tym okresie pomagał on całemu naszemu środowisku właśnie w utrzymaniu kontaktu z nauką światową, choćby zamawiając dla Instytutu prenumeraty *Cell* i *Nature*, ale też organizując możliwości staży laboratoryjnych i wspierając polskich badaczy za pośrednictwem Towarzystwa Kursów Naukowych, gdzie stypendia, które fundowała Solidarite France-Pologne, założona przez między innymi Hannę i Agnieszkę Słonimskie, były w gestii profesorów Gajewskiego i Kunickiego-Goldfingera. W ogóle wcześniej nawiązane stosunki z francuskimi laboratoriami również w tym okresie okazały się trwałe. Pracował nad tym Jacques Faure, sekretarz ambasady francuskiej w latach 1980-1986, wpierali nas i przyszła Prezydent Akademii Francuskiej, prof. Marianne Grunberg-Manago, i Francois Chapeville, i Anne-Lise Haenni, przyjmujący naszych pracowników w swoich laboratoriach Uniwersytetu Paris VII. Śp. Jean-Pierre Ebel wraz z Guy Dirheimerem wykorzystywał do pomocy nam przede wszystkim FEBS (tu anegdota - po tzw. „przemianach", zdradzili mi, że w algorytmie rozdziału stypendiów FEBS, nikomu nic nie mówiąc, wprowadzili mnożnik 2 dla Polski...). W przypadku Ebela ta reakcja oparta była na głębokich doświadczeniach osobistych. Znów, w jakiejś rozmowie powiedział mi, że on - *Compagnon de Liberation* - twórca podziemnego uniwersytetu strasburskiego w Vichy, aresztowany w 1943 roku przez Gestapo, przeżył Ravensbrűck tylko dzięki pomocy kilku Polaków i że pomagając nam spłaca tylko dług. Związki z Francją znalazły swoje odbicie w podjętej przez Radę Naukową (pod przewodnictwem niezapomnianej śp. Zofii Lassotowej) w 1987 roku inicjatywie utworzenia Grupy Doradczej przy Radzie Naukowej IBB. Członkostwo tej Grupy przyjęli właśnie Grunberg-Manago i Ebel. Zatem nie trudno zrozumieć, że po 1989 roku to właśnie naukowcy francuscy wspierali tworzenie strukturalnych więzi - związków bliźniaczych między naszymi i ich laboratoriami. Te działania najpełniej wyrażają się w utworzeniu Polsko-Francuskiego Centrum Biotechnologii Roślin, czynnego w latach 1994--2004 i przygotowanej jego kontynuacji w postaci *Groupment des Recherches Internationales*, poświęconego genomice porównawczej. Działalność Centrum opisana jest szczegółowo w odpowiednich raportach autorstwa prof. Stanisława Lewaka.

NOWA STRUKTURA

Właśnie współpraca z francuskimi laboratoriami nadała dynamikę transformacji Instytutu, mającej - moim zdaniem - do dziś swoje znaczenie nie tylko dla IBB, transformacji będącej w jakimś sensie modelem reformowania instytucji badawczych w Polsce po zmianach ustrojowych. Współpraca bilateralna z instytucjami Państwa założyciela Unii Europejskiej wskazała, że to europocentryzm może być motywem naszej lokalnej polityki naukowej. Opierając się na wzorach francuskich, stowarzyszyliśmy się z Wydziałem Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, osadzając we wspólnej siedzibie wraz z IBB Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin, Zakład Genetyki, Instytut Biochemii Roślin i Interdyscyplinarne Centrum Modelowania UW, tworząc konsorcjum instytucji PAN-owskich i uczelnianych. To do dziś

http://rcin.org.pl

jest chyba jedyny w Polsce przykład takiego rozwiązania, na pewno służącego wszystkim partnerom. Tworzenie takiej nowej formy organizacji nauki stymulował proces budowy nowej siedziby IBB (w latach 1988-1994), czemu towarzyszyły gruntowne zmiany programu badawczego i rekonstrukcja zespołu. Sama budowa (tu wielkie zasługi położył Bernard Wielgat) spełniała w tym procesie reorientacji Instytutu ową zalecaną przez Kazimierza Dąbrowskiego psychologiczną funkcję dezintegracji pozytywnej, polegającej na tym, iż realizacja wspólnego celu dezintegruje, likwiduje konflikty między partnerami ów wspólny cel sobie stawiającymi. Dla porządku tylko warto zanotować, że pierwsze poważne pieniądze inwestycyjne uzyskaliśmy w roku 1990, w roku 1992 wprowadziliśmy połowę zespołu do pierwszego pawilonu, w roku 1994 (w końcu listopada) otworzyliśmy całość nowego IBB. Tylko dla przypomnienia - wydaliśmy na budowę (17 000 m^2) równowartość około 8 mln dolarów amerykańskich, w tym 1/5 pochodziła ze środków własnych Instytutu. W dodatku była to powierzchnia całkowicie, nowocześnie wyposażona. Warto o tym wiedzieć, choćby po to by móc dokonać porównania z kosztami innych inwestycji. I warto pamiętać, że wiechę na nasz gmach wciągali Wacław Gajewski z Piotrem Słonimskim (tu ukłon w stronę kaprysów historii - przecież w poprzednim rozdziale widzieliśmy ich obu w nieco innej sytuacji...). Już wspomniałem o roli, jaką spełniało w owym procesie transformacji Centrum Polsko-Francuskie, łączące nas również ze środowiskiem krajowych biologów molekularnych, szczególnie z Instytutem Chemii Bioorganicznej PAN. Warto też przypomnieć, że dorobek tego Centrum to 120 publikacji doświadczalnych, powyżej 200 komunikatów, dwa patenty. I co ważniejsze - wejście w system wspólnego kierowania pracami doktorskimi przez polskich i francuskich uczonych, który jak dotąd zaowocował ponad trzydziestoma doktoratami przedstawianymi zgodnie z zasadami doktoratu europejskiego (praca pisana w języku kongresowym, oparta o doświadczenia wykonane w laboratoriach polskich i francuskich). Ważne w transformacji Instytutu stało się powstanie jego Filii na Uniwersytecie Gdańskim, z inicjatywy prof. Karola Taylora. Cały proces tworzenia nowej struktury Instytutu znalazł wsparcie wśród naszych pracowników rozrzuconych poza granicami, zajmujących istotne pozycje w świecie nauki. Owo wsparcie wyraziło się w ich zgodzie na wejście w skład Grupy Doradczej, której członkowie odwiedzają nas często, wygłaszają wykłady, śledzą i oceniają nasze badania.

W tej nowej strukturze instytutowej znalazło się miejsce dla naukowców z krajów sąsiednich. W 1994 roku zorganizowaliśmy system stypendiów dla kolegów z Europy Środkowej i Wschodniej. Pieniądze na ten cel początkowo pochodziły z UNESCO, a potem za niepisaną zgodą z CNRS, były częścią naszych kompensat za pieniądze francuskie przeznaczone na stypendia polskich doktorantów. System tych stypendiów od początku pozostaje pod opieką prof. Szafrańskiego. I też dla pamięci warto odnotować, że w ciągu tych lat potrafiliśmy przyjąć w IBB naukowców na staże trwające łącznie ponad 120 miesięcy. UNESCO pomogło nam także w uruchomieniu programu bioinformatycznego „Polska-Izrael" wiążącego IBB z Instytutem Weizmanna. Ze strony izraelskiej wspierali nas w tym Ephraim Katzir-Katchalski, Michał Sela, Meir Edelman i Leon Esterman. Ze strony UNESCO - Dyrektor Generalny Federico Mayor. To właśnie Mayor wręczał medal UNESCO Michałowi Seli tutaj w Warszawie, a obaj wielcy naukowcy, nasi izraelscy przyjaciele - Katzir-Katchalski i Sela - uhonorowali nas wchodząc w skład Rady naszego Centrum Doskonałości. W tym samym roku stworzyliśmy w Instytucie „Fundusz powrotów", znów na początku wspomagamy przez UNESCO a przeznaczony na pierwsze potrzeby warsztatu badawczego kolegów wracających do nas z zagranicy po dłuższych stażach.

Przypominam o tym wszystkim dlatego, że ludzka pamięć jest ulotna. Część kosztów budowy i powstający wówczas system stypendialny dla doktorantów były finansowane z budżetu Instytutu. To oznaczało, że w latach 1990-1995 prowadziliśmy dość nietypową politykę finansową. Za zgodą wszystkich samodzielnych pracowników ograniczony został wzrost płac tej właśnie grupy. W sumie fundusze pozwalające na stworzenie systemu stypendiów doktorskich powstały z należnych im pensji. Była to decyzja społeczności instytutowej, o której nie wolno zapominać, decyzja wsparta autorytetem Zofii Lassotowej. Ten dziwny system, w którym pieniądze na stypendia doktoranckie pochodzą z budżetu Instytutu, działa do dziś i jakoś nikt nie zauważa, że w IBB (i innych instytutach) trwa kształcenie nowego pokolenia naukowców, nie finansowane ani przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji, ani przez Ministerstwo Edukacji Narodowej i Sportu. Tak to sobie jakoś w Polsce radzimy, chociaż nie jesteśmy rozpieszczani przez budżet.

A wracając do europocentryzmu - jakimś zwieńczeniem tego naszego kierunku działania stał się sukces Instytutu w konkursie Unii na Centra Doskonałości w krajach stowarzyszonych z UE ogłoszonym w 1998 roku. Warto wiedzieć, że na 169 instytucji naukowych z 11 krajów zostaliśmy sklasyfikowani na dziewiątym miejscu, najwyżej spośród polskich zespołów zajmujących się naukami przyrodniczymi. Jak dotąd, zespoły Instytutu w IV, V i VI Programach Ramowych sumarycznie były obecne w 20 finansowanych przez Unię projektach badawczych. Ta aktywność została zauważona, Instytut był dwukrotnie wyróżniony przez Rząd za tę część swojej działalności. Jeden z tych programów obejmuje stworzenie w Instytucie „Marie Curie Training site" Unii. Działalność Centrum, ośrodka szkoleniowego i innych programów koordynował w latach 1999-2004 Andrzej Rabczenko, za co mu chwała.

Tu kończę opis nowej struktury. Celem jej powołania było oczywiście wykreowanie warunków do podjęcia nowych wyzwań badawczych, a nie samo owej struktury stworzenie. Sądząc po liczbie realizowanych programów, po klasyfikacjach w różnych systemach ocen krajowych i zagranicznych zespoły Instytutu tę strukturę wykorzystują. Dokumentacją tego była nasza tradycyjna sesja naukowa, organizowana już po raz piąty i poświęcona omówieniu tematyki badawczej placówki. Tym razem zbiegła się ona z pięćdziesiątą rocznicą powstania Zakładu Biochemii, przekształconego po niespełna dwóch latach w Instytut.

JUBILEUSZ

Obchody pięćdziesięciolecia zorganizowaliśmy z pewną myślą. Chcieliśmy, by część oficjalna nie była ich dominantą. I tak się stało - ograniczyła się ona

http://rcin.org.pl

do dwugodzinnej uroczystej sesji Rady Naukowej, prowadzonej przez Andrzeja Paszewskiego. W jej trakcie złożono nam gratulacje, cenimy sobie szczególnie te od Premiera Rządu RP oraz od prof. Andrzeja Legockiego, Prezesa PAN i naszego przyjaciela. Wielu pracowników Instytutu otrzymało odznaczenia państwowe. Szczególnym momentem i znakiem istnienia owej specjalnej więzi łączącej społeczność „instytutową" stało się wręczenie zasłużonej naszej profesurze wyróżnień Molecular Research Center. W imieniu dr Piotra Chomczyńskiego, Prezydenta MRC, wręczała je Jego córka, Dorota Mochnacka. Owe wyróżnienia (dyplom i zestaw pamiątkowych monet) otrzymali profesorowie Wierzchowski, Szafrański, Szarkowski, Jeżewska, Wielgat, Chojnacki, Shugar, Buchowicz, Hulanicka i autor tego szkicu. Po tej części pożegnaliśmy lampką wina pięćdziesiąt lat Instytutu i wróciliśmy do pracy. Przez cztery następne dni w ramach konferencji „Comparative Genomics for Health and Environment" nasi pracownicy oraz krąg współpracowników i przyjaciół IBB przedstawiali swoje najnowsze wyniki. Wykłady wygłosili Piotr Słonimski (CGM CNRS, Gif-sur-Yvette); Witold Filipowicz (FMI, Bazylea), Grzegorz Węgrzyn (Uniwersytet Gdański, Gdańsk), Gunter Kahl (Wolfgang Goethe Universitat, Hamburg), Katarzyna Bębenek (NIH, Research Triangle Park), Roel Schaaper (NIH, Research Triangle Park), Jolanta Jura (Uniwersytet Jagielloński, Kraków), Maciej Żylicz (Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa), Jadwiga Chroboczek (Institute Biologie Structurale, CNRS, Grenoble), Hilary Koprowski (Thomas Jefferson University, Philadelphia), Ryszard Kole (Lineberger, Comprehensive Cancer Center, Chapel Hill), Paweł Henryk Herzyk (Institute of Biomedical and Life Sciences, Glasgow), Aleksander Spirin (Institute of Protein Research, Pushchino). Kolejnym sesjom poświęconym pracom zespołów instytutowych współprzewodniczyli goście honorowi Wacław Szybalski (McArdle Institute, Wisconsin), Judy Campbell (University of California), Christian Kubicek (Vienna University of Technology), Anna El'skaya (Institute of Molecular Biology and Genetics, Kiev), Aleksander Edelman (Hopital Necker, Paryż). Konferencja stała się swoistym przeglądem pól badawczych zaawansowanej biologii molekularnej. Piotr Słonimski wprowadził słuchaczy w paradygmaty genomiki, Hilary Koprowski omówił nowe podejścia do uzyskiwania szczepionek, Witold Filipowicz przedstawił sprawę udziału regulacyjnych RNA w kontroli ekspresji genetycznej u eukariontów. Ryszard Kole wskazał nowe metody kontroli składania genów w organizmach ssaków. Program konferencji pozwala na zdanie sobie sprawy z zakresu badań rozwijanych w Instytucie w 2004 roku. Jasne, że ważnym wśród nich jest genomika, zresztą konferencję otwierał referat jednego z twórców tej nowej dziedziny biologii. Biologia molekularna roślin w Instytucie koncentruje się wokół reakcji roślin na stres, umieszcza też te badania w aktualnym kontekście rozwoju nauki światowej. Interesują nas również próby otrzymywania szczepionek doustnych opartych o ekspresję wybranych antygenów w roślinach. To dlatego uhonorował nas swoim wykładem Hilary Koprowski, twórca szczepionki przeciw polio, dziś animator programów szczepionkowych opartych o transgeniczne rośliny.

Jedną z naszych specjalności są badania nad mutagenezą, dotyczące zarówno mechanizmów generalnych, jak i swoistych, związanych z onkogenezą. Zespoły zajmujące się czynnością określonych genów prowadzą te analizy stosując podejście całościowe, ujawniające związki między działaniem badanego genu a ekspresją innych elementów genomu. Takie eksperymenty otwierają drogę do pełnego spojrzenia na czynności komórki i oznaczają, iż Instytut

Zespół Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w dniu wejscia Polski do Unii Europejskiej - 1 maja 2004 roku (zdjecie, L. Laskowski).

http://rcin.org.pl

zaczyna wchodzić aktywnie w rodzący się nowy paradygmat przyrodoznawstwa – biologię systemów. Ta oczywista tendencja w istocie zawarta jest w wielu wystąpieniach, podczas sesji IV i V. Tu warto wspomnieć, iż w ostatnim wykładzie gościnnym Aleksander Spirin, jeden z twórców wiedzy o mechanizmach syntezy białka, przedstawiał techniki otrzymywania białek na skalę masową w zrobotyzowanych układach biologicznych.

Nie chcę poświęcać więcej miejsca omawianiu naszej sesji jubileuszowej, zainteresowanych skierowuję do opublikowanych materiałów „Comparative Genomics for Health and Environment". Nie mogę jednak w tym miejscu nie wspomnieć o czterech pracach opublikowanych właśnie w okresie przygotowań i trwania naszej konferencji. Michał Dadlez dokładnie w dniu otwarcia konferencji przekazał mi szczotkę pracy „Global proteomic approach unmasks involvement of keratins 8 and 18 in the delivery of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)/ ΔF508-CFTR to the plasma membrane", Proteomics 4, 3333-3844, 2004, poświęconej mechanizmowi mukopoliwiscydozy. Jej autorzy wskazali, iż mutacja w kanale chlorkowym powodująca tę chorobę nie prowadzi do utraty aktywności kanału. Wywołuje za to zupełnie niespodziewany efekt – zmutowany kanał zostaje związany w cytoplazmie przez keratynę 8 – białko cytoszkieletu i nie przedostaje się do błony komórkowej. Jeśli zmniejszy się syntezę owej „kotwicy" – keratyny 8, to zmutowany kanał „wyskakuje" na powierzchnię, inkrustuje błonę i jest w pełni czynny. To zupełnie nowe spojrzenie na patogenezę tej ciężkiej choroby, w oczywisty sposób otwierające swoiste perspektywy farmakologiczne (choćby oparte o syntezę peptydów zmniejszających interakcję zmutowanego kanału z keratyną 8) i diagnostyczne. Drugą pracę wręczyła mi – także w trakcie konferencji – Małgorzata Łobocka. Publikacja „Genome of Bacteriophage P1" traktuje o genomice faga P1, podaje pełną sekwencję faga i profaga i analizuje wszystkie ramki odczytu zawarte w tej sekwencji. Jak na pracę doświadczalną jest ona w pewien sposób ekstrawagancka – liczy aż 34 strony. Redakcja Journal of Bacteriology (21, 7032-7068, 2004), nie tylko przeznacza na nią tyle miejsca, ale i opatruje ją komentarzem redakcyjnym, a co więcej – poświęca jej okładkę numeru. Praca już odnotowana została w Nature, szykowane jest jej omówienie w biuletynie American Microbiological Society. Na pewno będzie trwałym odnośnikiem literaturowym, dotyczącym faga, którego pochodną jest plazmid pBR i którego badania doprowadziły do poznania mechanizmów restrykcji i modyfikacji. Pełne poznanie jego genomu otwiera nowe perspektywy w badaniu współzależności między ekspresją genomu faga i komórki gospodarza. Znając tę sekwencję łatwo na przykład skonstruować mikrouszeregowania DNA faga i śledzić jego cykl życiowy w czasie – *in toto*. Nie muszę tu podkreślać, jak ważna jest znajomość genomów fagów w perspektywie myślenia o fagoterapiach. Trzecią publikacją, ogłoszoną w końcu sierpnia 2004 jest praca Marka Zagulskiego i współpracowników „High Coding Density on the Largest Paramecium tetraurelia Somatic Chromosome" (Curr. Biol. 14, 1397-404, 2004) podająca sekwencję najdłuższego chromosomu somatycznego *Paramecium*. Autorzy przedstawiają też analizę informatyczną sekwencji, podają listę zawartych w niej genów. To wyniki o znaczeniu – jak i poprzednie – trwałym. Jest to druga praca tego zespołu poświęcona poznaniu genów orzęska, ważna bo pozwoliła na stworzenie narzędzi informatycznych używanych w tej chwili przez „Genoscope" J. Weissenbacha do analizy i uporządkowania pełnego genomu *Paramecium*. Genom ten zawiera najprawdopodobniej 35 000 genów, jest więc pewnie nieco większy niż ludzki. Jego pełne sekwencjonowanie jest w tej chwili największym projektem genomicznym w Europie, a nasze w nim uczestnictwo jest znaczące. Oczywiście wysiłek zespołu Marka Zagulskiego wpisuje się na trwałe w fundamenty wiedzy o genomice porównawczej. W kilka dni po konferencji Andrzej Kierzek przekazał nam kopię artykułu w Nature 432 (695-716, 2004), którego jest współautorem („Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perpectives on vertebrate evolution", autorzy: International Chicken Genome Sequencing Consortium). Kierzek jest jednym sponad stu autorów tej publikacji, a IBB, gdzie wykonuje badania, znalazł się wśród pięćdziesięciu głównych instytucji światowych prowadzących badania genomiczne. Praca ta to jeden z kamieni milowych w genomice porównawczej, opisuje pełny genom ptaka (20-23 000 genów) i wskazuje na zasadnicze elementy architektury chromosomów kręgowców. I znów – będzie ona stanowić trwały wkład do światowej wiedzy biologicznej. Tak więc w końcu 2004 roku, w swoje pięćdziesięciolecie Instytut, dzięki wspomnianym badaniom, znajduje się w głównym nurcie nowego paradygmatu – ujęć genomicznych problemów biologii.

Co dodać do tego opisu stanu badań w Instytucie? Nie odmówię sobie zanotowania tu zdania jednego z Gości sympozjum prof. Andre Goffeau (Universite Catholique Louvain). Goffeau, szef europejskiego programu sekwencjonowania drożdży (w którym zresztą braliśmy aktywny udział w latach 1993-1996), w czasie spotkania oceniającego działalność Instytutu, kończącego konferencję powiedział wprost: „takiego Instytutu, tak pracującego my w Belgii – nie mamy". Niech ten komplement z ust jednego z najpoważniejszych autorytetów nauki europejskiej zakończy omówienie naszych aktualnych badań.

PERSPEKTYWY

Zajmowanie się futurologią, rozpoznaniem przyszłości, szczególnie przyszłości nauki to zadanie wdzięczne dla odpowiednich ciał zbiorowych. Ale – mniej ironicznie – pewne rzeczy, szczególnie dotyczące bliskiej przyszłości, przewidzieć można, można je też (i nawet pewnie należy) planować. Z punktu widzenia technicznego przewidujemy i planujemy kilka istotnych uzupełnień potencjału metodycznego Instytutu. W 2005 roku otworzymy pracownię mikroskopii (mikroskop konfokalny, doposażenie, mikroskop fazowy). Techniki mikroskopowe są istotnym składnikiem metod badawczych zespołów zajmujących się podejściami całościowymi do biologii komórki. Zostanie zakończona organizacja platformy proteomicznej, laboratorium organizowanego w przestrzeniach rezerwowych Instytutu (gmach D). Mamy zamiar otworzyć pracownię hodowli komórek zwierzęcych z prawdziwego zdarzenia (największe zainteresowanie tym wyrażają zespoły zajmujące się mutagenezą i naprawą DNA oraz wirusologiczne). Ta inicjatywa może być wspierana w ramach programu Krajowego Centrum Doskonałości powołanego przy Instytucie przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji.

http://rcin.org.pl

W ramach działania Kampusowego Centrum Zaawansowanych Technologii planujemy utworzenie kolejnej platformy Molekularnej Diagnostyki Medycznej. Jej program jest naturalnym rozwinięciem działań Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy DNA kierowanej przez dr Marka Zagulskiego. Za rozwojem badań nad biologią molekularną roślin winien dążyć rozwój technik tej dziedziny. Mamy zamiar wkrótce podjąć działania dążące do stworzenia nowej hali fitotronowej wraz z odpowiednią, bezpieczną biologicznie szklarnią. Czas rozważyć poważne przesprzętowienie informatyki Instytutu, szczególnie w tle rosnącego w kraju zapotrzebowania na usługi European Molecular Biology Network, którego główny węzeł osadzony jest w IBB. Warto tu wspomnieć, iż z tych baz danych korzysta dziś już ponad 1000 abonentów i że nasze serwery gromadzą wciąż rosnące światowe dane genomiczne i strukturalne, udostępniają je całemu środowisku krajowemu.

Wszystkie te plany oparte są o mniej lub bardziej realne perspektywy finansowe. Liczymy przynajmniej po części na fundusze strukturalne UE przeznaczone na wsparcie rozwoju nowych technik, po części na środki krajowe. Jeśli chodzi o te pierwsze, to wyrównywanie poziomów cywilizacyjnych w krajach UE (czemu te fundusze mają służyć) jest strategią osadzoną w rzeczywistości politycznej Europy. Sądzę, że ów instytutowy europrocentryzm, o którym uprzednio wspomniałem, w następnych latach przyniesie rzeczywiste wzmożenie rozwoju bazy badawczej w kraju. Również i ta świadomość, a nie tylko generalne rozważania geopolityczne powodowała, że tak cieszyliśmy się 1 maja 2004 roku z wejścia Polski do Unii Europejskiej, wywieszając flagi polską i unijną na frontonie Instytutu. I właściwie ten europocentryzm pozwala nam na rozsądne planowanie najbliższej przyszłości. Programy naukowe Instytutu będą w sumie determinowane przez programy ramowe Unii. A tu będzie trwać wyraźna dominacja tego, co skrótowo się określa jako bio-info-med. I dominować będą dążenia do komercjalizacji osiągnięć tych dziedzin. Czy Instytut wniesie do tych programów swój udział? Na pewno zespoły IBB będą - jak już się dzieje - uczestniczyły w różnego rodzaju programach europejskich. Naszą siłą jest oczywiście doświadczenie w genomice i informatyce, zdobyte w ostatnim dziesięcioleciu i stanowiące dziś o swoistości kultury naukowej IBB. Naszą siłą jest też osiągnięcie przyzwoitego światowego poziomu w dziedzinie stosowania różnorodnych technik współczesnej biologii molekularnej. Łatwo zauważyć, że tematyka Instytutu jest dość zróżnicowana, ale wszystkie zespoły operują pewnym uwspólnionych *modus operandi* - zestawem opanowanych podstawowych technik badawczych biologii strukturalnej i genetyki molekularnej. W zasadzie można tu zaproponować analizę czynności i struktury dowolnego genu i jego produktu, co kilkanaście lat temu było dość odległą technicznie perspektywą. Paradoksalnie ów szeroki (zbyt szeroki zapewne) wachlarz tematyczny - przy osiągniętym wysokim poziomie technicznym - jest swojego rodzaju zaletą naszej jednostki. Tworzy to z Instytutu całość zdolną do łatwego absorbowania nowych tematyk, do elastycznego reagowania na wyzwania i, co istotne, do podejmowania współpracy z różnymi zespołami w zakresie tematyk koncentrujących w danej chwili uwagę środowisk naukowych czy decyzyjnych. Ta elastyczność leży u podłoża uczestnictwa Instytutu w systemach grantowych, czego dowodem jest nasza obecność w programach Unii, NIH, NATO, MNiI. Sądzę, że jest ona pochodną atmosfery wolności nauki w istocie panującej od zawsze w Instytucie. Wierzę, że w następnych latach ta zasada nie ulegnie zmianie i że żadna parametryzacja nie zastąpi tu szacunku dla wysiłku poznawczego i zdrowego rozsądku. To właśnie tę postawę ciągłego zainteresowania nowym i rozbudowaną zdolność do uczestnictwa w rozwoju naszej dziedziny wnosimy do działań badawczych kontynentu. A jej nosicielami wierzę, że będą kolejne fale naszych doktorantów (było ich w IBB w końcu roku 2004 ponad stu), już w tej chwili będących liczącą się w Europie grupą młodych biologów molekularnych.

Jeśli chodzi o kontekst krajowy, to sprawy są mniej jasne. Niezdefiniowany dziś stosunek do roli nauk podstawowych w polskim społeczeństwie jest tylko pochodną ogólnego niezdefiniowania reguł działania owego społeczeństwa, ciągle jakby po omacku szukającego zapomnianych prostych zasad. Rozhuśtani między prymitywnymi opowieściami o liberaliźmie ekonomicznym a spaczonym solidaryzmem, szukamy wciąż formuły porządku wewnętrznego, zapewniającego to, co ładnie po angielsku nazywa się *sustainable development*. Warto tu przypomnieć, iż jedną z takich prostych zasad w uporządkowanych społeczeństwach jest zapewnienie naukom podstawowym odpowiedniego miejsca. Skrajne propozycje społeczne w przypadku nauki niosą swoiste zagrożenie, solidaryzm roszczeniowy może wyrodzić się w stagnację, komercjalizacja nauki - w hucpę. Obie rzeczy są dla rozwoju nauki niebezpieczne. Jeśli chodzi o tę drugą, to liczne doświadczenia z tzw. „poprzedniego okresu" mówią, iż dominacja myślenia o nauce tylko w kategoriach zastosowań kończy się źle. Jak często powtarza Federico Mayor: „po to, by mieć naukę stosowaną, najpierw należy mieć naukę". Oczywiście w naszej dziedzinie myślenie praktyczne jest jednym z motorów badawczych. Ale nie należy się poddawać myśleniu życzeniowemu i tworzyć na użytek inwestora czy grantodawcy mitów o naszej wszechmocy. Wydaje mi się, że zespoły Instytutu nie zgrzeszą tu przeciw zdrowemu rozsądkowi, choć będzie to wymagać wysiłku, bowiem myślenie magiczne wcale nie odeszło z poprzednio dominującą filozofią tyle, że objęło inne cele życiowe. Wygląda na to, że tak jak w poprzednim okresie, kto nie obieca gruszek na wierzbie, nie będzie chętnie widziany na świeczniku. Ale to jest po prostu los naukowca. Nie być handlarzem idei, tylko ich analitykiem. Sądzę, że tego typu funkcja społeczna nauki będzie w sumie zauważona i że znajdziemy może niewystarczające, ale jednak wsparcie Państwa. Niestety wydaje się, że czeka nas też wzrost konfliktów nauki z administracją. Jego źródłem będzie narastający nadmiar prawa. Problem dotyczy całego naszego społeczeństwa, ale nauka jest na to bardzo wyczulona. Wraz z innymi będziemy się parać z lokalnym mętniactwem prawnym, ubierającym się w piórka międzynarodowości, zakłócającym ciągłość działania i będącym wyrazem chęci kontroli nad każdym przejawem życia. Warto tu tylko przypomnieć, że „nadmiar prawa jest bezprawiem", bo daje pole woluntaryzmowi. Poważnej nauki nie da się uprawiać w „przeregulowanym" systemie, ponieważ krępuje on inwencję. Żeby i tu znaleźć jakiś element optymistyczny, można powiedzieć, że i systemy prawne mają tendencję do samooczyszczania się, jednak pod warunkiem działania

http://rcin.org.pl

światłych ludzi. Wierzę (może nawet wiem), że typ kultury naukowej wypracowany w Instytucie, oparty o swobodę badań, szacunek dla osiągnięć i cenienie innych, ma swoją wartość oczywistą dla nas, ale i stanowi jakiś wzór środowiskowy.

Trybuna Ludu
ORGAN KOMITETU CENTRALNEGO POLSKIEJ ZJEDNOCZONEJ PARTII ROBOTNICZEJ

TRYBUNA LUDU NR 277 (2789)
Z 4 PAŹDZIERNIKA 1956 ROKU

W ŚWIECIE NAUKI I TECHNIKI

TRADYCJE, KTÓRE NIE MOGĄ WYGASNĄĆ

• Nauka podstawowa dla wszystkich gałęzi biologii • 3.000 biochemików w W. Brytanii • Polska niegdyś niegdyś czołówce światowej

Prof. Józef Heller

Wiele się dzisiaj słyszy i czyta o biochemii jako nauce podstawowej dla wszystkich gałęzi biologii - medycyny, nauk rolniczych itp. Biochemia jest nauką stosunkowo młodą, istnieje bowiem dopiero od lat około 80. Początkowo zajmowała się składem chemicznym żywych istot i starała się wyświetlić zachodzące w nich procesy chemiczne. Badała więc, jak ustroje budują z pokarmów swoją substancję żywą i jak przez rozkład swoich składników uzyskują potrzebną energię, i wreszcie, jakie przy tym powstają i są wydalane odpadki.

Przed 20 mniej więcej laty biochemia osiągnęła wielkie sukcesy w wyjaśnieniu przemian odbywających się podczas pracy mięśni. Osiągnięcia te stały się punktem wyjścia dla rewolucyjnego wprost rozwoju innych gałęzi biochemii w ciągu ostatnich 15 lat.

Badania nad mięśniami dały nowy sposób patrzenia na procesy biochemiczne, stworzyły nowe problemy, które dla swego rozwiązania wymagały nowej, udoskonalonej techniki.

Nowoczesna biochemia wprzęgła więc na swe usługi udoskonalone metody fizykochemiczne i fizyczne - specjalnie przystosowaną spektrofotometrię obejmującą pomiary widma w częściach niewidzialnych, oznaczanie gęstości elektronowej promieniami rentgena, badania przy pomocy mikroskopu elektronowego i wiele innych. Specjalnie dla potrzeb biochemii skonstruowano ultrawirówki dające kilkadziesiąt, a nawet setki tysięcy obrotów na minutę. Zawodne obserwacje okiem zastąpiono przez obiektywne zapisywanie wyników przy pomocy światłoczułej komórki i sprzętu elektronowego. Ukoronowaniem rozwoju metodyki biochemicznej było wprowadzenie na krótko przed ostatnią wojną izotopów promieniotwórczych do znakowania w związkach chemicznych. Dzięki udoskonalonej technice można było wnikać coraz głębiej w istotę przemian odbywających się w żywych ustrojach.

Dzisiejsza biochemia stawia sobie za zadanie **wyjaśnienie wszystkich zjawisk biologicznych jako określonych reakcji chemicznych pomiędzy ściśle określonymi cząsteczkami chemicznymi.** Sięga ona zatem głębiej w istotę życia, niż inne nauki, stając się **podstawą wszystkich nauk biologicznych.** Wyjaśni to może najlepiej przykład.

Często występująca choroba cukrowa polega na tym, że trzustka chorego nie wytwarza w potrzebnej ilości hormonu - insuliny. Insulina jest stosunkowo prostym ciałem białkowym, którego budowa została wyjaśniona w ostatnich latach, tak że synteza tego hormonu weszła w sferę co najmniej teoretycznej możliwości. Zastrzyknięcie choremu insuliny usuwa wszelkie objawy cukrzycowe: zmniejsza się zawartość cukru we krwi, ustaje wydalanie cukru w moczu, a w wątrobie odkłada się, jak u zdrowego, glikogen, tj. ciało macierzyste cukru zwierzęcego. Znając te fakty, lekarz i fizjolog twierdzą, że rozumieją działanie insuliny. Biochemikowi to nie wystarcza. Podejrzewa on, że insulina hamuje działanie enzymu heksokinazy, dzięki któremu przyłącza się kwas fosforowy do 6-ego węgla glikozy (tj. cukru występującego powszechnie u żywych istot). Reakcja ta jest jedną z kilkudziesięciu poznanych kolejnych reakcji prowadzących do „spalenia" w ustroju cukru na wodę i dwutlenek węgla. Dotąd jednak nie udało się doświadczalnie potwierdzić tego podejrzenia i dlatego biochemik uważa, że nie wyjaśnił jeszcze roli insuliny.

Biochemia nie stawia sobie bezpośrednio celów praktycznych, ale liczne jej osiągnięcia znajdują od razu praktyczne zastosowanie. Znowu wyjaśni nam to przykład.

W r. 1944 biochemik T. Mann podjął w Cambridge badania nad biochemią nasienia zwierzęcego. Już po roku odkrył w nim obecność fruktozy, a w ciągu następnych dwóch lat wypracował długo poszukiwaną próbę na przydatność nasienia do sztucznego zapładniania zwierząt użytkowych. Próba ta oparta na metabolizmie fruktozy w nasieniu została natychmiast wprowadzona jako ogólnie obowiązująca we wszystkich angielskich stacjach zootechnicznych.

Biochemia wykazuje obecnie ogromne tempo rozwojowe, mimo że wymaga bardzo kosztownej aparatury i bieżących kosztów na odczynniki. **Kadry biochemików rosną na Zachodzie bardzo szybko.** Angielskie Towarzystwo Biochemiczne liczy dziś już około **3 tys. Członków,** w USA jest biochemików **znacznie więcej**. Miesięcznie ukazuje się na świecie około **300 prac z zakresu „czystej" biochemii, a 900 do 1200 łącznie z biochemią kliniczną, zwierzęcą, roślinną itp.** Biochemia rozszerza się na coraz nowe dziedziny, powstaje biochemia genetyczna, cytochemiczna, immunochemiczna itd. Obok biochemii wyrasta, w ścisłym z nią związku, nowa nauka - biofizyka. Powstają nowe instytuty i czasopisma obsługujące łącznie obie te pokrewne nauki.

JAK się na tym tle przedstawia biochemia polska?

Biochemia polska **do ostatniej wojny światowej zajmowała poczesne miejsce w nauce światowej.** Jednym ze współtwórców polskiej biochemii był **Marceli Nencki**. Nie dane mu było pracować w kraju. Słusznie uważamy go za pierwszego biochemika polskiego, nie zaprzeczając przez to tytułu ojca biochemii rosyjskiej, który mu przyznają nasi koledzy radzieccy. Młodszy od niego **Leon Marchlewski** rozpoczął swoje działania w Krakowie z początkiem bieżącego wieku i umarł tuż po drugiej wojnie światowej. Zasłużył się zwłaszcza w badaniach nad chlorofilem, zielonym barwnikiem roślin. W okresie dwudziestolecia działali wybitni uczeni: **Białaszewicz, Parnas i Przyłęcki.** Parnas był jednym z trzech uczonych (Embden, Meyerhof, Parnas), od któ-

http://rcin.org.pl

rych przemiany chemiczne w mięśniu określa się jako cykl E. M. P. Uczeni ci wychowali uczniów, którzy dzisiaj zajmują większość kierowniczych stanowisk w biochemii polskiej. Ich warsztaty naukowe były zaopatrzone jak przeciętne dobre pracownie światowe, co przy ówczesnym poziomie techniki naukowej nie było tak trudne jak dzisiaj.

Z grona badaczy, których nazwiska spotykało się przed wojną w światowych pismach przeżyła wojnę i stanęła do pracy zaledwie trzecia część - w zniszczonych pracowniach, przy zdekompletowanych lub zupełnie zniszczonych bibliotekach. Równocześnie ogromnie wzrosły zadania przez rozrost wyższych szkół i szybkie organizowanie instytutów badawczych na skalę nieznaną w okresie przedwojennym. W zdumiewająco krótkim czasie praca w katedrach biochemii potoczyła się normalnie, pojawiły się pierwsze powojenne prace naukowe, a nawet na miejsce wyczerpanego jednego podręcznika przedwojennego pojawiły się w przeciągu trzech lat dwa nowe podręczniki. Tak więc biochemia polska, pokonawszy w pierwszych 3 - 4 latach wielkie trudności organizacyjne, wywiązała się na swoim odcinku z zadania odbudowy i mogła słusznie liczyć na poparcie i opiekę nad dalszym swym rozwojem.

Niestety, lata następne nie spełniły tych nadziei. Nie doceniono początkowo znaczenia biochemii dla całości nauk przyrodniczych i lekarskich. Nie doceniono rewolucyjnego postępu techniki badań na Zachodzie, wymagającego odmiennego i kosztowniejszego wyposażenia technicznego. Nie doceniono wreszcie trudności kadrowych w zakresie biochemii.

Brak u nas kierunku studiów, który by kształcił specjalistów biochemików. Wyszkolenie biochemika zaczynać się u nas musi dopiero po uzyskaniu przez niego dyplomu lekarza, magistra chemii, biologii, lub farmacji. Wobec braku odpowiednich instytutów, szkolenie to odbywa się na skalę „chałupniczą" przez nieliczną garstkę specjalistów, przeciążonych praca dydaktyczną. Przyrost wyszkolonej kadry odbywa się powoli, pozostaje znacznie w tyle za rosnącymi potrzebami.

W tych warunkach polepszenia sytuacji można oczekiwać tylko w razie **koncentracji wysiłków, w razie skupienia rozporządzalnych sił kierowniczych, zakupu nowoczesnej aparatury, stworzenia odpowiedniej bazy bibliotecznej i zapewnienia odpowiednio przystosowanych pomieszczeń,** jednym słowem – w razie stworzenia specjalnego **Instytutu Biochemii i Biofizyki.**

W maju 1952 r. powstał Komitet Biochemiczny Polskiej Akademii Nauk. Dzięki poparciu PAN rozwinął się dział biochemii PZH jako zalążek przyszłego instytutu. W dwa lata później, Akademia powołała własny Zakład Biochemii.

Zakład Biochemii od chwili swego powstania wprowadził współczesne kierunki i metody badawcze. W oparciu o poprzedni dorobek działu biochemii PZH udało się skupić w Zakładzie poważne grono samodzielnych pracowników naukowych i wyszkolić pokaźny zastęp młodszych pracowników, którzy mogą się już wykazać pięknym dorobkiem naukowym. W Zakładzie pracuje obecnie czterech profesorów i pięciu docentów, chęć przystąpienia, w razie przekształcenia Zakładu na Instytut, zgłosił jeden profesor i dwóch docentów.

Niestety zespół ten, który ze względu na swą liczebność i ciężar gatunkowy, mógłby zapewnić szybki rozwój biochemii w Polsce, odrobienie naszych zaległości i zacofania – nie rozporządza odpowiednią bazą materialną. Przede wszystkim brak Zakładowi własnego lokalu. Mieści się on w pięciu punktach. Wszystkie pracownie mieszczą się wspólnie z odpowiednimi katedrami Akademii Medycznej, SGGW i z pracowniami PZH. W tych warunkach Zakład nie może wchłonąć odpowiedniej ilości młodych pracowników, ani potrzebnej ilości pracowników naukowo-technicznych.

Drugą, niemniejsza bolączką, jest **brak nowoczesnej aparatury.** W latach ubiegłych importowano do kraju niemało nowoczesnych przyrządów biochemicznych, ale trafiały one przede wszystkim do instytutów resortowych, a nawet do laboratoriów zakładów produkcyjnych, gdzie nie były ani tak bardzo potrzebne, ani odpowiednio wykorzystane. Pracownicy Zakładu nie chcąc rezygnować z nowoczesnych metod, korzystają z mniejszej lub większej gościnności innych zakładów.

Mimo tych trudności Zakład ogłosił już około **40 prac naukowych** i nawiązał szerokie kontakty z biochemikami różnych krajów. Zwłaszcza żywo przebiega **współpraca z pokrewnymi zakładami Czechosłowacji i Węgier, z którymi częściowo wspólnie planujemy i opracowujemy problemy naukowe i wymieniamy czasowo pracowników.** W obecnych jednak warunkach wiele wysiłków idzie na marne, a każdy osiągnięty wynik wymaga nieproporcjonalnie dużego wysiłku.

Czas najwyższy, żeby skończyć z obecną sytuacją w biochemii. Od wielu lat podnoszone są ze strony innych nauk słuszne żądania pomocy od biochemii, którym ze względu na trudności lokalowe i braki w aparaturze, nie możemy zadośćuczynić. Brak aparatury i lokalu nie pozwala na kształcenie, w nowoczesnych warunkach, młodej kadry, która powinna zasilić pracownie nauk pokrewnych. Wiadomości fachowe i zapał poważnej grupy doświadczonych pracowników nauki marnuje się i rozprasza na pokonywanie codziennych trudności. Należy przekształcić Zakład Biochemii PAN w nowoczesny Instytut Biochemii i Biofizyki, zapewnić mu odpowiedni własny lokal i aparaturę naukową.

SPROSTOWANIE

W sprawozdaniu z Konferencji „Modyfikowane Kwasy Nukleinowe" poświęconej pamięci profesora Bronisława Filipowicza, napisanym przez Marka Gniazdowskiego, Leszka Szmigiero i Dorotę Wilmańską, które zostało opublikowane w Postępach Biochemii, tom 50, zeszyt 4, str. 392-394 (2004), zamieszczono na stronie 393 karykaturę profesora Filipowicza z 1950 roku wykonaną przez Leszka Woźniaka, wówczas studenta Wydziału Lekarskiego, później profesora i rektora Akademii Medycznej w Łodzi (karykatura wykorzystano za zgodą autora). Niestety, karykatura została opublikowana bez właściwego opisu, za co jej autora oraz autorów sprawozdania redakcja serdecznie przeprasza.

http://rcin.org.pl

Wskazówki dla Autorów

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Prace przeznaczone do publikacji w „Postępach 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 „Postępach 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 opinie 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 „Postępów Biochemii", w którym ukazał się jego artykuł.

WSKAZÓWKI SZCZEGÓŁOWE:

Przed przystąpieniem do napisania artykułu Autorzy są proszeni o zapoznanie się z najnowszym numerem „Postępów 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

http://rcin.org.pl

przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady:

1. Jiang QX, Wang DN, MacKinnon R (2004) Electron microscopic analysis of KvAP voltage-dependent K^+ channels in an open conformation. Nature 430: 806-810
2. Toyoshima C, Inesi G (2004) Structural basis of ion pumping by Ca^{2+}-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. Annu Rev Biochem 73: 269-292
3. Dołowy K, Szewczyk A, Pikuła S (2003) Błony biologiczne, Wydawnictwo Naukowe Śląsk, 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. Darżynkiewicz 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. Ilustracje i tabele prosimy przesyłać 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 czerń i biel).

Prace w formie elektronicznej prosimy przesyłać 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

Komunikat Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

SKŁADKI CZŁONKOWSKIE I PRENUMERATA „POSTĘPÓW BIOCHEMII" W 2005 ROKU

Składka członkowska Towarzystwa w 2005 roku wynosi dla członków rzeczywistych 80 zł, dla członków studentów 40 zł (w tym roczna prenumerata „Postępów Biochemii"); małżeństwa mogą opłacać składki w wysokości 120 zł (80 + 40). Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską do 30 czerwca 2005 roku, mają zapewnioną bezpłatną prenumeratę kwartalnika „Postępy Biochemii". Członkowie, którzy opłacą składkę po tym terminie, będą otrzymywać kwartalnik do czasu wyczerpania się zapasów magazynowych. Powyższe zmiany nie dotyczą członków honorowych Towarzystwa. Natomiast członkowie-emeryci, nadal zwolnieni z opłacania składki członkowskiej, płacą jedynie 30 zł za roczną prenumeratę „Postępów Biochemii". Osoby, które nie są członkami Towarzystwa, mogą być prenumeratorami „Postępów Biochemii". Koszt prenumeraty w 2005 roku wynosi 100 zł (w tym koszty wysyłki). Biblioteki płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii" (wraz z kosztami wysyłki) 140 zł.

UWAGA: ZMIANA NUMERÓW KONT POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Składki członkowskie Towarzystwa i należności za prenumeratę kwartalnika „Postępy Biochemii" prosimy wpłacać na konto:

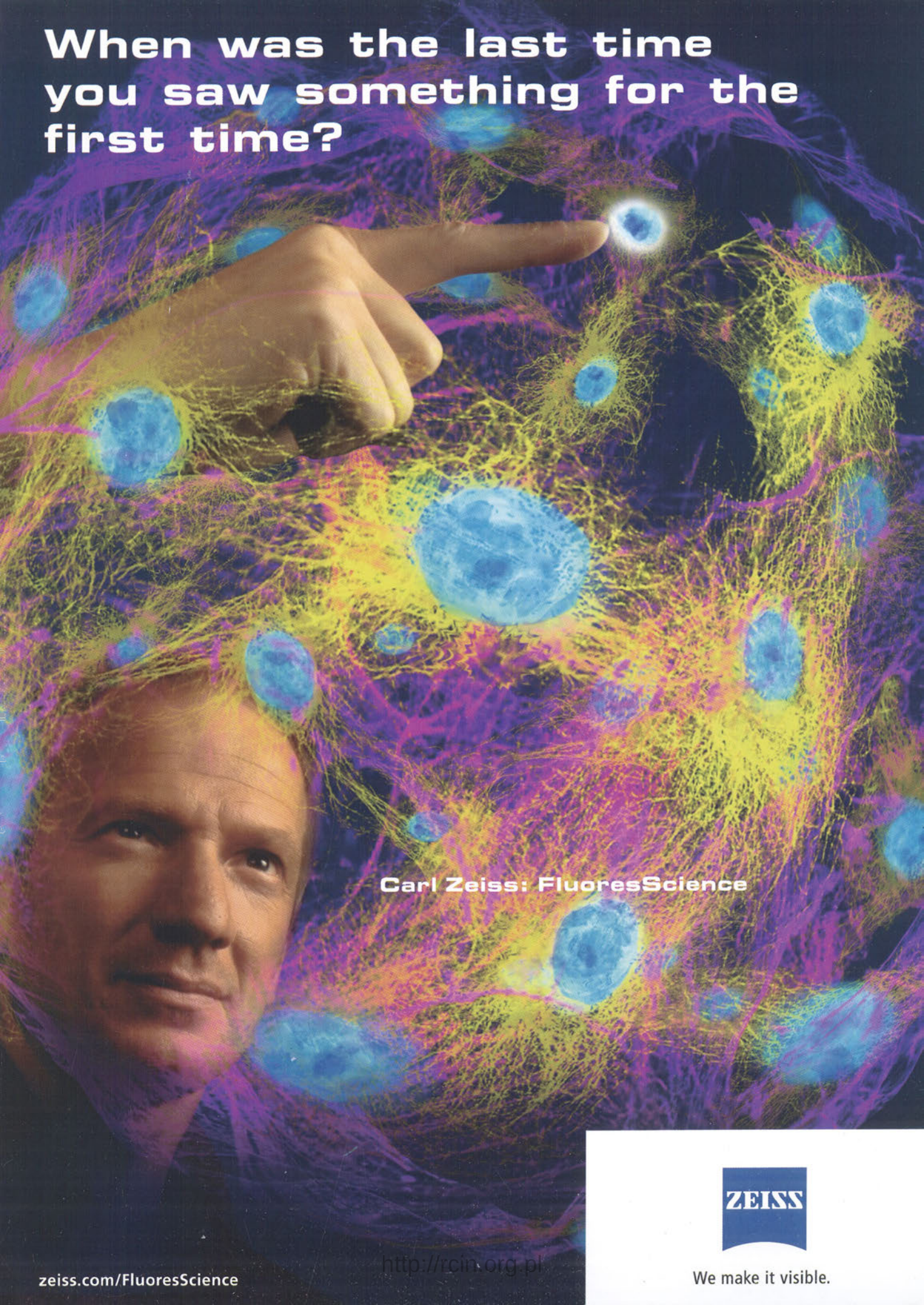
BPH PBK S.A. ODDZIAŁ W WARSZAWIE, UL. KRUCZA 24-26,
NR KONTA 95 1060 0076 0000 4110 5000 0371.

Wpłaty za prenumeratę kwartalnika „Acta Biochimica Polonica" należy dokonywać na konto:

BPH PBK S.A. ODDZIAŁ W WARSZAWIE, UL. KRUCZA 24-26,
NR KONTA 35 1060 0076 0000 4110 5000 0384.

dr Anna Dygas
skarbnik Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

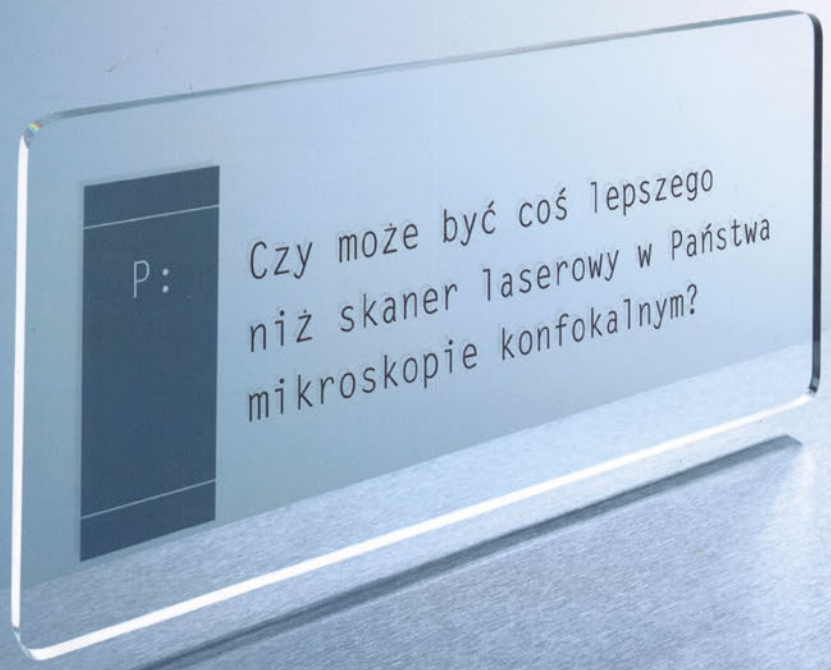
http://rcin.org.pl



http://rcin.org.pl

OLYMPUS

Your Vision, Our Future



O: TAK DWA SKANERY LASEROWE

Odpowiedź jest prosta: nowy mikroskop konfokalny Olympus FluoView FV1000 pracuje z dwoma skanerami, a nie jak inne podobne systemy, tylko z jednym. Wprowadzenie dodatkowego skanera stwarza zupełnie nowe możliwości w analizie żywych komórek, rozwiązuje problem utraty danych podczas rejestracji procesów. W systemach konfokalnych poprzedniej generacji do pobudzania komórek i do obserwacji używany był jeden tylko układ skanujący. Powodowało to, że niemożliwe było rejestrowanie szybkiej odpowiedzi komórek podczas i bezpośrednio po stymulacji. Dwa zsynchronizowane układy skanujące zastosowane w mikroskopie FV1000 umożliwiają jednoczesne prowadzenie obserwacji procesów oraz dokonywanie stymulacji. Ułatwia to wszechstronną, precyzyjną dokumentację i analizę zjawisk na poziomie komórkowym, bez utraty istotnych informacji. FluoView FV1000 wprowadza nową jakość w badaniach procesów przeżyciowych: rejestrację i zrozumienie zjawisk w stopniu poprzednio nieosiągalnym. Wystarczy tylko chwila pracy z naszym nowym systemem, aby to potwierdzić. Z nami rozwiązanie Państwa problemów badawczych będzie dwa razy prostsze.

Wiecej informacji pod adresem:
Olympus Polska Sp. z o.o.
Tel. (22) 860 00 77, Faks (22) 831 04 53
mikroskopy@olympus.pl
www.olympus.pl

O L Y M P U S M I C R O S C O P Y

http://rcin.org.pl