

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2005
TOM 51
NUMER 1



50 lat Postępów Biochemii

**Wirus zapalenia wątroby typu C
Sekwencje AURE a stabilność mRNA
Białko MDM2 w cyklu komórkowym**



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

www.postepybiochemii.pl

<http://rcin.org.pl>

gene transfer is evolving

APARATURA I ODCZYNNIKI DO:

Elektroporacji: Gene Pulser Xcell, Micro Pulser Electroporator

Biolistyki: Helios Gene Gun, PDS 1000/He

*Transfekcji Lipidowej: TransFectinLipid Reagent,
siLentFect - Lipid Reagent RNAi*

*Transformacji Chemicznej: EP-Max Electro-Competent Cells
C-Max Chemi-Competent Cells*

WIOSENNA PROMOCJA !!!

Bezpłatne próbki odczynników

ZAMÓW I SPRAWDŹ !!!!

**With Bio-Rad
Research Tools**

Bio-Rad Polska Sp. z o. o.
ul. Nakielska 3, 01 - 103 Warszawa
tel: (22) 331-99-99, fax: (22) 331-99-88
science@biorad.com.pl
www.bio-rad.pl

BIO-RAD



Helios Gene Gun



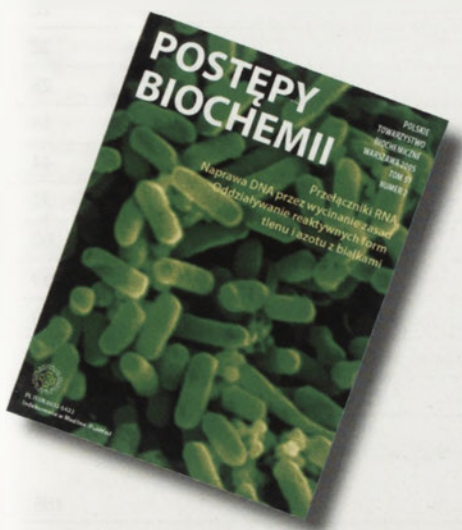
Biolistic PDS-1000/He

Gene Pulser Xcell™ System

BIO-RAD

<http://rcin.org.pl>

genetransfer



W NASTĘPNYM NUMERZE:

ARTYKUŁY
PRZEGLĄDOWE

Przełączniki RNA

Katarzyna Bugała, Marek Żywicki,
Eliza Wyszko, Mirosława Z. Barci-
szewska, Jan Barciszewski

Naprawa DNA przez wycinanie
zasad

Tomasz Śliwiński, Janusz Błasiak

Oddziaływanie reaktywnych form
tlenu i azotu z białkami

Michał Błazej Ponczek, Barbara Wa-
chowicz

FORUM MŁODYCH
BIOCHEMIKÓWCharakterystyka antygenów
i czynników wzrostu śródbłonka
limfatycznego

Halina Waś

Rysunek na okładce:

Krążący w krwiobiegu wirus zapalenia
wątroby typu C

Grafika: Paweł Pomorski

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

- | | |
|--|-----|
| Naczyniowe oksydazy NAD(P)H -
- znaczenie w patogenezie miażdżycy | 1 |
| Paweł Niemieć, Iwona Żak | |
| Czynnik wzrostu śródbłonka naczyń - budowa i funkcje | 12 |
| Patrycja Barańska, Hanna Jerczyńska, Zofia Pawłowska | |
| Mechanizmy oporności wirusa zapalenia
wątroby typu C na interferon | 22 |
| Dariusz Kmiecik | |
| Udział sekwencji AURE w regulacji stabilności mRNA | 28 |
| Dominika Trzaska, Jarosław Dastych | |
| Rola białek z rodziny Rho w kontroli
migracji komórek pełzających | 36 |
| Wanda Kłopocka, Jolanta Barańska | |
| Znaczenie białka MDM2 w cyklu komórkowym | 44 |
| Elżbieta Rozpończyk, Janusz Szemraj,
Jacek Bartkowiak, Janusz Greger, Katarzyna Oszejca | |
| Syndekey w procesach adhezji i różnicowania komórek | 52 |
| Edyta Brzóska, Iwona Grabowska | |
| Specyficzność i selektywność działania czynnika
transkrypcyjnego NFκB | 60 |
| Małgorzata Czyż | |
| Insulinopodobny czynnik wzrostu -
- IGF-I i białka z nim współdziałające | 69 |
| Aleksandra Obrępańska-Stęplowska,
Łukasz Durzyński, Anna Goździcka-Józefiak | |
| Receptor β₃-adrenergiczny | 80 |
| Katarzyna Bąbol, Janusz Błasiak | |
| Lizosomalna błonowa glikoprotein LAMP2A -
- receptor dla cytosolowych białek
przeznaczonych do selektywnej proteolizy | 88 |
| Katarzyna Roszek, Jadwiga Gniot-Szulżycka | |
| Fosfatazy serynowo-treoninowe z <i>Bacillus subtilis</i> | 95 |
| Michał Obuchowski | |
| WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE | |
| Zjazd FEBS w Warszawie w 2004 roku | 105 |
| Jolanta Barańska, Adam Szewczyk | |

REVIEWS

Vascular NAD(P)H oxidases - role in the pathogenesis of atherosclerosis	1
Vascular endothelial growth factor - structure and functions	12
The mechanisms of hepatitis C virus resistance to interferon	22
Role of AURE sequences in the regulation of mRNA stability	28
The role of Rho family proteins in controlling the migration of crawling cells	36
Significance of MDM2 protein in the cell cycle	44
Syndecans in cell adhesion and differentiation	52
Specificity and selectivity of the NFκB response	60
Insulin-like growth factor and interacting proteins	69
β3-adrenergic receptor	80
Lysosomal membrane glycoprotein lamp2a - receptor for chaperone-mediated degradation of cytosolic proteins	88
Serine-threonine protein phosphatases from <i>Bacillus subtilis</i>	95

EVENTS/OPINIONS/COMMENTS

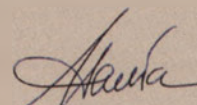
FEBS Congress Warszawa 2004	105
-----------------------------	-----

POSTĘPY BIOCHEMII „PO PIĘĆDZIESIĄTCE”

Ta okrągła rocznica jak zwykle skłania do refleksji i do zadawania pytań. Jedno, w moim odczuciu najważniejsze, to pytanie, czy czasopismo takie jak „Postępy Biochemii” jest potrzebne? W dobie zalewu informacji, ogromnej liczby istniejących i nowopowstających czasopism naukowych, internetu oraz wzięwszy pod uwagę fakt, że piśmiennictwo z zakresu biochemii od końca II wojny światowej jest zdominowane przez opracowania w języku angielskim, odpowiedź na tak postawione pytanie nie jest łatwa. Również w naszym kraju konieczność przywrócenia polskiej biochemii wymiaru porównywalnego z reprezentowanym w wysokorozwiniętych krajach europejskich, nie służy najlepiej rozwojowi piśmiennictwa naukowego w ojczystym języku. Począwszy od wymagań, jakie stawia się młodym adeptom biochemii, a skończywszy na ocenie działalności naukowej całych placówek badawczych, zdolność do prawidłowego posługiwania się językiem polskim nie stoi na pierwszym miejscu w hierarchii potrzeb. Teoretycznie, prawdziwy bastion, w którym znajomość języka polskiego w piśmie jest konieczna, stanowią prace magisterskie i licencjackie oraz rozprawy doktorskie i habilitacyjne. Ale czy i ta ostatnia twierdza nie ulegnie wkrótce naporowi języka angielskiego?

Mówiąc o języku mamy najczęściej na myśli ludzką mowę, to jest system artykułowanych dźwięków, układających się zgodnie z konwencją, gdzie mowa oznacza używanie języka w procesie porozumiewania się. A jeśli tak, jeśli ten system porozumiewania się jest tak ważny, choćby w procesie edukacji, to czy przed polskojęzycznym piśmiennictwem naukowym nie stoi ważne zadanie, wręcz misja do spełnienia? Na język ojczysty, jako ukształtowany społecznie zespół symboli, używanych w procesie komunikowania się zgodnie z obiektywnymi regułami budowania wypowiedzi językowej, składają się dwa elementy: zbiór znaków (fonemów, morfemów i wyrazów) oraz reguły tychże znaków łączenia (fonologia, morfologia, syntaktyka i semantyka). Jeśli uświadomimy sobie znaczenie tej definicji języka, dalsza dyskusja na temat podtrzymywania polskiego piśmiennictwa biochemicznego jest bezprzedmiotowa. Przecież jako Polacy zamierzamy w możliwie najbogatszy sposób porozumiewać się ze sobą w ojczystym języku. Zatem żadne względy koniunkturalne, mody i trendy światowe, nie wspominając o odgórnym decyzjach czy polityce międzynarodowej, nie mogą zmienić faktu nie tylko konieczności podtrzymywania ojczystego piśmiennictwa naukowego, ale jego propagowania i rozwoju.

Taką misję do wypełnienia zawsze miały i mają „Postępy Biochemii”; stanowią one tylko łamy służące przybliżeniu osobom zainteresowanym POSTĘPU w biochemii i naukach pokrewnych, w tym medycznych, ale przede wszystkim miejsce, gdzie powstaje polska terminologia naukowa, gdzie autorzy, czytelnicy i redaktorzy dodadzą wspólną cegielkę, dzięki której nasz język ojczysty jako najlepszy sposób przedstawiania przedmiotów, czynności czy abstrakcyjnych pojęć za pomocą umownego systemu dźwięków bądź znaków, stanie się bogatszy. Jedyne ukłonem w stronę mód jest nowa szata graficzno-edytorska czasopisma. Jeśli mamy zamiar dać „szansę” językowi ojczystemu, zadbajmy żeby ten język miał „równy start” i żeby po czasopismo nie tylko było warto sięgnąć, ale także by była to przyjemność.



Sławomir Pikula

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

Redaktorzy: Joanna Bandorowicz-Pikula, Grzegorz Bartosz, Andrzej Dżugaj, Krystyna Grzelak, Lilla Hryniewiecka, Danuta Hulanicka, Andrzej Jerzmanowski, Andrzej Kasprzak, Wanda Kłopocka, Liliana Konarska, Aleksander F. Sikorki, 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 lamowanie: 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

Naczyniowe oksydazy NAD(P)H - znaczenie w patogenezie miażdżycy

STRESZCZENIE

Naczyniowe oksydazy NAD(P)H to wielopodjednostkowe kompleksy enzymatyczne, występujące w komórkach miocytów naczyń krwionośnych i komórkach śródbłonna. Enzymy te są głównym źródłem anionorodnika ponadtlenkowego na terenie ścian naczyń krwionośnych. Związane z błonami plazmatycznymi aktywne formy oksydaz NAD(P)H zbudowane są co najmniej z sześciu podjednostek, mianowicie białek NOX, p22phox, p47phox, p67phox, p40phox i małej GTPazy Rac. Głównym aktywatorem naczyniowych oksydaz NAD(P)H jest angiotensyna II. Angiotensyna II stymuluje wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego i pośrednio nadtlenu wodoru. Oba wolne rodniki aktywują wiele procesów sprzyjających rozwojowi miażdżycy, między innymi podwyższają ekspresję białek anhezyjnych, chemoatraktantów i aktywują czynnik transkrypcyjny NF- κ B. Mogą także indukować apoptozę komórek śródbłonna, tlenowe modyfikacje lipoprotein o niskiej gęstości oraz przerost i proliferację miocytów naczyń. Specyficzne inhibitory oksydaz NAD(P)H mogą okazać się dobrym narzędziem badawczym i niewykluczone, że przyczynią się do rozwoju nowych terapeutycznych strategii leczenia chorób sercowo-naczyniowych.

WPROWADZENIE

Oksydazy NAD(P)H to wielopodjednostkowe kompleksy enzymatyczne, występujące w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych i komórkach śródbłonna, dlatego nazywane są naczyniowymi oksydazami NAD(P)H. Enzymy te są głównym źródłem anionorodników ponadtlenkowych (O_2^-) na terenie ścian naczyń krwionośnych [1, 2]. Aktywne formy oksydaz NAD(P)H zlokalizowane są w błonach plazmatycznych i wykazują duże podobieństwo do oksydazy NADPH obecnej w komórkach fagocytów, uczestniczącej w niszczeniu mikroorganizmów [3, 4]. Kompleks oksydazy NADPH fagocytów składa się z pięciu białek phox (ang. *phagocyte oxidase*). Białka gp91phox i p22phox są zlokalizowane w błonie komórkowej. Białko gp91phox jest podjednostką katalityczną kompleksu. Pozostałe trzy białka p47phox, p67phox i p40phox występują w cytosolu.

Aktywacja kompleksu naczyniowych oksydaz NAD(P)H zachodzi z udziałem licznych agonistów, w tym angiotensyny II [5-13] i związana jest z fosforylacją białka p47phox [14, 15]. Fosforylacja p47phox umożliwia translokację podjednostek cytoplazmatycznych do błony komórkowej i ich asocjacje ze składnikami błonowymi [14, 15]. W tworzeniu kompleksu aktywnego uczestniczy białko G o niskiej masie cząsteczkowej, Rac-1 lub Rac-2. W komórkach naczyń krwionośnych, obok białka gp91phox, występują także jego homologi, takie jak NOX1 (ang. *NADPH oxidase 1*) i NOX4 [16-19] oraz homologi białek p47phox i p67phox [20, 21], które w połączeniu z pozostałymi podjednostkami kompleksu mogą tworzyć aktywne katalityczne formy oksydaz NAD(P)H, zdolne do produkcji O_2^- .

Anionorodnik ponadtlenkowy wytwarzany na terenie ścian tętniczych przez oksydazy NAD(P)H, stymuluje wiele procesów prowadzących do rozwoju miażdżycy, takich jak osłabianie relaksacji naczyń zależnej od tlenu azotu [22], uszkadzanie komórek śródbłonna i tlenowe modyfikowanie lipoprotein o niskiej gęstości [23-26]. Nadtlenek wodoru (H_2O_2), będący produktem przekształcenia O_2^- przez dysmutazę ponadtlenkową zapoczątkowuje kaskady sygnalizacyjne, aktywując wiele kinaz białkowych i czynników transkrypcyjnych, zależnych od stanu redoks komórki. Nadtlenek wodoru może stymulować wzrost i proliferację miocytów naczyń [27-32], a także aktywować śródbłonek naczyń, co przejawia się wzrostem syntezy i ekspresji receptorów adhezyjnych na powierzchni błony [33-36] oraz wydzielaniem chemokin [11, 37, 38].

Do inhibitorów naczyniowych oksydaz NAD(P)H należą między innymi difenyleniodonian (DPI, ang. *diphenylene iodonium*), apocynina, estrogen i mo-

Paweł Niemiec[✉]

Iwona Żak

Katedra i Zakład Biochemii i Genetyki Medycznej, Śląska Akademia Medyczna, Katowice

Katedra i Zakład Biochemii i Genetyki Medycznej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice; e-mail: pnemiec@slam.katowice.pl; tel. (32) 252 84 32

Artykuł otrzymano 25 czerwca 2004
Artykuł zaakceptowano 1 lutego 2005

Słowa kluczowe: oksydazy NAD(P)H, miażdżycy, reaktywne formy tlenu

Wykaz skrótów: CYBA - cytochrom b alfa (ang. *cytochrome b alpha*), gen dla p22phox; CYBB - cytochrom b beta (ang. *cytochrome b beta*), gen dla gp91phox; DPI - ang. *diphenylene iodonium*; ICAM-1 - międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna -1 (ang. *intercellular adhesion molecule 1*); MCP-1 - chemokina monocytów typu pierwszego (ang. *monocyte chemoattractant protein type - 1*); NF- κ B - czynnik jądrowy - κ B (ang. *nuclear factor- κ B*); NOX - oksydaza NADPH (ang. *NADPH oxidase*), białko NOX; RFT - reaktywne formy tlenu; SH3 - domena homologiczna z Src -3 (ang. *Src homology domain-3*); VCAM-1 - naczyniowa cząsteczka adhezyjna-1 (ang. *vascular cell adhesion molecule-1*).

dulatory receptorów estrogenowych [39-49], oraz kwas acetylosalicylowy, inhibitory składników układu renina-angiotensyna i statyny [28, 50-56]. Większość wymienionych inhibitorów to związki działające nieswoiście lub inhibitory pośrednie. Poznanie roli naczyniowych oksydaz NAD(P)H w patogenezie miażdżycy oraz szczegółowego mechanizmu ich aktywacji i działania są przedmiotem licznych badań, prowadzonych z zastosowaniem swoistych inhibitorów. Badania te wyjaśniają szczegóły rozwoju miażdżycy i mogą przyczynić się do wprowadzenia nowych strategii terapeutycznych w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych o podłożu miażdżycowym.

BUDOWA OKSYDAZ NAD(P)H

SKŁADNIKI BŁONOWE KOMPLEKSU

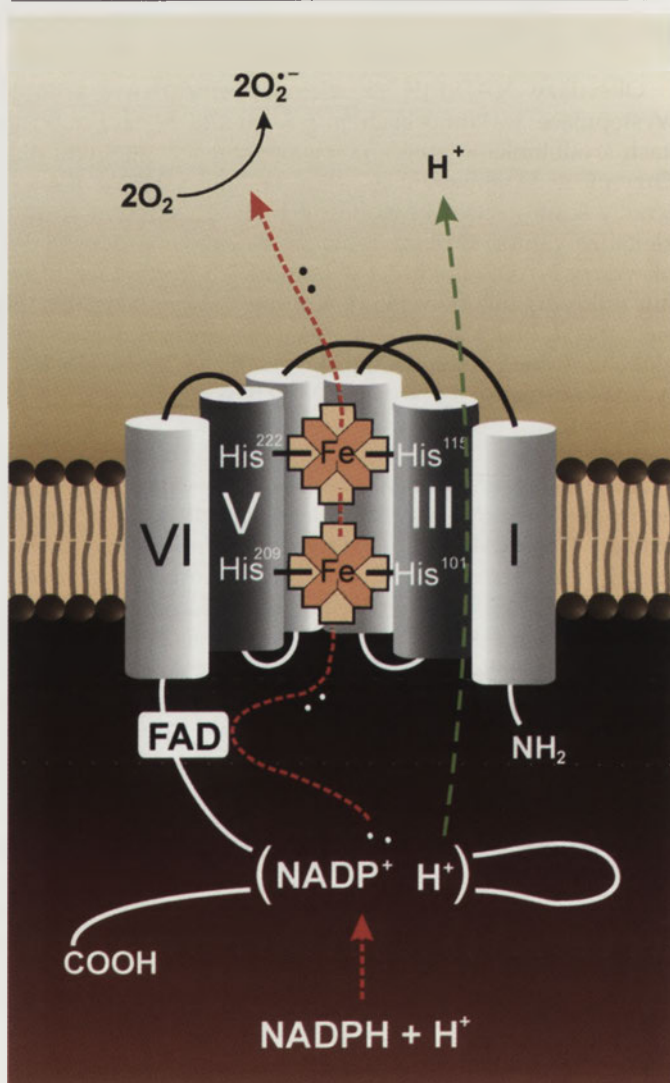
Białka gp91phox i p22phox tworzą heterodimer związany na stałe z błoną plazmatyczną. Kompleks ten nazwano cytochromem b_{558} , ze względu na maksimum absorpcji przy długości fali 558 nm. W stanie spoczynku cytochrom b_{558} zlokalizowany jest w błonie pęcherzyków wydzielniczych [3, 4]. Podczas aktywacji dochodzi do fuzji pęcherzyków wydzielniczych z błoną komórkową, wędrowki podjednostek cytosolowych w kierunku błony komórkowej i formowania kompleksu aktywnego.

gp91phox. Białko gp91phox, inaczej NOX2 (ang. *NADPH oxidase 2*) jest podjednostką katalityczną fagocytarnej oksydazy NADPH. Obecność gp91phox wykazano także w komórkach śródbłonna i miocytach naczyniowych [18, 19]. Białko to zbudowane jest z 570 reszt aminokwasowych. Łańcuch polipeptydowy gp91phox tworzy sześć domen w błonie i zawiera przynajmniej trzy miejsca glikozylacji (Asn131, Asn148, Asn239) [57]. W rejonie C-końcowym zlokalizowane jest centrum flawinowe i miejsce wiązania NADPH (Rys. 1). Białko gp91phox jest hemoproteiną, której dwa centra hemowe usytuowane są pomiędzy trzecią i piątą domeną błonową. Atom żelaza pierwszej grupy hemowej, znajdującej się bliżej powierzchni cytoplazmatycznej błony, związany jest z resztami konserwatywnych ewolucyjnie histydyn: His101 i His209. Natomiast atom żelaza drugiego centrum hemowego związany jest z resztami His115 i His222, również zachowawczymi ewolucyjnie [57, 58].

gp91phox, oraz pozostałe białka z rodziny NOX, to oksydazy zależne od FAD, generujące transport elektronu na tlen cząsteczkowy, który jest redukowany do anionorodnika nadtlenkowego [59, 60]. Donorem elektronów jest $\text{NADPH} + \text{H}^+$ lub $\text{NADH} + \text{H}^+$, a ich kolejnymi akceptorami pośrednimi są FAD, centrum hemowe 1 i centrum hemowe 2. Ostatecznym akceptorem elektronu jest zewnątrzkomórkowy tlen cząsteczkowy. Transport elektronów generuje depolaryzację błony. Ujemny ładunek jest kompensowany przez proton pochodzący z NADPH, ponieważ białko gp91 jest kanałem protonowym bramkowanym napięciem [59, 60]. Jeśli depolaryzacja nie zostanie skompensowana następuje wstrzymanie przepływu elektronów i wytwarzania O_2^- [61]. Na rysunku 1 przedstawiono model budowy białka gp91phox i mechanizm jego działania. Model ten jest właściwy także dla innych białek z rodziny NOX. Białko

gp91phox jest kodowane przez gen *CYBB* (ang. *cytochrome b beta*), znajdujący się na chromosomie X (Xp21) [62].

Inne białka NOX. Białko NOX1, inaczej *mox1* (ang. *mitogenic oxidase 1*) lub NOH-1 (ang. *NADPH oxidase homolog-1*) jest homologiem białka gp91phox, występującym w komórkach śródbłonna i miocytach naczyniowych [16-19, 63]. Białko NOX1 człowieka zbudowane jest z 564 reszt aminokwasowych. NOX1 wykazuje 56% podobieństwo do gp91phox, jednak miejsce wiązania FAD oraz miejsca wiązania hemów są prawie identyczne w obu białkach [63]. Białka NOX1 i gp91phox charakteryzują się bardzo podobnym profilem hydrofobowości, wskazującym na obecność sześciu domen błonowych [63]. Znane są dwie formy białka NOX1, będące produktami różnicowego cięcia i składania pierwotnego transkryptu; NOX1L (ang. *NOX1 long*), czyli forma dłuższa i NOX1S, forma krótsza, utworzona z 191 reszt aminokwasowych [64]. W łańcuchu polipeptydowym NOX1S obecne są jedynie cztery pierwsze domeny błonowe oraz krótki cytoplazmatyczny rejon C-końcowy. Brak miejsc wiązania



Rysunek 1. Model budowy i mechanizm działania białka gp91phox oraz innych przedstawicieli rodziny NOX. Cyframi rzymskimi oznaczono kolejne domeny błonowe: His101, His115, His209, His222 – reszty histydyny w pozycji 101, 115, 209 lub 222 łańcucha polipeptydowego. Linia czerwoną zaznaczono przepływ elektronów, natomiast zieloną protonów. Brązowe tło – cytosol, białe tło – przestrzeń zewnątrzkomórkowa lub pęcherzyków wydzielniczych. Szczegółowe objaśnienia w tekście (wg [57-61], zmodyfikowane).

NADPH+H⁺, FAD i hemów powoduje, że forma krótsza nie pośredniczy w transporcie elektronów i produkcji O₂. Białko NOX1S pełni jedynie rolę kanału protonowego [59, 64]. Białko NOX1 kodowane jest przez gen *NOX1* (inaczej *NOH*, *NOH1* czy *MOX1*), znajdujący się na chromosomie X (Xq22) [63]. W komórkach śródbłonna i miocytach naczyńnych występuje także białko NOX4 [16-19].

p22phox. Łańcuch polipeptydowy p22phox składa się z 195 reszt aminokwasowych i posiada cztery domeny błonowe (Rys. 2). Oba, N- i C-końce polipeptydu znajdują się po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej. Na C-końcu p22phox znajduje się rejon bogaty w reszty proliny (w pozycjach 151-160), który bierze udział w oddziaływaniu pomiędzy p22phox, a N-końcową domeną SH3 (ang. *Src homology domain*) cytoplazmatycznej podjednostki p47phox, podczas formowania aktywnego kompleksu. Białko p22phox posiada dodatkowe miejsce wiązania dla p47phox i dwa potencjalne miejsca wiązania dla p67phox [65]. Białko p22phox kodowane jest przez gen *CYBA* (ang. *cytochrome b alpha*), który znajduje się na chromosomie 16 (16q24) [66].

SKŁADNIKI CYTOPLAZMATYCZNE KOMPLEKSU

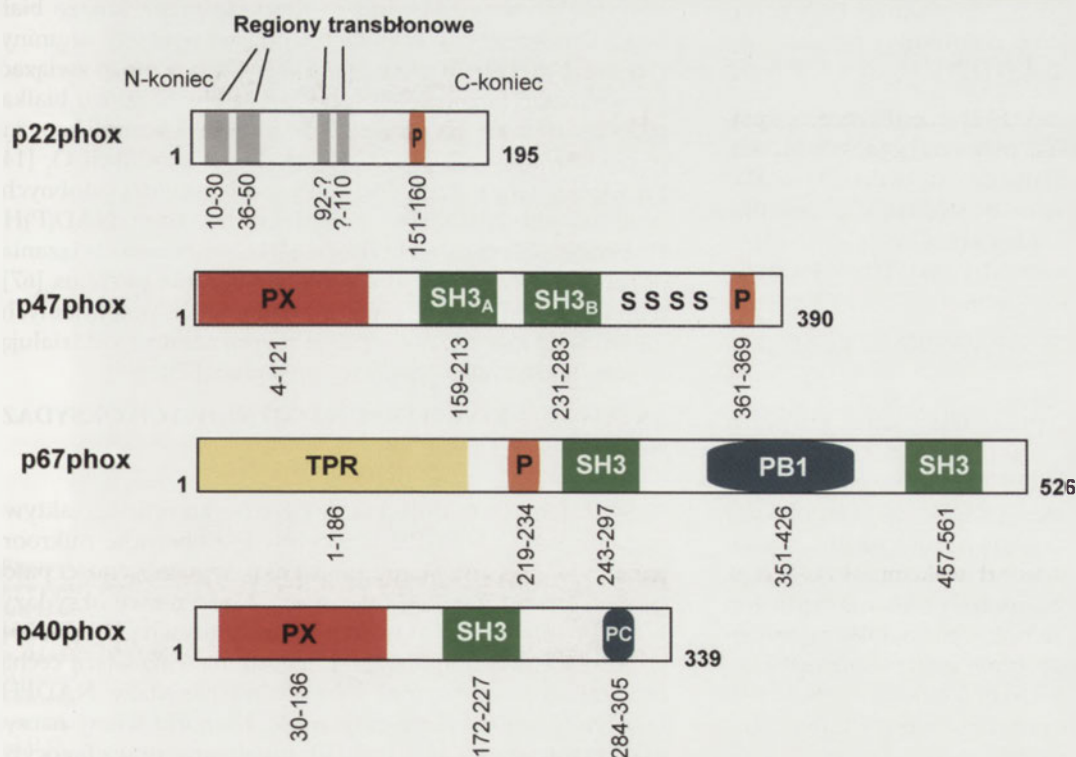
p47phox. Łańcuch polipeptydowy białka p47phox złożony jest z 390 reszt aminokwasowych, które tworzą kilka funkcjonalnych domen (Ryc. 2). Na N-końcu znajduje się domena PX (ang. *Phox homologous domain*) [67]. Podobne domeny obecne są także w białku p40phox i izoformach fosfolipazy D. Funkcja domeny PX nie została jeszcze poznana. Białko p47phox posiada dwie domeny SH3, uczestniczące w oddziaływaniach typu białko-białko z rejonami białek

bogatymi w reszty proliny. N-końcowa domena SH3_A zlokalizowana jest między resztami aminokwasowymi 159-213. Domena SH3_B zlokalizowana jest w C-końcowym rejonie białka, pomiędzy resztami aminokwasowymi 231-287 [67]. Rejon wzbogacony w reszty proliny znajduje się w części C-końcowej białka p47phox. Pomiedzy domeną SH3_B a rejonem bogatym w reszty proliny, występuje domena bogata w reszty argininy i lizyny (ang. *Arg/Lys rich domain*) o wypadkowym ładunku dodatnim. Obecne w tym rejonie białka powtarzające się reszty seryny stanowią miejsca fosforylacji dla licznych kinaz białkowych, np. kinazy białkowej C. Białko p47phox jest kodowane przez gen *NCF1* (ang. *neutrophil cytosol factor 1*) znajdujący się na chromosomie 7 (7q11.23) [68].

p67phox. Białko p67phox jest zbudowane z 526 reszt aminokwasowych. W N-końcowym rejonie polipeptydu występuje domena TPR (ang. *tetratricopeptide repeat domain*), zawierająca cztery motywy TPR [67, 70]. Motywy TPR odpowiedzialne są za wiązanie białka Rac. Motywy te wykazują wysoką homologię z motywem CRIB (ang. *Cdc42/Rac interactive binding motif*) obecnym w białkach wiążących Rac [70]. W białku p67phox występują także dwie domeny SH3 i przynajmniej jeden rejon bogaty w reszty proliny [67]. W rejonie C-końcowym zlokalizowana jest domena PB1 (ang. *Phox and Bem1p domain*), której funkcja polega na tworzeniu heterodimerów pomiędzy białkami zawierającymi domeny PB1. Białko p67phox kodowane jest przez gen *NCF2* (ang. *neutrophil cytosol factor 2*), który znajduje się na chromosomie 1q25 [68].

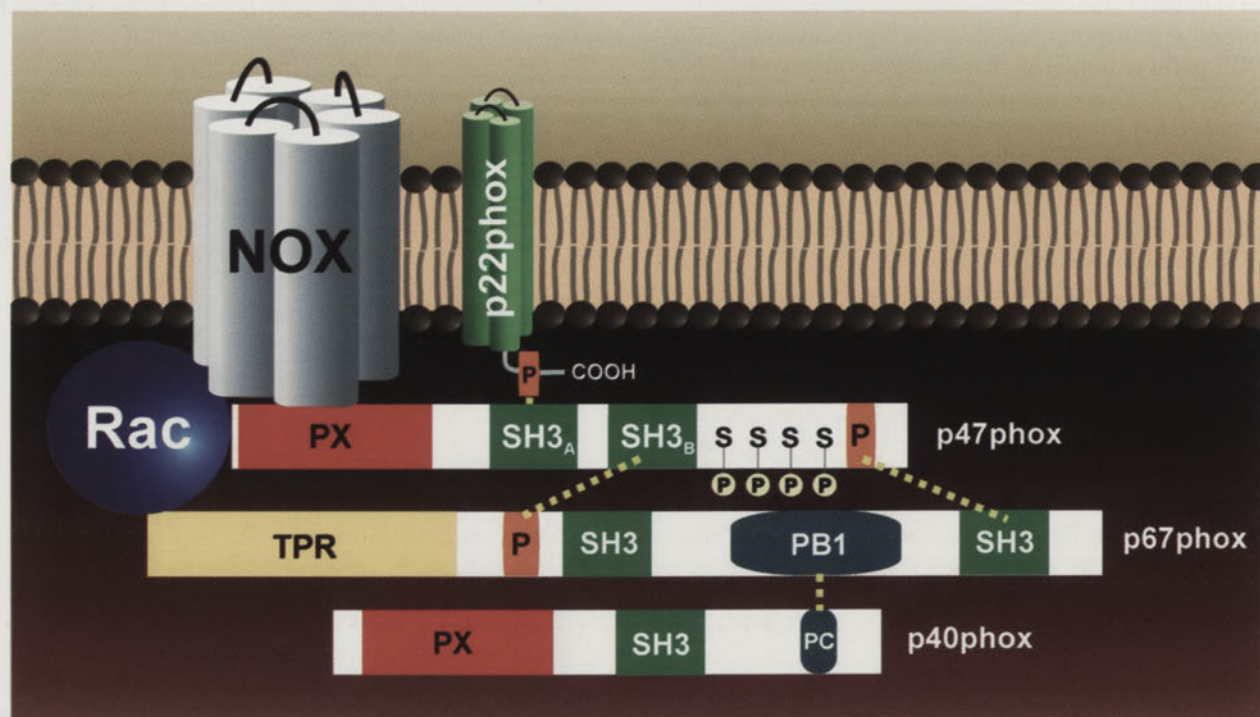
Homologi p47phox i p67phox. Homologami białek p47phox i p67phox są białka p41phox i p51phox [20, 21].

W białku p41phox, podobnie jak p47phox, występują domena PX, dwie domeny SH3 i konserwatywny ewolucyjnie C-końcowy rejon bogaty w reszty proliny. Białko p41phox oddziałuje z p22phox poprzez domeny SH3. Białko p51phox, analogicznie do p67phox, może tworzyć kompleks z p47phox oraz z p41phox poprzez domenę SH3, a jego domena TPR wiąże białko Rac. Białka p41phox i p51phox aktywują NOX1 i mogą funkcjonować razem lub z innymi składnikami kompleksu, białkami p47phox i p67phox [21]. Genami kodującymi p41phox i p51phox są odpowiednio *NOXO1* (ang. *Nox organizer 1*) i *NOXA1* (ang. *Nox activator 1*) [21].



Rysunek 2. Schemat budowy naczyniowych oksydaz NAD(P)H; PX – domena PX, SH3 – domena SH3, TPR – domena TPR, PB1 – domena PB1, PC – motyw PC, P – rejon bogaty w reszty proliny, S – reszty seryny. Zakresy cyfr przedstawiają pozycje reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym zajmowane przez odpowiednie domeny, reiony lub motywy (na podstawie [65, 67, 69], zmodyfikowane).

p40phox. Białko p40phox człowieka składa się z 339 reszt aminokwa-



Rysunek 3. Model kompleksu aktywnego oksydazy NAD(P)H; PX – domena PX, SH3 – domena SH3, TPR – domena TPR, PB1 – domena PB1, PC – motyw PC, P – rejon bogaty w reszty proliny, S – reszty seryny, P (w okręgu) – reszty fosforanowe. Brązowe tło – cytosol.

sowych. Zawiera ono domenę PX i jedną domenę SH3 (Ryc. 2). Na C-końcu białka znajduje się motyw PC [67], który jest konserwatywnym ewolucyjnie fragmentem domeny PB1, niezbędnym do łączenia się domen PB1 w heterodimery. Białko p40phox nie jest konieczne do aktywacji kompleksu oksydazy. Prawdopodobnie jego funkcją jest stabilizacja kompleksu p67phox – p44phox w cytoplazmie. Gen kodujący białko p40phox to *NCF4* (ang. *neutrophil cytosol factor 4*), obecny na chromosomie 22 (22q13.1) [71].

p21Rac. Rac-1 i Rac-2, o masie 21 kD to najliczniejsze białka Rac w komórkach neutrofilii, miocytach naczyń i komórkach endotelialnych. Białka te należą do GTPazy klasy Rho. Białka Rac w cytoplazmie występują w formie nieaktywnej i są związane z GDP. Aktywacja kompleksu oksydazy NAD(P)H wymaga wymiany GDP na GTP i związania białka Rac z p67phox [70].

ODDZIAŁYWANIA POMIĘDZY SKŁADNIKAMI KOMPLEKSU OKSYDAZ NAD(P)H

W komórkach w stanie spoczynku białka p47phox, p67phox i p40phox tworzą kompleks (1:1:1, mol/mol) o masie cząsteczkowej 250-300 kDa [67]. Białko p67phox jest łącznikiem pomiędzy p40phox i p47phox w kompleksie. Białka p67phox i p47phox oddziałują ze sobą na dwa sposoby (Rys. 3). W pierwszym przypadku domena SH3 C-końca p67phox wiąże rejon bogaty w reszty proliny, znajdujący się na C-końcu p47phox. W drugim przypadku rejon bogaty w reszty proliny białka p67phox wiąże domenę SH3_B białka p47phox (Rys. 3) [67]. Białko p40phox związane jest z domeną PB1 białka p67phox poprzez motyw PC (Rys. 3).

Białko p47phox pełni funkcję łącznika pomiędzy składnikami cytosolowymi a błonowymi. W cytoplazmie białko p47phox występuje w konformacji, w której jego aktyw-

ność jest zahamowana (konformacja autoinhibicyjna), co uniemożliwia połączenie elementów błonowych z cytoplazmatycznymi. Obie domeny SH3 są zablokowane przez wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania z rejonem bogatym w reszty proliny w C-końcu białka [14, 15]. Molekularnym przełącznikiem, aktywującym białko p47phox przez odblokowanie domeny SH3, jest fosforylacja przez kinazę białkową C reszt seryny w domenie bogatej w reszty arginy i lizyny. Dzięki temu domena SH3_A p47phox może związać się z rejonem bogatym w reszty proliny w C-końcu białka p22phox (Ryc. 3), co prowadzi do integracji kompleksu, zapoczątkowaniu przepływu elektronów i produkcji O₂⁻ [14, 15]. Opis ten nie uwzględnia wszystkich prawdopodobnych oddziaływań w obrębie kompleksu oksydazy NAD(P)H. W białku p22phox wykryto dodatkowe miejsca wiązania p47phox i dwa potencjalne miejsca wiązania p67phox [67], natomiast białko gp91phox posiada kilka potencjalnych miejsc wiązania p47phox [72]. Przepuszczalnie oddziałują ze sobą także białka p67phox i gp91phox [73].

AKTYWACJA KOMPLEKSU NACZYNIOWYCH OKSYDAZ NAD(P)H

Sygnałem stymulującym tworzenie kompleksu aktywnego oksydazy NADPH fagocytów jest obecność mikroorganizmów [3, 4]. W stanie spoczynku, w nieobecności patogenów, enzym nie ulega aktywacji. Naczyniowe oksydazy NAD(P)H wykazują aktywność konstytutywną [19, 74, 75], jak i indukowaną agonistami. Jednak najważniejszą cechą odróżniającą naczyniowe enzymy od oksydazy NADPH fagocytów jest ich niska aktywność. Komórki ściany naczynia wytwarzają 1%-10% ilości O₂⁻ uwalnianej przez fagocyty w obecności mikroorganizmów, podczas tzw. eksplozji tlenowej (ang. *oxidative burst*) [5, 76]. Tkankowe różnice w aktywności oksydazy NAD(P)H mogą być uwarunkowane

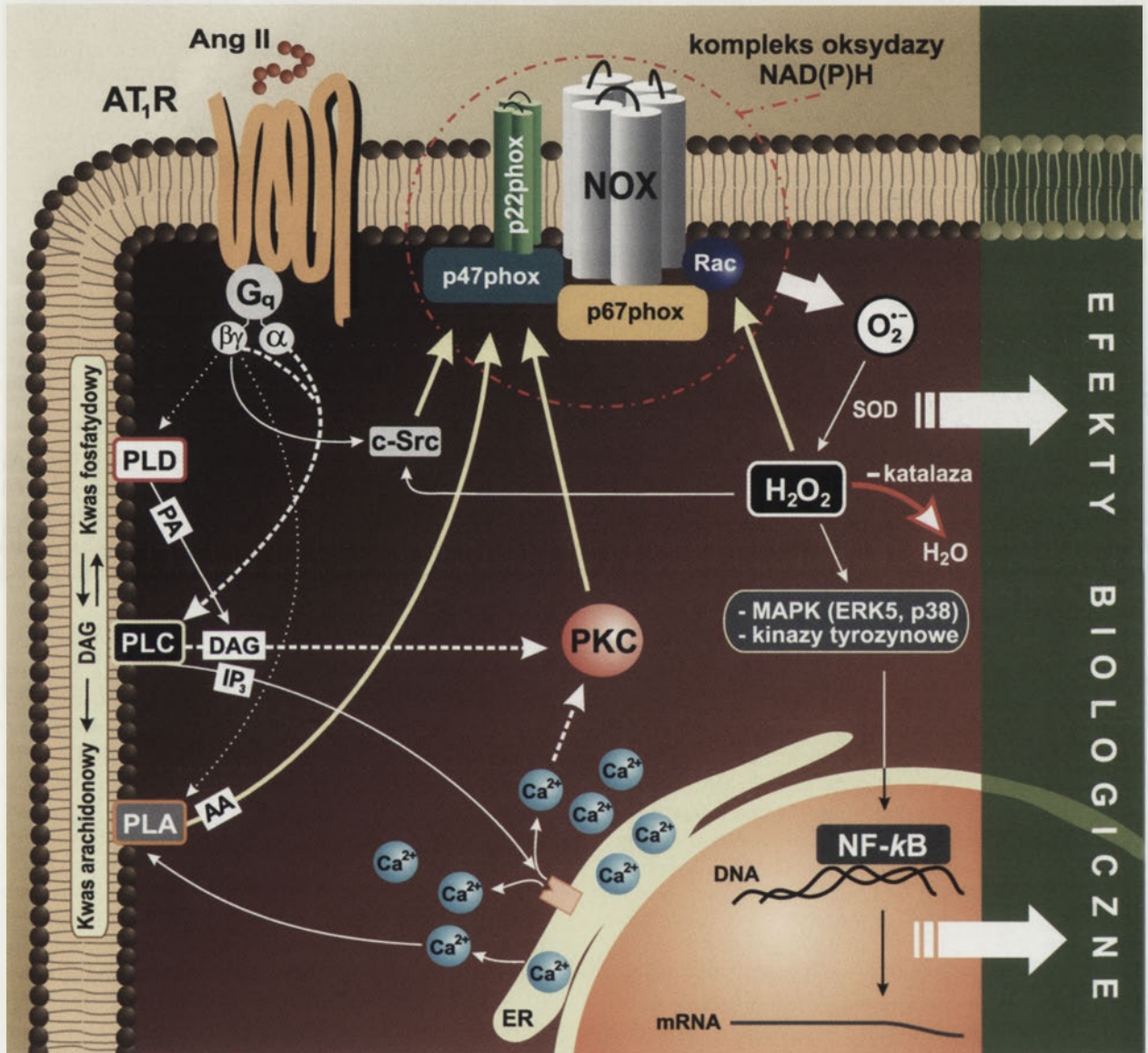
mniejszą dostępnością substratów NADPH+H⁺ lub NADH+H⁺ w komórkach śródbłonna i miocytach naczyniowych.

Aktywatorami naczyniowych oksydaz NAD(P)H są liczne zewnątrzkomórkowe czynniki humoralne, takie jak angiotensyna II [6-8], trombina [9] lub czynnik wzrostowy pochodzenia płytkowego (PDGF) [10, 11], czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α) [12, 13], naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) [7] oraz utlenione formy lipoprotein o niskiej gęstości (oxLDL) [5]. Wewnątrzkomórkowa aktywacja kompleksu oksydaz NAD(P)H zachodzi przy udziale metabolitów lipidów błony komórkowej, powstających w wy-

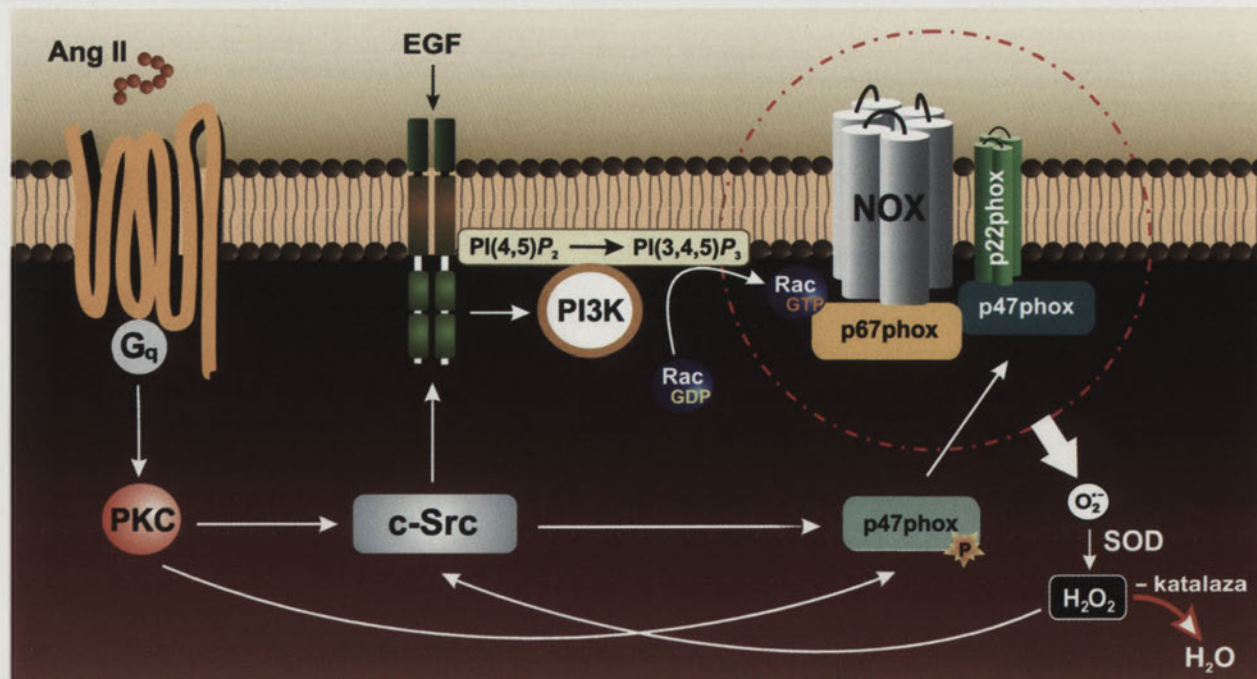
niku aktywności fosfolipaz. Na rysunku 4 przedstawiono propozycję mechanizmu aktywacji naczyniowych oksydaz NAD(P)H przez angiotensynę II.

FOSFORYLACJA BIAŁKA p47phox

Fosforylacja białka p47phox jest kluczową reakcją podczas aktywacji kompleksu oksydaz NAD(P)H. Enzymem odpowiedzialnym za ten proces jest kinaza białkowa C (PKC) [7, 8, 15]. Kinaza białkowa C jest aktywowana przez Ca²⁺ i diacyloglicerol (DAG), produkt hydrolizy lipidów z udziałem fosfolipazy C (PLC). Inkubacja miocytów naczyniowych



Rysunek 4. Schemat aktywacji naczyniowych oksydaz NAD(P)H przez angiotensynę II. Kinaza białkowa C (PKC), kinaza c-Src, kwas arachidonowy (AA) i H₂O₂ to wewnątrzkomórkowe aktywatory kompleksu oksydaz NAD(P)H (linie pogrubione koloru żółtego). Stymulacja receptora AT₁ przez angiotensynę II (Ang II) w pierwszej kolejności aktywuje fosfolipazę C (PLC) (pogrubiona linia przerywana), która hydrolizuje fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan do diacyloglicerolu (DAG) i inozytolotrifosforanu (IP₃). IP₃ uwalnia jony Ca²⁺ z retikulum endoplazmatycznego (ER). Ca²⁺ i DAG aktywują PKC. Aktywna PKC fosforyluje białko p47phox, uczestnicząc w składaniu kompleksu aktywnego oksydaz NAD(P)H. Ca²⁺ uwalniany z ER może zwrótnie aktywować PLC, a także fosfolipazy D (PLD) i A₂ (PLA₂). PLD i PLA₂ są aktywowane także poprzez białko G_q ($\beta\gamma$) (cienka linia przerywana) związane z receptorem AT₁. Aktywna PLD działa głównie na fosfatydylocholinę, dostarczając kwas arachidonowy, który pod wpływem fosfohydrolazy ulega defosforylacji do DAG. Aktywna PLA₂ uwalnia z lipidów błony kwas arachidonowy. Wysokie stężenie kwasu arachidonowego wspomaga translokację p47phox do błony komórkowej i znosi autoinhibicję p47phox. Ang II poprzez białko G_q ($\beta\gamma$) aktywuje także kinazę Src – zależną od H₂O₂, która może uczestniczyć w fosforylacji p47phox i pośredniczyć w aktywacji białka Rac. Konsekwencją aktywacji naczyniowych oksydaz NAD(P)H jest produkcja anionorodnika nadtlenkowego (O₂⁻), przekształcanego do H₂O₂ pod wpływem dysmutazy nadtlenkowej (SOD). Oba rodniki tlenowe mogą wywoływać efekty biologiczne, takie jak: skurcz ściany naczyń, wywoływanie apoptozy komórek śródbłonna i utlenianie LDL. H₂O₂ uczestniczy w aktywacji kinaz tyrozynowych i MAPK, które aktywują czynniki transkrypcyjne, w tym NF- κ B, wywołując zależne od H₂O₂ efekty biologiczne związane z modulacją ekspresji informacji genetycznej, zaburzeniami funkcji śródbłonna, proliferacją i przrostem miocytów naczyń. Obecność katalazy (czerwona strzałka) znosi efekty działania H₂O₂. Brązowe tło – cytosol.



Rysunek 5. Udział kinaz c-Src i PI3K w podtrzymywaniu aktywności naczyniowych oksydaz NAD(P)H. Angiotensyna II (Ang II) aktywuje kinazę białkową C (PKC). PKC fosforyluje białko p47phox i jednocześnie uczestniczy w aktywacji kinazy c-Src. Kinaza c-Src jest enzymem zależnym od H₂O₂ i w formie aktywnej stymuluje receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGF). Aktywny receptor EGF pobudza kinazę fosfatydylo-3-fosfoinozytolową (PI3K) do produkcji fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforanu (PI(3,4,5)P₃), który uczestniczy w aktywacji białka Rac-1. Wiązanie GTP przez Rac-1 i jego przemieszczenie do błony komórkowej aktywują oksydazę NAD(P)H do produkcji O₂⁻. O₂⁻ przekształcany jest do H₂O₂ z udziałem dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). H₂O₂ ponownie pobudza kinazę c-Src, która pośredniczy w aktywacji oksydaz NAD(P)H. Obecność katalazy (czerwona strzałka) obniża produkcję wolnych rodników. Brązowe tło – cytosol (na podstawie [7], zmodyfikowane).

z inhibitorami kinazy białkowej C (chelerytryna, kalfostyna C lub GF109203X) zapobiega fosforylacji p47phox, jego przemieszczaniu się do błony komórkowej i w rezultacie prowadzi do obniżenia wytwarzania reaktywnych form tlenu (RFT) indukowanego przez angiotensynę II, PDGF lub TNF- α [7, 11, 77, 78].

Podczas stymulacji miocytów naczyniowych przez angiotensynę II fosfolipaza D hydrolizuje fosfatydylocholinę do kwasu fosfatydowego. Inhibitor fosfolipazy D (dihydro-D-erytrosfingozyna) oraz DPI, inhibitor flawoprotein [77, 79], redukują generowanie reaktywnych form tlenu wywołane przez angiotensynę II [77, 79]. Wprowadzenie do komórek kwasu fosfatydowego znosi efekt hamowania i powoduje wznowienie wytwarzania O₂⁻. Kwas fosfatydowy może być dodatkowym źródłem diacyloglicerolu i kwasu arachidonowego, który jest również wewnątrzkomórkowym aktywatorem naczyniowych oksydaz NAD(P)H.

Enzymem odpowiedzialnym za uwalnianie z błonowych fosfolipidów kwasu arachidonowego jest fosfolipaza A₂. Antysensowny DNA dla fosfolipazy A₂ hamuje w około 85% przemieszczanie się podjednostek cytosolowych oksydazy NADPH do błony komórkowej [80]. Kwas arachidonowy znosi efekt tego hamowania [80] i indukuje wytwarzanie reaktywnych form tlenu zależne od oksydaz NAD(P)H [6, 80]. Związek ten w wyższych stężeniach wspomaga nie tylko przemieszczanie się białka p47phox do błony komórkowej, ale znosi również autohamowanie p47phox i odsłania jego domeny SH3 [81]. Kwas arachidonowy umożliwia łączenie się składników cytoplazmatycznych z białkiem p22phox bez udziału kinazy białkowej C. Kinaza białkowa C jest jednak niezbędna do aktywacji kompleksu przy niskich stęże-

niach kwasu arachidonowego [81]. Rolę oksydaz NAD(P)H w tworzeniu reaktywnych form tlenu zależnym od kwasu arachidonowego podkreśla fakt, że kwas arachidonowy nie jest zdolny do indukcji wytwarzania O₂⁻ w miocytach naczyniowych transfekowanych antysensownym p22phox [6].

AKTYWACJA BIAŁKA Rac-1

Agoniści i czynniki wzrostowe wzmagają ekspresję białka Rac-1, indukują jego aktywność GTPazową oraz wędrówkę do frakcji błonowej [43,46]. Procesy te są niezbędne do aktywacji kompleksu oksydaz NAD(P)H [7, 8] (Rys. 5). Hamowanie Rac-1 poprzez toksynę A (*Clostridium difficile*) lub transfekcja ludzkich miocytów naczyń adenowirusem z cDNA dla białka Rac-1 dominacyjnie negatywnego (ang. *dominant negative Rac cDNA*) w stosunku do produktu genu Rac-1 typu dzikiego, hamują produkcję reaktywnych form tlenu stymulowaną angiotensyną II [7]. Do aktywacji Rac-1 oraz fosforylacji p47phox indukowanej przez angiotensynę II konieczna jest obecność tyrozynowej c-Src [7, 8] (Rys. 5). Aktywacja kinazy c-Src zależy od obecności H₂O₂. Aktywna kinaza c-Src fosforyluje białko p47phox oraz stymuluje aktywację receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu, co prowadzi do wzrostu aktywności kinazy fosfatydylo-3-fosfoinozytoli (PI3K) i wzmożonej produkcji fosfatydyloinozytolo-(3,4,5)-trifosforanu (PI(3,4,5)P₃). PI(3,4,5)P₃ stymuluje aktywność GTPazową białka Rac-1 i umożliwia jego związanie z błoną [7, 8]. Inhibitory kinazy fosfatydylo-3-fosfoinozytoli (wormanina lub LY294002) oraz receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (AG1478) osłabiają zarówno aktywację Rac-1, jak i wytwarzanie reaktywnych form tlenu [7].

Opisane w tym rozdziale wyniki badań doświadczalnych wskazują na występowanie pozytywnego sprzężenia zwrotnego, dzięki któremu wolne rodniki wytwarzane przez oksydazę stymulowaną przez angiotensynę II, aktywują receptor naskórkowego czynnika wzrostu z udziałem kinazy c-Src, podtrzymując aktywność oksydaz NAD(P)H (Rys. 5).

Złożoność mechanizmów prowadzących do aktywacji naczyniowych oksydaz NAD(P)H stwarza możliwości powstawania zakłóceń na wielu etapach przekazywania sygnału. Konsekwencje zakłóceń prowadzących do nadmiernej aktywacji oksydaz NAD(P)H obserwuje się podczas patologicznych procesów zachodzących na terenie ściany naczyń, prowadzących do formowania blaszek miażdżycowych.

ROLA NACZYNIOWYCH OKSYDAZ NAD(P)H W PATOGENEZIE MIAŻDŻYCY

Reaktywne formy tlenu wytwarzane na terenie ścian tętniczych przez oksydazy NAD(P)H wywołują zaburzenia funkcji śródbłonka oraz proliferację i przerost miocytów naczyń. Reaktywne formy tlenu osłabiają relaksację naczyń tętniczych zależną od śródbłonka i zwiększają ciśnienie tętnicze krwi. Wszystkie te procesy są kluczowymi w rozwoju miażdżycy.

ZABURZENIA FUNKCJI ŚRÓDBŁONKA

Zaburzenia funkcji śródbłonka uważane są za przyczynę większości chorób układu sercowo-naczyniowego [82]. Mogą mieć one podłoże mechaniczne, chemiczne lub immunologiczne. Relaksacja naczyń krwionośnych jest jednym z podstawowych czynników utrzymujących integralność endotelium i zależy od równowagi między czynnikami wywołującymi skurcz naczyń (np. angiotensyna II, endotelina), a czynnikami rozkurczającymi. Czynnikiem rozkurczającym pochodzenia śródbłonkowego jest tlenek azotu. Poza utrzymaniem tonu naczyniowego, NO zapobiega apoptozie komórek endotelialnych indukowanej przez oxLDL [83], hamuje podziały i indukuje apoptozę miocytów naczyniowych [84]. NO zmniejsza także ekspresję białek adhezyjnych [85]. Tlenek azotu reaguje z O_2 dostarczając nadtlenoazotynu (ONOO⁻), który znosi ochronne właściwości NO [22]. Nadtlenoazotyn i O_2 uczestniczą w tlenowych modyfikacjach lipoprotein, w tym klasy LDL na terenie ściany naczyń [23]. W miocytach naczyniowych i komórkach zapalnych stężenie oxLDL zależy od ilości wytwarzanego O_2 i obecności p22phox [25, 26]. Podanie makrofagom apocyniny, specyficznego inhibitora oksydaz NAD(P)H, powoduje redukcję tlenowych modyfikacji LDL o 89% [24].

Anionorodniki ponadtlenkowe i cząsteczki oxLDL uszkadzają śródbłonek lub indukują apoptozę jego komórek [83, 86]. Do pobudzonych urazem rejonów śródbłonka przylegają leukocyty (głównie monocyty), co wywołuje ich migrację do ściany naczyń. Adhezja i diapedeza monocytów zachodzą z udziałem białek adhezyjnych, między innymi VCAM-1 (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*), ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecule 1*) i selektyń prezentowanych

na powierzchni komórek. Ekspresja genów kodujących VCAM-1, ICAM-1 i selektynę E indukowana jest przez cytokiny i angiotensynę II [33-36]. Procesy te zależą od stanu redoks komórek i zachodzą z udziałem czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. *nuclear factor- κ B*) aktywowanego przez H_2O_2 [33, 34, 36]. Hamowanie oksydaz NAD(P)H powoduje zahamowanie ekspresji ICAM-1 indukowanej angiotensyną II, przenikanie makrofagów z nieuszkodzonych naczyń krwionośnych do otaczających tkanek (diapedezę) oraz naczyńową hipertrofię [35].

Anionorodnik ponadtlenkowy stymuluje miocyty naczyń, komórki endotelialne oraz komórki jednojądrzaste do wydzielania chemoatraktantów, głównie białka MCP-1 (ang. *Monocyte Chemoattractant Protein type - 1*) [11, 37, 38]. Inhibitory naczyniowych oksydaz NAD(P)H, takie jak DPI lub apocynina, obniżają ekspresję genu kodującego MCP-1 indukowaną przez angiotensynę II i PDGF [11, 12]. H_2O_2 pełni rolę wtórnego przekaźnika w aktywacji ekspresji genu dla MCP-1, hamowanej przez katalazę [37].

Oksydazy NAD(P)H mogą uczestniczyć w uszkodzaniu śródbłonka oraz w migracji monocytów do wnętrza ściany naczyń. Monocyty/makrofagi są dodatkowym źródłem wolnych rodników, cytokin i czynników wzrostu na terenie ściany naczyń, zatem ich obecność może sprzyjać proliferacji i przerostowi miocytów warstwy wewnętrznej ściany naczyń.

WZMOŻONA PROLIFERACJA I PRZEROST MIOCYTÓW NACZYNIOWYCH I KARDIOMIOCYTÓW

Proliferacja komórek mięśni gładkich błony wewnętrznej naczyń towarzysząca rozwojowi miażdżycy jest konsekwencją uszkodzenia i zaburzenia funkcji śródbłonka. Głównym aktywatorem tego procesu jest angiotensyna II [27-29], natomiast H_2O_2 stanowi sygnał do zapoczątkowania wzrostu [27, 28]. Nadekspresja katalazy, podobnie jak DPI lub losartan (inhibitor receptora AT₁ dla angiotensyny II), obniżają proliferację miocytów naczyń indukowaną angiotensyną II. Podobny efekt biologiczny wywołuje transfekcja antysensownego DNA dla p22phox [27, 28].

Kinazy MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*) należą do białek wrażliwych na zmiany stanu redoks komórki, które aktywują czynniki transkrypcyjne takie jak NF- κ B lub AP-1 (ang. *activator protein-1*). Wszystkie cztery podstawowe typy kinaz MAPK, czyli kinazy ERK1/2 (ang. *extracellular signal-regulated kinase 1/2*), kinazy JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinases*), kinazy MAPK p38 i duża kinaza MAPK-1 są aktywowane przez H_2O_2 w miocytach naczyń krwionośnych [30, 31]. W miocytach szczura antysensowny cDNA dla p22phox hamuje aktywację kinaz JNK i p38 MAPK, ale nie ERK [31]. W kardiomiocytach angiotensyna II zapoczątkowuje ekspresję TGF- β (ang. *transforming growth factor - β*) w szlaku zależnym od kinazy p38 MAPK, a antysensowny p22phox i NOX hamują aktywację p38 MAPK oraz ekspresję TGF- β [32].

Nadciśnienie sprzyja rozwojowi zmian miażdżycowych, wywołując między innymi przerost miocytów naczyń i lewej komory serca. Układ renina-angiotensyna odgrywa znaczącą rolę w patogenezie nadciśnienia. Nadciśnienie wywołane angiotensyną II jest zależne od produkcji O_2^- przez oksydazę NAD(P)H [87, 88], natomiast nadciśnienie wywołane noradrenaliną jest niezależne od wolnych rodników tlenowych [89]. U myszy pozbawionych genu i białka p47phox (p47phox^{-/-}) podanie angiotensyny II nie wpływa na ilość wytwarzanego O_2^- i nie podnosi ciśnienia krwi, w odróżnieniu od myszy typu dzikiego [90]. Znaczne obniżenie ciśnienia krwi uzyskano podając dysmutazę ponadtlenkową szczurom z nadciśnieniem wywołanym angiotensyną II. U szczurów z nadciśnieniem wywołanym noradrenaliną i zwierząt kontrolnych nie wykryto różnic w ciśnieniu krwi po podaniu dysmutazy [89]. Apocynina i kwas acetylosalicylowy obniżają ciśnienie krwi i wytwarzanie O_2^- u szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem (ang. *spontaneously hypertensive rats*) [50, 91]. Hamowanie oksydaz NAD(P)H obniża także wartość ciśnienia krwi myszy z nadciśnieniem wywołanym angiotensyną II [92].

INHIBITORY KOMPLEKSU, IMPLIKACJE KLINICZNE

Do inhibitorów oksydaz NAD(P)H należą między innymi difenylenejodonian, apocynina, estrogen i modulatory receptorów estrogenowych. DPI jest akceptorem elektronów pochodzących ze zredukowanych centrów redoks oksydaz NAD(P)H, hamując w ten sposób produkcję anionorodnika ponadtlenkowego [39, 40].

DPI jest niespecyficznym inhibitorem wszystkich flawoenzymów i poza oksydazami NAD(P)H hamuje także działanie oksydazy ksantynowej, syntaz tlenu azotu i enzymów cytochromu P450.

Apocynina (4-hydroksy-3-metoksy-acetofenon) otrzymywana jest z ekstraktu korzenia *Picrorhiza kurroa*. Związek ten blokuje tworzenie kompleksu aktywnego oksydaz NAD(P)H, zapobiegając wędrowce składników cytosolowych do błony komórkowej [41, 42]. Apocynina indukuje czynnik transkrypcyjny AP-1 (ang. *activator protein-1*) [43], którego aktywacja wywołuje efekty biologiczne przeciwstawne do wywoływanych przez potencjalnie prozapalny czynnik transkrypcyjny NF- κ B. AP-1 należy do czynników transkrypcyjnych silnie zależnych od stanu redoks komórki, a jego aktywacja ma przypuszczalnie związek z hamowaniem oksydaz NAD(P)H.

Estrogen (17-beta estradiol) hamuje aktywność oksydaz NAD(P)H indukowaną przez angiotensynę II, w takim samym stopniu jak dysmutaza ponadtlenkowa lub inhibitory receptora AT₁ [44]. W komórkach endotelialnych człowieka 17-beta estradiol powoduje obniżenie ekspresji białka gp91phox, oksydazy zależnej od dawki i czasu, któremu towarzyszy redukcja poziomu mRNA i białka nawet o 60% [45]. Estrogen hamuje również ekspresję chemokin i białek adhezyjnych [45], obniża ekspresję mRNA dla Rac-1 indukowaną angiotensyną II, w sposób zależny od czasu i dawki

[46]. W modelu *in vivo* u szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem, estrogen redukuje ilość mRNA dla Rac1 i syntezę białka Rac-1, odpowiednio o 32 i 58%, w porównaniu ze szczurami nie poddanymi działaniu estrogenu [46].

Deksametazon w hodowli komórkowej ludzkich miocytów naczyniowych obniża wytwarzanie O_2^- i ekspresję p22phox wywołaną angiotensyną II i PDGF. Efekt ten znosi zahamowanie receptora glukokortykoidowego przez jego antagonistę RU486 [47].

Selektywne modulatory receptorów estrogenowych, idoksyfen (ang. *idoxifene*) oraz raloksyfen (ang. *raloxifene*), hamują działanie oksydaz NAD(P)H [48, 49]. Długotrwałe (10 tygodni) podawanie raloksyfenu samcom szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem powoduje spadek produkcji O_2^- oraz ciśnienia krwi a także obniżenie ekspresji białka Rac1 [49]. Raloksyfen powoduje także wzrost wydzielania NO w modelu *in vivo*.

Wiele leków, od dawna stosowanych w terapii farmakologicznej chorób sercowo-naczyniowych, zapobiega powstawaniu O_2^- . Przedstawicielami tej grupy związków są kwas acetylosalicylowy, inhibitory konwertazy angiotensynowej (ACE), antagoniści receptora dla angiotensyny II typu pierwszego (AT₁) oraz statyny.

Kwas acetylosalicylowy jest inhibitorem cyklooksygenazy, jednocześnie wpływa na aktywność naczyniowych oksydaz NAD(P)H. Długotrwałe podawanie kwasu acetylosalicylowego szczurom z nadciśnieniem indukowanym angiotensyną II obniża aktywność oksydazy NAD(P)H i wytwarzanie O_2^- o 45%, oraz całkowicie znosi nadciśnienie wywołane angiotensyną II [50].

Inhibitory ACE i antagoniści receptora AT₁ hamują ekspresję podjednostek oksydaz NAD(P)H i wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego zależne od oksydaz [28, 51-53].

Statyny są nie tylko inhibitorami reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA, kluczowego enzymu w syntezie endogennego cholesterolu, ale również obniżają wytwarzanie O_2^- poprzez hamowanie acylacji białka Rac-1 [54-56]. Uniemożliwia to jego zakotwiczenie w błonie komórkowej i wytworzenie aktywnego katalitycznie kompleksu oksydazy NAD(P)H, redukując syntezę O_2^- [54-56].

Większość omawianych w tym rozdziale inhibitorów oksydaz NAD(P)H (z wyjątkiem apocyniny) to związki działające nieswoiście lub inhibitory pośrednie, zatrzymujące wczesne etapy przekazywania sygnału, wywoływane przez angiotensynę II. Poznanie roli naczyniowych oksydaz NAD(P)H, mechanizmu ich aktywacji i działania w patogenezie miażdżycy w dużym stopniu umożliwiło użycie swoistych inhibitorów w badaniach eksperymentalnych. Swoiste inhibitory oksydaz NAD(P)H nie wydają się jednak być dobrym narzędziem w terapii przeciwmiażdżycowej, ponieważ białka phox należą do bardzo konserwatywnych i budują także fagocytarną oksydazę NADPH. Podanie inhibitorów białek phox lub inhibitorów zapobiegających formowaniu kompleksu aktywnego, hamowałoby nie tylko

oksydazę naczyniową ale również oksydazę fagocytarną. Wiązałoby się to z niekorzystnym zjawiskiem, jakim jest obniżenie odporności na mikroorganizmy. Obiecującym obiektem przyszłych badań farmakologicznych wydają się być białka NOX1 i NOX4. NOX1 nie występuje w fagocytach i charakteryzuje się bardzo niską ekspresją w zdrowej tkance a wysoką w chorej, przykładowo we wczesnym stadium nawrotu zwężenia (ang. *restenosis*) po balonowej angioplastyce tętnicy szyjnej [17].

Swoiste inhibitory białek NOX czekają na odkrycie i niewykluczone, że przyczynią się one do rozwoju nowych terapeutycznych strategii leczenia chorób, których patologia związana jest ze stresem oksydacyjnym, wywoływanym przez naczyniowe oksydazy NAD(P)H.

PIŚMIENNICTWO

- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H Oxidase. Role in Cardiovascular biology and disease. *Circulation Research* 86: 494-501
- Lassegue B, Clempus RE (2003) NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Vascular Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R277-R297
- Leusen JHW, Verhoeven AJ, Roos D. (1996) Interactions between the components of the human NADPH oxidase: A review about the intrigues in the phox family. *Front Biosci* 1: d72-90
- Babior BM. NADPH Oxidase; An update (1999) *Blood* 93: 1464-1476
- Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H (2001) Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation* 104: 1767-72
- Zafari AM, Ushio-Fukai M, Minieri CA, Akers M, Lassegue B, Griendling KK (1999) Arachidonic acid metabolites mediate angiotensin II-induced NADH/NADPH oxidase activity and hypertrophy in vascular smooth muscle cells *Antioxid Redox Signal* 1: 167-79
- Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK (2002) Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 91: 406-13
- Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL (2003) c-Src Induces Phosphorylation and Translocation of p47phox: Role in Superoxide Generation by Angiotensin II in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 981-7
- Patterson C, Ruef J, Nageswara R, Madamanchi NR, Barry-Lane P, Hu Z, Horaist C, Ballinger CA, Brasier AR, Bode C, Runge MS (1999) Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 274: 19814-22
- Kreuzer J, Viedt C, Brandes RP, Seeger F, Rosenkranz AS, Sauer H, Babich A, Nurnberg B, Kather H, Krieger-Brauer HI (2003) Platelet-derived growth factor activates production of reactive oxygen species by NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells through Gi1,2. *FASEB J* 17: 38-40
- Marumo T, Schini-Kerth VB, Fisslthaler B, Busse R (1997) Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 96: 2361-7
- De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK (1998) Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 329: 653-7
- Ungvari Z, Csiszar A, Edwards JG, Kaminski PM, Wolin MS, Kaley G, Koller A (2003) Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: role of tumor necrosis factor-alpha, NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 418-24
- Huang J, Kleinberg ME (1999) Activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Phosphorylation controls SH3 domain-dependent binding to p22(phox). *J Biol Chem* 274: 19731-7
- Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K (2003) Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 113: 343-55
- Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK (2001) Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 88: 888-94
- Szocs K, Lassegue B, Sorescu D, Hilenski LL, Valppu L, Couse TL, Wilcox JN, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK (2002) Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 21-7
- Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griendling KK (2002) Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 105: 1429-35
- Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL (2002) Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* 90: 1205-13
- Geiszt M, Lekstrom K, Witta J, Leto TL (2003) Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem* 278: 20006-12
- Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H (2003) Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 278: 25234-46
- Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320: 454-6
- Darley-Usmar VM, Hogg N, O'Leary VJ, Wilson MT, Moncada S (1992) The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* 17: 9-20
- Aviram M, Rosenblat M, Etzioni A, Levy R (1996) Activation of NADPH oxidase required for macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Metabolism* 45: 1069-1079
- Azumi H, Inoue N, Ohashi Y, Terashima M, Mori T, Fujita H, Awano K, Kobayashi K, Maeda K, Hata K, Shinke T, Kobayashi S, Hirata K, Kawashima S, Itabe H, Hayashi Y, Imajoh-Ohmi S, Itoh H, Yokoyama M (2002) Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1838-44
- Meyer JW, Schmitt ME (2000) A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS L* 472: 1-4
- Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK (1996) p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271: 23317-21
- Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK (1998) Role of NADH/NADPH oxidase-derived H2O2 in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 32: 488-95
- Kagiyama S, Eguchi S, Frank GD, Inagami T, Zhang YC, Phillips MI (2002) Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense. *Circulation* 106: 909-12
- Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK (1998) p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the re-

- dox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 273: 15022-9
31. Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, Fei J, Elsing C, Kubler W, Kreuzer J (2000) Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 940-8
 32. Wenzel S, Taimor G, Piper HM, Schluter KD (2001) Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes. *FASEB J* 15: 2291-3
 33. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM (1999) Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 100: 1223-9
 34. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB (2000) Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 645-51
 35. Liu J, Yang F, Yang XP, Jankowski M, Pagano PJ (2003) NAD(P)H Oxidase Mediates Angiotensin II-Induced Vascular Macrophage Infiltration and Medial Hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 776-782
 36. Costanzo A, Moretti F, Burgio VL, Bravi C, Guido F, Levrero M, Puri PL (2003) Endothelial activation by angiotensin II through NFkappaB and p38 pathways: Involvement of NFkappaB-inducible kinase (NIK), free oxygen radicals, and selective inhibition by aspirin. *J Cell Physiol* 195: 402-10
 37. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM (1998) Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83: 952-9
 38. Zeng X, Dai J, Remick DG, Wang X (2003) Homocysteine mediated expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human monocytes. *Circ Res* 93: 311-20
 39. O'Donnell BV, Tew DG, Jones OT, England PJ (1993) Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J* 290: 41-9
 40. Doussiere J, Gaillard J, Vignais PV (1999) The heme component of the neutrophil NADPH oxidase complex is a target for aryliodonium compounds. *Biochemistry* 38: 3694-703
 41. J Stolk, TJ Hiltermann, JH Dijkman and AJ Verhoeven (1994) Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am. J Respir Cell Mol Biol* 11: 95-102
 42. Dodd-O JM, Pearse DB (2000) Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ischemia-reperfusion lung injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H303-12
 43. Lapperre TS, Jimenez LA, Antonicelli F, Drost EM, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, Rahman I (1999) Apocynin increases glutathione synthesis and activates AP-1 in alveolar epithelial cells. *FEBS Lett* 443:235-9
 44. Gragasin FS, Xu Y, Arenas IA, Kainth N, Davidge ST (2003) Estrogen reduces angiotensin II-induced nitric oxide synthase and NAD(P)H oxidase expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23: 38-44
 45. Wagner AH, Schroeter MR, Hecker M (2001) 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *FASEB J*. 15: 2121-30
 46. Laufs U, Adam O, Strehlow K, Wassmann S, Konkol C, Laufs K, Schmidt W, Bohm M, Nickenig G (2003) Down-regulation of Rac-1 GTPase by Estrogen. *J Biol Chem*. 278: 5956-62
 47. Marumo T, Schini-Kerth VB, Brandes RP, Busse R (1998) Glucocorticoids inhibit superoxide anion production and p22phox mRNA expression in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension* 32: 1083-1088
 48. Baumer AT, Wassmann S, Ahlbory K, Strehlow K, Muller C, Sauer H, Bohm M, Nickenig G (2001) Reduction of oxidative stress and AT1 receptor expression by the selective oestrogen receptor modulator idoxifene. *Br J Pharmacol* 134: 579-84
 49. Wassmann S, Laufs U, Stamenkovic D, Linz W, Stasch JP, Ahlbory K, Rosen R, Bohm M, Nickenig G (2002) Raloxifene improves endothelial dysfunction in hypertension by reduced oxidative stress and enhanced nitric oxide production. *Circulation* 105: 2083-91
 50. Wu R, Lamontagne D, de Champlain J (2002) Antioxidative properties of acetylsalicylic Acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 105: 387-92
 51. van der Giet M, Erinola M, Zidek W, Tepel M (2002) Captopril and quinapril reduce reactive oxygen species. *Eur J Clin Invest* 32: 732-7
 52. Khan BV, Navalkar S, Khan QA, Rahman ST, Parthasarathy S (2001) Irbesartan, an angiotensin type 1 receptor inhibitor, regulates the vascular oxidative state in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 38: 1662-7
 53. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Bohm M, Meinertz T, Munzel T (1999) Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 99: 2027-33
 54. Laufs U, Kilter H, Konkol C, Wassmann S, Bohm M, Nickenig G (2002) Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart. *Cardiovasc Res* 53: 911-20
 55. Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, Linz W, Bohm M, Nickenig G (2002) Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 300-5
 56. Kugi M, Matsunaga A, Ono J, Arakawa K, Sasaki J (2002) Antioxidative effects of fluvastatin on superoxide anion activated by angiotensin II in human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Drugs Ther* 16: 203-7
 57. Wallach TM, Segal AW (1997) Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. *Biochem J* 321: 583-5
 58. Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef WM, Dinauer MC (2001) Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem* 276: 31105-12
 59. Maturana A, Arnaudeau S, Ryser S, Banfi B, Hossle JP, Schlegel W, Krause KH, Demaurex N (2001) Heme histidine ligands within gp91(phox) modulate proton conduction by the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 276: 30277-84
 60. Yu L, Quinn MT, Cross AR, Dinauer MC (1998) Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7993-8
 61. Banfi B, Schrenzel J, Nusse O, Lew DP, Ligeti E, Krause KH, Demaurex N (1999) A novel H(+) conductance in eosinophils: unique characteristics and absence in chronic granulomatous disease. *J Exp Med* 190: 183-94
 62. Teahan C, Rowe P, Parker P, Totty N, Segal AW (1987) The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245. *Nature* 327: 720-1
 63. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401: 79-82
 64. Banfi B, Maturana A, Jaconi S, Arnaudeau S, Laforge T, Sinha B, Ligeti E, Demaurex N, Krause KH (2000) A mammalian H+ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science* 287: 138-42
 65. Dahan I, Issaeva I, Gorzalczy Y, Sigal N, Hirshberg M, Pick E (2002) Mapping of functional domains in the p22(phox) subunit of flavocytochrome b(559) participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by „peptide walking“. *J Biol Chem* 277: 8421-32
 66. Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH (1990) Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). *Gene struc-*

- ture, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *Clin Invest* 86: 1729-37
67. Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y, Rittinger K (2002) Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem* 277: 10121-8
 68. Francke U, Hsieh CL, Foellmer BE, Lomax KJ, Malech HL, Leto TL (1990) Genes for two autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease assigned to 1q25 (NCF2) and 7q11.23 (NCF1). *Am J Hum Genet* 47: 483-92
 69. Das AK, Cohen PW, Barford D (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* 17: 1192-9
 70. Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H (1999) Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 274: 25051-60
 71. Zhan S, Vazquez N, Zhan S, Wientjes FB, Budarf ML, Schrock E, Ried T, Green ED, Chanock SJ (1996) Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. *Blood* 88: 2714-21
 72. DeLeo FR, Yu L, Burritt JB, Loetterle LR, Bond CW, Jesaitis AJ, Quinn MT (1995) Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7110-4
 73. Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD (1999) The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* 274: 22999-3005
 74. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT (1997) Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14483-8
 75. Li JM, Shah AM (2002) Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 19952-60
 76. Hohler B, Holzapfel B, Kummer W (2000) NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Histochem Cell Biol* 114: 29-37
 77. Touyz RM, Schiffrin EL (2001) Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens* 19: 1245-54
 78. Frey RS, Rahman A, Kefer JC, Minshall RD, Malik AB (2002) PK-Czeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ Res* 90: 1012-9
 79. Touyz RM, Schiffrin EL (1999) Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 34: 976-82
 80. Zhao X, Bey EA, Wientjes FB, Cathcart MK (2002) Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) regulation of human monocyte NADPH oxidase activity. cPLA2 affects translocation but not phosphorylation of p67(phox) and p47(phox). *J Biol Chem* 277: 25385-92
 81. Shiose A, Sumimoto H (2000) Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 275: 13793-801
 82. Ross R (1999) Atherosclerosis - an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine* 340: 115-126
 83. Kotamraju S, Hogg N, Joseph J, Keefer LK, Kalyanaraman B (2001) Inhibition of oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in endothelial cells by nitric oxide. Peroxyl radical scavenging as an antiapoptotic mechanism. *J Biol Chem* 276: 17316-23
 84. Krick S, Platoshyn O, Sweeney M, McDaniel SS, Zhang S, Rubin LJ, Yuan JX (2002) Nitric oxide induces apoptosis by activating K⁺ channels in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H184-93
 85. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM (1996) Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9114-9
 86. Li D, Yang B, Mehta JL (1998) Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. *Am J Physiol* 275: H568-76
 87. Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, Stahl RA, MacHarzina R, Brasen JH, Meinertz T, Munzel T (1999) Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int* 55: 252-60
 88. Li L, Fink GD, Watts SW, Northcott CA, Galligan JJ, Pagano PJ, Chen AF (2003) Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation* 107: 1053-8
 89. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG (1997) Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 95: 588-93
 90. Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG (2002) Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* 40: 511-5
 91. Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC (2001) NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension* 38: 1107-11
 92. Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ (2001) Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(-) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res* 89: 408-14

Vascular NAD(P)H oxidases - role in the pathogenesis of atherosclerosis

Paweł Niemiec[✉], Iwona Żak

Department of Medical Biochemistry and Genetics, Medical University of Silesia, 18 Medyków St., 40-752 Katowice, Poland

[✉]e-mail: pn Niemiec@slam.katowice.pl

Key words: NAD(P)H oxidases, atherosclerosis, reactive oxygen species

ABSTRACT

Vascular NAD(P)H oxidases are multicomponent enzymes found in vascular smooth muscle cells and endothelial cells. Vascular NAD(P)H oxidases are predominant sources of superoxide in the vasculature. Active forms of NAD(P)H oxidases are associated with plasma membrane and consist of at least six components, namely: NOX, p22phox peptides and p47phox, p67phox, p40phox and Rac.

Angiotensin II is the most important activator of NAD(P)H oxidases in vasculature. Angiotensin II induces superoxide and superoxide-derived hydrogen peroxide production, which may stimulate many proatherosclerotic processes, including increased expression of adhesion molecules, chemoattractants and activation of transcription factor NF- κ B. Moreover, reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidases may be involved in endothelial cells apoptosis, oxidation of low density lipoproteins and vascular myocytes hypertrophy and proliferation.

Specific inhibitors of NAD(P)H oxidases may be useful experimental tools for atherosclerosis research and may have potential therapeutic significance in the future.

Czynnik wzrostu śródbłonna naczyń – budowa i funkcje

Patrycja Barańska

Hanna Jerczyńska

Zofia Pawłowska

Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej
Instytutu Fizjologii i Biochemii, Uniwersytet
Medyczny, Łódź

Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej
Instytutu Fizjologii i Biochemii, Uniwersytet
Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8,
92-215 Łódź, e-mail: patrycja@zdn.am.lodz.pl;
tel. (42) 678 33 93; faks: (42) 678 94 33

Artykuł otrzymano 5 lipca 2004
Artykuł zaakceptowano 14 stycznia 2005

Słowa kluczowe: angiogeneza; czynnik wzro-
stu śródbłonna naczyń; neuropiliny.

Wykaz skrótów: ERK (ang. *extracellularly regulated protein kinases*) – kinazy regulowane sygnałami zewnątrzkomórkowymi; FAK (ang. *focal adhesion kinase*) – kinaza ognisk adhezyjnych; FGF (ang. *fibroblast growth factor*) – czynnik wzrostu fibroblastów; Flk-1 (ang. *foetal liver kinase 1*) – płodowa kinaza wątrobową 1; Flt-1 (ang. *fms-related tyrosine kinase1*) – kinaza tyrozynowa 1 związana z fms; HIF-1 (ang. *hypoxia inducible factor-1*) – czynnik indukowany hipoksją; HUVEC (ang. *human umbilical vein endothelial cells*) – komórki śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej; KDR (ang. *kinase insert domain receptor*) – receptor z domeną kinazową; MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny; PlGF (ang. *placenta growth factor*) – łożyskowy czynnik wzrostu.

Podziękowania: Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego KBN nr PBZ-KBN-039/P04/2001 oraz Centrum Doskonałości „MolMed” finansowanego z funduszy Unii Europejskiej.

STRESZCZENIE

Czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), opisany początkowo jako czynnik stymulujący przepuszczalność naczyń krwionośnych, uważany jest obecnie za jeden z głównych czynników regulujących proces angiogenezy, czyli tworzenia nowych naczyń krwionośnych w postaci wypustek z naczyń już istniejących. Pełni on wiodącą rolę w regulacji zarówno prawidłowej, jak i patologicznej angiogenezy. Niniejsza praca jest próbą zwięzłego podsumowania aktualnego stanu wiedzy na temat rodziny białek VEGF, struktury genu kodującego ludzki VEGF, regulacji jego ekspresji, receptorów VEGF oraz jego udziału w przekazywaniu sygnału. Celem tej pracy jest również przedstawienie najnowszych osiągnięć dotyczących poznanych biologicznych funkcji pełnionych przez czynnik wzrostu śródbłonna naczyń oraz ich klinicznego znaczenia.

WPROWADZENIE

Czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF - ang. *vascular endothelial growth factor*) jest głównym regulatorem procesu różnicowania komórek, powstawania nowych naczyń krwionośnych (waskulogeneza) oraz tworzenia odgałęzień z już istniejącej sieci naczyń (angiogeneza) [1]. VEGF moduluje wiele ważnych funkcji fizjologicznych komórek śródbłonna i jest jednym z najważniejszych czynników wzrostu i przeżycia śródbłonna naczyń. Stymuluje on rozwój prawidłowej sieci naczyń krwionośnych w procesie embriogenezy, jak również dalszego rozwoju organizmu, w przebiegu ciąży, gojenia się ran i cyklu miesięcznego u kobiet [2]. VEGF jest także zaangażowany w proces angiogenezy towarzyszący stanom patologicznym takim jak: retinopatia cukrzycowa, choroba nowotworowa, reumatoidalne zapalenie stawów, łuszczyca i inne [2,3].

Początkowo VEGF opisany był jako czynnik stymulujący przepuszczalność naczyń krwionośnych [4]. Obecnie wiedza dotycząca zarówno złożoności typów i izoform VEGF, jak i procesów regulowanych przez ten czynnik jest ogromna. Najszerze zainteresowanie budzi jednak jego rola w procesach nowotworowych. Stymulowanie komórek śródbłonna do proliferacji oraz tworzenia nowych naczyń krwionośnych stanowi ważny element regulowania procesu wzrostu i przenoszenia się nowotworu. Badania ostatnich lat nad prawdopodobnymi regulatorami procesu angiogenezy wykazały wiodącą rolę VEGF w regulacji zarówno prawidłowej, jak i patologicznej angiogenezy. Obecne wysiłki badawcze w dziedzinie terapii nowotworów skupiają się między innymi na neutralizowaniu VEGF w celu zahamowania procesu angiogenezy [3]. Celem tej pracy jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy o VEGF, jego budowie, receptorach, a w szczególności pełnionych funkcjach biologicznych i znaczeniu klinicznym.

RODZINA BIAŁEK VEGF

VEGF występuje w postaci glikozylowanego homodimeru o masie cząsteczkowej 46-48 kDa, który w warunkach redukujących dysocjuje na dwie identyczne podjednostki, monomery o masie 24 kDa połączone wiązaniami disiarczkowymi [4-6]. Oczyszczono białko VEGF (VEGF-A) otrzymali po raz pierwszy Gospodarowicz i in. [5] oraz Ferrara i Henzel [6] w roku 1989. Do rodziny VEGF należą również spokrewnione strukturalnie, lecz różniące się aktywnością biologiczną VEGF-B, -C, -D i E oraz łożyskowy czynnik wzrostu (PlGF). Członkowie rodziny VEGF różnią się m.in. powinowactwem wiązania z receptorami VEGF, lokalizacją oraz intensywnością ekspresji.

VEGF (VEGF-A) jest pierwszym opisanym czynnikiem wzrostu naczyń należącym do rodziny czynników, których geny zostały zidentyfikowane w ciągu ostatnich kilku lat. Geny PlGF, VEGF-A, -B, -C, -D zlokalizowane są w genomie komórek ssaków, natomiast sekwencję homologiczną do pozostałych, a kodują-

cą czynnik VEGF-E odnaleziono w genomie wirusa *orf* (paparowirusa).

Łożyskowy czynnik wzrostu występujący w postaci dwóch izoform PIGF₁₃₁ oraz PIGF₁₅₂, będących wynikiem różnicowego cięcia i składania pierwotnego transkryptu, został zidentyfikowany jako pierwszy czynnik homologiczny do VEGF [7]. PIGF występuje w postaci homodimeru i wykazuje niewielkie działanie mitogenne w stosunku do komórek śródbłonka. Heterodimery PIGF:VEGF, które tworzą się zarówno *in vitro* jak i *in vivo* wykazują nieco silniejszą aktywność, jednak nadal około siedmiokrotnie słabszą niż homodimery VEGF. Sugeruje to, że PIGF bierze udział w negatywnej regulacji aktywności VEGF poprzez przesunięcie równowagi w kierunku dimerów o mniejszej aktywności biologicznej [8].

Badania funkcji VEGF-B, odkrytego w 1995 roku w klonowanym fragmencie cDNA myszy [9], nie zyskały początkowo dużego zainteresowania. Ekspresja VEGF-B, często razem z VEGF-A, ma miejsce już we wczesnym życiu płodowym, głównie w kardiomiocytach, mięśniach szkieletowych i mięśniach gładkich dużych naczyń krwionośnych [9,10]. Na skutek alternatywnego składania genu, zlokalizowanego u człowieka na chromosomie 11q13, powstają dwie izoformy: VEGF-B₁₆₇ oraz VEGF-B₁₈₆ [9], które po uwolnieniu wiązane są z proteoglikanami błony komórkowej. Doniesienia na temat fenotypu myszy pozbawionych genu VEGF-B są sprzeczne. Wiadomo, że brak tego genu nie wpływa na żywotność i płodność zwierząt. Bellomo i in. [11] donoszą, że myszy takie mają mniejsze serca oraz charakteryzują się dysfunkcją tętnic wieńcowych, podczas gdy Aase i in. [12] udowadniają, że brak tego czynnika nie wpływa szkodliwie na prawidłowe ukształtowanie systemu sercowo-naczyniowego zwierząt zarówno w okresie rozwoju, jak i w dorosłym organizmie. Silvestre i in. [13] wskazują także na istotną rolę czynnika w stymulacji procesu angiogenezy *in vivo*, jednak nadal główną przeszkodą w określeniu funkcji biologicznej samego VEGF-B jest jego częste współwystępowanie z VEGF-A, z którym tworzy heterodimery wykazujące własną aktywność biologiczną.

VEGF-C człowieka syntetyzowany jest w formie białka prekursorowego, które po całkowitej obróbce proteolitycznej jest uwalniane z komórki w postaci homodimeru [2,9]. Jego gen jest zlokalizowany na chromosomie 4q34. VEGF-C jest konieczny w procesie tworzenia naczyń limfatycznych w rozwoju embrionalnym, lecz wykazuje aktywność również w tworzeniu naczyń krwionośnych [14,15]. Ze względu na jego mitogenne i ochronne działanie w stosunku do komórek białaczkowych, uwalniany z komórki VEGF-C, może mieć negatywny wpływ na postępy leczenia białaczek [16].

VEGF-D wykazuje podobne do VEGF-C działanie mitogenne w stosunku do komórek śródbłonka naczyń krwionośnych i limfatycznych. Czynnik ten syntetyzowany jest w komórkach płuc, serca, mięśni szkieletowych, okrężnicy i jelita cienkiego. Czynniki regulujące ekspresję genu VEGF-D, zlokalizowanego na chromosomie Xp22.3, nie zostały dotychczas poznane [17]. Interesującym odkryciem jest znalezienie w genomie wirusa *orf*, atakującego kozy,

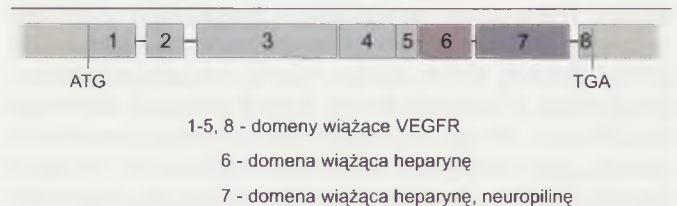
owce i sporadycznie człowieka, sekwencji homologicznej do genów pozostałych członków rodziny VEGF [2]. Może to sugerować, że gen wirusowego VEGF pochodzi od ssaków jako żywicieli i ulega dryfowi genetycznemu. VEGF-E wykazuje działanie proangiogenne [18], a dotychczasowa wiedza na temat oddziaływania tego czynnika z jednym z receptorów VEGF została streszczona w pracy Shibuya [19].

Do rodziny białek VEGF możemy również zaliczyć białka sv-VEGF wyizolowane z jadów węży. Z powodu ich homologii do VEGF występującego u naczelnych nazywane są one białkami „VEGF-like”. Jedno z nich wyizolowane zostało z jadu węża *Bothrops insularis* [20].

STRUKTURA GENU KODUJĄCEGO VEGF (VEGF-A) CZŁOWIEKA ORAZ IZOFORMY VEGF

Gen kodujący czynnik wzrostu VEGF człowieka zlokalizowany jest na chromosomie 6p21.3, a na jego strukturę składa się osiem egzonów oddzielonych siedmioma regionami niekodującymi (Rys. 1) [21,22]. Analizy sekwencji cDNA wskazywały na możliwość występowania kilku izoform VEGF, różniących się długością łańcucha aminokwasowego, a więc również właściwościami. Różnorodność ta, będąca skutkiem procesu dojrzewania mRNA, jest już opisana. W wyniku alternatywnego składania genu VEGF powstaje kilka izoform białka zawierających odpowiednio 121, 145, 148, 162, 165, 183, 189 i 206 aminokwasów [21-23].

Analiza regionu promotorowego genu ujawniła istnienie pojedynczego miejsca startu transkrypcji w bezpośrednim sąsiedztwie potencjalnego wiązania czynnika transkrypcyjnego Sp-1, oraz dwóch potencjalnych miejsc wiązania dla czynników AP-1 i AP-2 [21]. Egzony 1-5 oraz 8 kodują część białka niezbędną do prawidłowego wiązania się liganda z jego receptorami. Natywny VEGF jest glikoproteiną występującą w postaci homodimeru o charakterze zasadowym, wiążącą heparynę. Najbardziej rozpowszechniona, syntetyzowana przez wiele typów komórek zarówno zdrowych jak i zmienionych, oraz najbardziej aktywna biologicznie forma to VEGF₁₆₅. Pozbawiona jest ona reszt kodowanych przez egzon 6. Transkrypt izoformy VEGF₁₂₁ wykrywany w większości komórek i tkanek, w których ulega ekspresji VEGF₁₆₅ [21,22], nie ma reszt kodowanych zarówno przez egzon 6 jak i 7, niosący informację o sekwencji, która oprócz wiązania heparyny odpowiada za wiązanie z jednym z receptorów VEGF, neuropiliną-1. W przeciwieństwie do powszechnie występujących izoform VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ formy VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₃ oraz VEGF₂₀₆ występują *in vivo* niezwykle rzadko, np. najdłuższą z nich zlokalizowano jedynie w tkankach embrionalnych.



Rysunek 1. Struktura genu kodującego VEGF.

sorowych komórek hematopoetycznych [9]. Ekspresja VEGFR2 zachodząca we wczesnych etapach rozwoju odgrywa istotną rolę w różnicowaniu i dojrzewaniu komórek śródbłonna, ich proliferacji i migracji. Receptor ten wykazuje mniejsze powinowactwo do liganda niż VEGFR1 (Kd ~75 - 125 pM).

VEGFR3 wykrywany jest we wszystkich embrionalnych komórkach śródbłonna, a w dorosłych tkankach obecny jest głównie w śródbłonku naczyń limfatycznych, co wskazuje na jego udział w limfangiogenezie. Receptor ten nie rozpoznaje VEGF-A, natomiast wiąże formy VEGF-C i -D. Izofornie VEGF-C i -D są również rozpoznawane przez receptor VEGFR2, chociaż z niższym powinowactwem. Brak genu VEGFR3 zaburza prawidłowy rozwój układu naczyniowego [9].

ROZPUSZCZALNE RECEPTORY sVEGFR1 I sVEGFR2

W celu zbadania miejsc wiążących ligand konstruowano różne typy rozpuszczalnych receptorów VEGF, sprawdzając równocześnie ich zdolność do wywołania odpowiedzi biologicznej [8]. Obecnie zidentyfikowano dwa naturalnie występujące rozpuszczalne receptory: sVEGFR1 i sVEGFR2. sVEGFR1 powstaje na skutek różnicowego cięcia i składania pierwotnego transkryptu VEGFR1 [9]. Forma ta zawiera jedynie domeny homologiczne do immunoglobulin, przez co nie wykazuje aktywności kinazowej. Wykazano, że wiąże on z wysokim powinowactwem wszystkie izofornie VEGF oraz różne formy PlGF i VEGF-B. Wysoki poziom sVEGFR1 występuje w surowicy kobiet ciężarnych [29].

Receptor sVEGFR2 został zidentyfikowany przez Ebos'a i in. [29] w ludzkim i mysim osoczu. Budowa sVEGFR2 i jego powinowactwo do poszczególnych form VEGF pozostają dotychczas nieznanymi.

Rola biologiczna krótszych form receptorów nie jest do końca poznana. W przypadku sVEGFR1 badania wskazują głównie na jego funkcję jako negatywnego regulatora aktywności VEGF, a więc naturalnego inhibitora angiogenezy [29].

NEUROPILINY

Białka błonowe neuropilina-1 i neuropilina-2 stanowią specyficzną grupę receptorów dla dwóch strukturalnie niezwiązanych rodzin białek - semaforyn klasy 3 i niektórych form VEGF wiążących heparynę, tj. VEGF₁₆₅ [30]. Wiązanie liganda z neuropiliną-1 lub neuropiliną-2 nie jest w stanie uruchomić szlaku sygnałowego w nieobecności innych białek na powierzchni komórki. Do zapoczątkowania procesu przekazania sygnału do wnętrza komórki, po związaniu VEGF z neuropilinami, niezbędne jest sąsiedztwo innego receptora np. VEGFR1 lub VEGFR2. VEGF₁₆₅ wiąże się z obiema neuropilinami, VEGF₁₄₅ może wiązać się tylko z neuropiliną-2, natomiast forma VEGF₁₂₁ zwykle nie wiąże się z żadną z nich. Wiązanie VEGF₁₆₅ z neuropiliną-1 wzmacnia funkcję sygnałową receptora VEGFR2. Neuropilina-1 została pierwotnie zidentyfikowana jako receptor semaforyny kontrolujący wzrost aksonów. Obecność tego białka obserwuje się również w komórkach śródbłonna

i komórkach mezenchymy otaczających naczynia krwionośne oraz w niektórych komórkach nowotworowych [31]. Białko to bierze udział w kształtowaniu systemu naczyniowego serca. Na część zewnątrzkomórkową neuropiliny-1 składa się część homologiczna do domeny MAM (ang. *mepirin*, *A5 protein*, *receptor protein - tyrosine phosphatase mu*) biorącej udział w oddziaływaniach białko-białko, domeny *b* homologicznej do domen C1 i C2 czynników krzepnięcia krwi (VII i V) oraz domeny *a* homologicznej do niekatalitycznych regionów składników C1r i C1s komplementu [31]. Ze względu na niewielką domenę cytoplazmatyczną, neuropilina nie odgrywa roli w aktywacji złożonych szlaków sygnałowych. Z uwagi na jej występowanie wspólnie z pozostałymi receptorami VEGF [31] uważa się ją raczej za dodatkowy receptor VEGFR2 wiążący ligand. Nadekspresja neuropiliny u myszy prowadzi do różnego rodzaju wad w budowie morfologicznej naczyń oraz do zniekształcenia mięśnia sercowego, natomiast brak tego białka prowadzi do nieprawidłowego unaczynienia neuronów oraz wad aorty i innych naczyń krwionośnych [31]. Ostatnio wykazano, że semaforyna-3F działająca poprzez receptor neuropiliny-2 hamowała proliferację, angiogenezę *in vivo* oraz fosforylację kinazy ERK1/2 stymulowaną VEGF₁₆₅ w ludzkich komórkach śródbłonna HUVEC (ang. *human umbilical vein endothelial cells*). Semaforyna 3A blokuje wiązanie VEGF₁₆₅ z neuropiliną-1 (koreceptorem VEGFR2). Sugeruje się, że w ten sposób hamowane jest przekazywanie przez VEGFR2 sygnału proangiogenego [30]. W wiązaniu VEGF₁₆₅ z neuropiliną współzawodniczą w różnym stopniu semaforyny. Rola neuropiliny jako mediatora procesu angiogenezy została opisana szczegółowo w pracy Miao i in. [31].

REGULACJA EKSPRESJI VEGF

STYMULACJA EKSPRESJI

Jednym z głównych czynników indukujących ekspresję mRNA dla VEGF, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych, jest obniżenie ciśnienia parcjalnego tlenu. Wysoka ekspresja VEGF w niedotlenionych komórkach nowotworowych, wystawionych na bezpośredni kontakt z komórkami nekrotycznymi sugeruje, że lokalna hipoksja jest głównym czynnikiem indukującym ekspresję VEGF. W 1995 roku w regionie promotorowym 5' genu VEGF zidentyfikowano 28-zasadową sekwencję wysoce homologiczną do miejsca wiążącego, zasadowe białko HIF-1 (czynnik indukowany hipoksją), którego związanie stymuluje transkrypcję genu VEGF [32]. Zaobserwowano również niezależną od HIF-1 stymulację transkrypcji tego genu na skutek niedotlenienia [33]. W odpowiedzi na niskie ciśnienie tlenu może nastąpić nagromadzenie adenozyenu, która aktywując swój receptor A2 powoduje wzrost stężenia cAMP, co prowadzi do podniesienia poziomu mRNA dla VEGF [2]. Stymulacja transkrypcji genu VEGF nie jest jednak jedynym mechanizmem działającym w odpowiedzi na niedotlenienie komórki. Hipoksja może przyczyniać się także do wiązania z mRNA dla VEGF białek wywołujących potranskrypcyjny wzrost stabilności mRNA (m.in. białka HuR) [2]. Stymulacja ekspresji VEGF może nastąpić również pod wpływem działania różnego rodzaju cytokin, czy też na skutek mutacji niektórych onkogenów prowadzącej do transformacji nowotworowej (Tab. 1).

Szeroko prowadzone badania nad lekami antynowotworowymi blokującymi angiogenezę doprowadziły do odkrycia wielu jej inhibitorów, które bezpośrednio oddziałują z VEGF lub z jego receptorami. Inhibitory RAS farnazylotransferazy blokują szlak sygnałowy onkogenu, prowadzący do wzrostu produkcji VEGF przez komórki nowotworowe oraz obniżenia syntezy inhibitora angiogenezy, jakim jest trombospondyna-1. Wiele działających pośrednio inhibitorów procesu angiogenezy tj. ZD1839 (Iressa), ZD6474, OSI774 (Tarceva), CI1033, PKI1666, IMC225 (Erbix) [3] i PS 341 [34] (inhibitor proteasomu) hamuje syntezę VEGF przez komórki nowotworowe. Syntezę niektórych czynników angiogennych, m.in. transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β) i VEGF hamują przeciwciała Trastuzumab – blokujące szlak sygnałowy jednego z onkogenów, zwiększając równocześnie ekspresję inhibitora angiogenezy – trombospondyny. Inne przeciwciała monoklonalne Bevacizumab (Avastin) przeciw VEGF są obecnie stosowane w II i III fazie badań klinicznych. Niskocząsteczkowy inhibitor VEGF, NM-3 izokumaryna hamuje selektywnie proliferację komórek śródbłonna oraz tworzenie nowych naczyń *in vitro*. Stosowany szeroko w badaniach klinicznych talidomid powoduje obniżenie poziomu VEGF w krążeniu, co jest skorelowane z pozytywnym efektem terapeutycznym w wielu typach białaczek i innych chorobach krwi [3].

Na uwagę zasługuje także oddziaływanie VEGF z metaloproteazą macierzy zewnątrzkomórkowej ADAMTS1 (ang. *disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif-1*), która po związaniu z VEGF blokuje fosforylację receptora VEGFR2 i hamuje jego funkcję sygnałową [35]. Hamowanie proangiogenego działania VEGF przez ADAMTS1 jest procesem odwracalnym, gdyż dysocjacja tego kompleksu przywraca naturalną aktywność VEGF.

UDZIAŁ VEGF W PRZEWODZENIU SYGNAŁU

Receptory VEGF różnią się stopniem aktywacji po związaniu liganda, jak również uruchamianymi ścieżkami sygnałowymi. Jak już wspomniano, VEGFR1, mimo dużego powinowactwa do VEGF, ulega niewielkiej aktywacji. Jego zdolność do przekazywania sygnału wydaje się być mała, jednak wciąż pojawiają się doniesienia podkreślające istotne znaczenie biologiczne tego receptora. Najlepiej zbadanym

Tabela 1: Czynniki stymulujące ekspresję VEGF

Hipoksja	Cytokiny	Onkogeny
HIF-1	EGF, TGF- β , KGF IL-1 β	KRAS, HRAS SRC
adenozyna	IL-1, PGE ₂ IL-6	ERBB2 EGFR
potranskrypcyjna stabilizacja mRNA	IGF-1	FOS v-p3k PTTG1 Bcl-2

EGF - ang. *epidermal growth factor*, naskórkowy czynnik wzrostu; TGF- β - ang. *transforming growth factor β* , transformujący czynnik wzrostu β ; KGF - ang. *keratinocyte growth factor*, czynnik wzrostu keratynocytów; IL - interleukina; PGE₂ - ang. *prostaglandin E2*, prostaglandyna E2; IGF-1 - ang. *insulin-like growth factor*, insulino-podobny czynnik wzrostu.

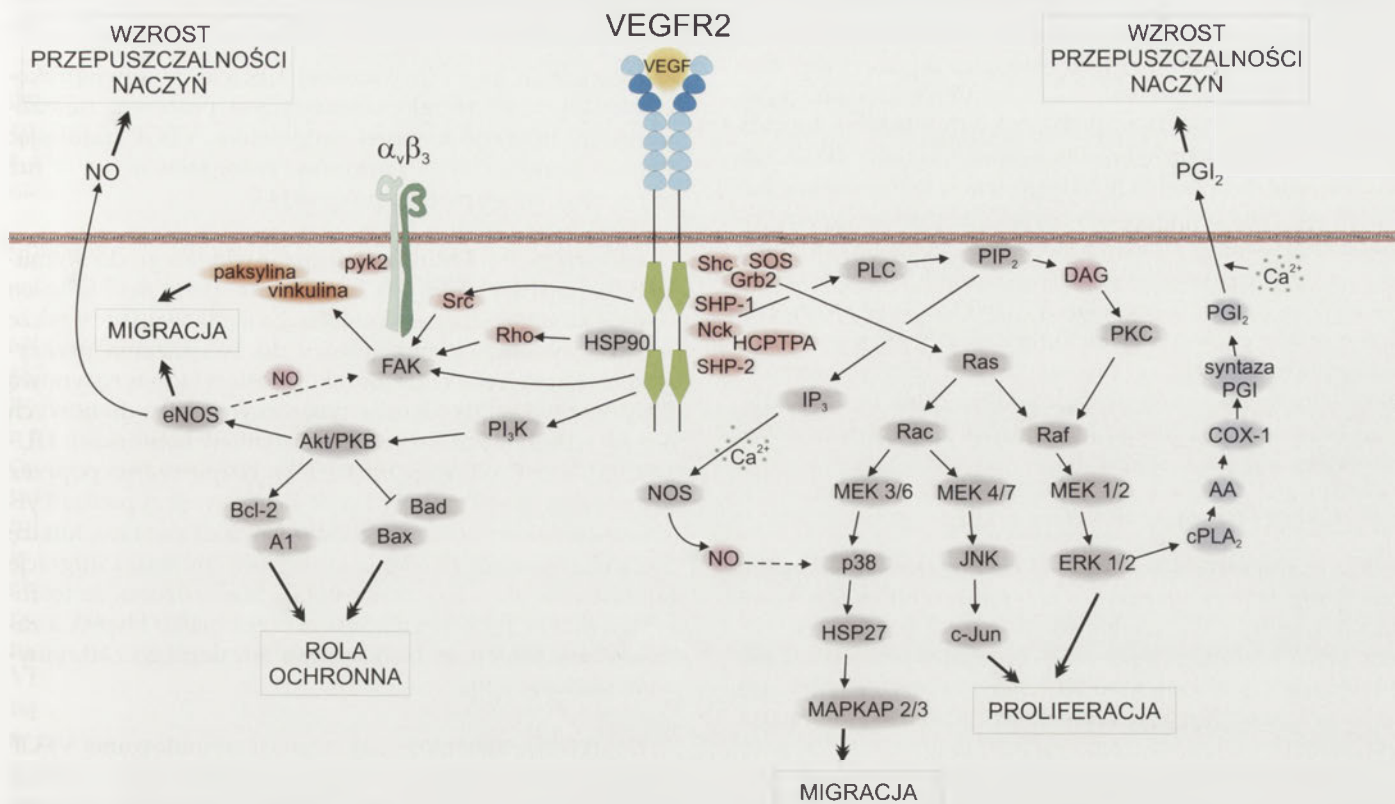
działaniem VEGF, poprzez receptor VEGFR1, jest stymulacja migracji monocytów oraz ekspresji czynnika tkankowego w tych komórkach, jednak znaczenie tych procesów nie jest w pełni poznane. Ostatnie badania wskazują na udział VEGFR1 w pozytywnej regulacji tworzenia struktur kapilaropodobnych [36] oraz w podtrzymaniu angiogenezy poprzez stymulację szlaków antyapoptotycznych biegnących przez białko antyapoptotyczne Bcl-2 i kinazę PI3 [37].

Głównym receptorem, poprzez który VEGF wywołuje szerokie spektrum odpowiedzi biologicznych jest receptor VEGFR2. Receptor ten pośredniczy w większości znanych szlaków przekazywania sygnału, w komórkach śródbłonna aktywowanych VEGF, prowadzących do określonych funkcji biologicznych (Rys. 3). Wykazano, że podobnie jak inne receptory kinazowe, wiąże się on z białkami zawierającymi domeny SH2 i białkowymi fosfatazami tyrozynowymi [1], uruchamia także skomplikowaną sieć sygnałową prowadzącą do regulacji prawie wszystkich procesów składających się na efekt biologiczny wywołany VEGF. Aktywacja VEGFR2, po związaniu liganda, następuje w wyniku dimeryzacji receptorów i autofosforylacji tyrozyny w cytoplazmatycznej części receptora. W cząsteczce tego receptora zidentyfikowano sześć miejsc autofosforylacji na tyrozynach w pozycjach: 951, 996, 1054, 1059, 1175 i 1214 [38]. VEGF stymuluje fosforylację tyrozynową i aktywność białek sygnałowych komórek śródbłonna tj. PLC γ , MAPK, kinazy PI3, FAK, białek adaptorowych Nck, Crk, i paksyliny. Również członek rodziny białek sygnałowych Shc – białko Sck bierze udział w przekazywaniu sygnału indukowanego pod wpływem VEGF w komórkach śródbłonna naczyń. Pod wpływem VEGF w komórkach HUVEC następuje przyłączenie Sck do tyrozyny w pozycji 1175 receptora VEGFR2 [39]. Rola fosforylacji większości miejsc receptora VEGFR2 jest w dalszym ciągu nieznana. Badania ostatnich lat wykazują, że w proces angiogenezy inicjowany przez VEGF zaangażowane są również niektóre szlaki integrynowe, pośredniczone przez receptory dla białek adhezyjnych, m.in. integryny $\alpha_v\beta_3$ oraz $\alpha_v\beta_5$ [1].

AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA VEGF

VEGF jest silnym i specyficznym mitogenem dla komórek śródbłonna pochodzących z naczyń układu krwionośnego i limfatycznego [1]. Wywołuje on tworzenie struktur kapilaropodobnych w modelu angiogenezy *in vitro*, podobnie jak zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów – bFGF (ang. *basic fibroblast growth factor*) [40], oraz silną odpowiedź w postaci angiogenezy w różnych modelach *in vivo* [21,41]. Możemy stwierdzić, że VEGF jest niezbędny do tworzenia nowych naczyń krwionośnych, ale nie jest wystarczający. Stymuluje on powstawanie naczyń „niedojrzałych”, o ścianie zbyt przepuszczalnej, które bez udziału takich czynników jak zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, angiopoetyna-1, czy efryny, nie są w stanie „dojrzeć” i prawidłowo funkcjonować [41].

Udział VEGF oraz jego receptorów w regulacji wielu genów jest już dobrze udokumentowany [1]. VEGF bierze udział w reorganizacji macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez indukcję ekspresji aktywatorów plazminogenu i ich inhibitorów [42] oraz metaloproteinaz [43]. Działa on rów-



Rysunek 3. Wewnątrzkomórkowe drogi przekazywania sygnału przez VEGFR2 (opis w tekście). Używane skróty: AA - kwas arachidonowy; Akt/PKB - kinaza Akt/ białkowa kinaza B; Bad, Bax - proapoptyczne białka z rodziny Bcl-2; Bcl-2 - białko antyapoptyczne; c-Jun - czynnik transkrypcyjny; COX-1 - cyklooksigenaza; DAG - diacyloglicerol; NOS - syntaza tlenu azotu; ERK1/2 - kinazy regulowane sygnałami zewnątrzkomórkowymi; FAK - kinaza ognisk adhezyjnych; Grb2 - białko adaptorowe; HCPTPA - ludzka białkowa fosfataza tyrozynowa A; HSP - białko szoku termicznego; IP₃ - inozytolo-1,4,5-trisfosforan; JNK - kinazy fosforylujące N-kończącą domenę białka c-Jun; MAPKAP - białko związane z kinazą białkową MAPK; MEK - kinaza kinaz MAP-ERK; Nck - białko adaptorowe; PGI₂ - prostacyklina; PI3K - 3-kinaza fosfatydyloinozytoli; PIP₂ - fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan; PKC - kinaza białkowa C; PLC - fosfolipazy typu C; PLA₂ - fosfolipaza A2; Raf - kinaza serynowo/treoninowa; Ras - rodzina białek onkogennych; Rho, Rac - małe białka G; SOS - aktywator wymiany nukleotydów guaninowych; SHP-1, SHP-2 - białkowe fosfatazy tyrozynowe; Src - kinaza tyrozynowa.

niez jako czynnik stymulujący przepuszczalność naczyń krwionośnych. Potwierdzono także jego ochronne działanie w stosunku do komórek poprzez stymulację szlaków antyapoptycznych. VEGF wpływa ponadto na wzrost występowania białek adhezyjnych takich jak VCAM-1 (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*) i ICAM-1 (ang. *intracellular adhesion molecule 1*) na powierzchni komórki oraz stymulację transportu heksoz do wnętrza komórki [44,45]. Oprócz specyficznego działania na komórki śródbłonna, VEGF wpływa także na inne komórki wywołując m.in. chemotaksję monocytów i prekursorowych komórek nerwowych [46], jak również stymuluje komórki mięśni gładkich do wydzielania fibronektyny w przebiegu astmy [47].

OCHRONNA ROLA VEGF

VEGF bierze udział nie tylko w stymulacji procesu tworzenia nowych naczyń krwionośnych, ale poprzez aktywację szlaków antyapoptycznych w komórkach śródbłonna odgrywa również istotną rolę w utrzymaniu prawidłowej morfologii już wykształconej sieci naczyń. Ochronne działanie VEGF zostało po raz pierwszy udokumentowane w stosunku do komórek śródbłonna siatkówki oka [48].

W głównej ścieżce sygnałowej prowadzącej do ochrony komórki przed apoptozą bierze udział kinaza PI3. Kinaza

ta po aktywacji fosforyluje antyapoptyczną kinazę Akt/PKB (ang. *Akt-kinase/protein kinase B*), co prowadzi do hamowania proapoptycznych białek: Bad, Bax [49] oraz CREB i kaspazy-9. Szlak sygnałowy związany z Akt okazał się być silnie zależny od VE-kadheryn (ang. *Vascular Endothelial-catherins*), receptorów białek adhezyjnych będących głównymi składnikami połączeń międzykomórkowych. Spadek ilości kadheryn niezależnie od jego przyczyn, wiąże się z letalnym zahamowaniem dojrzewania embrionalnych naczyń krwionośnych, wywołanym podwyższoną śmiertelnością komórek śródbłonna, utratą wiązania VEGFR2 z kadherynami, beta-kateninami i kinazą PI3 oraz zredukowanym działaniem kinazy Akt [50]. Szlak sygnałowy prowadzący do zwiększonej przeżywalności komórki, wiodący przez VEGFR2, jest więc ściśle związany z istnieniem funkcjonalnych połączeń międzykomórkowych.

Długotrwałe efekty ochronne VEGF związane są prawdopodobnie ze stymulacją komórkowych mechanizmów ochronnych, a więc z aktywacją białek Bcl-2, A1, IAP (ang. *inhibitors of apoptosis*), surwiwiny i XIAP (ang. *X-chromosome-linked IAP*) [51].

W przekazywaniu proprzeżyciowego sygnału w wielu typach komórek adherentnych bardzo istotną rolę odgrywa kinaza FAK [8], związana również ze szlakami sygnałowymi integryn. VEGF oddziałuje bezpośrednio na to białko

zwiększając fosforylację i gromadzenie się FAK, jak również na białka z nim związane: paksylinę oraz kinazę tyrozynową Pyk2 [8]. Oprócz bezpośredniej aktywacji zaobserwowano także selektywne wiązanie VEGFR2 z integryną $\alpha_v\beta_3$. Adhezja takiego kompleksu do witronektyny, liganda $\alpha_v\beta_3$, zwiększała zarówno mitogenne działanie VEGF, jak i aktywność receptora [52], którego rola w ochronie powstających naczyń krwionośnych została już potwierdzona. Na podstawie wyników badań procesu unaczyniania siatkówki oka myszy pozbawionej genu kodującego β_3 można wnioskować, że funkcja kompleksu VEGFR2/ $\alpha_v\beta_3$ w tworzeniu i utrzymaniu prawidłowej struktury naczyń jest jednak drugorzędowa. Obserwacje przebiegu patologicznej angiogenezy u zwierząt pozbawionych podjednostek β_3 i β_5 wskazują nawet na możliwość hamowania angiogenezy przez integryny $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ [53].

MITOGENNE DZIAŁANIE VEGF

VEGF poprzez aktywację VEGFR2 wykazuje działanie mitogenne w stosunku do wielu typów komórek śródbłonna. Główne ścieżki sygnałowe prowadzące do wzrostu syntezy DNA i proliferacji komórek prowadzą przez silnie aktywowane VEGF kinazy ERK1/2, stymulujące z kolei szereg czynników transkrypcyjnych. Jedną z tych dróg oparta jest na znanej ścieżce sygnałowej Ras/Raf/MEK/ERK wiodącej od kinazowych receptorów czynników wzrostu [54]. Droga ta indukowana jest fosforylacją białka adaptorowego Grb2, które kierując białko SOS do błony komórkowej wywołuje aktywację białka Ras i uruchamia kaskadę sygnału. Są jednak dowody na istnienie niezależnej od białka Ras drogi aktywującej kinazy ERK. Ścieżka ta uruchamiana jest przez aktywny receptor VEGFR2, który fosforyluje związaną z nim fosfolipazę C- γ [55]. Prowadzi to do powstawania diacyloglicerolu (DAG) oraz trisfosfoinozytolu (IP3), a w konsekwencji do aktywacji kinazy białkowej C (PKC) i uwolnienia jonów wapnia do cytoplazmy. Droga ta została potwierdzona poprzez badania, w których obserwowano zahamowanie aktywacji ERK po zastosowaniu inhibitorów farmakologicznych kinazy białkowej C oraz oligonukleotydów antysensowych przeciwko izoformom kinazy białkowej C- α i - ζ [56]. Inhibitory kinazy białkowej C efektywnie hamowały również stymulowany VEGF proces angiogenezy [57]. Istnieją jednak doniesienia, że stymulacja proliferacji przez VEGF wiąże się ze spadkiem aktywności jednej z izoform kinazy białkowej C, PKC- δ [58]. W zgodzie z tymi sygnałami pozostaje obserwacja spowolnienia cyklu komórkowego w komórkach śródbłonna z nadekspresją kinazy białkowej C- δ . Mitogenne działanie VEGF może więc zależeć zarówno od wzrostu jak i obniżenia aktywności poszczególnych izoform kinazy białkowej C.

Kolejną drogą działania VEGF jest indukcja szlaku kinaz MAP związana z aktywacją kinazy JNK. Dodatkowo wskazuje się na możliwe wzajemne oddziaływanie pomiędzy tą drogą sygnałową a ścieżką angażującą kinazy ERK w szlaku prowadzącym do wywoływanych przez VEGF efektów mitogennych [1].

MIGRACJA KOMÓREK

Degradacja błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej przez metaloproteinazy jest procesem umożliwiającym migrację komórek śródbłonna. VEGF indukując wzrost poziomu tych enzymów zaangażowany jest już w początkowe etapy tego procesu [43].

Głównym przekaźnikiem sygnału wiodącego do stymulacji migracji komórek jest kinaza FAK (ang. *focal adhesion kinase*), która jak już wspomniano, zaangażowana jest także w szlak sygnałowy prowadzący do zwiększenia przeżywalności komórek. VEGF indukuje fosforylację tyrozynową FAK oraz paksyliny kierując tym samym białka do nowych ognisk adhezyjnych, co zostało zbadane w komórkach HUVEC [8]. VEGF aktywuje kinazę FAK bezpośrednio poprzez fosforylację reszt Tyr-397 i Tyr-861, która w przypadku Tyr-861 może następować pośrednio również poprzez kinazę Src. Zahamowanie działania kinazy Src zmniejsza migrację komórek indukowaną przez VEGF. Stwierdzono, że fosforylacja kinazy FAK jest ułatwiana przez białko Hsp90, a zastosowanie inhibitora białka szoku termicznego zatrzymało migrację [59].

Obserwacje zahamowania migracji stymulowanej VEGF pod wpływem inhibitora kinazy p38 (SB203580), sugerują udział tej kinazy należącej do rodziny kinaz MAP w tym procesie [59]. Ostatnie doniesienia wskazują, że zarówno szlak prowadzący przez białko p38, jak również kinazę FAK indukowany jest poprzez VEGFR2, którego pełna fosforylacja i zdolność do aktywacji powyższych szlaków jest zależna od jego interakcji z integryną $\alpha_v\beta_3$ [60].

Kolejna droga prowadząca od VEGF do migracji wiedzie prawdopodobnie przez oddziaływanie szlaku kinazy FAK z NO, który stymuluje ruch komórki bez obecności chemoatraktanta. NO reguluje stabilność ognisk adhezyjnych i fosforylację kinazy FAK, a fosforylacja syntazy tlenu azotu (eNOS – ang. *endothelial nitric oxide synthase*) jest konieczna do indukcji migracji przez VEGF [61].

Oprócz wymienionych już szlaków VEGFR2 pośredniczy również w aktywacji białek z rodziny Rho i chociaż mechanizm tego działania jest nieznan, to wiadomo, że jest on niezależny od jonów wapnia i kinazy PI3K, a białka te odgrywają istotną rolę w regulacji migracji komórek śródbłonna, w której pośredniczą także białka adaptorowe Nck i Crk [62].

WZROST PRZEPUSZCZALNOŚCI NACZYŃ KRWIONOŚNYCH

VEGF był zdefiniowany początkowo jako czynnik zwiększający przepuszczalność naczyń, jednak do dziś ścieżki sygnałowe uczestniczące w tym procesie zostały słabo poznane. Stwierdzono na przykład, że w regulacji przepuszczalności naczyń uczestniczą białka z rodziny Src; brak genu kodującego pp60^{c-Src} hamuje odpowiedź komórek na VEGF [63]. Udział w tym procesie tlenu azotu i prostacyklin został potwierdzony obserwacjami spadku przepuszczalności

naczyń wywołanym działaniem inhibitorów zarówno syntazy tlenku azotu (eNOS), jak i cyklooksigenazy (COX) [1].

Fosforylacja białek odpowiedzialnych za adhezję międzykomórkową indukowaną VEGF, która prowadzi do zniszczenia połączeń między komórkami, może być jednym z mechanizmów wywołujących wzrost przepuszczalności naczyń [1].

PATOLOGICZNA ANGIOGENEZA

Podwyższony poziom VEGF obserwowany jest w większości tkanek nowotworowych [2]. VEGF uważany jest za aktywator angiogenezy nowotworowej. Zwiększona ekspresja genu VEGF jest ściśle związana ze złym rokowaniem i zwiększoną częstością występowania przerzutów u pacjentów z nowotworami. U pacjentów z rakiem przewodu pokarmowego lub sutka obserwuje się pozytywną korelację między ekspresją VEGF a gęstością naczyń krwionośnych w bezpośrednim otoczeniu guza nowotworowego. Wysoka ekspresja mRNA dla VEGF w nowotworach oraz wysoki poziom VEGF w innych jednostkach chorobowych związanych z patologiczną angiogenezą potwierdzają hipotezę, że VEGF jest kluczowym mediatorem tego procesu. Zwiększoną ekspresję mRNA dla VEGF obserwuje się bezpośrednio w komórkach nowotworowych, podczas gdy w komórkach śródbłonna sąsiadujących z nowotworem zwiększeniu ulega poziom mRNA dla receptorów VEGFR1 i VEGFR2. Wskazuje to na parakryny mechanizm działania VEGF. Duże zainteresowanie budzi ostatnio możliwy udział VEGF w tworzeniu się i rozwoju blaszki miażdżycowej. Okazuje się, że substancja, która według wielu badaczy miała być panaceum na miażdżycę i jej konsekwencje, może tę chorobę pogłębiać. Badania przeprowadzone na myszach i królikach wykazały, że VEGF zwiększa rozmiary i przyspiesza tworzenie blaszek miażdżycowych. Celletti i in. stwierdzili, że po wstrzyknięciu VEGF, do krwi przedostaje się bardzo wiele komórek macierzystych śródbłonna. Takich komórek było również znacznie więcej w blaszkach miażdżycowych myszy traktowanych VEGF, niż u zwierząt, którym podano obojętne białko [64,65]. Wiele wskazuje na to, że tworzenie unaczynienia może przyspieszać rozwój miażdżycy. Neowaskularyzacja w blaszce miażdżycowej pod wpływem podwyższonego, w odpowiedzi na hipoksję, poziomu VEGF może prowadzić do niestabilności i pęknięcia tej blaszki [27,66]. Dotychczasowej wiedzy na temat pozytywnej roli egzogennie użytego VEGF w regeneracji tkanek towarzyszyły kontrowersyjne doniesienia o wpływie VEGF na tworzenie patologicznej blaszki wewnętrznej naczynia (neointymy). W świetle najnowszych badań bardzo ważną rolę zarówno w procesie regeneracji uszkodzonej tkanki, jak i tworzenia neointymy odgrywa endogenny VEGF [67]. Zarówno jego nadekspresja, jak i rozmieszczenie w komórce endogennej formy prowadzą do zaburzenia czasu trwania odnowy uszkodzonego śródbłonna. Opóźnienie procesu regeneracji śródbłonna może inicjować kaskadę złożonych molekularnych i komórkowych oddziaływań, mogących prowadzić do zmiany wielkości tworzącej się neointymy. Może ono być również odpowiedzialne za różnice w lokalizacji komórek progenitorowych. Różny czas ekspozycji uszkodzonej tkanki na krążące czynniki wzrostu i tlenek azotu może mieć wpływ na wielkość neointymy. Wyjaśnie-

nie mechanizmu tego bardzo złożonego procesu regulacyjnego z udziałem VEGF wymaga jeszcze dodatkowych badań.

PODSUMOWANIE

Pomimo różnorodności czynników mających prawdopodobnie wpływ na proces angiogenezy, VEGF odgrywa kluczową, niezastąpioną rolę w wielu stanach fizjologicznych i patologicznych związanych z tym procesem. Zastosowanie przeciwciał anti-VEGF lub inhibitorów sygnału przekazywanego przez receptory, a także oligonukleotydów antysensowych blokujących działanie VEGF może mieć znaczenie w leczeniu wielu nowotworów i innych chorób, również jako terapia wspomagająca. Biorąc pod uwagę kluczową rolę systemu VEGF – receptory VEGF w rozwoju układu naczyń krwionośnych i homeostazie komórek śródbłonna naczyń, poznanie właściwości sygnałowych receptorów VEGFR1 i VEGFR2 może określić drogi prowadzące do regulacji podstawowych funkcji biologicznych komórek śródbłonna takich jak: różnicowanie, morfogeneza i angiogeneza. Oprócz głównych terapeutycznych wysiłków badawczych dotyczących zahamowania stymulacyjnego działania VEGF na proces angiogenezy, bardzo obiecującą możliwością jest zastosowanie rekombinowanego VEGF lub terapii genowej w przypadkach uszkodzenia lub upośledzonego rozwoju śródbłonna. Metody analizy proteomicznej stosowane ostatnio do identyfikacji białek, które ulegają modyfikacji pod wpływem aktywacji komórek śródbłonna czynnikiem VEGF, pozwalają lepiej poznać mechanizmy jego działania prowadzące do regulacji angiogenezy [68,69]. Wiedza na temat tych oddziaływań może znaleźć zastosowanie w leczeniu wielu chorób, u podłoża których leży zaburzenie procesu angiogenezy.

PIŚMIENNICTWO

1. Zachary I, Gliki G (2001) Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 49: 568-581
2. Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18: 4-25
3. Kerbel R, Folkman J (2002) Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2: 727-739
4. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J (1989) Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84: 1470-1478
5. Gospodarowicz D, Abraham J, Schilling J (1989) Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7311-7315
6. Ferrara N, Henzel W J (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 851-858
7. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico M G (1991) Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9267-9271
8. Zachary I (2001) Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1375-C1386
9. Petrova TV, Makinen T, Alitalo K (1999) Signaling via Vascular Endothelial Growth Factor receptors. *Exp Cell Res* 253: 117-130

10. Aase K, Lymboussaki A, Kaipainen A, Olofsson B, Alitalo K, Eriksson U (1999) Localization of VEGF-B in the mouse embryo suggests a paracrine role of the growth factor in the developing vasculature. *Dev Dyn* 215: 12-25
11. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings MC, Hayward NK, Kay GF (2000) Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 86: e29-e35
12. Aase K, von Euler G, Li X, Ponten A, Thoren P, Cao Y, Olofsson B, Gebre-Medhin S, Pekny M, Alitalo K, Betsholtz C, Eriksson U (2001) Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* 104: 358-364
13. Silvestre JS, Tamarat R, Ebrahimiyan TG, Le-Roux A, Clergue M, Emmanuel F, Duriez M, Schwartz B, Branellec D, Levy BI (2003) Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res* 93: 114-123
14. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K (2004) Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 5: 74-80
15. Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y, Thyberg J (2004) Comparative evaluation of FGF-2, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res* 94: 664-670
16. Dias S, Choy M, Alitalo K, Rafii S (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood* 99: 2179-2184
17. Li X, Eriksson U (2001) Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. *Intern J Biochem Cell Biol* 33: 421-426
18. Kiba A, Sagara H, Hara T, Shibuya M (2003) VEGFR-2-specific ligand VEGF-E induces non-edematous hyper-vascularization in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 301: 371-377
19. Shibuya M (2003) Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signaling and specific ligand, VEGF-E. *Cancer Sci* 94: 751-756
20. Junqueira de Azevedo IL, Farsky SH, Oliveira ML, Ho PL (2001) Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the Bothrops insularis pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. *J Biol Chem* 276: 39836-39842
21. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G (1996) Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 93: 1493-1495
22. Lange T, Guttmann-Raviv N, Baruch L, Machluf M, Neufeld G (2003) VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. *J Biol Chem* 278: 17164-17169
23. Jingjing L, Srinivasan B, Roque RS (2001) Ectodomain shedding of VEGF183, a novel isoform of vascular endothelial growth factor, promotes its mitogenic activity in vitro. *Angiogenesis* 4: 103-112
24. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, Ferrara N (1996) The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 271: 7788-7795
25. van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 10: 251-337
26. Lu D, Kussie P, Pytowski B, Persaud K, Bohlen P, Witte L, Zhu Z (2000) Identification of the residues in the extracellular region of KDR important for interaction with vascular endothelial growth factor and neutralizing anti-KDR antibodies. *J Biol Chem* 275: 14321-14330
27. Hanahan D (1997) Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277: 48-50
28. Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Muller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjan ED, Peschle C (1999) KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 285: 1553-1558
29. Ebos JM, Bocci G, Man S, Thorpe PE, Hicklin DJ, Zhou D, Jia X, Kerbel RS (2004) A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res* 2: 315-326
30. Kessler O, Shraga-Heled N, Lange T, Guttmann-Raviv N, Sabo E, Baruch L, Machluf M, Neufeld G (2004) Semaphorin-3F is an inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 64: 1008-1015
31. Miao HQ, Klagsbrun M (2000) Neuropilin is a mediator of angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 19: 29-37
32. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16: 4604-4613
33. Mizukami Y, Li J, Zhang X, Zimmer MA, Iliopoulos O, Chung DC (2004) Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer. *Cancer Res* 64: 1765-1772
34. Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, Yeh N, Crowl Bancroft C, Sausville E, Adams J, Elliott P, Van Waes C (2001) Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 7: 1419-1428
35. Iruela-Arispe ML, Carpizo D, Luque A (2003) ADAMTS1: a matrix metalloprotease with angioinhibitory properties. *Ann NY Acad Sci* 995: 183-190
36. Kearney JB, Kappas NC, Ellerstrom C, DiPaola FW, Bautch VL (2004) The VEGF receptor flt-1 (VEGFR-1) is a positive modulator of vascular sprout formation and branching morphogenesis. *Blood* 103: 4527-4535
37. Cai J, Ahmad S, Jiang WG, Huang J, Kontos CD, Boulton M, Ahmed A (2003) Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells. *Diabetes* 52: 2959-2968
38. Zachary I (2003) VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Transactions* 31: 1171-1177
39. Ratcliffe KE, Tao Q, Yavuz B, Stoletov KV, Spring SC, Terman BI (2002) Sck is expressed in endothelial cells and participates in vascular endothelial growth factor-induced signaling. *Oncogene* 21: 6307-6316
40. Saez E, Rutberg SE, Mueller E, Oppenheim H, Smoluk J, Yuspa SH, Spiegelman BM (1995) c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* 82: 721-732
41. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J (2002) Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 94: 883-893
42. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R (1991) Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 902-908
43. Brown MD, Hudlicka O (2003) Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. *Angiogenesis* 6: 1-14
44. Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK (1996) During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nature Med* 2: 992-997
45. Pekala P, Marlow M, Heuvelman D, Connolly D (1990) Regulation of hexose transport in aortic endothelial cells by vascular permeability factor and tumor necrosis factor-alpha, but not by insulin. *J Biol Chem* 265: 18051-18054
46. Zhang H, Vutskits L, Pepper MS, Kiss JZ (2003) VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *J Cell Biol* 163: 1375-1384

47. Kazi AS, Lotfi S, Goncharova EA, Tliba O, Amrani Y, Krymskaya VP, Lazaar AL (2004) Vascular endothelial growth factor-induced secretion of fibronectin is ERK dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L539-545
48. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1: 1024-1028
49. Yamaguchi H, Wang HG (2001) The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* 20: 7779-7786
50. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M (1999) Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98: 147-157
51. Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil S, LaCasse E, Korneluk R, Kerbel R (1999) Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 781-788
52. Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F (1999) Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO* 18: 882-892
53. Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, Sheppard D, Hynes RO, Hodivala-Dilke KM (2002) Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med* 8: 27-34
54. Meadows KN, Bryant P, Pumiglia K (2001) Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J Biol Chem* 276: 49289-49298
55. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M (2001) A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J* 20: 2768-2778
56. Gliki G, Abu-Ghazaleh R, Jezequel S, Wheeler-Jones C, Zachary I (2001) Vascular endothelial growth factor-induced prostacyclin production is mediated by a protein kinase C (PKC)-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 involving PKC-delta and by mobilization of intracellular Ca²⁺. *Biochem J* 353: 503-512
57. Gliki G, Wheeler-Jones C, Zachary I (2002) Vascular endothelial growth factor induces protein kinase C (PKC)-dependent Akt/PKB activation and phosphatidylinositol 3'-kinase-mediated PKC delta phosphorylation: role of PKC in angiogenesis. *Cell Biol Int* 26: 751-759
58. Shizukuda Y, Tang S, Yokota R, Ware JA (1999) Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity. *Circ Res* 85: 247-256
59. Rousseau S, Houle F, Kotanides H, Witte L, Waltenberger J, Landry J, Huot J (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 275: 10661-10672
60. Masson-Gadais B, Houle F, Laferriere J, Huot J (2003) Integrin alpha-vbeta3, requirement for VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and for Hsp90-dependent phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells activated by VEGF. *Cell Stress Chaperones* 8: 37-52
61. Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM (2000) Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 477: 258-262
62. Stoletov KV, Gong C, Terman BI (2004) Nck and Crk mediate distinct VEGF-induced signaling pathways that serve overlapping functions in focal adhesion turnover and integrin activation. *Exp Cell Res* 295: 258-268
63. Eliceiri BP, Puente XS, Hood JD, Stupack DG, Schlaepfer DD, Huang XZ, Sheppard D, Cheresch DA (2002) Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin alpha(v)beta5 in vascular endothelial growth factor signaling. *J Cell Biol* 157: 149-160
64. Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, Doi K, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, Yamashita J, Chun TH, Matsugata K, Becker AE, Nakao K (1998) Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* 98: 2108-2116
65. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD (2001) Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nature Medicine* 7: 425-429
66. Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, Tsao PS, Johnson FL, Cooke JP. (2001) Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med* 7: 833-839
67. Hutter R, Carrick FE, Valdiviezo C, Wolinsky C, Rudge JS, Wiegand SJ, Fuster V, Badimon JJ, Sauter BV (2004) Vascular endothelial growth factor regulates reendothelialization and neointima formation in a mouse model of arterial injury. *Circulation* 110: 2430-2435
68. Pawlowska Z, Baranska P, Jerczynska H, Koziolkiewicz W, Cierniewski CS (2005) Cellular machinery for protein synthesis is highly upregulated in VEGF-activated human endothelial cells. *Proteomics* 5 (3) (w druku)
69. Baranska P, Pawlowska Z, Jerczynska H, Cierniewski CS (2003) The role of vascular endothelial growth factor in an early phases of proangiogenic changes in human endothelial cells. *J Thromb Haemost* suppl 1, CD067

Vascular endothelial growth factor – structure and functions

Patrycja Barańska[✉], Hanna Jerczyńska, Zofia Pawłowska

Department of Molecular and Medical Biophysics, Institute of Physiology and Biochemistry, Medical University of Lodz, 6/8 Mazowiecka St., 92-215 Lodz, Poland

✉ e-mail: patrycja@zdn.am.lodz.pl

Key words: angiogenesis, vascular endothelial growth factor, neuropilins

ABSTRACT

Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), originally described as a vascular permeability factor, is currently known as one of the main factors which regulate angiogenesis. It plays an important role in the regulation of normal as well as pathological angiogenesis. In this paper we try to shortly review the actual knowledge on VEGF protein family, its expression, VEGF receptors and role of VEGF in signal transduction. The aim of this review is also to summarize recent achievements in research on biological functions of vascular endothelial growth factor and their clinical applications.

Mechanizmy oporności wirusa zapalenia wątroby typu C na interferon

Dariusz Kmiecik✉

Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań; e-mail: dkmiec@am.poznan.pl; tel. (61) 854 65 13; faks: (61) 854 65 10

✉ Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań; e-mail: dkmiec@am.poznan.pl; tel. (61) 854 65 13; faks: (61) 854 65 10

Artykuł otrzymano 15 lipca 2004

Artykuł zaakceptowano 29 listopada 2004

Słowa kluczowe: wirus zapalenia wątroby typu C, białko niestruktralne 5A, białko otoczki E2, rejon wiążące kinazę białkową R, oporność na interferon alfa

Wykaz skrótów: C – białko rdzenia (ang. *core*); E1 i E2 – białka otoczki 1 i 2 (ang. *envelope*); eIF – inicjacyjne czynniki translacyjne Eukariontów (ang. *eukaryotic initiation factors*); HCV – wirus zapalenia wątroby typu C (ang. *hepatitis C virus*); IFN – interferon; ISDR – rejon determinujący wrażliwość na interferon; (ang. *IFN sensitivity-determining region*); ISGF3 – czynnik trzeci genów stymulowanych przez interferon (ang. *IFN-stimulated gene factor 3*); ISRE – region odpowiedzi stymulowanej przez interferon (ang. *interferon-stimulated response element*); NS2 do NS5 – białka niestruktralne (ang. *nonstructural proteins NS2 to NS5*); PePHD – domena homologiczna do miejsc autofosforylacji PKR i fosforylacji eIF2 α (ang. *PKR-eIF2 α phosphorylation homology domain*); PKR – kinaza białkowa R (ang. *protein kinase R*), STAT – transduktory sygnału i aktywatory transkrypcji (ang. *signal transducers and activators of transcription*); UTR – rejon, który nie ulega translacji (ang. *untranslated region*).

STRESZCZENIE

Celem pracy jest opisanie roli białek wirusa zapalenia wątroby typu C (białka niestruktralnego NS5A oraz białka otoczki E2) w oporności na interferon alfa. Białka te zawierają domeny wiążące kinazę białkową R, indukowaną przez interferon alfa. Związanie kinazy z tymi białkami prowadzi do zahamowania jej aktywności, a tym samym zahamowania fosforylacji czynnika inicjacji translacji eIF2. Jak wskazują badania, zahamowaniu ulega również fosforylacja czynnika eIF4E. W rezultacie, w zakażonej komórce w obecności aktywnego czynnika eIF2, może odbywać się synteza białek wirusa przy równocześnie obniżonej, zależnej, między innymi, od czynnika eIF4E, syntezy białek gospodarza. Wydaje się, że proces ten stanowi jeden z molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za oporność wirusa zapalenia wątroby typu C na interferon alfa, na jego utrzymywanie się w zakażonej komórce i wynikające stąd trudności w leczeniu zakażonych osób.

WPROWADZENIE

Wirus zapalenia wątroby typu C (ang. *hepatitis C virus*, HCV) jest głównym czynnikiem powodującym przewlekłe zapalenie wątroby u człowieka, prowadzące do marskości, a także w wielu przypadkach będące wskazaniem do przeszczepu tego narządu. Genom wirusa stanowi nić RNA(+) o długości ok. 9500 nukleotydów, zawierająca jedną otwartą ramkę odczytu [1-3]. Pierwotny produkt translacji, długości ok. 3000 aminokwasów, jest hydrolizowany przez proteazy komórki gospodarza i wirusowe, do dojrzałych białek strukturalnych: rdzenia (ang. *core*, C), glikoprotein otoczki E1 i E2 (ang. *envelope*), a także białek niestruktralnych NS2 do NS5 (ang. *nonstructural proteins NS2 to NS5*) [1-3].

Genom HCV charakteryzuje się wysokim stopniem zmienności. Zmienność międzyosobnicza, a także dystrybucja geograficzna, doprowadziła do wyróżnienia co najmniej sześciu głównych genotypów, natomiast zmienność wewnątrzosobnicza związana jest z powstaniem tzw. *quasispecies*, czyli genetycznych, ściśle spokrewnionych ze sobą, ale rozróżnialnych wariantów wirusa w organizmie gospodarza [4].

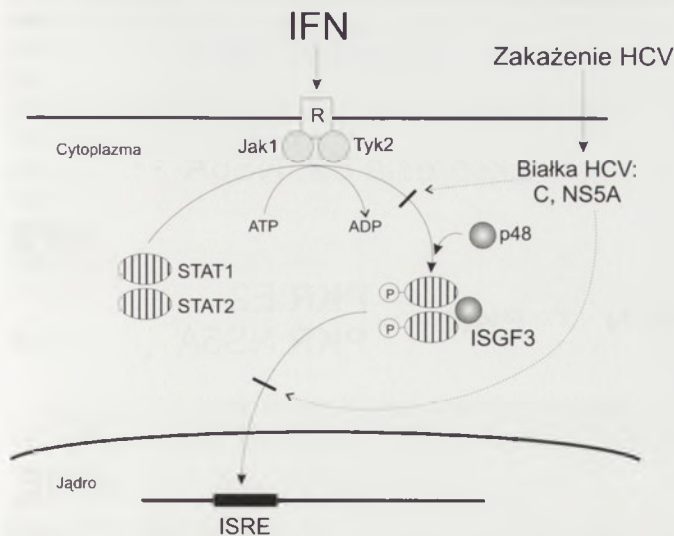
Obecnie leczenie zakażenia HCV polega na podawaniu interferonu alfa (IFN- α), często w połączeniu z rybawiryną [5, 6]. Zastosowanie zmodyfikowanego interferonu, połączonego z polietylenoglikolem, tzw. PEG-interferon- α , pozwoliło zwiększyć odsetek osób wyleczonych z ok. 20 % do ok. 46 % [6], jednakże nadal nie wiadomo dlaczego wielu chorych nie odpowiada na terapię. Wydaje się, że wielkość wirerii czy genotyp wirusa odgrywają w tym procesie dużą rolę [7]. W trakcie terapii wirus również przeciwdziała efektom wywołanym przez podanie interferonu, wytwarzając mechanizmy molekularne pozwalające na przetrwanie w komórce.

Celem pracy jest przedstawienie stanu wiedzy o oporności HCV na interferon alfa, a przede wszystkim opisanie roli białek wirusa, NS5A i E2, jak również białka rdzenia C, w kontekście neutralizacji, a przynajmniej osłabienia działania tej cytokiny. Ekspresja tych białek, jak się wydaje, nie tylko stanowi niezbędny fragment prawidłowego cyklu rozwojowego wirusa, lecz także przyczynia się do utrzymywania się wirusa w zakażonym organizmie oraz jest odpowiedzialna za oporność na leczenie interferonem.

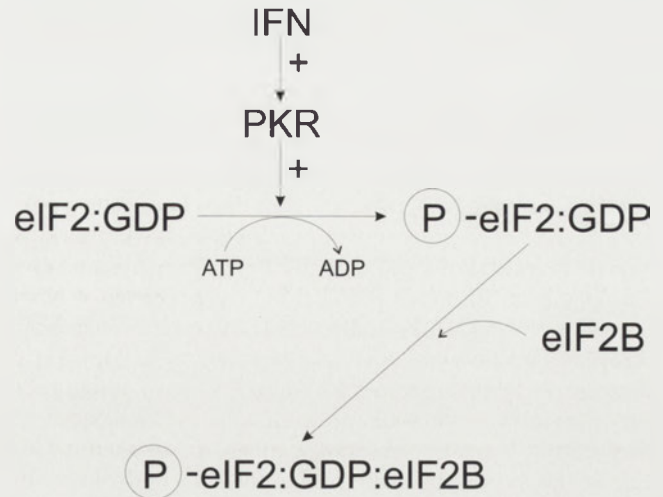
WPLYW BIAŁEK HCV NA ŚCIEŻKĘ SYGNAŁOWĄ JAK-STAT

W odpowiedzi na zakażenie wirusem komórki produkują i wydzielają do osocza interferony. Są to cytokiny, które po dotarciu do innych zakażonych komórek indukują w nich powstanie aktywnej odpowiedzi przeciwwirusowej. Po zadziałaniu interferonu- α , przekazywanie sygnału do wnętrza komórki odby-

wa się za pośrednictwem receptora, który aktywuje związane z nim cytosolowe kinazy tyrozynowe, Jak1 i Tyk2, należące do rodziny JAK [8]. Kinazy te fosforylują białka STAT1 i STAT2, tworzące następnie heterodimer łączący się dodatkowo z białkiem p48, w wyniku czego powstaje aktywny czynnik transkrypcyjny zwany czynnikiem trzecim genów stymulowanych przez interferon (ISGF3) [9, 10]. Po wejściu do jądra ISGF3 wiąże się ze swoistą sekwencją zwaną regionem odpowiedzi stymulowanej przez interferon (ISRE), obecnym w miejscach promotorowych genów aktywowanych przez interferon. Wśród nich wymienić można geny: syntetazy 2',5' oligoizoadeninowej RNazy L, kinazy białkowej R, białka przeciwwirusowego Mx [11, 12]. Na podstawie eksperymentów z użyciem linii komórkowych, które transfekowano plazmidem zawierającym całkowity genom HCV dowiedziano, że po dodaniu interferonu- α do hodowli, w obecności białek wirusowych w komórce następuje zahamowanie indukcji ścieżki sygnałowej Jak-STAT [13]. Wyniki pozwoliły ustalić, że działanie hamujące białek HCV polegało na zniesieniu ekspresji ISGF3 (Rys. 1). O tym, że zjawisko to jest swoiste, świadczy obserwacja, że jednocześnie białka HCV nie hamowały przekazywania sygnału za pomocą ścieżki sygnałowej indukowanej czynnikiem martwicy nowotworu α (TNF- α) i prowadzącej do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. *nuclear factor of kappa chain B cells*) [13]. Chociaż wtedy nie ustalono, które z białek HCV i w jaki sposób, bezpośrednio lub za pośrednictwem białka czy białek komórkowych, wpływa na zahamowanie transdukcji sygnału za pomocą ścieżki sygnałowej Jak-STAT, indukowanej interferonem- α , wyniki nowszych badań wskazują na rolę białek rdzenia C i NS5A w tym procesie [14]. W badaniach tych, z użyciem linii komórkowych, w których ekspresji ulegały różne białka HCV, wykazano, że



Rysunek 1. Uproszczony schemat działania interferonu alfa na komórkę i zaburzenie przekazywania sygnału przez białka wirusa HCV. Interferon alfa (pokazany jako IFN), po związaniu się z receptorem (R) powoduje uaktywnienie kinaz tyrozynowych Jak1 i Tyk2, które spośród różnych białek fosforylują m.in. białka STAT1 i STAT2, tworzące następnie heterodimer. Po dołączeniu białka p48 powstaje aktywny czynnik trzecich genów stymulowanych przez interferon (ISGF3). Po wnikięciu do jądra aktywuje on transkrypcję genów poprzez interakcję z regionem odpowiedzi stymulowanej przez interferon (ISRE), obecnym w miejscach promotorowych genów indukowanych przez interferon. W komórce zakażonej HCV zachodzi zniesienie ekspresji czynnika ISGF3 oraz jego transportu do jądra, jak się wydaje za pośrednictwem białek wirusowych rdzenia C i NS5A [14], jednakże nie jest znany dokładny mechanizm tego procesu.



Rysunek 2. Wpływ interferonu na zahamowanie translacji. Czynnikiem inicjacji translacji eIF2, z dołączonym GTP, wprowadza metionyl-tRNA inicjatorowy do podjednostki 40S rybosomu. Kiedy podjednostka ta, jako kompleks preinicjujący 43S, odnajdzie na mRNA właściwy kodon start, dochodzi do hydrolyzy GTP, umożliwiającą oddysocjowanie eIF2 od kompleksu. Do następnej rundy translacji eIF2 musi wymienić GDP na GTP, z pomocą czynnika eIF2B [45]. Pod wpływem interferonu alfa (IFN) następuje wzmożona ekspresja kinazy białkowej R (PKR), która fosforyluje podjednostkę alfa czynnika eIF2 (+). Ufosforylowany eIF2 wykazuje bardzo wysokie powinowactwo do eIF2B, co zapobiega dysocjacji czynników od siebie, a wymiana GDP na GTP, potrzebna do następnej rundy translacji, jest zahamowana [45]. W ten sposób, jednym z efektów działania interferonu jest ograniczenie ogólnej produkcji białka w zakażonej komórce..

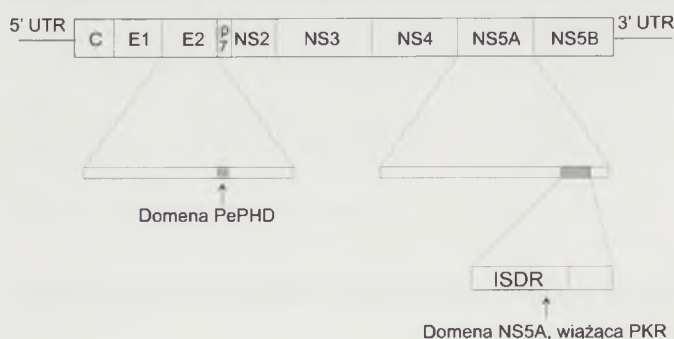
białko rdzenia C i NS5A hamowały indukowaną za pomocą interferonu- α jądrową akumulację STAT1, a akumulację STAT2 częściowo blokowało białko C (Rys. 1). Dodatkowo, o tym, że nie było to ogólne osłabienie systemu transportu jądrowego, świadczy brak wpływu tych białek na jądrowy import czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, wyindukowany czynnikiem martwicy nowotworu α (TNF- α) [14].

Jednocześnie doniesiono, że po stymulacji interferonem gamma (IFN- γ) komórek, które produkowały białko rdzenia C HCV, następowało zwiększenie fosforylacji kinaz tyrozynowych Jak1/2 i poziomu transkrypcji za pośrednictwem STAT1 i STAT2 [15]. O tym, że białko C różnie reguluje daną ścieżkę sygnałową w odpowiedzi na poszczególne cytokiny, świadczy już opisany wyżej przykład z interferonem- α [14], jak i stymulacja nie interferonem- γ , a interleukiną 6, po której białko C hamowało fosforylację kinaz Jak1/2 oraz transkrypcję za pośrednictwem STAT3 [15]. Z kolei doniesienie Sarcar i wsp. [16] sugeruje, że białko wirusowe NS5A aktywuje STAT3 poprzez kooperację (w formie kompleksu) z kinazą Jak1. Po dotarciu do jądra, ufosforylowany STAT3 wpływa na transkrypcję genów białek regulujących wzrost komórki, Bcl-xL i p21, co może mieć związek z ogólnymi efektami wywołanymi zakażeniem HCV [16].

ROLA BIAŁKA NS5A W OPORNOŚCI NA INTERFERON

NS5A jest fosfoproteiną o masie od 56 do 58 kD (w zależności od stopnia fosforylacji), występującą w cytoplazmie, w sąsiedztwie błony jądrowej lub siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego, i odgrywającą rolę w niektórych etapach replikacji RNA wirusa [17-19]. Według nowszych doniesień NS5A stanowi integralne białko błonowe, zakotwiczone w błonie za pomocą domeny N-końcowej o struk-

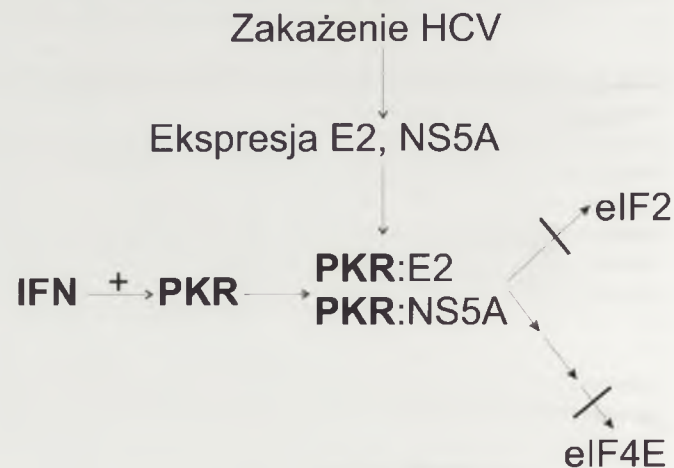
turze amfipatycznej helisy alfa [19, 20]. Gao i wsp. [21] zaproponowali model tworzenia się kompleksu replikacyjnego HCV, w którym białko NS5A łączy się z tzw. tratwą lipidową, czyli nierozpuszczalną w detergentach, bogatą w cholesterol i sfingolipidy mikrodomeną błon komórkowych, jako prekursor NS4A-NS4B-NS5A. Połączenie zachodzi dzięki właściwościom kotwiczącym NS4B. Następnie z NS4A wiąże się NS3, po czym do całego kompleksu przyłącza się NS5B. To połączenie umożliwia białko komórkowe o masie cząsteczkowej 33 kDa, hVAP33 (ang. *human vesicle associated protein*), które jedną domeną wiąże się z NS5B, a drugą z NS5A [21]. Ponadto wskazano na asocjacje NS5A z kroplami lipidowymi oraz apolipoproteina A1 (apoA1), co sugeruje, że NS5A, razem z białkiem C wirusa, może zaburzać prawidłowy metabolizm lipidów, przyczyniając się do stłuszczenia wątroby, obserwowanego w zakażeniu HCV [22]. Białko to powstaje jako prekursor NS5, hydrolizowany przez proteazę serynową NS3 do NS5A i NS5B [1-3]. W części 3' genu kodującego NS5A wykryto sekwencję, którą określono jako rejon determinujący wrażliwość na interferon, w skrócie ISDR (ang. *IFN sensitivity-determining region*) [23]. Początkowe zainteresowanie białkiem NS5A wzrosło w wyniku doniesień z Japonii, sugerujących, że ilość mutacji w obrębie ISDR, wpływających na zamiany reszt aminokwasowych, korelowała z wrażliwością na leczenie interferonem [23, 34]. Jednakże inne badania, przeprowadzone w Europie i Stanach Zjednoczonych, nie potwierdziły tych informacji [25-27]. Natomiast stwierdzono, że NS5A wiąże się z indukowaną przez interferon- α kinazą białkową R (ang. *protein kinase R*, PKR), hamując jej aktywność, polegającą na unieczynnieniu czynnika inicjacji translacji eIF2 poprzez fosforylację jego podjednostki alfa (eIF2 α) (Rys. 2) [28, 29]. W ten sposób białko NS5A przeciwdziała antywirusowym właściwościom interferonu- α , polegającym m.in. na ograniczeniu produkcji wszystkich białek w zakażonej komórce. Domena NS5A, wiążąca kinazę białkową R, zawiera odcinek o długości 66 aminokwasów, z których pierwsze 40 tworzy wcześniej opisany ISDR (reszty 237-276), a następne 26 aminokwasów (277-302) znajduje się bezpośrednio za ISDR, w kierunku końca karboksylowego białka (Rys. 3) [30]. U chorych przed leczeniem interferonem, badania sekwencji domeny wiążącej kinazę białkową R nie wykazały



Rysunek 3. Domeny wirusa HCV, wiążące kinazę białkową R. Dwa białka wirusa HCV, NS5A oraz E2 pochodzące z HCV o genotypie 1, mogą potencjalnie wiązać i inaktywować kinazę białkową R (PKR), indukowaną przez interferon alfa. Uczestniczą w tym domeny wiążące kinazę białkową R. W białku NS5A domena ta zawiera 66 aminokwasów i obejmuje reszty 237-302, a jej częścią (reszty aminokwasowe 237-276) jest tzw. rejon determinujący wrażliwość na interferon (ISDR). W białku otoczki E2 domeną tą jest tzw. PePHD, odcinek o długości 12 aminokwasów (reszty 276-287), wykazujący podobieństwo do miejsca autofosforylacji kinazy białkowej R oraz miejsca fosforylacji czynnika inicjacji translacji eIF2.

znaczących różnic w zmienności regionu ISDR, zarówno u pacjentów, którzy zostali wyleczeni, jak i u tych, którzy nie wyzdrowieli [27]. Zaobserwowano jednak zmiany w sekwencji domeny wiążącej kinazę białkową R, w obrębie 26 aminokwasów znajdujących się poza ISDR. U chorych, którzy odpowiadali na terapię interferonem, zmiany te, w postaci liczby mutacji, były większe, niż u pacjentów niewrażliwych na lek [27]. Wydaje się, że większa zmienność tego regionu powoduje, że wiązanie kinazy białkowej R przez NS5A jest słabsze, a zatem taki NS5A słabiej przeciwdziała aktywności interferonu alfa. Dotyczy to zarówno chorych zakażonych wirusem o genotypie 1a, jak i 1b [27].

Jak wykazały badania He Y i wsp. [29], białko NS5A, poprzez wiązanie kinazy białkowej R, hamuje nie tylko fosforylację eIF2 α , ale także czynnika inicjacji translacji eIF4E, wpływając na ścieżkę sygnałową PKR-p38-Mnk1-eIF4E, w której p38 jest kinazą białkową aktywowaną przez mitogen (ang. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK), biorącą udział w przekazywaniu sygnałów odpowiedzi na stres i aktywującą m.in. kinazę Mnk1 (ang. *MAPK-interacting protein kinase 1*), która z kolei fosforyluje czynnika eIF4E. Potwierdzeniem tego jest obserwacja, że bezpośrednie zablokowanie tej ścieżki sygnałowej, poprzez podanie inhibitora p38 komórkom, w których następuje produkcja HCV, i które rosną w obecności interferonu- α , powodowało zredukowanie przeciwwirusowego efektu interferonu- α na wirusa [31]. W ten sposób HCV hamowałby translację białek, zależną od czapeczki (ang. *cap-dependent translation*), w której uczestniczy eIF4E, ale przy dostatecznej podaży eIF2 (w postaci defosforylowanej), nadal trwałaby translacja RNA wirusowego, gdyż zachodzi ona w sposób niezależny od czapeczki, poprzez wewnętrzne miejsce wiązania z rybosomem, tzw. strukturę IRES (ang. *internal ribosome entry site*), znajdującą się w rejonie 5'-UTR wirusa (Rys. 4) [32].



Rysunek 4. Zahamowanie aktywności kinazy białkowej R przez białka wirusa HCV. W zakażonej komórce białka wirusa, NS5A i E2, poprzez swoje domeny wiążące kinazę białkową R (PKR), mogą hamować jej aktywność. W ten sposób wirus przeciwdziałania się efektem wywołanym przez interferon alfa (IFN): następuje zahamowanie fosforylacji czynnika inicjacji translacji eIF2, przez co ogólna produkcja białek, w tym wirusowych, nie ulega obniżeniu. Inny mechanizm zakłada, że kinaza białkowa R uczestniczy w fosforylacji czynnika inicjacji translacji eIF4E, wchodzącego w skład kompleksu wiążącego się z czapeczką na 5'-końcu mRNA [45]. Ograniczenie fosforylacji tego czynnika przez białka HCV związane z kinazą białkową R prowadzi do zmniejszenia jego aktywności, a tym samym translacji zależnej od czapeczki. W ten sposób produkcja białek komórki uległaby obniżeniu, w przeciwieństwie do białek HCV, których translacja nie jest zależna od czapeczki i odbywa się poprzez strukturę IRES – wewnętrzne miejsce wiązania z rybosomem (ang. *internal ribosome entry site*).

Donesiono ostatnio, że NS5A może wiązać syntetazę 2',5' oligoizoadeninową, kolejne, oprócz kinazy białkowej R, kluczowe białko antywirusowe [33]. Wiązanie wydaje się zachodzić w sposób niezależny od ISDR czy też całego regionu wiążącego białkową kinazę R, gdyż skrócone białko NS5A, pozbawione tego regionu, równie silnie wiązało syntetazę 2',5' oligoizoadeninową, co NS5A o pełnej długości [33]. Zamiana jednego aminokwasu w N-końcowej części skróconej wersji NS5A spowodowała znaczne osłabienie wiązania syntetazy 2',5' oligoizoadeninowej, wskazując tym bardziej na rolę innej domeny niż wiążącej kinazę białkową R w tym oddziaływaniu [33]. Zatem, przeciwdziałanie antywirusowej aktywności interferonu- α przez białko NS5A może, jak się wydaje, nie tylko polegać na hamowaniu transkrypcji genów zależnych od interferonu- α , takich jak geny kinazy białkowej R czy syntetazy 2',5' oligoizoadeninowej, ale na blokowaniu aktywności produktów tych genów.

Wskazano też na rolę NS5A w aktywacji transkrypcyjnej promotora interleukiny 8 (IL-8), której wysoki poziom w surowicy osób zakażonych częściowo znosi efekt przeciwwirusowy, indukowany interferonem alfa [34, 35]. Postulowany jest tutaj inny mechanizm niż poprzez wiązanie kinazy białkowej R. Być może białko NS5A podlega transportowi do jądra gdzie ulega interakcji z czynnikami transkrypcyjnymi, aktywując ekspresję genu IL-8, ale nie wiadomo, czy następuje to bezpośrednio, czy za pomocą mechanizmu pośredniego [34]. Dokładnie nie wiadomo też, jak IL-8, cytokina indukująca odpowiedź przeciwzapalną w zakażeniach wirusowych i bakteryjnych, w postaci zwiększonej chemotaksji i degranulacji neutrofilów, limfocytów T i bazofili, działa przeciwstawnie do interferonu. Ponieważ IL-8 jest produkowana przez wiele komórek, m.in. przez hepatocyty, wydaje się, że w przebiegu zakażenia HCV, zwiększone jej stężenie, wyindukowane dodatkowo obecnością białka NS5A, powoduje napływ i infiltrację wątroby przez limfocyty, przyczyniając się do zaostrzenia objawów zakażenia, a także rozprzestrzeniania się wirusa poza wątrobę [34]. Szkodliwy efekt podniesionego stężenia tej cytokiny potwierdzili Mihm U i wsp. [36], którzy wykazali, że u pacjentów zakażonych przewlekle HCV o genotypie 1, niższe stężenie IL-8 w surowicy przed leczeniem wiąże się z lepszą odpowiedzią na interferon, niż u pacjentów z wyższym stężeniem IL-8 przed leczeniem.

WPLYW HAMUJĄCY BIAŁKA OTOCZKI E2

Białko strukturalne E2 jest glikoproteiną otoczki wirusa HCV, biorącą udział w wiązaniu z receptorem CD81 i internalizacją wirusa [37, 38]. Powierzchniowa lokalizacja powoduje, że w trakcie zakażenia może nastąpić indukcja i wytwarzanie przeciwciał neutralizujących skierowanych przeciwko temu białku [39]. Jednakże wysoka zmienność E2, zwłaszcza w tzw. rejonach hiperzmiennych 1 i 2 (ang. *hypervariable regions 1 and 2*, HVR1 and HVR2), wynikająca z braku funkcji naprawczej polimerazy wirusowej, powoduje, że z czasem odpowiedź w postaci przeciwciał staje się nieefektywna [40]. Stanowi to jeden z powodów małej skuteczności układu immunologicznego, przez co wirus utrzymuje się w organizmie [41]. Ponadto doniesiono, że białko E2 wywodzące się z HCV o genotypie 1 może odpo-

wiadać za oporność wirusa na interferon- α , gdyż, podobnie jak NS5A, wykazuje zdolność hamowania aktywności kinazy białkowej R indukowanej interferonem (Rys. 4) [42]. Jak się wydaje, nie dotyczy to jednak białek E2 wywodzących się z wirusów o innym genotypie. W sekwencji białka E2 zidentyfikowano 12-aminokwasowy, konserwatywny odcinek łączący się z kinazą białkową R, tzw. PePHD (ang. *PKR-eIF2 α phosphorylation homology domain*) (Rys. 3) [42]. Wykazuje on podobieństwo do miejsca autofosforylacji kinazy białkowej R oraz miejsca fosforylacji czynnika eIF2 α i właśnie stopień tego podobieństwa decyduje o tym, że białko E2 wywodzące się z genotypu 1 HCV, w odróżnieniu od białek E2 pochodzących z innych genotypów, wykazuje największą zdolność wiązania kinazy białkowej R [42]. Być może tym wytłumaczyć można największą oporność wirusów HCV o genotypie 1 na terapię interferonem, w porównaniu z wirusami o innym genotypie. Natomiast, jak wskazano, u chorych zakażonych HCV o tym samym genotypie i poddanych leczeniu interferonem, sekwencje odcinków PePHD mogą być identyczne zarówno u tych, którzy zostali wyleczeni, jak i u tych, którzy nie zostali wyleczeni [43]. Podobnie zauważył Yang SS i wsp. [44], badając trzydziestu pacjentów zakażonych HCV o genotypie 1b, z których dziewięciu wyzdrowiało po terapii interferonem- α i rybawiryną, i stwierdzając, że heterogenność odcinka PePHD nie może służyć do przewidzenia możliwego wyniku terapii, gdyż nie było znaczących różnic w sekwencji PePHD w obydwu grupach, tj. u osób wyleczonych, jak i niewyleczonych. Potwierdza się jednak fakt, że w obrębie genotypu 1, gdzie występuje największa zgodność odcinka PePHD z odpowiednim miejscem kinazy białkowej R i eIF2 α , mniej osób zostało wyleczonych (dwie na osiem osób poddanych terapii wg [43]; dziewięć na trzydzieści wg [44]), w porównaniu z genotypem 3, gdzie na siedem leczonych osób, pięć wyzdrowiało [43]. Zatem, można wyciągnąć dwa wnioski: (i) sekwencja PePHD pochodząca z HCV o genotypie 1, jest związana z większą opornością na leczenie interferonem; (ii) chociaż PePHD uczestniczy w oporności na interferon, fakt, że w obrębie tego samego genotypu ci pacjenci, którzy w wyniku terapii wyzdrowieli, jak i ci, którzy nie wyzdrowieli, mogą mieć identyczne sekwencje PePHD, wskazuje, że za ogólną oporność na interferon odpowiadają również inne mechanizmy, m.in. opisany powyżej wpływ białka NS5A.

PODSUMOWANIE

Wirus zapalenia wątroby typu C stanowi ważny problem epidemiologiczny. Dotychczas, inaczej niż w przypadku wirusa zapalenia wątroby typu B, nie opracowano jeszcze skutecznej szczepionki. Leczenie zakażonych osób polega na podawaniu interferonu alfa, często w połączeniu z rybawiryną. Jednakże skuteczność terapii ocenia się na ok. 46 %; nadal zbyt mało, jak na wysokie jej koszty. U podstaw tego, jak się wydaje, leży nie tylko stan pacjenta, ale przede wszystkim wysoka zmienność wirusa, pozwalająca na utrzymywanie się w organizmie mimo aktywności układu immunologicznego, jak i mechanizmy, które wirus wykształcił, aby przeciwstawić się działaniu interferonu. Istotna rola białek NS5A i E2 w tym procesie pozwala zrozumieć niską wydajność leczenia za pomocą interferonu, ale równocześnie wzmacnia nadzieję na opracowanie bardziej

skutecznej terapii. Mimo to, niewykluczone, że wkrótce zostaną odkryte jakieś inne, nieznanne dotychczas sposoby obrony HCV przed efektami podania interferonu, dlatego duże znaczenie mają prowadzone równoległe badania nad uzyskaniem skutecznej szczepionki przeciwwirusowej.

PIŚMIENNICTWO

1. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM (1993) Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 67: 1385-1395
2. Clarke B (1997) Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 78: 2397-2410
3. Sidorkiewicz M (2002) Powstawanie i funkcje białek wirusa zapalenia wątroby typu C. *Post Biochem* 48: 143-150
4. Holland JJ, De La Torre JC, Steinhauer DA (1992) RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* 176: 1-20
5. McHutchinson JG, Gordo SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK (1998) Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 339: 1485-1492
6. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncalves FL, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J (2002) Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347: 975-982
7. Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Pouteau M, Castelnau C, Boyer N, Poliquin M, Degott C, Descombes I, Le Breton V, Milotova V, Benhamou JP, Erlinger S. (1995) Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 22: 1050-1056
8. Velazquez L, Fellous M, Stark GR, Pellegrini S (1992) A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* 70: 313-322
9. Fu XY, Schindler C, Improtta T, Aebersold R, Darnell JE Jr (1992) The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7840-7843
10. Darnell JE, Kerr IM, Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415-1421
11. Sen GC, Lengyel P (1992) The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry. *J Biol Chem* 267: 5017-5020
12. Jakóbsiak M (1998) Odporność nieswoista, W: Jakóbsiak M (red) *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, str. 169-222
13. Heim MH, Moradpour D, Blum HE (1999) Expression of Hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway. *J Virol* 73: 8469-8475
14. Melen K, Fagerlund R, Nyqvist M, Keskinen P, Julkunen I (2004) Expression of hepatitis C virus core protein inhibits interferon-induced nuclear import of STATs. *J Med Virol* 73: 536-547
15. Hosui A, Ohkawa K, Ishida H, Sato A, Nakanishi F, Ueda K, Takehara T, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N (2003) Hepatitis C virus core protein differently regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon-gamma stimuli. *J Biol Chem* 278: 28562-28571
16. Sarcar B, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB (2004) Hepatitis C virus NS5A mediated STAT3 activation requires co-operation of Jak1 kinase. *Virology* 322: 51-60
17. Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R (2001) Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 75: 1252-1264
18. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM (2000) Efficient initiation of HCV replication in cell culture. *Science* 290: 1972-1974
19. Moradpour D, Evans MJ, Gosert R, Yuan Z, Blum HE, Goff SP, Lindebach BD, Rice CM (2004) Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* 78: 7400-7409
20. Brass V, Bieck E, Montserret R, Wolk B, Hellings JA, Blum HE, Penin F, Moradpour D (2002) An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 277: 8130-8139
21. Gao L, Aizaki H, He J-W, Lai MMC (2004) Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* 78: 3480-3488
22. Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, Gretch DR, Lai MMC (2002) Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the Core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 292: 198-210
23. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi M, Marumo F, Sato C (1995) Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitution in the NS5a region. *J Clin Invest* 96: 224-230
24. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C (1996) Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334: 77-81
25. Herion D, Hoofnagle JH (1997) The interferon sensitivity determining region: all hepatitis C virus isolates are not the same. *Hepatology* 25: 769-771
26. Zeuzem S, Lee JH, Roth WK (1997) Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa. *Hepatology* 25: 740-744
27. Nousbani J - B, Polyak SJ, Ray SC, Sullivan DG, Larson AM, Carithers RL Jr, Gretch DR (2000) Prospective characterization of full-length hepatitis C virus NS5A quasispecies during induction and combination antiviral therapy. *J Virol* 74: 9028-9038
28. Gale MJr, Korth MJ, Tang NM, Tan S L, Hopkins DA, Dever TE, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG (1997) Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230: 217-227
29. He Y, Tan S-L, Tareen SU, Vijaysri S, Langland JO, Jacobs BL, Katze MG (2001) Regulation of mRNA translation and cellular signaling by hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Virol* 75: 5090-5098
30. Gale M, Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dosset M, Tang NM, Korth MJ, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG (1998) Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 18: 5208-5218
31. Ishida H, Ohkawa K, Hosui A, Hiramatsu N, Kanto T, Ueda K, Takehara T, Hayashi N (2004) Involvement of p38 signaling pathway in interferon-alpha-mediated antiviral activity toward hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 722-727
32. Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66: 1476-1483
33. Taguchi T, Nagano-Fujii M, Akutsu M, Kadoya H, Ohgimoto S, Ishido S, Hotta H (2004) Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. *J Gen Virol* 85: 959-969
34. Polyak SJ, Khabar KSA, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR (2001) Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 75: 6095-6106
35. Polyak SJ, Khabar KSA, Rezeiq M, Gretch DR (2001) Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. *J Virol* 75: 6209-6211
36. Mihm U, Herrmann E, Sarrazin U, von Wagner M, Kronenberger B, Zeuzem S, Sarrazin C (2004) Association of serum interleukin-8

- with virologic response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 40: 845-852
37. Hadlock KG, Lanford RE, Perkins S, Rowe J, Yang Q, Levy S, Pileri P, Abrignani S, Fong SKH (2000) Human monoclonal antibodies that inhibit binding of hepatitis C virus E2 protein to CD81 and recognize conserved conformational epitopes. *J Virol* 74: 10407-10416
38. Cormier EG, Tsamis F, Kajumo F, Durso RJ, Gardner JP, Dragic T (2004) CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7270-7274
39. Ishii K, Rosa D, Watanabe Y, Katayama T, Harada H, Wyatt C, Kiyosawa K, Aizaki H, Matsuura Y, Houghton M, Abrignani S, Miyamura T (1998) High titers of antibodies inhibiting the binding of envelope to human cells correlate with natural resolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 28: 1117-1120
40. Weiner AJ, Brauer MJ, Roseblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K (1991) Variable and hypervariable domains are found in regions of HCV corresponding to flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope proteins. *Virology* 180: 842-848
41. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, Bonino F, Crawford K, Marion CD, Crawford KA, Brunetto M, Barr PJ, Miyamura T, McHutchinson J, Houghton M (1992) Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: Potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3468-3472
42. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM (1999) Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285: 107-110
43. Abid K, Quadri R, Negro F (2000) Hepatitis C virus, the E2 envelope protein, and α -interferon resistance. *Science* 287: 1555
44. Yang SS, Lai MY, Chen DS, Chen GH, Kao JH (2003) Mutations in the NS5A and E2-PePHD regions of hepatitis C virus genotype 1b and response to combination therapy of interferon plus ribavirin. *Liver Int* 23: 426-433
45. Sobczak K, Krzyżosiak W (2000) Rola struktury mRNA w inicjacji translacji u Eukaryota. *Post Biochem* 46: 207-218

The mechanisms of hepatitis C virus resistance to interferon

Dariusz Kmieciak 

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Karol Marcinkowski University of Medical Sciences, Swiecickiego 6 St., 60-781 Poznan, Poland
e-mail: dkmiec@am.poznan.pl

Key words: hepatitis C virus; non-structural protein 5A; envelope protein E2; protein kinase R binding domains; resistance to interferon alpha

ABSTRACT

The aim of this review is to describe the role of hepatitis C proteins, non-structural protein 5A and envelope protein E2, in resistance to interferon alpha. These proteins contain interferon induced-protein kinase R binding domains. The binding renders the kinase inactive; therefore the phosphorylation of translation factor eIF2 is inhibited. The studies indicate that phosphorylation of eIF4E is also inhibited. As a result, with the sufficient pool of active eIF2 in infected cell, synthesis of viral proteins proceeds while cap- and cap binding factors-, among them eIF4E-, -dependent synthesis of host proteins is diminished. It seems this process is one of the molecular mechanisms responsible for the resistance of hepatitis C virus to interferon, persistence in infected cell and the resultant difficulties in treatment of infected individuals.

Udział sekwencji AURE w regulacji stabilności mRNA

Dominika Trzaska^{1,2}

Jarosław Dastych²

¹Laboratorium Immunologii Molekularnej, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa

²Centrum Biologii Medycznej PAN, Łódź

Laboratorium Immunologii Molekularnej, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, 02-109 Warszawa, e-mail: nika@imcb.gov.pl, tel. (22) 659 55 33 wew. 501

Artykuł otrzymano 15 lipca 2004

Artykuł zaakceptowano 15 listopada 2004

Słowa kluczowe: stabilność mRNA, ekspresja genów, regulacja post-transkrypcyjna, sekwencje AURE, region 5'UTR, region 3'UTR

Wykaz skrótów: AUF1 (ang. *AU binding factor 1*) – wiążący sekwencje bogate w adeninę i uracyl czynnik 1; AURE/ARE (ang. *AU-rich element*) – bogata w adeninę i uracyl sekwencja; CRD (ang. *coding region determinant of instability*) – położony w regionie kodującym mRNA determinant niestabilności; CRE (ang. *C-rich stability element*) – bogata w cytozynę sekwencja wpływająca na stabilność mRNA; ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*) – kinaza regulowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi; GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów; IL (ang. *interleukin*) – interleukina; IRE (ang. *iron-responsive element*) – element odpowiadający na żelazo; JNK (ang. *jun N-terminal kinase*) – kinaza N-końca białka c-Jun; JRE (ang. *JNK responsive element*) – element odpowiadający na kinazę JNK; MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) – kinaza aktywowana czynnikami mitogennymi; TNF (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworów; UTR (ang. *untranslated region*) – region mRNA nie ulegający translacji.

STRESZCZENIE

Procesy post-transkrypcyjne decydujące o stabilności mRNA są ważnym punktem kontroli regulacji ekspresji genów. Spośród sekwencji regulatorowych, których obecność w mRNA wpływa na stabilność transkryptu, najlepiej poznano bogate w uracyl i adeninę sekwencje AURE, występujące na obszarze 3'UTR wielu genów kodujących między innymi cytokiny i białka zaangażowane w odpowiedź komórki na czynniki stresowe. Obecność tych motywów powoduje, że transkrypt ma krótki czas półtrwania, zaś na skutek stymulacji czy działania czynników stresowych jego czas półtrwania znacznie się wydłuża. Badania nad regulacją procesu degradacji mRNA zależnej od AURE doprowadziły do poznania wielu białek wiążących AURE oraz do określenia ścieżek przekazywania sygnału zaangażowanych w regulację stabilności transkryptów. Stwierdzono również, że zaburzenia w regulacji stabilności mRNA mogą stanowić podłoże stanów chorobowych takich jak chłoniaki, nerwiaki, choroby immunologiczne lub stany zapalne.

WPROWADZENIE

Ekspresja genów w komórce eukariotycznej kontrolowana jest na wielu poziomach. Struktura chromatyny decyduje o tym, czy dany gen może podlegać transkrypcji. Nasilenie transkrypcji aktywnych transkrypcyjnie genów poddane jest z kolei ściślejszej kontroli, w której decydującą, choć nie wyłączną, rolę odgrywa oddziaływanie jądrowych czynników transkrypcyjnych z promotorem. Regulacja ekspresji genów nie ogranicza się jednak do decydowania o tym, które sekwencje DNA i w jakim tempie zostaną przepisane na sekwencje mRNA. Na poziomej ekspresji danego genu wpływają również procesy post-transkrypcyjne decydujące o stabilności mRNA, wydajności translacji oraz o stabilności białka będącego końcowym produktem ekspresji.

Czas rozpadu mRNA w komórkach eukariotycznych jest odmienny dla różnych transkryptów. U drożdży czas półtrwania mRNA może wynosić od około 5 minut do ponad godziny, natomiast w kręgowców – od kilku minut do ponad 24 godzin. Regulacja stabilności mRNA w odpowiedzi na swoiste sygnały jest istotnym sposobem kontroli ekspresji wielu genów w procesach wzrostu i różnicowania, w odpowiedzi komórki na czynniki stresowe, a także stanowi jeden z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za szybką zmianę ekspresji genów obserwowaną w komórkach układu odpornościowego pobudzonych swoistym antygenem [1-3].

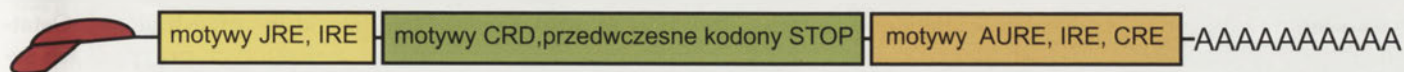
Coraz więcej wiadomo o mechanizmach, jakie decydują o zmianach stabilności mRNA w komórce. Na stabilność transkryptu wpływają zarówno wspólne dla większości mRNA czynniki takie, jak czapeczka na jego 5'-końcu, ogon poli(A) na 3'-końcu, czy pojawienie się przedwczesnych kodonów „stop” w sekwencji kodującej przed intronem, jak i obecność w sekwencji mRNA swoistych motywów pełniących rolę sygnałów dla białek zaangażowanych w procesy lokalizacji, translacji i degradacji mRNA [4-6]. Te ostatnie motywy mogą znajdować się zarówno na obszarze sekwencji kodującej białko, np. element CRD (ang. *coding region determinant of instability*) – położony w regionie kodującym mRNA dla *c-FOS* determinant niestabilności [7], jak i na obszarach nieulegających translacji (UTR, ang. *untranslated region*), np. elementy wpływające na stabilność transkryptu znajdujące się w mRNA dla interleukiny 2, położone zarówno na obszarze 5'UTR (np. odpowiadający na kinazę JNK element JRE, ang. *JNK responsive element*), jak i na obszarze 3'UTR [8]. Wydaje się jednak, że większość tych motywów zlokalizowana jest na obszarze sekwencji niekodujących. Może mieć to związek z mniejszą presją na konserwowanie ewolucyjne tych regionów, co daje większe możliwości powstawania nowych elementów regulatorowych.

ELEMENTY SEKWENCJI WPŁYWAJĄCE NA STABILNOŚĆ TRANSKRYPTU

W ostatnich latach poznano liczne sekwencje regulatorowe, których obecność w mRNA wpływa na stabilność transkryptu. Wiązanie się białek z tymi motywami może zależeć zarówno od ich sekwencji, jak i od struktury przestrzennej, jaką przyjmują. Przykład takiego elementu regulatorowego mogą stanowić tworzące strukturę typu łożyska i pętla (ang. *stem-loop*) elementy IRE (ang. *iron-responsive element*) obecne w nieulegających translacji rejonach wielu genów zaangażowanych w metabolizm żelaza, np. w genach kodujących ferrytynę (w 5'UTR) czy receptor transferyny (w 3'UTR) [9]. Innym przykładem motywu wpływającego na stabilność

3'UTR sekwencje bogate w AU. Przykładami genów, które nie kodują cytokin, a u których czas półtrwania transkryptu podlega regulacji poprzez sekwencje AURE, mogą być geny *c-FOS* czy *c-MYC*. Jednak czas półtrwania mRNA nie jest jedynym parametrem określającym dostępność transkryptu dla syntezy białka. Sekwencje znajdujące się na obszarach 3'UTR wielu genów regulują transport produkowanego mRNA do właściwego przedziału komórkowego. Na przykład sekwencja AUUUA znajdująca się w 3'UTR genu *c-Myc* jest odpowiedzialna nie tylko za kontrolę stabilności transkryptu, ale i za jego lokalizację [13].

Wydaje się, że sekwencje AURE są bardzo silnie konserwowane ewolucyjnie, np. w przypadku genów interleukiny 3 człowieka i myszy region kodujący białko odznacza się



Rysunek 1. Rozmieszczenie elementów wpływających na stabilność transkryptu. Elementy sekwencji wpływające na stabilność mRNA mogą znajdować się zarówno w rejonie kodującym białko (zielony), jak i w rejonach nieulegających translacji na końcu 5' (żółty) i 3' (pomarańczowy). Elementy te mogą być specyficzne dla danego transkryptu czy grupy transkryptów (np. CRE, AURE), lub wspólne dla większości mRNA (czapeczka lub jej brak, występowanie przedwczesnych kodonów STOP, długość ogona poli(A)).

transkryptu jest bogaty w cytozyny motyw znajdujący się w 3'UTR α -globiny, nazwany CRE (ang. *C-rich stability element*). Z sekwencją tą wiąże się kompleks złożony z wielu białek, powodując stabilizację mRNA, prawdopodobnie poprzez ochronę ogona poli(A) (Rys. 1) [10].

Pośród zaangażowanych w stabilizację transkryptu sekwencji znajdujących się na obszarze 3'UTR najlepiej poznane są bogate w uracyl i adeninę sekwencje AURE, nazywane też sekwencjami ARE (ang. *AU-rich elements*). Motywy AURE, oprócz wysokiej zawartości adeniny i uracylu, charakteryzują się często występowaniem jednego lub więcej powtórzeń pentameru AUUUA. Obecność tych motywów powoduje, że transkrypt ma krótki czas półtrwania, np. wstawienie fragmentu 3'UTR *GM-CSF* o długości 51 nukleotydów do stabilnego transkryptu β -globiny powoduje jego destabilizację [11]. Na skutek stymulacji czy działania czynników stresowych czas półtrwania transkryptu zawie-

zaledwie 45% homologią, regiony niekodujące są homologiczne w 73%, zaś motywy AURE aż w 93% [14]. W przypadku genów TNF- α człowieka i myszy region kodujący białko jest homologiczny w 80%, natomiast znajdująca się w 3'UTR tego genu sekwencja AURE o długości 33 nukleotydów odznacza się 100% homologią [15]. Występowanie sekwencji bogatych w AU stwierdzono w 3'UTR licznych niepo pochodzących od ssaków transkryptów związanych z odpowiedzią komórki na stres [16, 17].

KLASYFIKACJA AURE

Występujące w 3'UTR sekwencje typu AURE, które regulują stabilność mRNA, charakteryzują się występowaniem znacznych ilości adeniny i uracylu. Zazwyczaj mają one długość od 50 do 150 nukleotydów. Pierwszej próby klasyfikacji destabilizujących mRNA sekwencji AURE dokonali Chen i Shyu, dzieląc je na trzy klasy (Tab. 1) [18].

Tabela 1. Klasyfikacja sekwencji AURE wg Chen i Shyu [18]

Klasa	Przykład	AUUUA	Charakterystyczne sekwencje
Klasa I	c-Fos, c-Myc	występują	1-3 kopie pentameru AUUUA, domena bogata w U lub ciąg U
Klasa II	GM-CSF, IL-3, TNF- α	występują	co najmniej dwie zachodzące na siebie kopie nonameru UUAUUUA(U/A)(U/A), domena bogata w U lub ciąg U
Klasa III	c-Jun	brak	domena bogata w U lub ciąg U

ającego AURE znacznie się wydłuża. Na przykład czas półtrwania mRNA dla interleukiny 3 w spoczynkowych limfocytach wynosi ok. 30 min., ale po aktywacji komórek antygenem wydłuża się nawet do kilku godzin [12]. Innymi przykładami cytokin, których ekspresja jest w znacznym stopniu regulowana na poziomie post-transkrypcyjnym, są geny kodujące TNF- α , interleukiny 2, 6 i 8, których ekspresja podlega regulacji poprzez znajdujące się na obszarze

3'UTR genów *c-Fos* i *c-Myc* zawierają sekwencje AURE zaliczane do klasy I, zawierające od jednego do trzech powtórzeń pentameru AUUUA w otoczeniu sekwencji o wysokiej zawartości adeniny i uracylu, z często występującymi ciągami uracylu. AURE klasy II, występujące np. w mRNA dla GM-CSF, IL-3 czy TNF- α , zawierają wiele zachodzących na siebie powtórzeń motywu AUUUA w sąsiedztwie sekwencji o wysokiej zawartości adeniny i uracylu, natomiast

Tabela 2. Klasyfikacja sekwencji AURE oparta na ilości powtórzeń AUUUA [24]

Klasa	Motyw	Przykład
Klasa I	WAUUUAW i region bogaty w U	c-Fos, c-Myc
Klasa II A	AUUUAUUUAUUUAUUUAUUUA	GM-CSF, TNF- α
Klasa II B	AUUUAUUUAUUUAUUUA	interferon- α
Klasa II C	WAUUUAUUUAUUUAW	cyklooksigenaza-2, IL-2
Klasa II D	WWAUUUUUUUAWW	FGF2
Klasa II E	WWWAUUUUAWWWW	receptor u-PA
Klasa III	region bogaty w U, brak AUUUA	c-Jun

AURE klasy III, takie jak w c-JunmRNA, nie zawierają pentameru AUUUA, ale charakteryzują się znaczną zawartością adeniny i uracylu oraz występowaniem ciągów uracylu. Transkrypty zawierające AURE klasy I oraz III ulegają degradacji, gdy ich ogon poli(A) ma długość od 30 do 60 nukleotydów, natomiast degradacja mRNA zawierających AURE klasy II rozpoczyna się od całkowitego usunięcia ogona poli(A) [18, 19].

Wzrost ilości poznanych sekwencji niekodujących zaowocował powstaniem kilku baz danych zawierających informacje o nich. Jedną z nich jest ARED, baza sekwencji mRNA, w których występują motywy AURE (<http://rc.kfshrc.edu.sa/ared>) [20, 21]. Stworzono również dwie inne bazy danych zawierające informacje o sekwencjach niepodlegających translacji (UTR). Są to UTRdb – baza niepodlegających translacji sekwencji mRNA organizmów eukariotycznych, oraz UTRsite – baza sekwencji i sygnałów regulatorowych specyficznych dla sekwencji niepodlegających translacji (<http://bigghost.area.ba.cnr.it/BIG/UTRHome>) [22, 23].

Analiza bazy danych ARED dowodzi, że mRNA zawierające AURE reprezentują 5-8% genów człowieka, wśród których są geny kodujące białka zaangażowane we wzrost i różnicowanie się komórek, przekazywanie sygnału, kontrolę transkrypcji i translacji, hematopoezę, apoptozę, transport składników odżywczych i metabolizm komórki. Na podstawie analizy tej bazy danych powstała nowa, bardziej szczegółowa klasyfikacja elementów AURE oparta na ilości powtórzeń pentameru AUUUA (Tab. 2) [24].

Obie zaproponowane klasyfikacje motywów AURE nie pozwalają na dokładne przewidywanie czasu półtrwania transkryptu, ani na stwierdzenie, czy jego stabilność podlega regulacji po wpływie swoistych sygnałów. Prace nad ustaleniem sekwencji konsensusowej, wystarczającej do stabilizacji mRNA, doprowadziły do stwierdzenia, że motyw AUUUA, nawet otoczony sekwencją bogatą w AU, nie zawsze funkcjonuje jako sygnał do destabilizacji transkryptu [25]. Wydaje się, że najkrótszą sztuczną sekwencją powodującą destabilizację mRNA jest nonamer UUAUUUA(A/U)(A/U) [26, 27]. Jednak istnieją AURE, w których nie występują ani pentamery AUUUA, ani nonamery UUAUUUA(A/U)(A/U), a mimo to mają one działanie destabilizujące [25]. Jak dotąd nie udało się zatem określić uniwersalnej sekwencji konsensusowej, która odpowiada za regulację stabilności transkryptu. Być może, tak jak w przypadku innych moty-

wów regulatorowych w RNA, istotne jest występowanie słabo zdefiniowanego motywu w odpowiednim kontekście przyjmowanej przez RNA struktury przestrzennej. Ostatnie doniesienia sugerują, że w niektórych przypadkach sekwencje AURE mogą tworzyć struktury wyższego rzędu, które wpływają na ich interakcje z białkami. Przykładowo wydaje się, że struktura przestrzenna transkryptu odgrywa rolę w interakcjach białka AUF1 z RNA [28]. Podobnie białko HuR wiąże się z sekwencją bogatą w uracyl o długości 17-20 nukleotydów, która przyjmuje strukturę przestrzenną typu łożyska i pętla [29]. Można więc przypuszczać, że rolę sygnału destabilizującego w transkryptach niosących AURE pełni charakterystyczna struktura przestrzenna w połączeniu z motywem bogatym w adeninę i uracyl.

BIAŁKA WIĄŻĄCE SIĘ Z AURE

Sekwencje regulatorowe występujące w mRNA umożliwiają zmianę stabilności mRNA pod wpływem swoistych sygnałów dzięki interakcjom z białkami wiążącymi mRNA. Poznano liczne białka wiążące się z sekwencjami AURE, jednak tylko w przypadku niektórych z nich wykazano, że ich wiązanie z RNA odgrywa rolę w regulacji stabilności transkryptu. Zalicza się do nich AUF1, HuR i białka z jego rodziny, a także tristetraprolinę i inne białka z jej rodziny. Białka wiążące AURE mogą brać udział zarówno w stabilizacji transkryptu, jak i w przyspieszaniu jego rozpadu. Najlepiej poznano dwa z nich, HuR (antygen Hu) – białko stabilizujące, i AUF1 – białko destabilizujące transkrypty zawierające AURE (Rys. 2).

Białko HuR (HuA) tak, jak inne białka z jego rodziny, zawiera trzy motywy wiążące RNA. Wydaje się, że dwa z nich biorą udział w wiązaniu sekwencji AURE, zaś trzeci prawdopodobnie zaangażowany jest w wiązanie ogona poli(A) [30]. Białko HuR zawiera także domenę pozwalającą na przemieszczanie się pomiędzy jądrem a cytoplazmą komórki [31].

Nadekspresja białka HuR powoduje zwiększenie stabilności licznych mRNA zawierających AURE, takich jak mRNA dla c-Fos, GM-CSF [32] czy TNF- α [33]. Zaobserwowano także, że poziom tego białka w komórce zwiększa się podczas aktywacji limfocytów T, kiedy dochodzi do stabilizacji licznych transkryptów cytokinowych [34]. Wykazano również, że HuR jest zaangażowane w takie procesy zachodzące w komórce, jak różnicowanie komórek w procesie miogenezy, gdzie działa poprzez stabilizację transkryptów

dla miogeniny, MyoD i p21 [35], czy regulacja proliferacji komórek, gdzie działa poprzez stabilizację transkryptów kodujących cyklinę A i cyklinę B1 [36]. Badania nad ekspresją genu kodującego HuR w starzejących się komórkach pokazały, że spada w nich poziom HuR, a także, że zmniejsza się jego wiązanie z transkryptami kodującymi cyklinę A, cyklinę B1 oraz c-FOS. Co ciekawe, nadekspresja HuR w takich komórkach przywracała „młody” fenotyp [37].

Mechanizm stabilizacji mRNA pod wpływem białka HuR może wiązać się ze zdolnością tego białka do przemieszczania się pomiędzy cytoplazmą i jądrem komórkowym. Dzięki tej zdolności białko HuR może po przyłączeniu się do mRNA wpływać na dystrybucję transkryptu w komórce, zmieniając jego dostępność dla aparatów translacji i degradacji [38].

Innym dobrze poznanym białkiem wiążącym AURE jest AUF1. Zawiera ono dwa motywy wiążące RNA i bogaty w glutaminę C-koniec. Występuje w czterech izoformach o masie 37, 40, 42 i 45 kDa, powstających na skutek alternatywnego splicingu [39, 40]. Wiązanie białka AUF1 z sekwencją AURE powoduje szybką degradację transkryptów [41, 42]. Zaobserwowano jednak także, że pod wpływem czynników stresowych, takich jak szok cieplny, wiązanie tego białka może powodować ich stabilizację. AUF1 oddziałuje z innymi białkami, takimi jak białka szoku cieplnego, eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4G i białko wiążące poli(A). W efekcie tych oddziaływań dochodzi do powstania kompleksu białek z RNA. Odlączenie się od tego kompleksu czynnika inicjacji translacji 4G i jednoczesna ubiquitynacja, a następnie degradacja proteasomalna AUF1 mogą być sygnałem uruchamiającym proces degradacji mRNA [43].

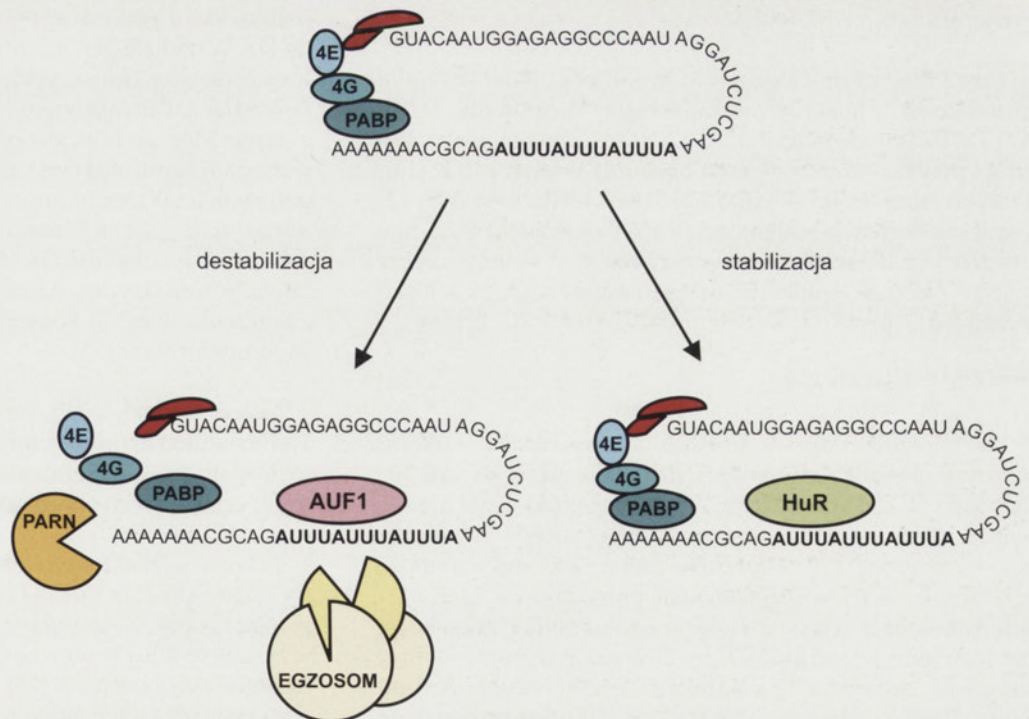
Regulacja stabilności mRNA za pośrednictwem białka AUF1 odgrywa rolę w tak istotnych procesach biologicznych, jak apoptoza. AUF1 wiąże się z sekwencją AURE w 3'UTR genu *BCL-2*, kodującego białko o działaniu antyapoptotycznym. Wykazano, że naświetlenie komórek UVC powoduje zwiększenie się ilości izoformy p45 białka AUF1 w cytoplazmie komórki, wzmożone wiązanie się AUF1 z *BCL-2*-mRNA i destabilizację tego transkryptu [44]. AUF1 może również wiązać się z mRNA dla p21, inhibitora cyklin o działaniu antyapoptotycznym [45].

Białko AUF1 bierze udział także w obróbce mRNA nie zawierających AURE. Wchodzi ono w skład kompleksu białkowego wiążącego się

z elementem CRE (ang. *C-rich element*) w 3'UTR mRNA dla α -globiny, który powoduje jego stabilizację [46]. Zaobserwowano też wiązanie się AUF1 z wpływającym na stabilność mRNA motywem znajdującym się w regionie kodującym genu *c-FOS* [7]. AUF1 bierze zatem udział zarówno w destabilizacji, jak i w stabilizacji transkryptów, w zależności od stanu komórki i sekwencji mRNA, z którą się wiąże.

Białkiem wiążącym się z sekwencjami AURE jest także tristetraprolina. Zawiera ona dwie domeny typu palca cynkowego CCCH oraz trzy motywy tetraproliny (PPPP). Białko to pełni rolę destabilizującą mRNA między innymi dla TNF- α [47] i GM-CSF [48]. W makrofagach inkubowanych z lipopolisacharydem tristetraprolina przemieszcza się z jądra do cytoplazmy, a jej ilość w komórce wzrasta [49]. Powoduje to jej zwiększone wiązanie się z 3'UTR TNF- α -mRNA i jego destabilizację, co ogranicza produkcję tej cytokiny. U myszy pozbawionych tristetraproliny rozwijają się stany zapalne stawów i pojawiają się reakcje autoimmunologiczne, spowodowane zwiększonym poziomem ekspresji genu kodującego TNF- α [50].

Sekwencje AURE oraz wiążące się z nimi białka mogą odgrywać istotną rolę w szczególnej regulacji obróbki mRNA, jaka ma miejsce w komórkach podczas stresu takiego jak szok cieplny czy naświetlanie UV. W takiej sytuacji dochodzi do powstrzymania translacji poprzez zgromadzenie mRNA w wydzielonych granulach stresowych. W transporcie mRNA do granul stresowych biorą udział niektóre białka wiążące AURE [51]. Białka te nieustannie przemieszczają się do granul stresowych i z powrotem, biorąc udział



Rysunek 2. Rola białek wiążących AURE w degradacji transkryptu. Białka wiążące sekwencje AURE są zaangażowane zarówno w stabilizację, jak i w destabilizację transkryptu. Związanie się z mRNA białka o działaniu stabilizującym (np. HuR) chroni mRNA przed degradacją, natomiast związanie się białka o działaniu destabilizującym (np. AUF1) stymuluje degradację transkryptów zawierających AURE poprzez dysocjacje kompleksu białkowego zawierającego białko wiążące poli(A) (PABP) oraz eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4G, a także przez ułatwienie kontaktu mRNA z egzozosomem i rybonukleazą specyficzną dla ogona poli(A) (PARN).

w procesie, który pozwala na selektywną degradację lub translację określonych mRNA [52, 53].

DROGI PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU

W przekazywaniu sygnału regulującego stabilność mRNA zawierającego sekwencje AURE istotną rolę odgrywają kinazy białkowe należące do grupy MAPK, czyli kinaz aktywowanych mitogenami. Kinazy z tej grupy są aktywowane przez czynniki wzrostu, hormony i cytokiny, a także przez czynniki stresowe.

Stwierdzono, że stabilizacja mRNA dla interleukiny 6 i 8 obserwowana w pobudzonych komórkach zależy od drogi przekazywania sygnału obejmującej kinazę MAPK p38 [54]. Ścieżka przekazywania sygnału obejmująca kinazę p38 jest również zaangażowana w następującą na skutek pobudzenia komórek stabilizację mRNA dla cyklooksygenazy-2 [55, 56] i dla TNF- α [57], oraz w indukcję ekspresji genu kodującego tristetraprolinę, a także w stymulację wiązania się tego białka z AURE w mRNA dla TNF- α [58]. Fosforylacja tristetraproliny *in vitro* jest zależna od kinazy MAPKAPK2 (ang. *MAPK-activated protein kinase 2*) [58], która stanowi substrat dla kinazy p38 w kaskadzie kinazowej MAPK. Przypuszczalny mechanizm działania kinazy p38 w regulacji stabilności transkryptów cytokinowych polega na fosforylacji kinazy MAPKAPK2, która z kolei fosforyluje tristetraprolinę regulując jej zdolność do oddziaływania z AURE [54, 59]. Wymienione powyżej transkrypty nie są jedynymi, których stabilność jest zależna od p38. Na przykład w ludzkich monocytach stymulowanych lipopolisacharydem zaobserwowano, że aktywność kinazy p38 wpływa na stabilność czterdziestu dwóch nieopisanych wcześniej transkryptów zawierających AURE [60].

Także inne kinazy z grupy MAPK biorą udział w regulacji stabilności transkryptów zawierających elementy AURE. W przypadku mRNA dla IL-2 i IL-3 zaangażowana jest droga przekazywania sygnału obejmująca kinazę JNK (ang. *jun N-terminal kinase* – kinaza N-końca białka c-Jun) [8, 12]. Z kolei w regulację stabilności mRNA dla GM-CSF zaangażowana jest kinaza ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase* – kinaza regulowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi) [61].

DEGRADACJA mRNA

Mechanizmy degradacji RNA w komórkach eukariotycznych poznano najlepiej u drożdży, gdzie proces ten rozpoczyna się od skracania ogona poli(A) czyli deadenylacji, w którą są zaangażowane specyficzne rybonukleazy – deadenylazy. Następnie degradacja mRNA może przebiegać dwiema drogami. Na pierwszym z tych szlaków katabolicznych po usunięciu ogona poli(A) transkrypt jest trawiony w kierunku 3' – 5' przez egzosom – duży kompleks złożony z co najmniej jedenastu białek. Następnie hydrolizowana jest czapeczka na 5'-końcu pozostałego oligonukleotydu. Natomiast na drugiej drodze degradacji po usunięciu ogona poli(A) następuje usunięcie czapeczki, po którym rozpoczyna się trawienie transkryptu w kierunku 5' – 3' przez egzorybonukleazę cytoplazmatyczną [62]. U ssaków proces degradacji mRNA jest gorzej poznany, ale

zidentyfikowano już liczne białka, które biorą w nim udział, np. rybonukleaza specyficzna dla ogona poli(A) [63, 64] czy ludzkie homologi białek wchodzących w skład drożdżowego egzosomu [65].

Obecność sekwencji typu AURE w mRNA stymuluje zarówno deadenylację, jak i degradację transkryptu. Oddziałująca z sekwencjami AURE tristetraprolina stymuluje deadenylację w procesie zależnym od aktywności rybonukleazy specyficznej dla ogona poli(A) [66]. Oddziałuje również z egzosomem i wspomaga kontakt egzosomu z mRNA [67]. Ponadto jedna z podjednostek egzosomu, PM-Sci75, może kierować go bezpośrednio do mRNA zawierających sekwencje AURE [68]. Wykazano także, że dysocjacja kompleksu ryboproteinowego zawierającego białko AUF1 może służyć jako sygnał uruchamiający proces degradacji mRNA [43]. Przypuszcza się, że również inne białka wiążące AURE mogą wchodzić w interakcje z białkami zaangażowanymi w degradację RNA i wpływać na jej przebieg.

ROLA 3'UTR W PROCESACH PATOLOGICZNYCH

Zarówno mutacje sekwencji regulatorowych znajdujących się w obszarze 3'UTR wielu mRNA, jak i zaburzenia ekspresji genów kodujących białka wiążące te sekwencje, mogą stanowić podłoże stanów chorobowych takich, jak chłoniaki, nerwiaki, choroby immunologiczne lub stany zapalne [69, 70].

Przykładem choroby wiążącej się z zaburzeniami funkcjonowania sekwencji typu AURE może być odmiana chłoniaka nieziarniczego wiążąca się z translokacją chromosomalną, która powoduje rearanżację genu kodującego cyklinę D1. W efekcie gen ten przesuwa się w pobliże sekwencji wzmacniającej transkrypcję immunoglobulin. Rearanżacja powoduje także pojawienie się krótszych transkryptów tego genu, w których brak jest rejonu bogatego w AU, zaangażowanego w kontrolę translacji i stabilności tego mRNA. Czas półtrwania tak zmienionych transkryptów wydłuża się z 30 minut do 3 godzin. Uważa się, że wywołana sąsiedztwem sekwencji wzmacniającej transkrypcję i zwiększeniem stabilizacji transkryptu nadekspresja cykliny D1 powoduje zaburzenia w cyklu komórkowym i przyczynia się do rozwoju nowotworu [71].

Myszy z delecją sekwencji AURE w genie kodującym TNF- α wykazują nadekspresję TNF- α prowadzącą do reumatoidalnego zapalenia stawów i stanów zapalnych jelit przypominających chorobę Crohna [72].

Z kolei w niektórych nowotworach obserwowano podwyższony poziom białka HuR połączony ze wzmożoną ekspresją genów stymulujących angiogenezę, zawierających w obszarze 3'UTR sekwencje typu AURE, takich jak cyklooksygenaza-2 czy *IL-8* [73]. Można więc przypuszczać, że nadekspresja tych istotnych dla wzrostu nowotworu genów wynika ze zwiększonej ilości białka HuR. Podobnie istotny dla wzrostu niektórych nerwiaków podwyższony poziom czynnika transkrypcyjnego MYCN [74] może być spowodowany nadmierną ekspresją genu kodującego HuD, specyficzny dla tkanki nerwowej homolog HuR, które bierze udział

w stabilizacji transkryptu dla MYCN [75]. Nadekspresja cyklooksygenazy-2, która odgrywa rolę w karcynogenezie nowotworów jelita grubego, również może być związana z zaburzeniami ekspresji genów kodujących białka wiążące AURE. Jedną z przyczyn nadekspresji cyklooksygenazy-2 w nowotworach jelita grubego jest bowiem nadmierne wiązanie się HuR z transkrypcyjnym cyklooksygenazy-2, którego 3'UTR zawiera sekwencję AURE, oraz z innymi transkryptami zawierającymi AURE, np. z IL-8mRNA, powodujące ich stabilizację, co stymuluje neoangiogenezę [76]. Także białko AUF1 może odgrywać rolę w onkogenezie. U myszy, u których obserwuje się znaczną nadekspresję izoformy p37 białka AUF1, rozwijają się liczne nowotwory. Towarzyszą temu zaburzenia ekspresji genów kodujących cyklinę D1, c-Myc, c-Jun, c-Fos, GM-CSF oraz TNF- α [77].

Istnieją również dane wskazujące na antynowotworowe działanie niektórych białek wiążących się z sekwencją AURE, na przykład nadekspresja tristetraproliny, białka destabilizującego transkrypty zawierające sekwencje AURE, hamuje onkogenezę w mysim modelu mastocytomy destabilizując IL-3mRNA [78]. Wiadomo też, że działanie antynowotworowe prostaglandyny A₂ opiera się na hamowaniu ekspresji genu kodującego cyklinę D1 poprzez destabilizację jego transkryptu, który wykazuje zdolność do wiązania białka AUF1 [79].

Podsumowując, istnieją przesłanki wskazujące na to, że zaburzenia procesów związanych z regulacją ekspresji genów poprzez stabilność transkryptu są elementem patogenezy niektórych chorób, a ingerencja w regulację tych procesów może być sposobem na rozwinięcie nowych form terapii.

PODSUMOWANIE

Regulacja stabilności transkryptu w odpowiedzi na swoje sygnały to ważny punkt kontroli ekspresji genów w komórce eukariotycznej. Biorą w tym udział liczne sekwencje regulatorowe DNA, znajdujące się głównie w regionach niekodujących, a zwłaszcza na obszarze 3'UTR. Badania prowadzone w ciągu ostatnich kilkunastu lat pozwoliły na naszkicowanie ogólnych zarysów funkcjonowania mechanizmu regulacji stabilności mRNA w komórce eukariotycznej. Jak dotychczas najlepiej poznano działanie elementów AURE, występujące w licznych genach kodujących cytokiny i proto-onkogeny. Obecność tych motywów sekwencyjnych w mRNA łączy się zazwyczaj z niestabilnością transkryptu. W odpowiedzi na czynniki stresowe mRNA niosące elementy AURE ulega stabilizacji, co pozwala na szybką zmianę ilości mRNA dostępnego dla translacji. W procesie regulacji stabilności mRNA biorą udział liczne białka zaangażowane zarówno w stabilizację, jak i w destabilizację transkryptu. Coraz więcej wiadomo także o ścieżkach przekazywania sygnału do stabilizacji transkryptu. Pojawiają się również intrygujące doniesienia sugerujące, że rozregulowanie tych mechanizmów może stanowić podłoże patogenezy pewnych chorób.

PIŚMIENNICTWO

1. Beelman CA, Parker R (1995) Degradation of mRNA in eukaryotes. Cell 81: 179-183
2. Sachs AB (1993) Messenger RNA degradation in eukaryotes. Cell 74: 413-421
3. Peltz SW, Brewer G, Bernstein P, Hart PA, Ross J (1991) Regulation of mRNA turnover in eukaryotic cells. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 1: 99-126
4. Wickens M, Anderson P, Jackson RJ (1997) Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. Curr Opin Genet Dev 7: 220-232
5. Ross J (1996) Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes. Trends Genet 12: 171-175
6. Guhaniyogi J, Brewer G (2001) Regulation of mRNA stability in mammalian cells. Gene 265: 11-23
7. Grosset C, Chen CY, Xu N, Sonenberg N, Jacquemin-Sablon H, Shyu AB (2000) A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. Cell 103: 29-40
8. Chen CYA, Del Gatto-Konczak F, Wu Z, Karin M (1998) Stabilization of interleukin-2 by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. Science 280: 1945-1949
9. Rouault T, Klausner R (1997) Regulation of iron metabolism in eukaryotes. Curr Top Cell Regul 35: 1-19
10. Wang X, Kiledjian M, Weiss IM, Liebhaber SA (1995) Detection and characterization of a 3' untranslated region ribonucleoprotein complex associated with human alpha-globin mRNA stability. Mol Cell Biol 15: 1769-1777
11. Shaw G, Kamen R (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. Cell 46: 659-667
12. Ming XF, Kaiser M, Moroni C (1998) c-jun N-terminal kinase is involved in AUUUA-mediated interleukin-3 mRNA turnover in mast cells. EMBO J 17: 6039-6048
13. Veyrune JL, Campbell GP, Wiseman J, Blanchard JM, Hesketh JE (1996) A localisation signal in the 3' untranslated region of c-myc mRNA targets c-myc mRNA and β -globin reporter to the perinuclear cytoplasm and cytoskeletal-bound polysomes. J Cell Sci 109: 1185-1194
14. Dorssers L, Burger H, Bot F, Delwel R, Geurts van Kessel AH, Lowenberg B, Wagemaker G (1987) Characterization of a human multilineage-colony-stimulating factor cDNA clone identified by a conserved noncoding sequence in mouse interleukin-3. Gene 55: 115-124
15. Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A (1986) Identification of a common nucleotide sequence in the 3' untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. Proc Natl Acad Sci USA 83: 1670-1674
16. Asson-Batres MA, Spurgeon SL, Diaz J, DeLoughery TG, Bagby GC (1994) Evolutionary conservation of the AU-rich 3' untranslated region of messenger RNA. Proc Natl Acad Sci USA 91: 1218-1222
17. Vasudevan S, Peltz SW (2001) Regulated ARE-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell 7: 1191-1200
18. Chen CYA, Shyu AB (1995) AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. Trends Biochem Sci 20: 465-470
19. Xu N, Chen CYA, Shyu AB (1997) Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. Mol Cell Biol 17: 4611-4621
20. Bakheet T, Frevel M, Williams BR, Greer W, Khabar KS (2001) ARED: Human AU-rich element containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. Nucleic Acids Res 29: 246-254
21. Bakheet T, Williams BRG, Khabar KSA (2003) ARED 2.0: an update of AU-rich element mRNA database. Nucleic Acids Res 31: 421-423
22. Pesole G, Liuni S, Grillo G, Licciulli F, Larizza A, Makalowski W, Saccone C (2000) UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Nucleic Acids Res 28: 193-196
23. Pesole G, Liuni S, Grillo G, Licciulli F, Mignone F, Gissi C, Saccone C (2002) UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and

- functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Update. *Nucleic Acids Res* 30: 335-340
24. Wilusz CJ, Wormington M, Peltz SW (2001) The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 237-246
 25. Chen CYA, Shyu AB (1994) Selective degradation of early-response-gene mRNAs: functional analyses of sequence features of the AU-rich elements. *Mol Cell Biol* 14: 8471-8482
 26. Lagnado CA, Brown CY, Goodall GJ (1994) AUUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A). *Mol Cell Biol* 14: 7984-7995
 27. Zubiaga AM, Belasco JG, Greenberg ME (1995) The nonamer UUAU-UUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol Cell Biol* 15: 2219-2230
 28. Wilson GM, Sutphen K, Chuang K-y, Brewer G (2001) Folding of A+U-rich RNA elements modulates AUF1 binding. *J Biol Chem* 276: 8695-8704
 29. Lopez de Silanes I, Zhan M, Lal A, Yang X, Gorospe M (2004) Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2987-2992
 30. Ma WJ, Chung S, Furneaux H (1997) The ELAV-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA. *Nuc Acids Res* 25: 3564-3569
 31. Fan XC, Steitz JA (1998) HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 15293-15298
 32. Fan XC, Steitz JA (1998) Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J* 17: 3448-3460
 33. Dean JLE, Wait R, Mahtani KR, Sully G, Clark AR, Saklatvala J (2001) The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol* 21: 721-730
 34. Atasoy U, Watson J, Patel D, Keene JD (1998) ELAV protein HuA (HuR) can redistribute between nucleus and cytoplasm and is up-regulated during serum stimulation and T cell activation. *J Cell Sci* 111: 3145-3156
 35. Figueroa A, Cuadrado A, Fan J, Atasoy U, Muscat GE, Munoz-Canoes P, Gorospe M, Munoz A (2003) Role of HuR in skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes. *Mol Cell Biol* 23: 4991-5004
 36. Wang W, Caldwell MC, Lin S, Furneaux H, Gorospe M (2000) HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *EMBO J* 19: 2340-2350
 37. Wang W, Yang X, Cristofalo VJ, Holbrook NJ, Gorospe M (2001) Loss of HuR is linked to reduced expression of proliferative genes during replicative senescence. *Mol Cell Biol* 21: 5889-5898
 38. Keene JD (1999) Why is Hu where? Shuttling of early response-gene messenger RNA subsets. *Commentary. Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 5-7
 39. Wagner BJ, DeMaria CT, Sun Y, Wilson GM, Brewer G (1998) Structure and genomic organization of the human AUF1 gene - alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics* 48: 195-202
 40. Dempsey LA, Li MJ, DePace A, Bray-Ward P, Maizels N (1998) The human HNRPD locus maps to 4q21 and encodes a highly conserved protein. *Genomics* 49: 378-384
 41. Loflin P, Chen CY, Shyu AB (1999) Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev* 13: 1884-1897
 42. DeMaria CT, Brewer G (1996) AUF1 binding affinity to A+U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J Biol Chem* 271: 12179-12184
 43. Laroia G, Cuesta R, Brewer G, Schneider RJ (1999) Control of mRNA decay by heat-shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 284: 499-502
 44. Lapucci A, Donnini M, Papucci L, Witort E, Tempestini A, Bevilacqua A, Nicolini A, Brewer G, Schiavone N, Capaccioli S (2002) AUF1 is a *bcl-2* A+U-rich element-binding protein involved in *bcl-2* destabilization during apoptosis. *J Biol Chem* 277: 16139-16146
 45. Bhattacharya S, Giordano T, Brewer G, Malter JS (1999) Identification of AUF-1 ligands reveals vast diversity of early response gene mRNAs. *Nucleic Acids Res* 27: 1464-1472
 46. Kiledjian M, DeMaria CT, Brewer G, Novick K (1997) Identification of AUF1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D) as a component of the alpha-globin mRNA stability complex. *Mol Cell Biol* 17: 4870-4876
 47. Lai WS, Carballo E, Strum JR, Kennington EA, Phillips RS, Blackshear PJ (1999) Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol Cell Biol* 19: 4311-4323
 48. Carballo E, Lai WS, Blackshear PJ (2000) Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood* 95: 1891-1899
 49. Taylor GA, Thompson MJ, Lai WS, Blackshear PJ (1996) Mitogens stimulate the rapid nuclear to cytosolic translocation of tristetraprolin, a potential zinc-finger transcription factor. *Mol Endocrinol* 10: 140-146
 50. Taylor GA, Carballo E, Lee DM, Lai WS, Thompson MJ, Patel DD, Schenkman DI, Gilkeson GS, Broxmeyer HE, Haynes BF, Blackshear PJ (1996) A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity* 4: 445-454
 51. Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* 147: 1431-1442
 52. Kedersha N, Cho MR, Li W, Yacono PW, Chen S, Gilks N, Golan DE, Anderson P (2000) Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol* 151: 1257-1268
 53. Kedersha N, Anderson P (2002) Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 30: 963-969
 54. Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CYA, Shyu AB, Muller M, Gaestel M, Resch K, Holtmann H (1999) The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J* 18: 4969-4980
 55. Ridley SH, Dean JLE, Sarsfield SJ, Brook M, Clark AR, Saklatvala J (1998) A p38 MAP kinase inhibitor regulates stability of interleukin-1-induced cyclooxygenase-2 mRNA. *FEBS Lett* 439: 75-80
 56. Dean JLE, Brook M, Clark AR, Saklatvala J (1999) p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem* 274: 264-269
 57. Brook M, Sully G, Clark AR, Saklatvala J (2000) Regulation of tumour necrosis factor alpha mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signalling cascade. *FEBS Lett* 483: 57-61
 58. Mahtani KR, Brook M, Dean JLE, Sully G, Saklatvala J, Clark AR (2001) Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Mol Cell Biol.* 21: 6461-6469
 59. Neininger A, Kontoyiannis D, Kotlyarov A, Winzen R, Eckert R, Volk HD, Holtmann H, Kollias G, Gaestel M (2002) MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *J Biol Chem* 277: 3065-3068
 60. Frevel MAE, Bakheet T, Silva AM, Hissong JG, Khabar KSA, Williams BRG (2003) p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent and -Independent Signaling of mRNA Stability of AU-Rich Element-Containing Transcripts. *Mol Cell Biol* 23: 425-436
 61. Esnault S, Malter JS (2002) Extracellular signal-regulated kinase mediates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mes-

- senger RNA stabilization in tumor necrosis factor- α plus fibronectin-activated peripheral blood eosinophils. *Blood* 99: 4048-4052
62. Parker R, Song H (2004) The enzymes and control of eukariotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 11: 121-127
63. Martinez J, Ren JG, Thuresson AC, Hellman U, Astrom J, Virtanen A (2000) A 54-kDa fragment of the poly(A)-specific ribonuclease is an oligomeric, processive, and cap-interacting poly(A)-specific 3' exonuclease. *J Biol Chem* 275: 24222-24230
64. Korner CG, Wahle E (1997) Poly(A)-tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J Biol Chem* 272: 10448-10456
65. Allmang C, Petfalski E, Podtelejnikov A, Mann M, Tollervey D, Mitchell P (1999) The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3'-5' exonucleases. *Genes Dev* 13: 2148-2158
66. Lai WS, Kennington EA, Blackshear PJ (2003) Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol Cell Biol* 23: 3798-3812
67. Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Raijmakers R, Pruijn GJ, Stoecklin G, Moroni C, Mann M, Karin M (2001) AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107: 451-464
68. Mukherjee D, Gao M, O'Connor JP, Raijmakers R, Pruijn G, Lutz CS, Wilusz J (2002) The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J* 21: 165-174
69. Grzybowska EA, Wilczynska A, Siedlecki JA (2001) Regulatory functions of 3' UTRs. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 291-295
70. Conne B, Stutz A, Vassalli J-D (2000) The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nat Med* 6: 637-641
71. Rimokh R, Berger F, Bastard C, Klein B, French M, Archimbaud E, Rouault JP, Santa Lucia B, Duret L, Vuillaume M, et al. (1994) Rearrangement of CCND1 (BCL1/PRAD1) 3' untranslated region in mantle-cell lymphomas and t(11q13)-associated leukemias. *Blood* 83: 3689-3696
72. Kontoyannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G (1999) Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut associated immunopathologies. *Immunity* 10: 387-398
73. Nabors LB, Gillespie GY, Harkins L, King PH (2001) HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer Res* 61: 2154-2161
74. Schwab M (2004) MYCN in neuronal tumours. *Cancer Lett* 204: 179-187
75. Manohar CF, Short ML, Nguyen A, Nguyen NN, Chagnovich D, Yang Q, Cohn SL (2002) HuD, a neuronal-specific RNA-binding protein, increases the *in vivo* stability of MYCN RNA. *J Biol Chem* 277: 1967-1973
76. Dixon DA, Tolley ND, King PH, Nabors LB, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (2001) Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J Clin Invest* 108: 1657-1665
77. Gouble A, Grazide S, Meggetto F, Mercier P, Delsol G, Morello D (2002) A new player in oncogenesis: AUF1/hnRNP D overexpression leads to tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Res* 62: 1489-1495
78. Stoecklin G, Gross B, Ming XF, Moroni C (2003) A novel mechanism of tumor suppression by destabilizing AU-rich growth factor mRNA. *Oncogene* 22: 3554-3561
79. Lin S, Wang W, Wilson GM, Yang X, Brewer G, Holbrook NJ, Gorospe M (2000) Down-regulation of cyclin D1 expression by prostaglandin A(2) is mediated by enhanced cyclin D1 mRNA turnover. *Mol Cell Biol* 20: 7903-7913

Role of AURE sequences in the regulation of mRNA stability

Dominika Trzaska^{1,✉}, Jarosław Dastych²

¹Laboratory of Molecular Immunology, International Institute of Molecular and Cell Biology, 4 Ks. Trojdena St., 02-109 Warsaw, Poland

²Centre for Medical Biology, Polish Academy of Sciences, 106 Lodowa St., 93-232 Lodz, Poland

✉ e-mail: nika@iimcb.gov.pl

Key words: mRNA stability, gene expression, post-transcriptional regulation, AURE, 5'UTR, 3'UTR

ABSTRACT

Post-transcriptional processes influencing mRNA stability are an important control point in gene expression regulation. The best-studied regulatory elements controlling mRNA stability are AU-rich sequences (AURE) found in 3'UTRs of many genes coding cytokines and stress response proteins. The presence of these elements results in short half-life of mRNA, but such mRNA half-life is prolonged upon cell stimulation or exposition to stress factors. Research on AURE-mediated mRNA decay resulted in discovery of AURE-binding proteins and in elucidating signal transduction pathways involved in the process of mRNA stability regulation. Defects in mRNA stability regulation can result in diseases such as lymphomas, neuromas or immunological and inflammatory disorders.

Rola białek z rodziny Rho w kontroli migracji komórek pełzających

Wanda Kłopocka✉

Jolanta Barańska

Pracownia Przekazników Sygnałów, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa

Pracownia Przekazników Sygnałów, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, e-mail: w.klopocka@nencki.gov.pl, tel. (22) 589 22 25

Artykuł otrzymano 10 stycznia 2005
Artykuł zaakceptowano 3 lutego 2005

Słowa kluczowe: adhezja, białka Rho, cytoszkielet aktynowy, migracja, polimeryzacja

Wykaz skrótów: GBD – (ang. *GTPase binding domain*); GEF, GDI, GAP – białka regulujące aktywność białek Rho; PAK (ang. *p21-activated kinase*); PIP – fosfatydyloinozytolo monofosforan; PIP₂ – fosfatydyloinozytolo 4,5-bisfosforan; PIP₃ – fosfatydyloinozytolo 3,4,5-trisfosforan; Src – niereceptorowa kinaza tyrozynowa; WASp – (ang. *Wiskott-Aldrich Syndrome protein*).

Podziękowanie: Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego KBN 3 P04C 028 25

STRESZCZENIE

Ruchem pełzającym przemieszczają się organizmy jednokomórkowe oraz niektóre komórki tkankowe. Migracja tych komórek jest związana z dynamiczną reorganizacją cytoszkieletu aktomiozynowego i angażuje procesy polimeryzacji i depolimeryzacji aktywnymi. Procesy te odpowiedzialne są za: ekspansję frontu, obkurczanie i przesuwanie uropodu w kierunku migracji oraz adhezję komórki do podłoża. Komórki zaczynają migrować w odpowiedzi na różnorodne bodźce, aktywujące różne receptory i uruchamiające rozmaite szlaki sygnałowe. Ogniwami tych szlaków są m. in. wiążące GTP białka z rodziny Rho. Najlepiej poznanymi i pełniącymi istotną rolę w kontroli migracji poprzez regulację organizacji cytoszkieletu aktomiozynowego oraz aktywności kurczliwej systemu aktomiozynowego są białka Rho, Rac i Cdc42. Podczas migracji komórek pełzających wyróżnić można trzy etapy: ekspansję strefy frontальной, adhezję (umożliwiającą stabilizację wysuniętego frontu) oraz deadhezję strefy tylnej (uropodu) i przesunięcie ciała komórki w kierunku migracji. We wszystkich tych etapach rolę regulatorów pełnią białka z rodziny Rho. Cdc42 i Rac są niezbędne dla uzyskania polaryzacji przez rozpoczynającą migrację komórkę, kontrolują formowanie i ekspansję lamellipodiów oraz organizację miejsc adhezji w strefie frontальной. Białko Rho reguluje aktywność kurczliwą systemu aktomiozynowego poza strefą frontální, kontrolując obkurczanie ciała komórki i adhezję uropodu.

WPROWADZENIE

Dynamiczna reorganizacja cytoszkieletu aktomiozynowego w odpowiedzi na różnorodne bodźce leży u podstaw wszystkich zjawisk związanych z ruchliwością komórek. Jednym z nich jest migracja komórek pełzających.

Ruchem pełzającym, zwanym również ameboidalnym przemieszczają się różne komórki zwierzęce. Wolno żyjące ameby, np. *Amoeba proteus*, *Acanthamoeba castellanii*, śluzowiec *Dictyostelium discoideum* w komórkowym stadium rozwojowym oraz komórki tkankowe: komórki zarodka, których migracja odgrywa istotną rolę podczas embriogenezy, fibroblasty i komórki nabłonkowe biorące udział w gojeniu ran, komórki układu odpornościowego (limfocyty, granulocyty i makrofagi) odpowiedzialne za obronę organizmu przed czynnikami chorobotwórczymi, a także inwazyjne komórki nowotworowe, których migracja jest zjawiskiem patologicznym i prowadzi do powstawania przerzutów.

Tak migrujące komórki tkankowe oraz jednokomórkowe organizmy nie posiadają wyspecjalizowanych, trwałych narządów ruchu takich jak rzęski czy wici, lecz rozwijają przejściowe organy lokomotoryczne o różnym kształcie i wielkości (ameby – pseudopodia, komórki tkankowe – lamellipodia i filopodia). Komórki pełzają przyczepione do podłoża, mają morfologicznie i funkcjonalnie zróżnicowany przedni oraz tylny rejon (polaryzacja ruchowa). Siłą niezbędną dla ruchu komórki generują dzięki procesom zachodzącym w cytoszkielecie korykalnym, znajdującym się pod błoną plazmatyczną. Podstawowym składnikiem tego cytoszkieletu są filamenty aktynowe, które formują wiązki albo sieci. Organizacja cytoszkieletu korykalnego zależy od białek regulujących i wiążących aktyne.

Migracja angażuje procesy polimeryzacji i depolimeryzacji aktywnymi, formowania i dezorganizacji sieci aktynowej oraz interakcji miozyny z filamentami aktynowymi. Ekspansja czoła komórki jest związana z organizacją struktur cytoszkieletalnych *de novo*, a więc: polimeryzacją aktywnymi i sieciowaniem filamentów. Zmiany zachodzące w tylnej strefie migrującej komórki dotyczą zorganizowanych już struktur cytoszkieletu aktomiozynowego i są związane z aktywacją miozyny. Rozdzielenie tych procesów w migrującej komórce możliwe jest dzięki asymetrii przestrzennej, czyli polaryzacji komórki, która pojawia się natychmiast po uzyskaniu przez komórkę kontaktu z podłożem, podczas zjawiska zwanego rozplaszczaniem.

RODZINA BIAŁEK Rho

Komórki zaczynają migrować w odpowiedzi na różnorodne bodźce, które aktywują różne receptory i uruchamiają rozmaite szlaki sygnałowe. Ogniwami tych szlaków są m. in. wiążące GTP białka z rodziny Rho. Współdziałają one synergistycznie albo antagonistycznie z innymi białkami szlaków sygnałowych oraz wtórnymi przekaźnikami informacji, takimi jak jony wapnia, fosfatydyloinozytole (PIP, PIP₂, PIP₃), czy cykliczny adenozylo monofosforan (cAMP).

Rodzinę Rho tworzą małe, monomeryczne białka, o masach cząsteczkowych 20-30 kDa, wykazujące homologię do białka Ras. Występują we wszystkich organizmach eukariotycznych, od mikroorganizmów do ssaków, i wykazują między sobą znaczny stopień homologii (ponad 50% identycznych aminokwasów). Znane są przede wszystkim z roli jaką odgrywają w regulacji organizacji cytoszkieletu aktynowego i aktywności miozyna. Jakkolwiek ich wpływ na dynamikę mikrotubul, drogi transportu wewnątrzkomórkowego i aktywność czynników transkrypcyjnych jest także znaczący. Ponadto białka te uczestniczą w regulacji cyklu komórkowego i morfogenezy.

U człowieka zidentyfikowano 20 genów kodujących białka Rho. Podzielono je na 5 grup: Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoBTB [1]. W komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* znaleziono geny kodujące cztery izoformy białek z grupy Rho i jedną izoformę z grupy Cdc42 [2]. *Dictyostelium* posiada geny kodujące izoformy białka tylko z grupy Rac [3, 4]. W chorobotwórczym pierwotniaku *Entamoeba histolytica* wykryto geny kodujące białka homologiczne do Rac i Rho [5, 6]. Białka należące do rodziny Rho występują również w wolno żyjących amebach - *Acanthamoeba castellanii* [7] i *Amoeba proteus* [8].

Najlepiej poznanymi i odgrywającym istotną rolę w kontroli organizacji cytoszkieletu są białka Rho, Rac i Cdc42. Poprzez kontrolę organizacji cytoszkieletu aktynowego oraz aktywności kurczliwej systemu aktomiozynowego białka te regulują szereg procesów i zjawisk, takich jak: migracja, endocytoza, cytokineza, skurcz mięśni gładkich, transport pęcherzyków sekrecyjnych, formowanie kontaktów międzykomórkowych [9]. Białka Rho, podobnie jak heterotrimeryczne białka G są aktywne, gdy przyłączony jest do nich nukleotyd guanynowy GTP, a nieaktywne z przyłączonym

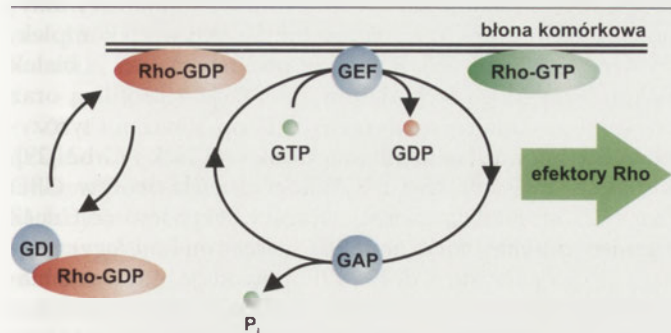
GDP [10, 11]. Przejście ze stanu nieaktywnego w aktywny i odwrotnie wymaga udziału dodatkowych białek regulujących (Rys. 1): GEF (ang. *guanine nucleotide exchange factor*), GAP (ang. *GTPase-activating proteins*) oraz GDI (ang. *guanine nucleotide dissociation inhibitor*). W cytoplazmie występuje nieaktywna forma białek Rho w postaci kompleksu z białkiem regulatorowym GDI. Białka GDI hamują dysocjację GDP, a poprzez zamknięcie motywu geranylogeranylowego w domenie hydrofobowej uniemożliwiają zakotwiczenie białek Rho w błonie. Zamianę formy nieaktywnej w aktywną poprzedza dysocjacja GDI i przemieszczenie białka Rho do błony komórkowej. Białka GEF ułatwiają zarówno dysocjację GDI, jak też wymianę GDP na GTP, a więc aktywują białka Rho. Aby pełnić swoje funkcje i związać się z błoną, białka Rho ulegają farnesylicacji, bądź geranylogeranylicacji. Białka GAP aktywują hydrolizę GTP do GDP, a więc przyspieszają przejście ze stanu aktywnego w nieaktywny [11].

Białka Rho odbierają sygnały z różnych receptorów powierzchniowych: z receptorów posiadających aktywność kinaz tyrozynowych, aktywowanych przez naskórkowy i płytkopochodny czynnik wzrostu (EGF, PDGF), czy insulinę, receptorów o siedmiu domenach transbłonowych związanych z heterotrimerycznymi białkami G, a stymulowanych m. in. przez takie ligandy jak: kwas lizofosfatydowy, bombezyna, bradykinina, czy trombina, a także cząsteczek adhezywnych, takich jak integryny, kadheryny i białka z nadrodziny immunoglobulin [12, 13, 14, 15].

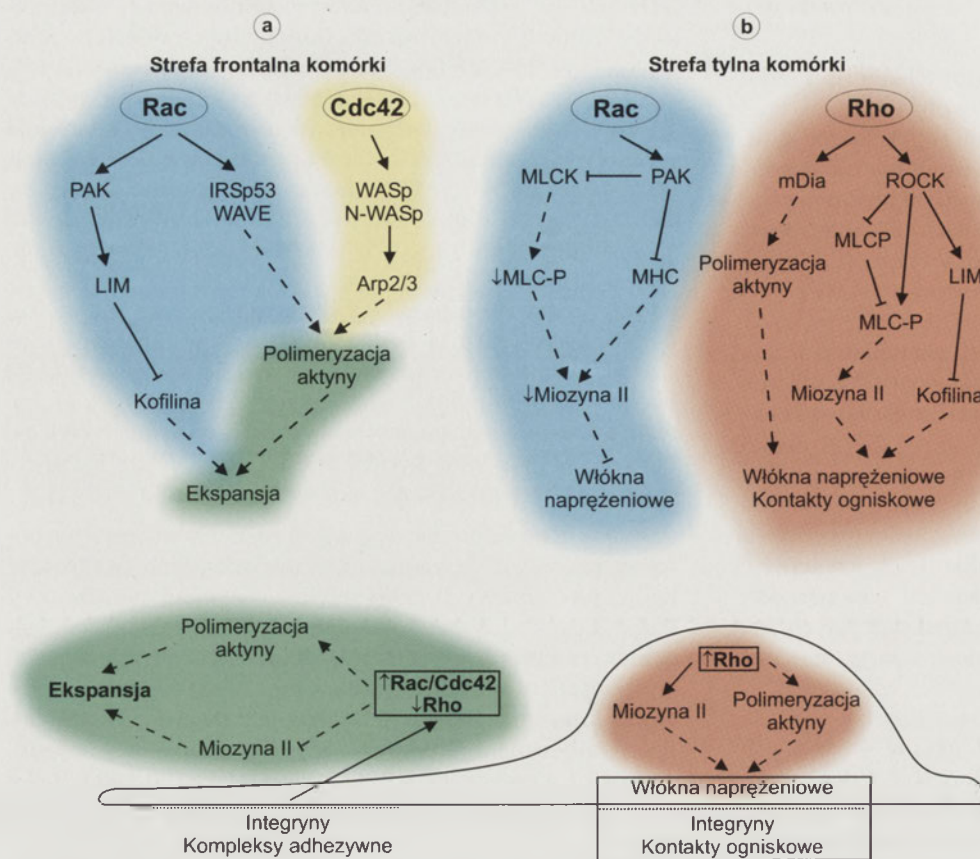
Za specyficzność szlaków sygnałowych związanych z białkami Rho odpowiedzialne są białka regulatorowe GEF, które oprócz aktywacji wyznaczają również konkretną drogę przekazywania informacji przez białka Rho [9]. Aktywne formy białek z rodziny Rho wiążą się z białkami efektorowymi, za pośrednictwem których oddziałują na białka biorące udział w reorganizacji cytoszkieletu. W ciągu ostatnich lat zidentyfikowano i scharakteryzowano szereg efektorów specyficznie aktywowanych przez białka z grup Rho, Rac i Cdc42. Każdy szlak sygnałowy stymuluje specyficzny model organizacji aktyny, angażując różne białka regulujące i wiążące aktynę. Konsekwencją jest formowanie różnych struktur cytoszkieletalnych - wiązek albo sieci, a w powiązaniu z dynamicznymi zmianami błony plazmatycznej tworzenie, odpowiednio filopodiów, lamellipodiów albo pseudopodiów.

MIGRACJA

Podczas migracji komórek pelzających wyróżnić można trzy etapy: ekspansję strefy frontальной, adhezję (umożliwiającą stabilizację wysuniętego frontu) oraz deadhezję strefy tylnej (uropodu) i przesunięcie ciała komórki w kierunku migracji. We wszystkich tych zjawiskach rolę regulatorów pełnią białka z rodziny Rho. Cdc42 i Rac są niezbędne dla uzyskania polaryzacji przez rozpoczynającą migrację komórkę, kontrolują formowanie i ekspansję lamellipodiów oraz organizację miejsc adhezji w strefie frontальной (Rys. 2a). Białko Rho reguluje aktywność kurczliwej systemu aktomiozynowego poza strefą frontálną, kontrolując obkurczanie ciała komórki i adhezję uropodu (Rys. 2b).



Rysunek 1. Aktywacja i dezaktywacja białek z rodziny Rho (dokładny opis w tekście). Wykaz skrótów zastosowanych na rycinie: GDP – guanozyna difosforan, GEF, GDI, GAP – białka regulujące aktywność białek Rho, GTP – guanozyna trifosforan..



Rysunek 3. Funkcje białek z rodziny Rho w regulacji ekspansji, adhezji i przemieszczenia komórki podczas migracji: a. Ekspansja i adhezja strefy frontalnej. Udział białek Rac i Cdc42 w kontroli polimeryzacji aktyny oraz kurczliwości cytoszkieletu aktomiozynowego, b. Adhezja, deadhezja i przemieszczenie uropodu. Udział białka Rho w regulacji polimeryzacji aktyny i aktywności miozyny II. Wpływ białek Rac i Cdc42 na aktywność miozyny II (opis procesów i zjawisk w tekście). Wykaz skrótów zastosowanych na rycinie: Arp2/3 – (ang. *actin related proteins*), LIM – serynowo/treoninowa kinaza, MHC – ciężki łańcuch miozyny, MLCK – kinaza lekkich łańcuchów miozyny, MLCP – fosfataza lekkich łańcuchów miozyny, MLC-P – fosforylowane lekkie łańcuchy miozyny, PAK (ang. *p21-activated kinase*), Src – niereceptorowa kinaza tyrozynowa, WASp – (ang. *Wiskott-Aldrich Syndrome protein*).

EKSPANSJA FRONTU

Utworzenie strefy frontalnej, a następnie jej progresja są związane z intensywną, zlokalizowaną polimeryzacją aktyny i formowaniem struktur cytoszkieletalnych. W odpowiedzi na bodziec komórki uruchamiają mechanizmy zapoczątkowujące polimeryzację aktyny w ściśle określonym miejscu, tuż pod błoną plazmatyczną. Mechanizmy te polegają na: udostępnianiu dla polimeryzacji skierowanych ku błonie plazmatycznej końców kolczastych istniejących filamentów, do których preferencyjnie przyłączane są monomery aktyny związane z ATP, oraz tworzeniu zarodki nowych filamentów w procesie zwanym nukleacją [16, 17, 18]. Białka Cdc42 oraz Rac, stanowią ogniwa szlaków sygnałowych indukujących polimeryzację aktyny (Rys. 2a). Współdziałają z nimi m. in. fosfatydyloinozytole: PIP₂ i PIP₃ [19].

Końce kolczaste udostępniane są dla polimeryzacji, gdy ma miejsce dysocjacja białek zakrywających je oraz fragmentacja filamentów. Białka skracające długość filamentów mogą się jednocześnie wiązać z ich szybciej przyrastającymi końcami, blokując polimeryzację. Jednym z białek fragmentujących filamenty i kontrolujących dostępność końców kolczastych jest żelsolina [20], występująca w komór-

kach wyższych organizmów eukariotycznych. Białko to jest regulowane przez jony wapnia i fosfatydyloinozytole. W obecności mikromolarnych stężeń wolnego wapnia w cytoplazmie żelsolina łączy filamenty aktynowe i wiąże się z ich końcami kolczastymi, a więc powoduje rozpad sieci i jednocześnie blokuje polimeryzację. Natomiast, przy niższym poziomie Ca²⁺ i w obecności PIP i PIP₂ oddysocjuje, odsłaniając końce kolczaste [21, 22]. Wykazano, że w obecności aktywnego białka Rac odsłanianych jest 9 razy więcej miejsc dla polimeryzacji niż w obecności samych fosfatydyloinozytoli.

Proces tworzenia zarodki nowych filamentów jest najwolniejszym etapem polimeryzacji. Zarodki składają się z trzech monomerów, których układ stanowi początek struktury helikalnej. Ich formowanie ma miejsce wówczas, gdy bodziec uruchamia szlaki sygnałowe aktywujące białka z rodziny WASp/Scar. W komórkach ssaków występują białka WASp, N-WASp (w komórkach nerwowych) oraz cztery izoformy Scar, z których jedną określa się

jako WAVE [23]. Białka te lub ich homologi zidentyfikowano również u niższych Eukaryota, np. białko Scar wykryto u śluzowca *Dictyostelium discoideum* [24]. W przyspieszaniu nukleacji aktyny kluczową rolę odgrywa, występujący powszechnie w komórkach eukariotycznych kompleks białek Arp2/3 (ang. *actin related proteins*). Białka WASp/Scar wiążą się bezpośrednio z kompleksem Arp2/3 i stymulują jego aktywność [25, 26, 27]. Oprócz motywu oddziałującego z kompleksem Arp2/3 w C-końcowym odcinku białek WASp/Scar znajduje się domena wiążąca monomery aktynowe. Obie te domeny są niezbędne dla aktywacji kompleksu Arp2/3 [25, 27, 28]. Bogate w prolinę sekwencje białek WASp/Scar mogą wchodzić w interakcje z profiliną oraz białkami posiadającymi domeny SH3 np. kinazami tyrozynowymi Src, czy białkami adaptorowymi Nck i Grb2 [29]. Koniec N białek WASp i N-WASp zawiera motyw GBD (ang. *GTPase binding domain*), wiążący bezpośrednio Cdc42 i domenę plekstrynową (ang. *PH – pleckstrin homology*), wiążącą PIP₃. Związanie Cdc42 i PIP₃ powoduje aktywację białek WASp i N-WASp (Rys. 2a) dzięki uwolnieniu zablokowanych przez motyw GBD domen wiążących Arp2/3 i monomery aktynowe na końcu C cząsteczki [25]. Autoinhibicja tych białek może być również zniesiona przez odpowiednie białka wiążące się z domenami bogatymi w prolinę. Białka

Scar/WAVE nie posiadają motywu GBD ani domeny wiążącej PIP₂ i są pośrednio aktywowane przez białko Rac. Rac aktywuje białka Scar/WAVE (Rys. 2a) za pośrednictwem białka IRSp53 [30], będącego substratem receptora insuliny albo przy udziale białka adaptorowego Nck, indukując dysocjację kompleksu białek PIR121, Nap125 i HSPC300, który inaktywuje białko WAVE [31]. Sugeruje się, że białka Scar/WAVE i kompleks Arp2/3 wiążą się do boków filamentów i tam formując zarodzie polimeryzacji, tworzą kolejne odgałęzienia filamentów [32].

Polimeryzację aktyny kontroluje również miozyna I przez wiązanie białek z rodziny WASp i kompleksu Arp2/3 [33]. U niższych Eukaryota (*Acanthamoeba castellanii* i *Dictyostelium discoideum*) miozyny I są regulowane przez fosforylację reszty serynowej lub treoninowej ciężkiego łańcucha w obrębie główki [34]. Jednym z regulatorów miozyn jest kluczowy efektor białek Cdc42 i Rac - serynowo/treoninowa kinaza PAK (ang. *p21-activated kinase*), która jest kinazą ciężkiego łańcucha amebowych izoform miozyny I [34]. Fosforyluje ona i aktywuje miozyny I. Wszystkie kinazy z rodziny PAK, podobnie jak inne białka aktywowane przez Rac i Cdc42 mają w pobliżu końca N motyw CRIB (ang. *Cdc42/Rac interactive binding*), znany również pod nazwą PBD oraz ewolucyjnie konserwatywną domenę katalityczną w rejonie końca C. Kinazy z rodziny PAK pełnią istotne funkcje w regulacji nie tylko procesów związanych z ruchliwością komórek, ale także morfogenezą, mitozą, angiogenezą czy przeżywaniem komórek [35]. Zidentyfikowane w komórkach *A. proteus* białko Rac [8] także zaangażowane jest w regulację procesu nukleacji. Blokada amebowego białka Rac powoduje zwolnienie tempa polimeryzacji aktyny [36].

Formowanie struktur cytoszkieletalnych (wiązek, sieci) polega na wiązaniu filamentów aktynowych przez białka sieciujące. Regulacja aktywności tych białek, a także regulacja ilości miejsc dostępnych dla polimeryzacji wpływają na geometrię cytoszkieletu i wyznaczają jego funkcje. Polimeryzacji aktyny towarzyszy stale jej depolimeryzacja od strony końca ostrego i zjawisko, polegające na przenoszeniu uwalnianych monomerów na koniec kolczasty przy błonie plazmatycznej. Za ten etap dynamicznych przemian w obrębie filamentu aktynowego odpowiedzialne jest małe białko - profilina występujące we wszystkich komórkach eukariotycznych [37]. Szybkość depolimeryzacji aktyny oraz ilość dostępnych końców kolczastych determinują tempo polimeryzacji aktyny, a tym samym efektywność tego procesu [38]. Widocznym tego efektem jest ekspansja krawędzi komórki.

Za depolimeryzację filamentów aktynowych odpowiedzialne są białka należące do rodziny ADF/kofilina (ang. *actin depolymerizing factor*). Białka te znaleziono we wszystkich badanych komórkach od pierwotniaków do ssaków. Wiążą się one preferencyjnie z monomerami aktyny, a także fragmentami filamentu związanymi z ADP, a więc zwiększają szybkość uwalniania monomerów od strony końca ostrego [37, 38, 39]. Depolimeryzacja aktyny jest kontrolowana zarówno przez białko Rac jak i Rho. Efekторы tych białek, odpowiednio - kinaza PAK i kinaza zależna od Rho, fosforylują serynowo/treoninową kinazę LIM, co zwiększa jej

zdolność do fosforylacji i inaktywacji kofiliny (Rys. 2a i 2b) [35, 40, 41, 42]. Fosforylacja przez kinazę LIM reszty serynowej w rejonie N-końca kofiliny blokuje wiązanie się tego białka z monomerami-ADP. Hamowana w ten sposób depolimeryzacja jest jednym z czynników czasowo stabilizujących struktury cytoszkieletalne: podbłonową sieć aktynową w lamellipodiach czy pseudopodiach lub włókna naprężeniowe w cytoplazmie niektórych komórek.

Dla progresji frontu niezbędny jest również brak aktywności kurczliwej cytoszkieletu przy krawędzi wiodącej. Takie warunki zapewnia lokalizacja miozyny II poza strefą frontalną migrującej komórki oraz negatywna regulacja miozyny przez białka Rac i Cdc42. Efektem tego szlaku sygnałowego jest kinaza PAK, która wpływa zarówno na stopień ufosforylowania lekkich łańcuchów miozyny zmniejszając jej aktywność, jak też fosforyluje ciężki łańcuch miozyny II w C-końcowym rejonie pałeczki (Rys. 2a), co powoduje dezorganizację filamentów miozynowych i obniżenie aktywności tego białka [1, 35]. W komórkach układu immunologicznego brak aktywności kurczliwej w rejonie frontu jest również skutkiem lokalnego hamowania aktywności białka Rho [43, 44].

Mechanizm migracji ameb oraz małych szybko przemieszczających się komórek tkankowych, takich jak keratynocyty czy leukocyty bazuje tylko na dynamice cytoszkieletu aktynowego. W polaryzacji i ekspansji niektórych komórek, np. *Dictyostelium*, czy fibroblastów biorą udział również mikrotubule. Ich ustawienie w szyku wyznaczającym polaryzację kontrolują białka z rodziny Rho. Zlokalizowane na krawędzi wiodącej białko IQGAP1, będące efektem Rac i Cdc42 wchodzi w interakcje z CLIP170, jednym ze składników kompleksu białek końca plus mikrotubul i lokalizuje skierowany ku peryferiom komórki koniec mikrotubuli [45]. Z drugiej strony czasowe interakcje końców plus mikrotubul z aktyną powodują ich wzrost w strefie frontalnej, co z kolei lokalnie aktywuje białko Rac, a więc pośrednio stymuluje polimeryzację aktyny i ekspansję komórki. Natomiast skracanie mikrotubul od strony końca minus, w rejonie jądra komórkowego, powoduje aktywację białka Rho [46]. Gradient dynamiki mikrotubul jest więc jednym z czynników uruchamiających lokalnie właściwe szlaki sygnałowe niezbędne dla polaryzacji i migracji komórki.

Wyniki niektórych badań wskazują, że energia polimeryzacji aktyny jest w stanie pokonać opór mechaniczny błony plazmatycznej i jest wystarczająca dla ekspansji krawędzi wiodącej [18, 38, 39]. Wiadomo jednak, że w wielu komórkach szybkość progresji czoła znacznie przewyższa tempo polimeryzacji aktyny. Wydaje się, że mechanizmy odpowiedzialne za wysuwanie frontu komórek migrujących tzw. ruchem ameboidalnym są różne i zależą od rodzaju komórki. W niektórych komórkach, np. u makrofagów [47], *D. discoideum* [48], czy u *A. proteus* [49] siła motoryczna dla ekspansji krawędzi komórki jest generowana podstawowo przez aktywność kurczliwą systemu aktomiozynowego poza frontem. Cykliczne osłabienia frontalnej ściany komórki przez odsunięcie sieci aktynowej od błony umożliwia jej przesunięcie ku przodowi przez napływającą endoplazmę. Zachodząca pomiędzy tymi cyklami polimeryzacja aktyny i odbudowywanie sieci pod błoną frontu wyznacza kieru-

nek migracji i stanowi znacznie wolniejszy etap progresji. Za ekspansję czola komórki czyni się również odpowiedzialnymi miozyny niekonwencjonalne, zlokalizowane w strefach frontalnych migrujących komórek, a mające zdolność wiązania filamentów aktynowych z błoną i przesuwania ich względem tej błony.

ADHEZJA

Wysuwana strefa frontalna komórek jest stabilizowana dzięki formowanym w tym rejonie strukturalnym adhezywnym, których budowa i funkcjonowanie zależne są od rodzaju podłoża i środowiska, w którym żyją komórki. Swobodnie żyjące komórki nie migrują po podłożu białkowym i nie mają specjalnych receptorów adhezywnych, jakimi są integryny. Struktury adhezywne tych komórek są bogate w F-aktynę, obecne są w nich białka wiążące i regulujące aktynę [50, 51]. Formowanie i dezorganizacja miejsc adhezji we wszystkich komórkach przemieszczających się ruchem ameboidalnym związane jest z reorganizacją cytoszkieletu aktynowego oraz aktywnością kurczliwą systemu aktomiozynowego, jednak mechanizmy kontrolujące adhezję i deadhezję w organizmach jednokomórkowych są słabo poznane.

Receptorami adhezywnymi biorącymi udział w migracji pełzających komórek ssaków są integryny pełniące również funkcje białek sygnałowych [52, 53, 54]. Regulują m.in. ekspresję genów, proliferację, wzrost komórek. Współdziałają z ogniwami szlaków sygnałowych włączanych zarówno przez aktywację receptorów dla czynników wzrostu czy insuliny, jak też receptorów związanych z heterotrimerycznymi białkami G. Integryny są, podobnie jak inne receptory biorące udział w adhezji, integralnymi proteoglikanami. Ich cząsteczki tworzą heterodimery α/β , które wiążą różne białka zewnątrzkomórkowej macierzy (kolagen, fibronektyna, laminina), zależnie od rodzaju podjednostki α i formują różne typy struktur adhezywnych, o czym decyduje podjednostka β [55]. Podjednostki $\beta 1$ np. biorą udział w adhezji wysuwanego frontu, podjednostki $\beta 2$ i $\beta 3$ formują bardziej stabilne struktury adhezywne, jakimi są kontakty ogniskowe (ang. *focal adhesions*) [43, 55].

Funkcjonalną jednostkę adhezywną stanowi wielo-białkowy kompleks, na który składają się: receptory adhezywne, białka zewnątrzkomórkowej macierzy oraz kompleks białek cytoplazmatycznych, w skład którego wchodzi białko regulatorowe i cytoszkieletalne, tworzące szlaki sygnałowe i regulujące funkcje cząsteczek adhezywnych. Wiele integryn jest stale aktywne i może związać się z ligandem, inne wymagają dla aktywacji sygnału wewnątrzkomórkowego. W aktywacji integryn biorą udział białka z rodziny Rho oraz kinaza 3 fosfatyloinozytoli [43].

Związanie liganda, którym może być cząsteczka adhezywna na powierzchni komórek śródbłonna albo białko zewnątrzkomórkowej macierzy, przez integryny $\beta 1$, biorące udział we wstępnej adhezji komórek rozpoczynających migrację stymuluje, niezbędną dla aktywacji, asocjacje białek Cdc42 i Rac oraz kinazy PAK z błoną i zmniejsza aktywność białka Rho [43]. Te warunki promują polimeryzację aktyny i ekspansję frontu (Rys. 2). Jednocześnie aktywne białka

Cdc42 i Rac indukują agregację cząsteczek integryn i formowanie u podstawy rosnących lamellipodiów tzw. kompleksów adhezywnych (ang. *focal complex*).

W regulacji aktywności białek Cdc42/Rac oraz kinazy PAK bierze udział kompleks białek związany z paksyliną – białkiem sygnałowym struktur adhezywnych [55]. Kompleks ten oprócz paksyliny tworzą białka adaptorowe p95PKL i Nck, białko GEF dla Cdc42/Rac – PIX oraz kinaza PAK. PKL działa jako adaptor pomiędzy paksyliną i białkiem PIX, Nck wiąże się z kinazą PAK [33]. Cały kompleks podtrzymuje aktywność białek Cdc42/Rac i kinazy PAK zapoczątkowującą rozplaszczanie komórek, wysuwanie lamellipodium i formowanie miejsc adhezji w strefie frontальной [56]. Hamowanie aktywności Rho zachodzi za pośrednictwem aktywowanej przez integryny kinazy c-Src, która fosforyluje i aktywuje białko przyspieszające hydrolizę GTP – p190RhoGAP [57].

Poza strefą frontálną w niektórych komórkach integryny $\beta 2$ i $\beta 3$ tworzą znacznie silniejsze i trwalsze miejsca kontaktu z podłożem zwane kontaktami ogniskowymi. Połączone są one z biegnącymi przez cytoplazmę wiązkami mikrofilamentów powiązanych krótkimi filamentami miozyny II. Skurcz tych struktur generuje izometryczne naprężenia w komórce i stąd ich nazwa włókna naprężeniowe. W naturalnym środowisku pojawiają się one w komórkach podczas cytokinezy oraz w komórkach biorących udział w zabliznianiu ran: fibroblastach i komórkach nabłonkowych. Są to komórki, które migrują bardzo wolno i dla których migracja nie jest warunkiem umożliwiającym wypełnianie wyznaczonych im funkcji. Komórki układu immunologicznego, które muszą szybko przemieszczać się do miejsc infekcji są ok. 10 razy słabiej zaadherowane, co umożliwia im ok. 30 razy szybsze przemieszczanie się. Kontakty ogniskowe wraz z włóknami naprężeniowymi występują także powszechnie w kulturach komórek. Warunki w hodowlach pod pewnymi względami są podobne do tych, jakie występują w miejscach gojenia się ran: płaskie i niedające się modelować podłożo oraz występujące w serum te same czynniki, które podczas zablizniania ran aktywują białko Rho. Kontroluje ono formowanie włókien naprężeniowych i związanych z nimi miejsc adhezji poprzez regulację polimeryzacji aktyny oraz aktywności miozyny II. W kompleksie białek formujących kontakty ogniskowe jest białko sygnałowe zyxyna, która wiąże jedno z białek GEF Rho (Vav) i podtrzymuje aktywność Rho [55].

Efektorem Rho regulującym polimeryzację aktyny jest p140mDia (Rys. 2b). Stymuluje polimeryzację aktyny bezpośrednio [58], albo pośrednio poprzez oddziaływanie z mikrotubulami [59] czy przez interakcję z profiliną [60], wiążącą monomery aktynowe i promującą polimeryzację. mDia jest istotnym czynnikiem regulującym ilość i strukturę włókien naprężeniowych. Formowanie włókien naprężeniowych i kontaktów ogniskowych jest związane również z aktywacją przez białko Rho kinazy 5 fosfatyloinozytoli [61, 62, 63], której produktem jest PIP₂, biorący udział w regulacji profiliny, zelsoliny, a także białek wiążących aktynę z błoną, niezbędnych dla formowania połączeń pomiędzy włóknami naprężeniowymi i kontaktami ogniskowymi.

Formowanie obu tych struktur wymaga również aktywności kurczliwej.

KONTROLA KURCZLIWOŚCI BAZUJE NA REGULACJI AKTYWNOŚCI MIOZYNY II.

Kluczowym regulatorem miozyny II szlaków sygnałowych związanych z białkiem Rho jest serynowo/treoninowa Rho-kinaza zwana również ROCK (Rys. 2b). Kinaza ta została odkryta i scharakteryzowana jako białko pośredniczące w indukowanym przez Rho formowaniu włókien naprężeniowych i kontaktów ogniskowych. Znane są dwie izoformy tego białka [42]: ROCK I (p160ROCK) i ROCK II (ROK α). Kinazy te wykazują specyficzność tkankową, a ich funkcje i lokalizacja w komórkach są różne. Włączone są w kontrolę wielu zjawisk związanych z ruchliwością komórek od skurczu mięśni gładkich po migrację. Domenę katalityczną stanowi N-terminalny koniec cząsteczki, na końcu C znajdują się: motyw wiążący Rho (ang. *RBD - Rho binding domain*) oraz domena homologiczna do plekstryny (PH) odpowiedzialna za lokalizację białka. Każda z domen końca C może niezależnie wiązać się z N końcem cząsteczki i blokować jej aktywność katalityczną. Interakcja białka Rho z domeną GBD uwalnia domenę katalityczną kinazy i przywraca jej aktywność [64, 65]. Kinazy Rho fosforylują liczne substraty (Rys. 2b), wśród których są: wiążąca miozynę podjednostka fosfatazy lekkich łańcuchów miozyny II (MLCP – ang. *myosin light chain phosphatase*) oraz lekkie łańcuchy miozyny (MLC – ang. *myosin light chain*), kinaza LIM, czy białka z rodziny ERM (ang. *ezrin-radixin-moesin*) i adducyna, wiążące filamenty aktynowe odpowiednio z białkami błony plazmatycznej czy cytoszkieletem podbłonowym [41].

Fosforylacja fosfatazy, powodująca hamowanie jej aktywności, jak też bezpośrednia fosforylacja łańcuchów regulatorowych miozyny II przez kinazy Rho pełnią ważną rolę w regulacji kurczliwości systemu aktomiozynowego. Wzrost stopnia ufosforylowania miozyny umożliwia jej interakcję z filamentami aktynowymi, co z kolei aktywuje ATPazę miozynową i indukuje skurcz (Rys. 2b). Kinaza Rho fosforyluje, w sposób niezależny od Ca²⁺, tę samą resztę serynową lekkich łańcuchów miozyny, co zależna od Ca²⁺ kinaza lekkich łańcuchów miozyny (MLCK – ang. *myosin light chain kinase*) [66]. Prawdopodobnie aktywacja obu rodzajów kinaz jest niezbędna dla formowania włókien naprężeniowych w migrujących komórkach [42].

Istotne znaczenie dla formowania włókien naprężeniowych ma również stabilizacja filamentów aktynowych, która jest osiągana w wyniku hamowania depolimeryzacji aktyny. Jak już wspomniano, ROCK fosforyluje i aktywuje kinazę LIM, która fosforyluje i inaktywuje kofilinę (Rys. 2b), białko przyspieszające odłączanie monomerów aktynowych od strony końca ostrego filamentów, a więc biorące udział w ich dezorganizacji.

Miejsca adhezji umożliwiają komórkom odbieranie informacji z zewnątrzkomórkowej macierzy. Mogą indukować polaryzację, zmiany morfologiczne podczas różnicowania, proliferację komórek. Jednak dopiero precyzyjnie regulowana dynamiczna reorganizacja miejsc adhezji umożliwia

komórce migrację. Podobnie jak ekspansję frontu białka z rodziny Rho kontrolują również dynamikę adhezji migrujących komórek, regulując reorganizację cytoszkieletu aktynowego i aktywność kurczliwą systemu aktomiozynowego.

DEADHEZJA I PRZEMIESZCZENIE SIĘ KOMÓRKI

Dezorganizacja miejsc adhezji i skurcz cytoszkieletu kortykalnego poza strefą frontalną migrujących komórek są niezbędne dla ich przemieszczenia się za wysuwającym frontem. W deadhezji komórek biorą udział różne procesy, polegające na rozrywaniu połączeń pomiędzy integrzynami i cytoszkieletem, m. in. proteoliza regulowana, fosforylacja integrzyn oraz zmiany regulowane przez białka z rodziny Rho. Efekty aktywacji i hamowania tych białek są różne i zależą od mechanizmu migracji i rodzaju komórki.

Zablokowanie szlaku sygnałowego Rho-ROCK, przez farmakologiczny inhibitor kinazy zależnej od Rho – Y-27632 w komórkach tkankowych powoduje obniżenie aktywności miozyny II. W silnie zaadherowanych i bardzo wolno migrujących komórkach, takich jak fibroblasty, czy komórki glejaka C6 prowadzi to do dezorganizacji włókien naprężeniowych i częściowo kontaktów ogniskowych, czego wynikiem jest zmiana kształtu komórki oraz deadhezja. Rozpad włókien naprężeniowych i zerwanie połączeń z podłożem może być również wynikiem negatywnej regulacji miozyny II (obniżenia jej aktywności) przez szlak sygnałowy Rac – kinaza PAK (Rys. 2b) [67]. Kinaza PAK fosforyluje kinazę lekkich łańcuchów miozyny, lecz ta fosforylacja redukuje aktywność tej kinazy, czego wynikiem jest zmniejszenie stopnia ufosforylowania lekkich łańcuchów miozyny [68].

W migrujących leukocytach natomiast dla oderwania uropodu od podłoża i przesunięcia ciała komórki za wysuwającym frontem niezbędna jest aktywacja szlaku Rho-ROCK, indukująca skurcz sieci aktomiozynowej i dezorganizację miejsc adhezji [69]. Zahamowanie białka Rho przez C3 transferazę, powodującą ADP-rybozylację tego białka, lub kinazy zależnej od Rho powoduje w tych komórkach akumulację integrzyn i uniemożliwia deadhezję. Aktywację białka Rho w uropodzie, powodują integrzyny β 2 [43], które formują agregaty adhezyjne w migrujących komórkach układu immunologicznego. Genetyczny defekt, polegający na zaburzeniu regulacji białek z rodziny Rho uniemożliwia migrację neuronów. Komórkom takim można przywrócić zdolność do normalnej migracji hamując szlak sygnałowy Rho-ROCK, albo C3 transferazą albo Y-27632. W takich warunkach zostaje przywrócona aktywność białek Rac i Cdc42, które promują polimeryzację aktyny i ekspansję frontu [70].

U *A. proteus* blokada szlaku sygnałowego Rho-ROCK, odwrotnie niż w komórkach tkankowych, powoduje wzrost aktywności amebowej izoformy miozyny II [71], która jest prawdopodobnie negatywnie regulowana przez fosforylację ciężkiego łańcucha, podobnie jak miozyna II u *Acanthamoeba castellanii* [72]. Konsekwencją blokady białka Rho lub kinazy Rho jest zahamowanie migracji na skutek silnego skurczu całego cytoszkieletu kortykalnego, a jednocześnie zbyt silnej adhezji. Kontrola aktywności białek z rodziny

Rho, jak też antagonizm pomiędzy szlakami Rac i Rho są więc odpowiedzialne za czasowo-przestrzenną regulację procesów determinujących kolejne etapy migracji, a co za tym idzie właściwą odpowiedź komórki na bodziec.

PIŚMIENICTWO

- Burridge K, Wennerberg K (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell* 116: 167-179
- Garcia-Ranea JA, Valencia A (1998) Distribution and functional diversification of the ras superfamily in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 434: 219-225
- Bush J, Franek K, Cardelli J (1993) Cloning and characterization of seven novel *Dictyostelium discoideum* rac-related genes belonging to the Rho family GTPases. *Gene* 136: 61-68
- Larochelle DA, Vithalani KK, de Lozanne A (1996) A novel member of Rho-family of small GTP-binding proteins is specifically required for cytokinesis. *J Cell Biol* 133: 1321-1330
- Lohia A, Samuelson J (1993) Molecular cloning of Rho family gene of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 58: 177-178
- Lohia A, Samuelson J (1996) Heterogeneity of *Entamoeba histolytica* Rac encoding p21^{rac} homologues. *Gene* 173: 205-209
- Rędownicz MJ, Korn ED (2000) Detection of Rho-family proteins in *Acanthamoeba castellanii*. *Acta Protozool* 39: 75-79
- Kłopocka W, Rędownicz MJ (2003) Effect of Rho family GTP-binding proteins on *Amoeba proteus*. *Protoplasma* 220: 163-172
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81: 153-208
- Fabczak H (2001) Rodzina białek Rho a cytoszkielet. *Kosmos* 50: 283-293
- Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629-635
- Ridley AJ, Hall A (1992) The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399
- Ridley AJ, Paterson HF, Lohston CL, Diekmann D, Hall A (1992) The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70: 401-410
- Schwartz M, Shattil S (2000) Signaling network linking integrins and Rho family GTPases. *Trends Biochem Sci* 25: 388-391
- Matozaki T, Nakanishi H, Takai Y (2000) Small G-protein networks: Their cross talk and signalling cascades. *Cell Signal* 12: 515-524
- Carlier M-F (1998) Control of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 10: 45-51
- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in non-muscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 545-576
- Strzelecka-Gólaszewska H (2001) Generacja ruchu przez polimeryzację aktyny. *Kosmos* 50: 411-425
- Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: 453-465
- Weeds A, Maciver S (1993) F-actin capping proteins. *Curr Opin Cell Biol* 5: 63-69
- Janmey PA, Stossel TP (1987) Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature* 325: 362-364
- Kwiatkowska K, Sobota A (1997) Rola wapnia w organizacji cytoszkieletu podbłonowego. *Kosmos* 46: 579-585
- Miki H, Sutsugu S, Takenawa T (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J* 17: 6932-6941
- Bear JE, Rawls JF, Saxe CL (1998) SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late *Dictyostelium* development. *J Cell Biol* 142: 1325-1335
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97: 221-231
- Yarar D, To W, Abo A, Welch MD (1999) The Wiscott-Aldrich Syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Curr Biol* 9: 555-558
- Machesky LM, Mullins RD, Higgs HN, Kaiser DA, Blanchoin L, May RC, Hall ME, Pollard TD (1999) Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3739-3744
- Machesky LM, Insall RH (1998) Scar1 and the related Wiscott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* 8: 1347-1356
- Higgs HN, Pollard TD (1999) Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASP/Scar protein. *J Biol Chem* 274: 32531-32534
- Miki H, Yamaguchi H, Suetsugu S, Takenawa T (2000) IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* 408: 732-735
- Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M, Kirschner MW (2002) Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418: 790-793
- Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching network of filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6181-6186
- Chung CY, Funamoto S, Firtel RA (2001) Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem Sci* 26: 557-566
- Brzeska H (2001) Przygoda z amebą: dziwaczne miozyny i kinaza. *Kosmos* 50: 223-232
- Bokoch GM (2003) Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* 72: 743-781
- Kłopocka W, Moraczewska J, Rędownicz MJ Characterization of Rac/PAK pathway in *Amoeba proteus*. *Protoplasma*, w druku
- Selden LA, Kinoshita HJ, Estes JE, Gershman LC (1999) Impact of profilin on actin-bound nucleotide exchange and actin polymerization dynamics. *Biochemistry* 38: 2769-2778
- Southwick FS (2000) Gelsolin and ADF/cofilin enhance the actin dynamics of motile cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6936-6938
- Borisy GG, Svitkina TM (2000) Actin machinery: pushing the envelope. *Current Opin Cell Biol* 12: 104-112
- Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Ohinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S (1999) Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285: 895-898
- Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nature Cell Biol* 1: 253-259
- Riento K, Ridley AJ (2003) ROCKs: Multifunctional kinases in cell behaviour. *Mol Cell Biol* 4: 446-456
- Worthylake RA, Burridge K (2001) Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr Opin Cell Biol* 13: 569-577
- Worthylake RA, Burridge K (2003) RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem* 278: 13578-13584
- Fukata M, Watanabe T, Noritake J, Nakagawa M, Yamaga M, Kuroda S, Matsuura Y, Iwamatsu A, Perez F, Kaibuchi K (2002) Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* 109: 873-885
- Small JV, Kaverina I (2003) Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* 15: 40-47
- Hartwig JH, Yin HL (1988) The organization and regulation of the macrophage actin skeleton. *Cell Motil Cytoskel* 10: 117-126

48. Yoshida K, Inouye K (2001) Myosin II-dependent cylindrical protrusion induced by guanine in Dictyostelium: antagonizing effects of actin polymerization at the leading edge. *J Cell Sci* 114: 2155-2165
49. Grębecki A (1990) Dynamic of the contractile system in the pseudopodial tips of normally locomoting amoebae, demonstrated in vivo by video-enhancement. *Protoplasma* 154: 98-111
50. Fukui Y, Inoue S (1997) Amoeboid movement anchored by eupodia, new actin-rich knobby feet in Dictyostelium. *Cell Motil Cytoskel* 36: 339-354
51. Grębecki A, Grębecka L, Wasik A (2001) Minipodia, the adhesive structures active in locomotion and endocytosis. *Acta Protozool* 40: 235-247
52. Schoenwaelder SM, Burridge K (1999) Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 11: 274-286
53. Schwartz MA, Shattil SJ (2000) Signaling networks linking integrins and Rho family GTPases. *Trends Biochem Sci* 25: 388-391
54. Schwartz MA (1992) Transmembrane signalling by integrins. *Trends Cell Biol* 2: 304-308
55. Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 463-519
56. Arthur WT, Burridge K (2001) RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol Biol Cell* 12: 2711-2720
57. Arthur WT, Petch LA, Burridge K (2000) Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol* 10: 719-722
58. Pruyne D, Bretscher A (2000) Polarization of cell growth in yeast I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci* 113: 365-375
59. Palazzo AF, Cock TA, Alberts AS, Gundersen GG (2001) mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nature Cell Biol* 3: 723-729
60. Watanabe N, Madaule P, Reidt T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, Saito Y, Nakao K, Jockusch BM, Narumiya S (1997) p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPases and is a ligand for profilin. *EMBO J* 16: 3044-3056
61. Glimore AP, Burridge K (1996) Molecular mechanisms for focal adhesion assembly through regulation of protein-protein interactions. *Structure* 4: 647-651
62. Oude Weernink PA, Schulte P, Guo Y, Wetzel J, Amano M, Kaibuchi K, Haverland S, Voss M, Schmidt M, Mayr GW, Jakobs KH (2000) Stimulation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase by Rho-kinase. *J Biol Chem* 275: 10168-10174
63. Shmitz AAP, Govek E-E, Bottner B, Van Aelst L (2000) Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res* 261: 1-12
64. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, Morii N, Narumiya S (1996) The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J* 15: 1885-1893
65. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K (1996) Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding Rho. *EMBO J* 15: 2208-2216
66. Katoh K, Kano Y, Amoano M, Onishi H, Kaibuchi K, Fujiwara K (2001) Rho-kinase-mediated contraction of isolated stress fibers. *J Cell Biol* 153: 569-583
67. Fukata M, Nakagawa M, Kuroda S, Kaibuchi K (1999) Cell adhesion and Rho small GTPases. *J Cell Sci* 112: 4491-4500
68. Sanders LC, Matsumura F, Bokoch GM, de Lanerolle P (1999) Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* 283: 2083-2085
69. Worthylake RA, Lemoine S, Watson JM, Burridge K (2001) RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol* 154: 147-160
70. Kholmanskikh SS, Dobrin JS, Wynshaw-Boris A, Letourneau PC, Ross ME (2003) Disregulated RhoGTPases and actin cytoskeleton contribute to the migration defect in Lis1-deficient neurons. *J Neurosci* 23: 8673-8681
71. Kłopocka W, Rędowicz MJ (2004) Rho/Rho-dependent kinase affects locomotion and actin-myosin II activity of Amoeba proteus. *Protoplasma* 224: 113-121
72. Rędowicz MJ (2001) Regulation of nonmuscle myosins by heavy chain phosphorylation. *J Muscle Res Cell Motil* 22: 163-173

The role of Rho family proteins in controlling the migration of crawling cells

Wanda Kłopocka[✉], Jolanta Barańska

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

✉ e-mail: w.klopocka@nencki.gov.pl

Key words: adhesion, Rho proteins, actin cytoskeleton, migration, polymerization

ABSTRACT

Migration of crawling cells (amoebae and some kinds of the tissue cells) is a process related to the dynamic reorganization of actomyosin cytoskeleton. That reorganization engages actin polymerization and depolymerization, branching of actin network and interaction of myosin II with actin filaments. All those cytoskeleton changes lead to the cell progression, contraction and shifting of the uropod and the cell adhesion. Numerous external stimuli, which activate various surface receptors and signal transduction pathways, can promote migration. Rho family proteins play an important role in the regulation of actin cytoskeleton organization. The most known members of this family are Rho, Rac and Cdc42 proteins, present in all mammalian tissue cells. These proteins control three different stages of cell migration: progression of the frontal edge, adhesion which stabilizes the frontal area, and deadhesion and shifting of the uropod. Cdc42 and Rac control cell polarization, lamellipodium formation and expansion, organization of focal complexes. Rho protein regulates contractile activity of actomyosin cytoskeleton outside the frontal area, and thus contraction and deadhesion of the uropod.

Znaczenie białka MDM2 w cyklu komórkowym

Janusz Szemraj

Elżbieta Rozpończyk[✉]

Jacek Bartkowiak

Janusz Greger

Katarzyna Oszejka

Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii, Uniwersytet Medyczny, Łódź

[✉]Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, pokój 129, 92-215 Łódź, e-mail: elroz2@interia.pl; tel. (42) 678-24-65 wew. 137 lub (42) 678-08-26 wew. 137

Artykuł otrzymano: 30 czerwca 2004

Artykuł zaakceptowano: 2 grudnia 2004

Słowa kluczowe: cykl komórkowy, MDM2, pRb, p53, p14^{ARF}, onkogeneza

Wykaz skrótów: CBP - (ang. *CREB-binding protein*) białko wiążące CREB (ang. *cAMP-response element binding protein* - białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP); MDM2 - (ang. *murine double minute gene*) onkogen kodujący białko MDM2; MTBP - (ang. *MDM two binding protein*) białko wiążące MDM2 zdolne do hamowania wzrostu i zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 niezależnie od p53; MyoD - czynnik transkrypcyjny istotny w różnicowaniu fibroblastów w komórki mięśniowe; Numb - regulator różnicowania komórek nerwowych; PCAF - (ang. *p300/CBP associated protein*) kompleks białka p300 (koaktywator transkrypcji) i CBP o aktywności acetylotransferazy histonowej, aktywujący transkrypcję genów, uczestniczących w różnicowaniu komórek, kontroli cyklu i apoptozie; TAFII70 - (ang. *TBP-associated factor II*) podjednostka podstawowego czynnika transkrypcyjnego TFIID będącego składnikiem kompleksu inicjującego transkrypcję z udziałem polimerazy RNAII; TBP - (ang. *TATA box-binding protein*) białko wiążące się z kasetą TATA; TSG101 - (ang. *tumor susceptibility gene*) - gen podatności na nowotwory produkujący białko TSG101, które jest inhibitorem degradacji MDM2; Twist - inhibitor różnicowania komórek nerwowych, mięśniowych, kości, hamuje aktywność acetylotransferazy histonowej p300 i PCAF.

STRESZCZENIE

U podstaw procesu onkogenezy leży zmiana mechanizmów kontrolujących cykl komórkowy, która prowadzi do zachwiania równowagi między proliferacją, a apoptozą. Białko MDM2 blokuje zdolność p53 do aktywacji genów związanych z naprawą lub apoptozą komórki, a także doprowadza do jego degradacji przez ubikwitynację. Hamuje również właściwości supresorowe białka pRb, poprzez uwolnienie czynnika transkrypcyjnego E2F1, który indukuje fazę S - syntezy DNA. MDM2 wpływa także na procesy różnicowania komórek mięśniowych i nerwowych. Ilość i stabilność polipeptydu MDM2 jest regulowana przez p73, p53, TSG101, p14^{ARF} i ścieżkę Ras-Raf-MEK-ERK. Zmiany poziomu białka MDM2 zaburzają kontrolę cyklu komórkowego, co może doprowadzić do onkogenezy.

WPROWADZENIE

Cykl komórkowy wymaga ścisłej kontroli. W kontroli tej uczestniczy wiele genów i produktów ich ekspresji uwikłanych w sieć wzajemnych połączeń. Ważną rolę odgrywa białko MDM2, które poprzez oddziaływanie z białkami p53, pRb, p14^{ARF}, E2F1 uczestniczy w szlakach proliferacji i apoptozy komórek [1-3]. Białko MDM2 jest głównym regulatorem białka p53. Wykazuje ono również niezależną od p53 funkcję, poprzez oddziaływanie z innymi białkami odgrywającymi ważną rolę biologiczną: Numb, TSG101, czynnikami transkrypcyjnymi TBP i Sp1 oraz rybosomalnym białkiem L5 [3].

ODDZIAŁYWANIE BIAŁEK MDM2 I p53

Gen p53 jest zlokalizowany w ramieniu krótkim chromosomu 17 człowieka (17p13.1). Białko p53 zawiera domenę trans-aktywującą (N-koniec), domenę wiążącą DNA, miejsca oddziaływań typu białko-białko i sygnał lokalizacji jądrowej (NLS- ang. *nuclear localization signal*) na końcu C łańcucha [4]. Reguluje ono dwa punkty kontrolne: przejście cyklu z fazy G1 do S i z fazy G2 do M. Kontroluje wejście w fazę syntezy DNA, poprzez opóźnienie tej fazy umożliwia reperację uszkodzonego DNA. Przez to zapobiega sytuacji, w której uszkodzony DNA uległby powieleniu i przekazaniu komórkom potomnym. Z kolei zatrzymanie cyklu w punkcie G2/M zapobiega utracie materiału genetycznego, do którego mogłoby dojść w czasie mitozy, jeżeli przedtem nastąpiłaby niekompletna replikacja. W przypadku zbyt dużych uszkodzeń białko p53 kieruje komórkę na tory apoptozy. W ten sposób przeciwdziała proliferacji komórek uszkodzonych [5]. p53 spełnia swoje zadanie poprzez funkcjonowanie jako czynnik transkrypcyjny, aktywujący ekspresję genów:

1. p21 - który zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G1 i G2 przez hamowanie kinaz zależnych od cyklin [6],
2. Bax - indukującego apoptozę [6],
3. GADD45 - (ang. *growth arrest DNA damage inducible*) uczestniczącego w blokowaniu komórek w fazie G1 i reperacji DNA [6],
4. Cykliny G [6].

Funkcja p53 może zostać zablokowana przez białko MDM2. Hamowanie p53 przez MDM2 odgrywa ważną rolę we wczesnych stadiach rozwoju. Homologiczna delecja genu *MDM2* jest letalna we wczesnej fazie embriogenezy [7].

Białko MDM2 człowieka zbudowane jest z 491 aminokwasów [3]. Jego N-koniec oddziałuje z domeną aktywowującą p53 i w ten sposób hamuje jego aktywność jako strażnika genomu [8,9]. MDM2 wiąże te same sekwencje aminokwasowe p53, poprzez które p53 oddziałuje z podjednostkami podstawowego czynnika transkrypcyjnego TFIID- (TAFII31 i TAFII70), inicjującego transkrypcję

[6]. To sugeruje, że MDM2 współzawodniczy z czynnikiem transkrypcyjnym TFIID w utworzeniu kompleksu z białkiem p53 i blokuje zdolność p53 do aktywacji transkrypcji [6].

C-końiec MDM2 jest ewolucyjnie konserwatywny i wykazuje aktywność ligazy ubikwytynującej białko supresorowe p53 [3]. Zatem MDM2 nie tylko hamuje zdolność p53 do aktywacji transkrypcji genów, związanych z naprawą DNA lub z apoptozą, ale także sprzyja jego proteolitycznej degradacji [1-3].

Polipeptyd MDM2 ma zdolność do przemieszczania się między jądrem a cytoplazmą komórki dzięki sekwencji NES (sygnał eksportu jądrowego), umożliwiającej opuszczenie jądra i sygnałowi lokalizacji jądrowej (NLS), pozwalającemu na wejście do jądra przez pory jądrowe. Migracja białka MDM2 do cytoplazmy komórki jest wymagana dla degradacji p53 w proteasomie 26S- wielocząsteczkowym kompleksie przekształcającym ubikwytynowane białka do oligopeptydów [6].

Transport białek zawierających sekwencje NES (w tym MDM2) z jądra do cytoplazmy, hamuje leptomycyna B (mykotoksyna), co może zwiększać poziom białka p53, poprzez hamowanie jego degradacji [10,11].

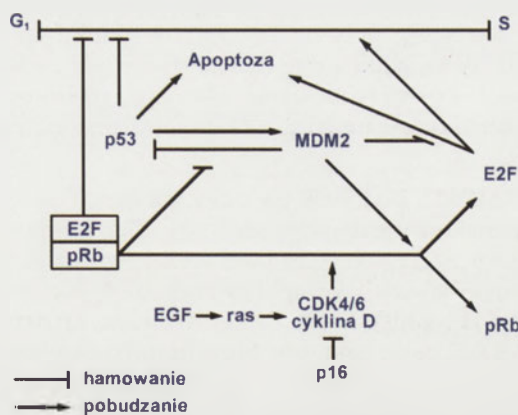
W komórkach nieuszkodzonych poziom p53 jest niski z powodu degradacji przez MDM2. W odpowiedzi na wiele typów uszkodzeń DNA poziom białka p53 podnosi się w wyniku:

1. blokowania tworzenia kompleksu MDM2-p53 (fosforylacja Ser¹⁵ i Ser³¹ białka p53 w miejscu wiążącym MDM2 umożliwia tworzenie tego kompleksu) [6].
2. zmniejszania ilości MDM2 (poprzez degradację białka MDM2 i spadek poziomu mRNA MDM2) [6].
3. zablokowania przemieszczenia MDM2 z jądra do cytoplazmy (poprzez aktywację p53, który reguluje prawdopodobnie transport MDM2) [11].

Fosforylacja p53 (Ser³⁹²) przez kinazę zależną od cyklin - H-CDK7 [6] i acetylacja p53 przez p300, aktywuje ten polipeptyd do wiązania ze specyficznymi sekwencjami DNA i inicjuje transkrypcję genów związanych z reperacją uszkodzeń, blokowaniem cyklu komórkowego, apoptozą oraz genu *MDM2* [3,6]. Zaobserwowano gromadzenie się białka MDM2 bezpośrednio po uszkodzeniu komórki [3]. Nie wiadomo jednak, czy jest to tylko wynikiem działania sprzężenia zwrotnego ujemnego, czy też białko p53 reguluje tworzenie określonej izoformy białka MDM2, która uczestniczy w naprawie komórki [3].

Reasumując: oddziaływanie między genem supresorowym *p53* a onkogenem *MDM2* ma postać sieci ujemnego sprzężenia zwrotnego (Rys. 1) [12]. Możliwe jest zablokowanie tworzenia kompleksu MDM2-p53 [6] oraz wywołanie apoptozy zależnej od p53 poprzez:

1. zastosowanie monoklonalnych przeciwciał anty-MDM2
2. fosforylację miejsc serynowych N-końca łańcucha p53



Rysunek 1. Kontrola fazy G1-S przez p53, pRb, E2F1 i MDM2. Czynniki wzrostu EGF aktywuje ścieżkę Ras-Raf-MEK-ERK, a ta aktywuje kompleks cykliny D-CDK4/6, który fosforyluje pRb. Kompleks D-CDK4/6 jest hamowany przez p16. Rys. zmodyfikowany na podstawie [3].

3. zmniejszenie poziomu MDM2 przez zastosowanie antysensownych konstruktów [6]

ZWIĄZEK MIĘDZY pRB, E2F1 I MDM2

MDM2 reguluje aktywność białka pRb i czynnika transkrypcyjnego E2F1 [13] (Rys. 1). Gen *Rb* został odkryty w siatkówczaku (retinoblastoma) w 1986 r. przez laboratorium Weinberga jako pierwszy gen supresorowy [14]. Zbudowany z 200 kbp gen *Rb* [4] koduje dużą rodzinę białek o masie cząsteczkowej od 105 do 130 kDa [3]. Produkt tego genu w formie hipofosforylowanej jest zdolny do hamowania transkrypcji genów zaangażowanych w replikację DNA. Hamuje przejście komórki z fazy G1 do S poprzez wiązanie się z rodziną czynników transkrypcyjnych E2F. Pod wpływem bodźców stymulujących, np. czynnika wzrostu, dochodzi do aktywacji kaskady kinaz białkowych ścieżki Ras-Raf-MEK-ERK [3]. To prowadzi do fosforylacji pRb przez kompleks cykliny D1-CDK4/6 (CDK-kinaza zależna od cyklin) w fazie G1 i uwolnienia czynnika transkrypcyjnego E2F1, który aktywuje geny ważne dla zainicjowania fazy S: reduktazy dihydrofolianowej, syntazy tymidylanowej, polimerazy DNA, reduktazy rybonukleotydowej [3,4].

Czynnik transkrypcyjny E2F należy do dużej rodziny białek oznaczonych od E2F1 do E2F6. *E2F1* może być uznany za gen supresorowy, ponieważ jego brak u myszy zwiększa liczbę nowotworów [3,15], co jest związane z indukowaniem przez niego apoptozy w komórkach z niepo-hamowanym wzrostem na drodze zależnej i niezależnej od p53. E2F1 może zatem uczestniczyć w procesie wzrostu komórek i w apoptozie.

Nadekspresja MDM2 zwiększa aktywność białka E2F1. Może to być spowodowane bezpośrednią stymulacją E2F1 przez MDM2 lub występowaniem przeszkód w wiązaniu E2F1 przez pRb. Polipeptyd MDM2, wiążąc się z pRb, hamuje jego zdolność do blokowania E2F1 [13].

Białko MDM2 w kompleksie z p53 zwiększa aktywność E2F1 poprzez degradację białka p53, które z kolei hamuje domenę aktywującą E2F1 i wiązanie E2F1 z DNA. Zaobser-

wowano, że w komórkach z nadekspresją MDM2 aktywacja E2F1 występuje przy równoczesnym spadku poziomu białka p21. W związku z tym można stwierdzić, że MDM2 aktywuje E2F1 przez hamowanie zależnej od p53 transkrypcji p21 (inhibitora kompleksu cdk-cykliny, fosforylującego pRb) [16].

Białko MDM2, podobnie jak duży antygen T wirusa 40 (T SV40), inaktywuje dwóch „stróżów” cyklu komórkowego p53 i pRb. Szczegółowe badania wykazały jednak istnienie znacznie bardziej skomplikowanej zależności między p53, pRb, E2F1 a MDM2 [3]. Zaobserwowano, że przy braku p53, MDM2 może hamować proapoptotyczny efekt E2F1 i jednocześnie stymulować syntezę DNA przy współpracy z E2F1. Zależy to od poziomu czynnika transkrypcyjnego E2F1. Białko MDM2 obniża ilość E2F1 do poziomu umożliwiającego przejście z fazy G1 do S [17]. Również antyapoptotyczna i promująca wzrost rola MDM2 może zależeć od czynnika E2F1, który z kolei może decydować o niezależnej od p53 onkogennej właściwości MDM2 [3].

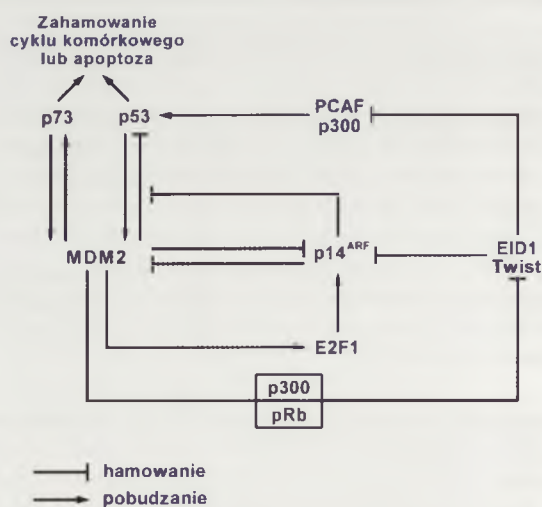
ODDZIAŁYWANIE p73 I MDM2

Pierwsze dane wskazujące na supresorowy charakter genu *p73* uzyskali Brown i wsp. [18]. Zaobserwowali oni zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 w komórkach NIH3T3 z nadekspresją MDM2, pozbawionych p53. To zwróciło uwagę na kontrolę cyklu przez inne geny. Białko *p73* wykazuje wysoki stopień podobieństwa do p53 [19,20], choć rzadko kodujący je gen ulega mutacji w nowotworach człowieka [3]. Brak genu *p73* u myszy wywołuje zaburzenia neurologiczne, hormonalne i odczyny zapalne [19]. Białko *p73*, podobnie jak p53, jest indukowane pod wpływem uszkodzeń DNA. Dochodzi wtedy do jego fosforylacji przez kinazę tyrozynową [20]. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA, przy braku p53, *p73* aktywowany przez E2F1 może indukować apoptozę [3,20]. Nadekspresja *p73* w komórkach nowotworowych z brakiem p53 prowadzi do zatrzymania proliferacji [3]. Interesujące, że MDM2 oddziałując z *p73* nie prowadzi do jego degradacji, ale stabilizuje i wzmacnia jego funkcje jako supresora wzrostu [3] (Rys. 2). Zahamowanie transkrypcyjnej aktywności *p73* przez MDM2 wymaga znacznie wyższego poziomu tego białka, w porównaniu z blokowaniem p53 [20]. Molekularny mechanizm chroniący *p73* przed degradacją nie jest znany. Gu i wsp. [21] określili sekwencje, które występują w p53, a brak ich w *p73*. Istotną przyczyną może być również niezdolność *p73* do przemieszczania się z jądra do cytoplazmy komórki w wyniku braku czynnych sekwencji sygnału eksportu jądrowego (NES). Białko *p73* w komórkach z ekspresją MDM2 kumuluje się w jądrze [21]. W komórkach pozbawionych p53, polipeptyd *p73* zwiększa ilość i stabilność białka MDM2 (Rys. 2), ale nie wiadomo, czy bezpośrednie oddziaływanie między *p73* a MDM2 odpowiedzialne są za stabilizację MDM2 [20]. Wang i wsp. [20] wykazali, że poziom p53 może być zmieniony przez współdziałanie z MDM2 i *p73*. Jest to prawdopodobnie spowodowane zwiększeniem proteolizy p53. Stwierdzono, że MDM2 ma większe powinowactwo do p53 niż do *p73*.

HAMOWANIE p14^{ARF} PRZEZ TWIST, MDM2, EID1 DROGĄ REGULACJI FUNKCJI p53

Gen *INK4A* koduje dwa białka. Eksony 1 α , 2 i 3 tego genu kodują białko p16 (specyficzny inhibitor kinaz CDK4/6 fosforylujących pRb), a eksony 1 β , 2 i 3 - białko p14^{ARF} (ang. *alternative reading frame*). Białko p14^{ARF} nie wykazuje homologii strukturalnej z p16, ale pełni podobną do niego funkcję - zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G1 lub G2 [1,22,23]. Białko p16 wpływa na cykl komórkowy zależnie od pRb w postaci hipofosforylowanej, a białko p14^{ARF} niezależnie od pRb. Stwierdzono, że mimo inaktywacji pRb przez onkoproteinę E7 brodawczaka (papilloma), p14^{ARF} reguluje cykl komórkowy [3]. Myszy pozbawione genu *p14^{ARF}* rozwijały się prawidłowo, wykazując predyspozycję do różnych typów nowotworów [3] częściej, niż gdy brakowało tylko *p53*, lub *p53* i *MDM2* [24]. Homologiczną delecję eksonu 1 β genu *INK4A*, kodującego p14^{ARF} znaleziono w glioblastoma i anaplastycznych astrocytach [25]. Gen *INK4A* jest aktywowany w odpowiedzi na onkogeny. Onkogen *Ras* aktywuje ekspresję p16 oraz p14^{ARF} i w ten sposób zatrzymuje cykl komórkowy. Inne onkogeny, jak *c-myc* (homologiczny z *v-myc* wirusa mieloblastozy ptaków), czynnik transkrypcyjny E2F1 i E1A (białko adenowirusa), aktywują ekspresję p14^{ARF}, ale nie p16 [26].

N-koniec białka p14^{ARF} wiąże się z MDM2 [3,25]. Kompleks p14^{ARF} z MDM2 w jądrze zapobiega oddziaływaniu MDM2 z p53, chroniąc w ten sposób p53 przed transportem z jądra do cytoplazmy komórki [23]. Białko p14^{ARF} hamuje także aktywność MDM2 jako ligazy ubikwitynowej w stosunku do p53, a tym samym zapobiega degradacji białka p53, zwiększa jego poziom i stabilność oraz aktywuje jego funkcję supresorową [3]. MDM2 zaś hamuje zdolność p14^{ARF} do zatrzymania cyklu komórkowego (Rys. 2). Polipeptyd MDM2, wg Webera i wsp. [24], jest negatywnym regulatorem p14^{ARF}, podobnie jak Twist, należący do rodziny czynników transkrypcyjnych zawierających motyw helisa-



Rysunek 2. Schemat współdziałania p14 i MDM2. MDM2, Twist i EID1 są negatywnymi regulatorami p14^{ARF}. MDM2 przy współdziałaniu p300 i pRb degraduje Twist i EID1 w procesie ubikwitynacji. EID1 i Twist hamują aktywność acetyltransferazy histonowej p300 i PCAF, która odgrywa ważną rolę w procesie acetylacji p53. Rys. zmodyfikowany na podstawie [3,24,26-29].

pętla - helisa HLH (ang. *helix-loop-helix*) [27]. Twist blokuje zatrzymanie cyklu komórkowego zależne od p53 poprzez hamowanie aktywacji genów uczestniczących w replacji uszkodzonego DNA, np. p21, a także jest inhibitorem zależnej od p53 apoptozy komórek. Wpływ tego białka na cykl komórkowy może wynikać ze zmniejszenia poziomu p14^{ARF}, chroniącego p53 przed degradacją [27]. Komórki, w których Twist ulega ekspresji, zachowywały się podobnie jak komórki z brakującym eksonem 1β genu *INK4A*, kodującego p14^{ARF} - były odporne na zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptozę zależną od p53 [27].

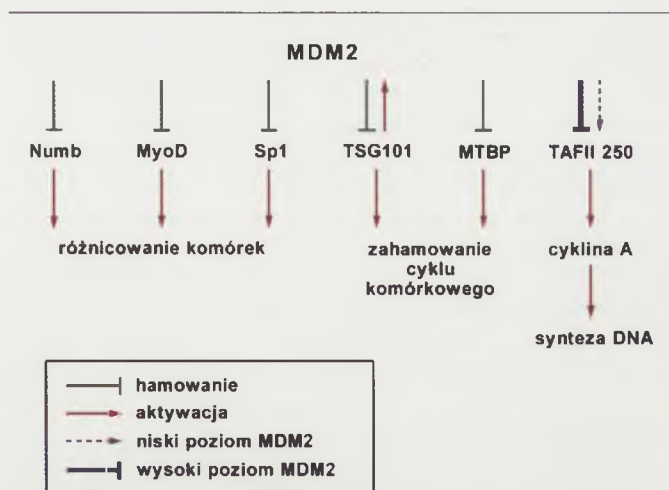
Jak dotąd nie ma bezpośrednich dowodów na to, że obniżenie poziomu p14^{ARF} jest wystarczające do zmiany aktywności p53 [27], ponieważ może być ona zmieniona poprzez oddziaływanie z kofaktorami p300, CBP (ang. *CREB-binding protein*) i P/CAF (ang. *p300/CBP associated protein*). Są to białka o aktywności acetylotransferazy, mające zdolność do acetylowania histonów i czynników transkrypcyjnych [3,28]. Białko Twist hamuje aktywność acetylotransferazy p300 i P/CAF [3,28]. Wiąże się ono z domenami HAT (acetylotransferazy histonowej), p300 i P/CAF. HAT zawiera 4 motywy oznaczone od A do D [28]. Motywy A i B obejmują miejsca wiązania acetylo-CoA. Czynniki transkrypcyjne Twist blokuje prawdopodobnie wiązanie acetylo-CoA do motywu A i B. Wykazano również, że HAT, p300 i P/CAF zawierają unikatowy motyw E [28]. Prawdopodobnie Twist wiążąc się do motywu E, hamuje p300 i P/CAF i w ten sposób blokuje różnicowanie mięśni, kości i komórek nerwowych [28].

Inhibitorem różnicowania jest również białko EID1 (ang. *E1A-like inhibitor of differentiation*), które podobnie jak Twist przejawia zdolność do hamowania aktywności acetylotransferazy kofaktora p300 [29]. Białko EID1 blokuje zależne od pRb różnicowanie, ale nie wpływa na zatrzymanie cyklu zależne od pRb. Białka pRb i p300 odgrywają ważną rolę w procesie degradacji EID1 na drodze ubikwitynacji. Do C-końca EID1 wiążą się białka p300 i pRb, które mają zdolność oddziaływania z ligazą ubikwitynową MDM2 [29]. Miejsca wiążące p300 i pRb na MDM2 zostały scharakteryzowane przez Browna i wsp. [18] jako domeny ID1 i ID2.

Podsumowując: ubikwitynacja białka EID1 jest związana z MDM2, ale zachodzi przy współudziale p300 i pRb. EID1 może hamować transkrypcję p14^{ARF} podobnie jak Twist. Usunięcie EID1 na drodze ubikwitynacji prawdopodobnie aktywuje p14^{ARF} [3].

ODDZIAŁYWANIE MDM2 Z INNYMI BIAŁKAMI

Białko MDM2 oddziałuje *in vivo* i *in vitro* niezależnie od p53 z białkami: Numb, TSG101, MTBP, TBP, Sp1 i L5 (Rys. 3). Polipeptyd MDM2 za pomocą N-końca łączy się z białkiem Numb o masie cząsteczkowej 65 kDa, związanym z błoną cytoplazmatyczną. Jest to regulator różnicowania, który odgrywa ważną rolę w procesie rozwoju układu nerwowego [30]. Gen *Numb* zlokalizowany jest w rejonie 14q24.3, który jest związany z chorobą Alzheimera [30]. Uszkodzenie tego rejonu może być przyczyną rozwoju chorób neurodegeneracyjnych.



Rysunek 3. Wpływ MDM2 na procesy różnicowania i cykl komórkowy, niezależnie od p53. Rys. zmodyfikowany na podstawie [3,30-34].

Białko MDM2 degraduje Numb, a przez to hamuje różnicowanie komórek [30]. Ponadto MDM2 uczestniczy również w degradacji innego białka - TSG101, kodowanego przez gen supresorowy *tsg101* [31]. Gen ten znajduje się na chromosomie 11 (p11p15.2-p15). Jego brak u myszy zwiększa podatność na rozwój nowotworów. Polipeptyd TSG101 (o masie cząsteczkowej 42.8 kDa) odgrywa bardzo ważną rolę w utrzymaniu stabilności genomu i w regulacji cyklu komórkowego. Przeciwdziała ubikwitynacji MDM2, podnosi jego poziom, stabilność i przedłuża okres półtrwania do 28 minut (okres połowicznego rozpadu prawidłowego białka MDM2 wynosi około 15-20 minut). TSG101 doprowadza do nagromadzenia MDM2 - negatywnego regulatora p53, a białko MDM2 na zasadzie sprzężenia zwrotnego zmniejsza poziom TSG101 poprzez zwiększenie jego degradacji [31].

Polipeptydem zdolnym do hamowania wzrostu i zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 niezależnie od p53 jest MTBP (ang. *MDM two binding protein*). Jest to białko o masie cząsteczkowej 104 kDa, kodowane przez gen *Mtbp* zlokalizowany na chromosomie 8 (8q24.1-q24.2). Gen ten ulega ekspresji w różnych tkankach, wykazując najwyższy poziom w grasicy, jądrach i jajnikach. Białko MDM2, tworząc kompleks z MTBP, hamuje jego funkcję jako supresora wzrostu [3]. Należy podkreślić, że miejsca wiązania tego supresora do MDM2 nie są specyficzne, ponieważ w tym samym obszarze (167-304) mogą przyłączyć się inne białka supresorowe: pRb i p19, podstawowe czynniki transkrypcyjne TFII lub koaktywatory transkrypcji p300 [32]. MTBP może współzawodniczyć z tymi białkami o wiązanie się z MDM2. W miejscu wiązania się MTBP do MDM2 znajdują się sekwencje NLS i NES, co może wpływać na lokalizację i funkcję tego supresora [32].

Ponadto MDM2 oddziałuje *in vivo* i *in vitro* z:

1. podjednostką czynnika transkrypcyjnego TFII wiążącą się z kasetą TATA- TBP (ang. *TATA-binding protein*), która odgrywa ważną rolę w inicjacji transkrypcji i funkcjonowaniu polimerazy RNA [3].

2. podjednostką czynnika transkrypcyjnego TFII współdziałającą z TBP - TAFII250 (ang. *TBP-associated factor*). TAFII250 jest wymagany do transkrypcji cykliny A [33]. Oddziaływanie MDM2-TAFII250 prowadzi do aktywacji promotora cykliny A, natomiast delecja miejsc wiążących TAFII250 na MDM2 znosi tę aktywację. Niski poziom białka MDM2 aktywuje promotor cykliny A poprzez usunięcie represorów jej transkrypcji, natomiast wysoki - wywołuje efekt przeciwny. MDM2 poprzez regulację promotora cykliny A (cyklina ta jest odpowiedzialna za przejście komórki z fazy G1 do S i z S do G2 i ulega ona degradacji w końcu fazy G2 [33]) oraz oddziaływanie z E2F1 wpływa na proces replikacji DNA [3]. p53 hamuje ekspresję cykliny A, ale MDM2 hamuje p53, a aktywuje promotor cykliny A [33].

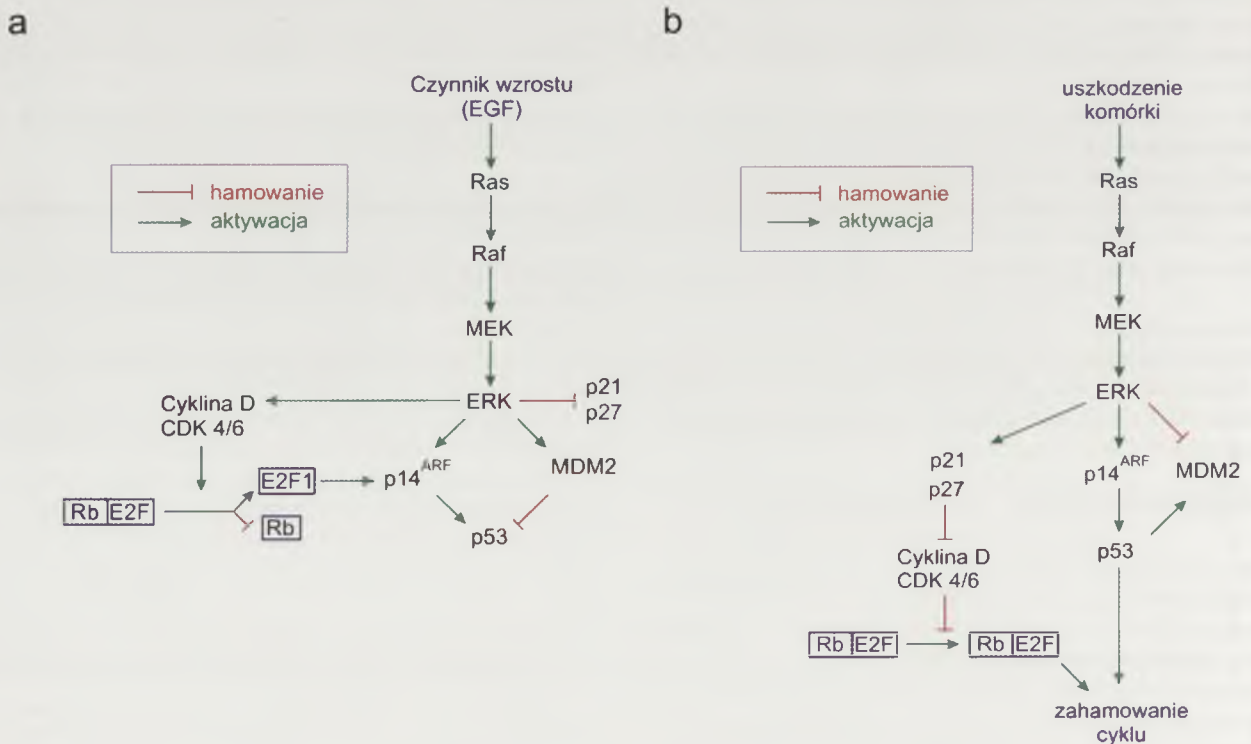
MDM2 bezpośrednio wiąże czynnik transkrypcyjny Sp1 (ang. *specificity protein 1*) i w ten sposób hamuje jego zdolność do wiązania się z DNA. pRb uwalnia Sp1 z kompleksu Sp1-MDM2 i przywraca jego zdolność do wiązania z DNA. Ten mechanizm jest ważny dla końcowego procesu różnicowania [34] (Rys. 3). Polipeptyd MDM2 może tworzyć kompleksy z białkiem rybosomalnym L5 i podjednostką 5S rRNA [3]. Jednak rola MDM2 w regulacji biosyntezy białek nie jest znana. Białko L5 ma zdolność przemieszczania się między jądrem a cytoplazmą i może odgrywać rolę w transporcie MDM2 między tymi przedziałami komórki. Białko MDM2 oddziałuje z RNA, ale fizjologiczne znaczenie tych interakcji nie zostało jeszcze wyjaśnione [3]

MDM2 poprzez oddziaływanie z tymi białkami przeciwdziała mechanizmom kontroli wzrostu, uczestniczy w procesie rozwoju i różnicowania komórek.

MDM2 A ŚCIEŻKA Ras-Raf-MEK-ERK

Gen *MDM2* jest regulowany przez ścieżkę Ras-Raf-MEK-ERK, niezależnie od p53 [35]. Przenoszenie sygnałów na tej ścieżce jest aktywowane przez czynniki wzrostu oraz hormony i uczestniczy w proliferacji komórki [36]. Schemat transdukcji sygnałów na ścieżce Ras-Raf-MEK-ERK można przedstawić na przykładzie naskórkowego czynnika wzrostu EGF (ang. *epidermal growth factor*). Przyłączenie EGF do zewnątrzkomórkowej domeny receptora EGF wywołuje dimeryzację cząsteczek receptorowych i zmiany konformacyjne domeny wewnątrzkomórkowej receptora, co prowadzi do autofosforylacji jego reszt tyrozynowych. Do fosfotyrozynowych miejsc receptora EGF przyłączają się białka adaptorowe. Białka te rozpoznają zaktwowaną formę receptorowej kinazy tyrozynowej, dzięki obecności domen SH2 (Src Homology 2 - domeny homologiczne z domeną 2 kinazy Src - wirusa mięsaka Rousa - ang. *sarcoma*), wiążących się z ufosforylowanymi tyrozynami w pobliżu karboksylowego końca aktywnego receptora.

Białkami adaptorowymi są Grb (ang. *growth factor, receptor binding protein*), SOS (ang. *Son of sevenless*) i Ras. Białka Ras są pokrewne z białkami G. Należą do nadrodziny małych białek GTP-azowych. Są one aktywowane po związaniu GTP, a nieaktywne po związaniu się z GDP (z uwagi na



Rysunek 4. Rola ścieżki Ras-Raf-MEK-ERK w regulacji cyklu komórkowego. a) Proliferacja komórki. Ścieżka Ras-Raf-MEK-ERK aktywuje p14^{ARF}, MDM2 i kompleks cykliny D-CDK4/6, a hamuje inhibitory kinaz zależnych od cyklin p21, p27, p16. Poziom p53 jest niski, ponieważ jest zachowana równowaga między degradacją p53 przez MDM2 a stabilizacją przez p14^{ARF}. Białko pRb jest ufosforylowane, a uwolniony czynnik E2F1 może aktywować p14^{ARF}. Rys. zmodyfikowany na podstawie [39]. b) Uszkodzenie komórki. Ścieżka Ras-Raf-MEK-ERK jest hiperaktywna, aktywuje inhibitory kinaz zależnych od cyklin p21, p27, p16. Dzięki temu zablokowana jest fosforylacja pRb (nieaktywna CDK4/6) i białko to jest zdolne do zahamowania cyklu. Białko p53 jest stabilizowane przez p14^{ARF}, ale nie jest degradowane przez MDM2. W ten sposób p53 jest również zdolne do zahamowania cyklu komórkowego. Rys. zmodyfikowany na podstawie [39].

to, że same hydrolizują GTP, następuje ich szybka autoinhibicja [37]. Przyłączenie się kompleksu Grb2-SOS do miejsc fosfotyrozynowych receptora EGF stymuluje przemianę GDP w GTP, co powoduje zmiany konformacyjne w białku Ras. Umożliwia to związanie się z kinazą Raf-1 z dużym powinowactwem, rekrutując ją z cytosolu do błony komórkowej, gdzie ma miejsce wieloetapowy proces aktywacji Raf-1. Proces ten obejmuje defosforylację miejsc inhibitorowych przez fosfatazy białkowe 2A (PP2A-ang. *protein phosphatase 2A*) oraz fosforylację miejsc aktywnych przez kinazy: PAK (ang. *p21-activated kinase*, kinaza aktywująca białko p21), kinazy tyrozynowe z rodziny Src oraz nierozpoznane dotąd inne kinazy [38]. Zaktywowana kinaza Raf-1 oddziałuje z MEK i fosforyluje jej dwie reszty serynowe. Następnie zaktywowane białko MEK fosforyluje, a tym samym aktywuje, kinazę ERK (ang. *extracellular regulated kinases*) [36,38]. Kaskadowy proces fosforylacji doprowadza do aktywacji kolejnych etapów pobudzania i przekazywania sygnałów do jądra komórkowego. ERK może aktywować czynniki transkrypcyjne regulujące produkty białkowe onkogenów: c-fos, c-jun, c-myc, MDM2 i białko p14^{ARF} [37,39].

Ścieżka Ras-Raf-MEK-ERK reguluje ekspresję genu MDM2 i w rezultacie podnosi poziom białka MDM2. Pod wpływem sygnału mitogennego dochodzi do aktywacji nie tylko MDM2, ale i p14^{ARF} (Rys. 4a). Oba te białka mają wpływ na poziom p53. MDM2 degraduje p53, a p14^{ARF} - będąc inhibitorem MDM2 - zapobiega tej degradacji. Poziom p53 jest zatem zależny od równowagi między aktywacją p14^{ARF} a MDM2 przez Ras-Raf-MEK-ERK. W komórkach dzielących się poziom p53 jest niski. Zachowana jest równowaga między degradacją p53 a jego stabilizacją [39]. W komórkach spoczynkowych ścieżka Ras-Raf-MEK-ERK jest nieaktywna. ERK nie aktywuje kompleksu cykliny D/Cdk4/6 i nie dochodzi do fosforylacji pRb. Poziom białka p53 jest niski ze względu na degradację p53 przez MDM2 [39]. W przypadku uszkodzenia komórki ścieżka Ras-Raf-MEK-ERK jest hiperaktywna (Rys. 4b) i aktywuje inhibitory cyklino-zależnych kinaz: p21, p27, p16. W ten sposób utrzymuje białko pRb w formie hipofosforylowanej, zdolnej do blokowania cyklu komórkowego. Również aktywne i stabilne białko p53 prowadzi do naprawy komórki lub apoptozy. Stabilizacja p53 jest zapewniona dzięki indukcji p14^{ARF} przez kinazę ERK. W przypadku utraty p14^{ARF} dochodzi do zmian poziomu p53. Wówczas MDM2 jest aktywowane przez ERK i doprowadza do degradacji p53 [39].

Podsumowując, aktywacja ścieżki przenoszenia sygnałów Ras-Raf-MEK-ERK odgrywa ważną rolę w onkogenezie, ponieważ ma wpływ na poziom i aktywność białek: p53, pRb, p14^{ARF}, MDM2, które odgrywają kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego [38,39].

UDZIAŁ MDM2 W ONKOGENEZIE

Białko MDM2 odgrywa istotną rolę w kontroli cyklu komórkowego poprzez oddziaływanie z p53, pRb, E2F1, p73, p14^{ARF}. W związku z tym zmiana poziomu tego białka może doprowadzić do onkogenezy. Nadekspresję MDM2 zaobserwowano w ostrych białaczkach, przewlekłej białaczce szpikowej, chłoniakach i szpiczakach [40]. Nadmiar MDM2 z jednej strony nasila aktywację E2F1, który ułatwia przej-

ście z fazy G1 do S, a z drugiej zwiększa degradację białka p53, hamując jego funkcję supresorową (aktywację genów zaangażowanych w proces naprawy komórki lub apoptozę), co przyczynia się do intensywnego wzrostu i zwiększa przeżycie komórek nowotworowych [40]. W liniach białaczkowych nie tylko dochodzi do zwiększenia ilości białka MDM2, ale i jego trwałości, co może doprowadzić do zachwiania równowagi i niekontrolowanego wzrostu zmienionych komórek. U podstaw tego zjawiska leży zmieniona degradacja białka MDM2 w proteasomie [41].

Ampifikację genu MDM2 i zmiany ścieżki p14^{ARF}/p53/MDM2 znaleziono w glejakach (glioma, glioblastoma), mięśniakach mózgu i gwiaździakach anaplastycznych [42]. W mięśniakach kości [43], raku wątrobowo-komórkowym, obok amplifikacji genu MDM2, występują punktowe mutacje i insercje, które pociągają za sobą zmiany transkrypcji, a tym samym doprowadzają do powstania białka o innych właściwościach, a nawet do zatrzymania jego syntezy [44]. Na tej podstawie można stwierdzić, że nie tylko nadekspresja, ale również brak białka MDM2 może mieć wpływ na proces onkogenezy.

W białaczkach [45], raku piersi [46], mięśniakomięsaku prążkowokomórkowym (agresywnym nowotworze tkanek miękkich) [47] znaleziono różnej długości mRNA MDM2 i potwierdzono obecność białek o różnej masie, które mogą mieć odmienne funkcje biologiczne oraz zmienioną zdolność blokowania p53. Występowanie zmian w transkrypcji oraz w translacji genu MDM2 u pacjentów z białaczkami, chłoniakami, szpiczakami, nowotworami mózgu i mięśniakami, związane jest ze złym rokowaniem, skróceniem czasu przeżycia oraz opornością na chemioterapię [40,42]. Kondo i wsp. [48] zaobserwowali, że białko MDM2 indukuje ekspresję genu MDR1 (oporności wielolekowej), co prowadzi do zwiększenia ilości jego produktu- glikoproteiny P w linii komórek glioblastoma U87-MG. Leczenie antysensowymi konstruktami MDM2 hamuje produkcję glikoproteiny P, co podkreśla rolę MDM2 w rozwoju oporności wielolekowej.

Białko MDM2 może być również wskaźnikiem oceny stopnia złośliwości nowotworów. Blokuje ono bowiem czynnik transkrypcyjny MyoD, a tym samym przyczynia się do powstania niezróżnicowanych form mięśniakomięsaka prążkowokomórkowego opornego na leczenie [49].

PODSUMOWANIE

MDM2 uczestniczy w kontroli cyklu komórkowego i w różnicowaniu komórek nerwowych i mięśniowych. Zmiany poziomu białka MDM2 mogą przyczynić się do zachwiania równowagi cyklu komórkowego i ucieczki spod mechanizmów kontrolujących, co może doprowadzić do nowotworzenia. W związku z tym celem dalszych badań powinno być sprawdzenie skuteczności antysensowych oligonukleotydów blokujących syntezę MDM2 oraz poznanie mechanizmów regulujących MDM2, a w szczególności hamujących jego zdolność do indukcji fazy S.

Należy sobie postawić pytanie, dlaczego p53 - strażnik genomu - nie hamuje białka MDM2, a nawet zwiększa jego poziom po uszkodzeniu komórki. Być może białko MDM2

ma dualistyczną naturę: uczestniczy w naprawie komórki oraz w indukcji cyklu komórkowego, ponieważ występuje w wielu odmianach, różniących się od siebie właściwościami. Dlatego dalszy kierunek badań powinien zmierzać do zbadania różnych izoform tego białka. Białko MDM2 ma zdolność hamowania p53, ale także wykazuje niezależną od p53 funkcję: indukuje syntezę DNA poprzez aktywację E2F1, cykliny A i degradację supresorów MTBP, TSG101. Należy również zbadać, czy istnieją drogi przeciwdziałające ekspansji MDM2 i dlaczego komórki z nich nie korzystają oraz poznać czynniki doprowadzające do amplifikacji czy nadekspresji bez zwielokrotniania kopii genu *MDM2*. Przedmiotem dalszych badań powinno być szczegółowe poznanie regulacji tego genu na poziomie mRNA i określenie właściwości odmian tego białka.

PIŚMIENNICTWO

- Grzelakowska-Sztabert B (2000) Apoptoza i nowotwory. Postępy Biologii Komórki 15: 9-43
- Czajkowski R, Drewa T, Olszewska D, Woźniak A (2000) Zaburzenia kontroli fazy G1 cyklu komórkowego podczas onkogenezy. Post Biochem 46: 309-317
- Daujat S, Neel H, Piette J (2001) MDM2: life without p53. Trends Genet 17: 459-464
- Franks LM, Teich NM (1999) Introduction to the molecular biology of cancer. Oncogenes and cancer. Imperial Cancer Research Fund London, Oxford University press, London, str. 169-201
- Dębiec-Rychter M, Liberski PP (1998) Wybrane zagadnienia etiopatogenezy nowotworów W: Berner J, Liberski PP, Plużańska A, Woźniak L (red) Zarys onkologii. Wydawnictwo Akademii Medycznej w Łodzi, Łódź, str.21-22
- Freedman D A, Levine AJ (1999) Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein--thirty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. Cancer Res 59: 1-7
- Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A (1995) Rescue of embryonic lethality in *Mdm2*-deficient mice by absence of p53. Nature 378: 206 - 208
- Chen J, Marechal V, Levine AJ (1993) Mapping of the p53 and *mdm-2* interaction domains. Mol Cell Biol 13: 4107-4114
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992) The *mdm-2* oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. Cell 69: 1237-1245
- Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, Yanagida M, Nishida E (1997) RM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. Nature 390: 308-311
- Freedman DA, Levine AJ (1998) Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. Mol Cell Biol 18: 7288-7293
- Barak Y, Gottlieb E, Juven-Gershon T, Oren M (1994) Regulation of *mdm2* expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. Genes Dev 8:1739-1749
- Xiao ZX, Chen J, Levine AJ, Modjtahedi N, Xing J, Sellers WR, Livingston DM (1995) Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. Nature 375: 694-698
- Weinberg RA (1989) The Rb gene and the negative regulation of cell growth. Blood 74: 529-532
- Field SJ, Tsai FY, Kuo F, Zubiaga AM, Kaelin WG, Livingston DM, Orkin SH (1996) E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. Cell 85: 549-561
- Wunderlich M, Berberich SJ (2002) Mdm2 inhibition of p53 induces E2F1 transactivation via p21. Oncogene 21: 4414-4421
- Loughran O, La Thangue NB (2000) Apoptotic and growth-promoting activity of E2F modulated by MDM2. Mol Cell Biol 20: 2186-2197
- Brown DR, Thomas CA, Deb SP (1998) The human oncoprotein MDM2 arrests the cell cycle: elimination of its cell-cycle-inhibitory function induces tumorigenesis. EMBO J 17: 2513-2525
- Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F, Caput D (2000) p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. Nature 404: 99-103
- Wang XQ, Ongkeko WM, Lau AW, Leung KM, Poon RY (2001) A possible role of p73 on the modulation of p53 level through MDM2. Cancer Res 61:1598-1603
- Gu J, Nie L, Kawai H, Yuan ZM (2001) Subcellular distribution of p53 and p73 are differentially regulated by MDM2. Cancer Res 61: 6703-6707
- Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ (1995) Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. Cell 83: 993-1000
- Sherr CJ, Weber JD (2000) The ARF/p53 pathway. Curr Opin Genet Dev 10: 94-99
- Weber JD, Jeffers JR, Rehg JE, Randle DH, Loano G, Roussel MF, Sherr CJ, Zambetti GP (2000) p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. Genes Dev 14: 2358-2365
- Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP (2001) Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. Cancer Res 60: 417-424
- Serrano M (2000) The INK4a/ARF locus in murine tumorigenesis. Carcinogenesis 21: 865-869
- Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, Kedes L, Doglioni C, Beach DH, Hannon GJ (1999) twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. Genes Dev 13: 2207-2217
- Hamamori Y, Sartorelli V, Ogryzko V, Puri PL, Wu HY, Wang JY, Nakatani Y, Kedes L (1999) Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein. Cell 96: 405-413
- Miyake S, Sellers WR, Safran M, Li X, Zhao W, Grossman SR, Gan J, DeCaprio JA, Adams PD, Kaelin GW (2000) Cells degrade a novel inhibitor of differentiation with E1A-like properties upon exiting the cell cycle. Mol Cell Biol 20: 8889-8902
- Juven-Gershon T, Shifman O, Unger T, Elkeles A, Haupt Y, Oren M (1998) The Mdm2 oncoprotein interacts with the cell fate regulator Numb. Mol Cell Biol 18: 3974-3982
- Li L, Liao J, Ruland J, Mak T W, Cohen SN (2001) A TSG101/MDM2 regulatory loop modulates MDM2 degradation and MDM2/p53 feedback control. Proc Natl Acad Sci USA 98: 1619-1624
- Boyd MT, Vlatkovic N, Haines DS (2000) A novel cellular protein (MTBP) binds to MDM2 and induces a G1 arrest that is suppressed by MDM2. J Biol Chem 275: 31883-31890
- Leveillard T, Wasyluk B (1997) The MDM2 C-terminal region binds to TAFII250 and is required for MDM2 regulation of the cyclin A promoter. J Biol Chem 272: 30651-30661
- Johnson - Pais T, Degrain C, Thayer MJ (2001) pRB induces Sp1 activity by relieving inhibition mediated by MDM2. Proc Natl Acad Sci USA 98: 2211-2216
- Ries S, Biederer C, Woods D, Shifman O, Shirasawa S, Sasazuki T, McMahon M, Oren M, McCormick F (2000) Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of *mdm2* and induction of p19ARF. Cell 103: 321-330
- Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF (2001) Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. Recent Prog Horm Res 56: 127-155
- Różalski M (2000) Alternatywne losy komórek W: Wierzbicki R (red) Wybrane zagadnienia z biologii molekularnej. Wydawnictwo Akademii Medycznej w Łodzi, Łódź, str. 66-74
- Kolch W (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. Biochem J 351: 289-305

39. Kolch W, Kotwaliwale A, Vass K, Janosch P (2002) The role of Raf kinases in malignant transformation. *Expert Rev Mol Med* 25: 1-18
40. Teoh G, Urashima M, Ogata A, Chauhan D, DeCaprio JA, Treon SP, Schlossman RL, Anderson KC (1997) MDM2 protein overexpression promotes proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Blood* 90:1982-1992
41. Pan Y, Haines DS (1999) The pathway regulating MDM2 protein degradation can be altered in human leukemic cells. *Cancer Res* 59: 2064-2067
42. Korshunov A, Golanov A, Sycheva R (2002) Immunohistochemical markers for prognosis of cerebral glioblastomas. *J Neurooncol* 58: 217-236
43. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B (1992) Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358: 80-83
44. Schlott T, Reimer S, Jahns A, Ohlenbusch A, Ruschenburg I, Nagel H, Droese M (1997) Point mutations and nucleotide insertions in the MDM2 zinc finger structure of human tumours. *J Pathol* 182: 54-61
45. Bueso-Ramos CE, Manshouri T, Haidar MA, Huh YO, Keating MJ, Albitar M (1995) Multiple patterns of MDM-2 deregulation in human leukemias: implications in leukemogenesis and prognosis. *Leuk Lymphoma* 17: 13-18
46. Gudas JM, Nguyen H, Klein RC, Katayose D, Seth P, Cowan KH (1995) Differential expression of multiple MDM2 messenger RNAs and proteins in normal and tumorigenic breast epithelial cells. *Clinic Cancer Res* 1: 71-80
47. Bartel F, Taylor AC, Taubert H, Harris LC (2000) Novel mdm2 splice variants identified in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines. *Oncol Res* 12: 451-457
48. Kondo S, Kondo Y, Hara H, Kaakaji R, Peterson JW, Morimura T, Takeuchi J, Barnett GH (1996) mdm2 gene mediates the expression of mdr1 gene and P-glycoprotein in a human glioblastoma cell line. *Br J Cancer* 74: 1263-1268
49. Fiddler TA, Smith L, Tapscott SJ, Thayer MJ (1996) Amplification of MDM2 inhibits MyoD-mediated myogenesis. *Mol Cell Biol* 16: 5048-5055

Significance of MDM2 protein in the cell cycle

Janusz Szemraj, Elżbieta Rozpończyk[✉], Jacek Bartkowiak, Janusz Greger, Katarzyna Oszajca

Department of Biochemistry, Institute of Physiology and Biochemistry, Medical University of Lodz, 6/8 Mazowiecka St., 92-215 Lodz, Poland
[✉]e-mail: elroz2@interia.pl

Key words: cell cycle, MDM2, p53, pRb, p14^{ARF}, oncogenesis

ABSTRACT

The basis of oncogenesis underlies the modification of the control of the cell cycle, which leads to disturb balance between proliferation and apoptosis. The MDM2 protein suppresses the ability of p53 to activate genes responsible for repairing or apoptosis, but also promotes p53 degradation by ubiquitination. MDM2 inhibits tumor suppressor property of pRb, by releasing E2F1, which stimulates DNA synthesis in S-phase. MDM2 influences on the neuronal and muscle differentiation. Quantity and stability of the MDM2 protein is regulated by p73, p53, TSG101, p14^{ARF} and Ras-Raf-MEK-ERK pathway. Changes of the level of the MDM2 can disturb control of cell cycle and contribute to oncogenesis.

Edyta Brzóska

Iwona Grabowska

Zakład Cytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Zakład Cytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, e-mail: edbrzoska@biol.uw.edu.pl, tel. (22) 554 22 03

Artykuł otrzymano 13 września 2004

Artykuł zaakceptowano 25 października 2004

Słowa kluczowe: syndekey, proteoglikan, różnicowanie, adhezja, płytka przylegania, cytoszkielet

Wykaz skrótów: ADAM – metaloproteazy transbłonowe posiadające domenę dezintegrynową (ang. *A disintegrin and metalloproteinases*); CBD – domena wiążąca komórkę (ang. *cell binding domain*); ECM – macierz międzykomórkowa (ang. *extracellular matrix*); FGF – czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor*); HGF – czynnik wzrostu hepatocytu (ang. *hepatocyte growth factor*); MMP – serynowo/cysteinowe metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *matrix metalloproteinases*); PIP₂ – 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu; PKC – kinaza białkowa C (ang. *protein kinase C*); VEGF – czynnik wzrostu komórek nabolka naczyń (ang. *vascular endothelial growth factor*).

Podziękowania: Panu prof. dr hab. Jerzemu Moraczewskiemu dziękujemy za opiekę i cenne uwagi podczas pisania tej pracy. Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego KBN 6P04C02016.

STRESZCZENIE

Syndekey (45-20 kDa) to rodzina proteoglikanów błonowych. Zbudowane są z krótkiej domeny cytoplazmatycznej, domeny błonowej i domeny kontaktującej się ze środowiskiem zewnętrznym, która posiada związane kowalencyjnie łańcuchy glikozaminoglikanu siarczanu heparanu i łańcuchy glikozaminoglikanu siarczanu chondroityny. Syndekey mają zdolność wiązania licznych ligandów obecnych w macierzy zewnątrzkomórkowej: czynników wzrostu, enzymów, białek macierzy zewnątrzkomórkowej (fibronektyna, laminina), a także wirusów i toksyn. Za pośrednictwem domeny cytoplazmatycznej syndekey łączą się z białkami cytoszkieletu oraz białkami biorącymi udział w przekazywaniu sygnału. Syndekey obok integryn są głównymi receptorami w tworzeniu połączeń komórka – macierz zewnątrzkomórkowa. Zmiany w ich ekspresji wpływają na adhezję oraz migrację komórek, organizację płytek przylegania i cytoszkieletu. Syndekey są zaangażowane w procesy różnicowania komórek i regeneracji tkanek.

WPROWADZENIE

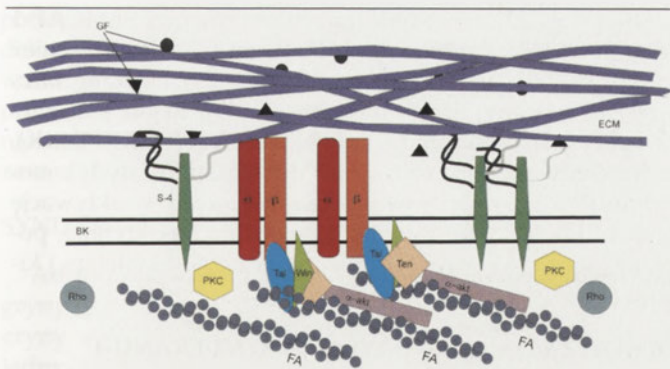
Syndekey (45-20kDa) stanowią rodzinę transbłonowych proteoglikanów siarczanu heparanu typu 1 [1-7]. Zbudowane są z krótkiej domeny cytoplazmatycznej, domeny błonowej oraz domeny zewnątrzkomórkowej, z którą związane są kowalencyjnie łańcuchy glikozaminoglikanu siarczanu heparanu lub glikozaminoglikanu siarczanu chondroityny. Obecność łańcuchów glikozaminoglikanu siarczanu heparanu warunkuje szereg funkcji syndekey w komórce. Wiązą one liczne ligandy obecne w macierzy zewnątrzkomórkowej: czynniki wzrostu, enzymy, białka macierzy zewnątrzkomórkowej, wirusy, toksyny, a także bakterie. Syndekey biorą udział w procesach adhezji komórkowej, przekazywaniu sygnału oraz regulacji metabolizmu lipidów poprzez wiązanie lipoprotein [8]. U ssaków znane są cztery syndekey, natomiast u *Drosophila melanogaster* i *Cenorhabditis elegans* jeden [9]. Syndekey 1-3 są specyficzne dla niektórych tkanek, natomiast syndekey-4 jest syntetyzowany w większości z nich [10]. Syndekey-1 występuje w komórkach nabolka. Syndekey-2 obecny jest w komórkach mezenchymy, jest on również syntetyzowany w komórkach międzybłoniaka człowieka (nowotwór opłucnej i otrzewnej) [11]. Zarówno syndekey-1 jak i -3 ulega ekspresji w tkance nerwowej [12].

W adhezję i migrację komórek zaangażowany jest przede wszystkim syndekey-4 [13-15]. Występuje on obok integryn na terenie płytek przylegania – miejsc adhezji komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) (Rys. 1) [16,17].

Z badań przeprowadzonych na myszach z uszkodzonym genem syndekey-4 wynika, iż zwierzęta takie rozwijają się i rozmnażają prawidłowo [18]. Pojawiają się jednak u nich pewne zaburzenia w rozwoju naczyń krwionośnych łożyska oraz nerek. Zaobserwowano również nieprawidłowości w gojeniu się ran i angiogenezie [19,20].

BUDOWA SYNDEKANÓW

Wszystkie syndekey to integralne białka błonowe, z N-końcem (ektodomeną) zawierającym miejsce wiązania dla od 3 do 5 łańcuchów glikozaminoglikanu siarczanu heparanu i siarczanu chondroityny (Rys. 2). Syndekey mają pojedynczą hydrofobową domenę transbłonową i krótką C-końcową domenę cytoplazmatyczną. Geny, kodujące poszczególne syndekey, znajdują się na różnych chromosomach, ale wykazują bardzo podobną organizację, co sugeruje, że powstały one przez duplikację genu prekursora [21]. Łańcuchy glikozaminoglikanu siarczanu heparanu mają zdolność wiązania licznych ligandów obecnych w macierzy zewnątrzkomórkowej. Natomiast rdzeń białkowy syndekey odpowiedzialny jest za zjawiska związane z adhezją komórek, łączenie



Rysunek 1. Schemat budowy płytki przylegania. Płytki przylegania stanowią region w obrębie błony komórkowej (BK), gdzie cytoszkielet oddziałuje z macierzą pozakomórkową (ECM). W skład płytek przylegania wchodzi: integryny (zbudowane z podjednostek α i β - kolor czerwony i pomarańczowy), syndekany-4 (S-4), filamenty aktynowe (FA), liczne białka stanowiące łącznik pomiędzy cytoszkieletem a błoną komórkową: talina (TA), winkulina (Win), α -aktynina (α -akt), tensyna (Ten) oraz cały szereg białek regulatorowych, które przez fosforylację, defosforylację i proteolizę regulują strukturę, funkcję i dynamikę płytek przylegania. Ze względu na przejrzystość ryciny nie pokazano bezpośrednich powiązań białek cytoszkieletu z syndekaniem-4. GF- czynniki wzrostu.

się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, receptorami błonowymi oraz oddziaływanie z innymi komórkami. Domena cytoplazmatyczna białka wiąże się między innymi z białkami cytoszkieletu (aktyną, α -aktyniną) i białkami zaangażowanymi w przekazywanie sygnału (β -kateninami, CASK (wapniowo/kalmodulino zależna białkowa kinaza serynowa), białkiem cytoszkieletu 4.1) [12].

DOMENA ZEWNĄTRZKOMÓRKOWA

Poszczególne syndekany bardzo różnią się budową domeny zewnątrzkomórkowej. Łańcuchy glikozaminoglikanu siarczanu heparanu są przyłączane do białka podczas obróbki post-translacyjnej poprzez region łączący: ksyloza

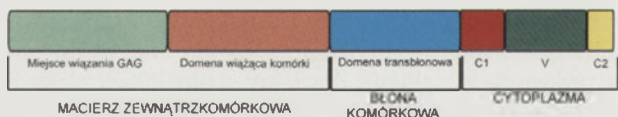
- galaktoza - galaktoza - kwas glukuronowy, przy udziale enzymów: ksylozylotransferazy, galaktozylotransferazy I i II [22,23]. Łańcuchy glikozaminoglikanu siarczanu heparanu wiążą się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej: domeną HepII fibronektyny, lamininą, witronektyną i kolagenem, a także z licznymi czynnikiem wzrostu i ich receptorami, inhibitorami proteaz, enzymami i toksynami (Tab. 1) [24,25]. Liczne wirusy, bakterie i pasożyty (*Herpes Simplex Virus*, *Neisseria gonorrhoea*, *Bordetella pertussis*, *Plasmodium falciparum*) wykorzystują łańcuchy siarczanu heparanu jako miejsca przyczepu [8,26]. Wykazano na przykład, iż wiązanie *Neisseria gonorrhoeae* do syndekanu-1 lub -4 indukuje dalsze sygnały umożliwiające wejście bakterii do komórek gospodarza [8].

Łańcuchy glikozaminoglikanu siarczanu heparanu syndekanu-4 mogą również wiązać się z bogatą w reszty cysteinowe domeną transbłonowej metaloproteazy ADAM12 [25,27]. Adhezja komórek do podłoża zsintetyzowanego z bogatych w reszty cysteinowe fragmentów ADAM12, prowadzi do aktywacji PKC α oraz białka Rho i jest regulowana przez sygnał pochodzący zarówno od syndekanu-4, jak i od podjednostki β 1 integryny [28]. Mc Fall i Rapraeger wykazali, że część białkowa domeny zewnątrzkomórkowej syndekanu-4 może oddziaływać z innymi białkami [29]. Zawiera ona region CBD (ang. *cell binding domain*), który prawdopodobnie oddziałuje z innymi receptorami błonowymi [15].

Domeny zewnątrzkomórkowe syndekanu-1 i -4 mogą być proteolitycznie odcinane tuż przy błonie komórkowej przez metaloproteazy wrażliwe na TIMP-3 (tkankowy inhibitor metaloproteaz - 3) [30,31]. Traktowanie komórek inhibitorami metaloproteaz powoduje zahamowanie odcinania tych domen. Proces ich proteolizy jest regulowa-

Tabela 1. Niektóre białka wiążące się z łańcuchami siarczanu heparanu syndekanów wg Tumova i wsp. [90]

Ligand białkowy		Działanie
czynniki wzrostu i cytokiny	FGF-2	dimeryzacja, ochrona przed degradacją i stymulacja interakcji z receptorem kinazy tyrozynowej
	FGF-1	
	HGF	wiązanie czynników wzrostu
	interferon γ	dimeryzacja i modulowanie procesów proteolitycznych
	interleukina-8	ochrona przed degradacją, wiązanie chemokin i zapobieganie dyfuzji
białka wirusów	glikoproteina C	wiązanie HSV (ang. <i>herpes simplex virus</i>) do komórki gospodarza
	lipaza lipoproteinowa	stabilizacja dimerów LPL, unieruchamianie, internalizacja, transport
enzymy	lipaza lipoproteinowa	stabilizacja dimerów LPL, unieruchamianie, internalizacja, transport
inhibitory proteaz	antytrombina III	zmiany konformacyjne inhibitora proteaz, zwiększenie aktywności antytrombiny
białka ECM	laminina	adhezja do ECM
	fibronektyna	adhezja, formowanie płytek przylegania



Rysunek 2. Schemat budowy syndekanu-4. Domena zewnątrzkomórkowa – kolor zielony i pomarańczowy, domena błonowa – kolor niebieski, domena cytoplazmatyczna – kolor czerwony, zielony, żółty.

ny i może być indukowany przez szereg różnych czynników np. aktywatory: PKC, kinaz tyrozynowych i kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (MAP) [8]. Odcinanie domen zewnątrzkomórkowych jest bardzo istotne z dwóch powodów. Po pierwsze, syndekania poprzez swoje łańcuchy siarczanu heparanu łączą się z licznymi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, odcięcie domen zewnątrzkomórkowych uniemożliwia tworzenie tych wiązań i ułatwia migrację komórek. Po drugie, uwolnione domeny zewnątrzkomórkowe wiążą czynniki wzrostu, proteazy i inhibitory proteaz obecne w macierzy zewnątrzkomórkowej [32,33]. Przykładowo z powierzchni ludzkich komórek białaczkowych JN3 i RPMI8226 odcinane są domeny syndekanu-1. Zjawisko to jest stymulowane przez aktywatory PKC, nie jest natomiast hamowane przez inhibitory, związanych z macierzą zewnątrzkomórkową, serynowo/cysteinowych metaloproteaz. Ponieważ jedynie inhibitor BB-94 istotnie hamuje proteolizę domen syndekanu-1, prawdopodobnie odbywa się ona przy udziale metaloproteaz transbłonowych posiadających domenę dezintegrynową ADAM [34].

DOMENA TRANSBŁONOWA

W obrębie domeny błonowej znajduje się zachowana w ewolucji sekwencja aminokwasów, która jest odpowiedzialna za oligomeryzację syndekanu oraz za oddziaływanie z innymi białkami i lokalizację syndekanu w płytkach przylegania [14].

DOMENA CYTOPLAZMATYCZNA

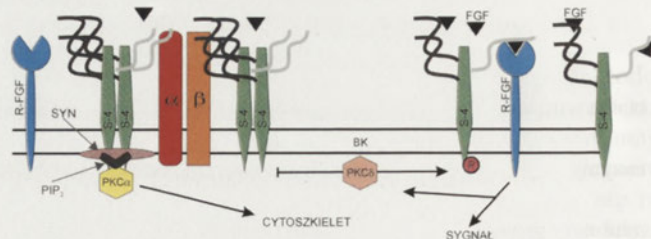
Domena cytoplazmatyczna zawiera dwa rejonu identyczne we wszystkich sydekanach, proksymalny C1 i C-końcowy rejon C2, rozdzielone przez rejon V o zmiennej dla poszczególnych typów sydekanów długości i sekwencji aminokwasowej. Pierwszy z rejonów - C1, zawiera obszar 10 zachowanych w ewolucji aminokwasów (RM(R/K)KKDGE₂SY). Domena C1 może wiązać białko 4.1 (za pośrednictwem białka CASK [36-37]), ezrynę, radyksynę, moezynę (należące do grupy białek związanych z elementami cytoszkieletu - ERM (ang. *Ezrin Radixin Moesin proteins*) oraz syndesmos [38]. Syndesmos oddziałuje z domeną C1 i V syndekanu-4 i razem z nim występuje w płytkach przylegania. Nadekspresja syndesmosu w fibroblastach mysich 3T3 powoduje, iż komórki lepiej przyczepiają się do podłoża, tworzą liczniejsze włókna aktynowe i są rozciągnięte na większej powierzchni [38]. Domena C1 syndekanu-3 może również wiązać kinazę Src i białko kortaktynę, która oddziałuje z podbłonowymi mikrofilamentami aktynowymi i mikrotubulami [8]. Rejon C2 domeny cytoplazmatycznej może poprzez sekwencje EFYA wiązać białka zawierające domeny PDZ typu II [39]. Do takich białek należy: syntenina [40],

CASK [37,41,42], synektyna (nazywana również SEMCAP-1 lub GIPC) [43], synbindyna [44]. Rejon C2 wiąże również białka: PSD-95 (ang. *post-synaptic density 95*), Dlg (ang. *discs large*), ZO-1 (ang. *zonula occludens-1*) [45]. Rejon V zawiera specyficzną sekwencję aminokwasową (LGKKPIYKK), która wiąże aktywną PKC α i 4,5-difosforan fosfatydyloinozylitolu (PIP₂). Syndekan-4 jest zaangażowany w aktywację białka Rho, łączy się również z paksyliną i α -aktyniną, poprzez które może tworzyć połączenia z cytoszkieletem i kinazą płytek przylegania FAK [36].

DIMERYZACJA I FOSFORYLACJA SYNDEKANU-4

Współwystępowanie syndekanu-4 z integrynami w obrębie płytek przylegania jest zależne od aktywacji PKC α i PKC δ [12,46] (Rys. 3). W domenie cytoplazmatycznej syndekanu-4, w rejonie V znajdują się dwie pary lizyny, pomiędzy którymi zlokalizowana jest sekwencja: prolina-izoleucyna-tyrozyna. W tym regionie przyłączany jest PIP₂, a następnie PKC α [35, 47-49]. Wiązanie PIP₂ umożliwia najpierw dimeryzację, a potem tworzenie oligomerów syndekanu-4 w błonie komórkowej. Obecność PIP₂ stabilizuje oligomery [50]. Do dimerów syndekanu-4 wiązana jest PKC α , w obrębie sekwencji LGKKPIYKK [51]. PKC α łączy się z sydekanem-4 poprzez swoją domenę katalityczną, natomiast PIP₂ wiąże domenę regulatorową kinazy [47]. Aktywacja kinazy na tej drodze jest niezależna od poziomu Ca²⁺, co jest przypadkiem szczególnym dla rodziny cPKC (ang. *conventional PKC*), do której należy PKC α . Wszelkie mutacje w obrębie domeny V syndekanu-4 zakłócają tworzenie dimerów i przyłączanie oraz aktywację PKC α [35]. Natomiast traktowanie komórek aktywatorami PKC indukuje transport syndekanu-4 do błony komórkowej i powstawanie licznych płytek przylegania [24]. Tworzące się dimery syndekanu-4 wiążą syndesmos oraz pozostałe białka kompleksu: synteninę, synbindynę, białka cytoszkieletu i inne [12].

Horowitz i Simons wykazali, że w komórkach 3T3 oligomery domeny cytoplazmatycznej syndekanu-4 są wymagane do aktywacji PKC α [52,53]. Pokazali, że fosforylacja reszt serynowych domeny C2 przez kinazę PKC δ (występująca przy braku stymulacji czynnikami wzrostu), blokuje zdolność domeny cytoplazmatycznej do oligomeryzacji i powoduje brak aktywacji PKC α . Fosforylacja syndekanu-4 przez PKC δ na Ser¹⁸³ uniemożliwia wiązanie PIP₂, w wyniku czego nie są tworzone dimery syndekanu-4, a PKC α nie jest przyłączana i aktywowana [52-54]. Fosforylacja syndekanu-4 następuje po dodaniu FGF-2 do komórek, który prawdo-



Rysunek 3. Proces dimeryzacji syndekanu-4 (S-4). Syndekan-4 w płytkach przylegania występuje obok integryn (kolor czerwony i pomarańczowy) i jest wiązany z PKC α i PIP₂. Fosforylacja syndekanu-4 przez PKC δ uniemożliwia tworzenie jego dimerów. Ufosforylowany syndekan-4 działa jako receptor czynników wzrostu. R-FGF – receptor FGF, SYN – syndesmos.

podobnie wiąże się z łańcuchami siarczanu heparanu syndekanu-4 i poprzez swój receptor aktywuje PKC δ . Traktowanie komórek czynnikiem wzrostu fibroblastów (FGF-2) prowadzi do wzrostu zdolności komórek do migracji, ponieważ komórki nie tworzą połączeń syndekan-4-macierz zewnątrzkomórkowa [55].

SYNDEKAN-4 - UDZIAŁ W ADHEZJI KOMÓRKOWEJ

Adhezja komórkowa jest zapoczątkowana przez integryny, ale również zależna jest od syndekanu-4 [56]. Integryny wiążą się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Jednym z takich białek jest fibronektyna, z którą integryny wiążą się poprzez jej fragment RGD, znajdujący się w obrębie domeny CBD (ang. *cell binding domain*). Syndekan-4 także łączy się z licznymi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Wiązanie syndekanu-4 z fibronektyną zachodzi przez jej domenę HepII (ang. Heparin binding domain II) [57]. Wykazano, iż komórki mięśni gładkich aorty szczura (RASMCs, ang. *rat aortic smooth muscle cells*) przyczepiają się do podłoża zbudowanego z fragmentów fibronektyny pierwszego typu poprzez integrynę $\alpha 5\beta 1$ i syndekany, i jest to związane z aktywacją kinazy ERK1/2 [58].

Fibroblasty wysiane na podłoże pokryte fragmentami fibronektyny, zawierającymi domenę CBD, przyczepiają się do podłoża, chociaż nie formują typowych płytek przylegania i nie rozciągają się na podłożu. Tworzenie właściwych płytek przylegania i aktywnych włókien naprężeniowych jest stymulowane przez aktywację białka Rho (traktowanie kwasem lizofosfatydowym, LPA) lub aktywację PKC estrami forbolu lub reakcją komórek z przeciwciałami przeciwko domenie zewnątrzkomórkowej syndekanu-4. Wytworzenie typowych płytek przylegania zależne jest od syndekanu-4, który indukuje fosforylację tyrozyny 397 i aktywację kinazy płytek przylegania (FAK), na drodze zależnej od białka Rho [59,60]. Wytworzenie połączeń z macierzą zewnątrzkomórkową jest niezwykle istotnym zjawiskiem. Przykładowo komórki REF (ang. *rat embryo fibroblasts*) mają zdolność do przyczepiania się do fragmentów CBD fibronektyny przez integryny, nie tworząc połączeń, w których bierze udział syndekan-4. Jednak po 8h komórki REF odczepiają się od podłoża i włączany jest program apoptozy, związany ze spadkiem aktywności/stabilności kinazy tyrozynowej pp125FAK [61].

Fibroblasty myszy z uszkodzonym genem syndekanu-4 wykazują mniejszą zdolność do migracji i adhezji. Komórki takie przyczepiają się do podłoża zbudowanego z fragmentów fibronektyny zawierających region HepII, ale nie tworzą płytek przylegania, ani nie reorganizują cytoszkieletu [57]. Zdolne są jednak do adhezji przy udziale integryn, do całego białka fibronektyny.

Nadekspresja syndekanu-4 prowadzi do zmian w organizacji płytek przylegania oraz zdolności komórek do migracji. Transfekcja komórek CHO-K1 (ang. *Chinese hamster ovary*) cDNA kodującym całą cząsteczkę syndekanu-4 powodowała wzrost liczby płytek przylegania. Komórki miały kształt charakterystyczny dla fibroblastów i wykazywały mniejszą zdolność do migracji [14,15]. Natomiast transfekcja tych samych komórek cDNA syndekanu-4, pozbawionego całej

domeny cytoplazmatycznej, lub antysensownym konstruktem, prowadziła do spadku liczby płytek przylegania [14]. Na znaczący udział domeny wewnątrzkomórkowej syndekanu-4 w organizacji płytek przylegania wskazują również wyniki prac, w których wykazano, że mutacje w regionie V domeny cytoplazmatycznej syndekanu-4 uniemożliwiają komórkom tworzenie tych struktur. Nadekspresja syndekanu-4 pozbawionego wyłącznie regionu V prowadziła do spadku liczby płytek przylegania. Podobnie nadekspresja białka pozbawionego domeny C2 była przyczyną zmniejszenia zdolności do adhezji, jednak brak domeny EFYA w obrębie rejonu C2, wiążącej białka zawierające domenę PDZ, nie hamuje powstawania płytek przylegania [15].

Również wpływ nadekspresji białek związanych z domeną cytoplazmatyczną syndekanu na adhezję komórek był przedmiotem szeregu badań. Nadekspresja synteniny powodowała, iż komórki były bardziej rozciągnięte na podłożu. Wzrost syntezy synektyny redukował zdolność komórek do migracji. W środowisku pozbawionym surowicy nadekspresja syndesmosu w komórkach 3T3 prowadziła do rozciągania się komórek i tworzenia większej ilości włókien naprężeniowych na podłożu z fibronektyny [15].

Syndekany są receptorami dla integryn w procesie adhezji (Rys. 1). W tworzeniu płytek przylegania niezbędny jest sygnał pochodzący od integryn, które wiążą się z domeną CBD fibronektyny, i sygnał pochodzący od syndekanu-4 wiążącego się z domeną C-końcową fibronektyny HepII. Wytworzenie połączeń syndekan-4-macierz zewnątrzkomórkowa związane jest z aktywacją PKC α i białka Rho, a dalej kinazy płytek przylegania FAK [15,59,60]. W obrębie płytek przylegania syndekany wiążą się z białkami cytoszkieletu. Syndekany-2 i -3 wiążą się bezpośrednio z aktyną, a syndekan-4 z α -aktyniną i prawdopodobnie za jej pośrednictwem również z mikrofilamentami aktynowymi [15].

Do tej pory nie została wyjaśniona rola łańcuchów siarczanu heparanu w tworzeniu się płytek przylegania. Wiadomo, że zmutowane komórki CHO niesyntetyzujące łańcuchów glikozaminoglikanu nie są zdolne do wytwarzania płytek przylegania i włókien naprężeniowych na fibronektynie. Natomiast komórki te mogą tworzyć płytki przylegania, kiedy zostaną transfekowane cDNA syndekanu-4, mimo iż białko nie zawiera związanych łańcuchów siarczanu heparanu [62]. Sugeruje to, iż łańcuchy HS odgrywają drugorzędową rolę w organizacji płytek przylegania, a najważniejsza jest tutaj oligomeryzacja samego białka.

Na terenie płytek przylegania występuje głównie syndekan-4; ani nadekspresja syndekanu-2, ani jego mutacje nie powodują żadnych zmian w płytkach przylegania [14]. Jedynie w linii komórkowej raka płuc P29 wykazano, iż syndekan-2 przyczepia się poprzez łańcuchy siarczanu heparanu do domeny HepII fibronektyny i razem z integryną $\alpha 5\beta 1$ indukuje tworzenie włókien naprężeniowych [63]. Również transfekcja komórek COS-7 syndekaniem-1 powoduje, iż komórki przyczepiają się do podłoża i rozciągają, ale nie tworzą typowych płytek przylegania [45]. W komórkach COS-1 i 3T3 nadekspresja

syndekanu-2 wywołuje wydłużanie się filopodiów, co jest związane z aktywacją Cdc42 [45]. Na uwagę zasługuje również fakt, iż poza tworzeniem połączeń komórka-macierz zewnątrzkomórkowa, syndekany biorą udział w formowaniu połączeń komórka-komórka. Wstępne wyniki badań wykazują, iż syndekany występują wspólnie z kadherynami (białkami tworzącymi połączenia międzykomórkowe) w miejscach adhezji komórka-komórka [64].

SYNDEKANY JAKO KORECEPTORY

Syndekany w komórce mogą funkcjonować jako koreceptory (Rys. 3) [12,24,64]. Syndekany wiążą FGF, VEGF, HB-EGF (wiązący heparynę naskórkowy czynnik wzrostu), HGF, PDGF (płytkopochodny czynnik wzrostu) i inne czynniki wzrostu, interferon- γ i chemokiny (Tab. 1) [2,5,65,66]. Syndekany zwiększają lokalnie stężenie czynników wzrostu przez wiązanie ich w okolicy występowania receptorów. Syndekany mogą także zmieniać konformację czynników wzrostu, zwiększając ich powinowactwo do receptora. Syndekany mogą oddziaływać bezpośrednio z receptorami dla czynników wzrostu [64], tak jak ma to miejsce w przypadku FGF, gdzie syndekan nie tylko wiąże sam czynnik wzrostu, ale również jego receptor [65]. Przyłączenie FGF-2 do syndekanu jest niezbędne do wytworzenia kompleksu z receptorem FGF-2. Syndekan-1 bierze udział w przekazywaniu sygnału przez FGF-2 i FGF-8 oraz inne czynniki wzrostu wiążące się z siarczanami heparanu, a także białka regulatorowego Wnt-1 - β kateniny [8,32,67-73].

Do tej pory nie wiadomo, na jakiej drodze syndekany biorą udział w przekazywaniu sygnału oraz jaka jest rola łańcuchów siarczanu heparanu i czy czynniki wzrostu są wiązane specyficznie przez poszczególne syndekany [74]. Kombinacja cytoplazmatycznej domeny syndekanu-4, PIP₂ i PKCa stanowi potencjalny kompleks sygnałowy. Syndekany wiążą się z białkiem CASK (LIN-2 u *Caenorhabditis elegans*), synteniną, białkiem cytoszkieletu 4.1 i β -kateninami [15,37,41,42]. Wszystkie z wymienionych białek odgrywają rolę czynników regulujących transkrypcję [15]. Pojawiają się również doniesienia o lokalizacji syndekanu-1 w jądrze komórkowym i wrzecionie mitotycznym (współwystępowanie z tubuliną) w dzielących się komórkach nabłonka linii STAV-AB [75].

SYNDEKANY W PROCESACH RÓŻNICOWANIA I REGENERACJI

Integriny wspólnie z syndekaniem-4 indukują procesy związane z adhezją i migracją komórek, regulują oddziaływanie z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej i czynnikami wzrostu. Syndekany biorą udział w procesach różnicowania komórek i regeneracji tkanek [12,76]. Po uszkodzeniu skóry [77] lub naczyń krwionośnych [78] obserwowano wzrost ekspresji syndekanu-1 i -4 [15].

Syndekan-1 pojawia się w zarodku myszy już na etapie czterech komórek [79]. Wpływa on na prawidłowy fenotyp komórek nabłonka, biorąc udział w organizacji szkieletu aktywnego i regulując ekspresję E-kadheryn [6,8,80]. Odgrywa również rolę w rozwoju zębów, trzustki i kończyn

[81,82,83]. Myszy z uszkodzonym genem syndekanu-1 rozwijają się i rozmnażają normalnie, ale zaobserwowano u nich nieprawidłowości podczas gojenia się ran [45]. Syndekan-2 ulega ekspresji w osteoblastach i bierze udział w przekazywaniu sygnału przez GM-CSF (czynnik pobudzający kolonie granulocytów i makrofagów) [84]. Syndekan-3 odgrywa również bardzo ważną rolę w rozwoju szkieletu i kończyn [85].

Syndekany mają istotny udział w rozwoju i różnicowaniu się komórek mięśniowych, a także w zachowaniu w mięśniach dorosłych osobników puli niezróżnicowanych mioblastów. Ich obecność jest niezbędna w przekazywaniu sygnału od FGF i HGF. Sygnał przekazywany przez HGF prowadzi do migracji mioblastów z somitów do kończyn, a następnie do tworzenia miotub drugorzędowych. FGF reguluje wzrost i różnicowanie się wczesnych mioblastów zarodkowych i później dojrzałych mioblastów w mięśniach. Ekspresja syndekanu-3 i -4 jest ograniczona w dojrzałych mięśniach do komórek mających zdolność do miogenezy, tzn. do komórek satelitowych, obecnych pomiędzy błoną podstawną a sarkolemmą dojrzałych włókien mięśniowych [76]. Obserwowano hamowanie ekspresji syndekanu-1, -2 i -3 podczas różnicowania się mioblastów [65,76,86,87]. Wykazano także ekspresję syndekanu-4 w różnicujących się mioblastach i wpływ TPA (12-O-tetradekanol 13-acyloforbol, ester forbolu), oraz kalfostyny C (odpowiednio aktywator i inhibitor PKC) na jego lokalizację [88].

Syndekany obecne są także w tkance nerwowej. Syndekan-2 ulega ekspresji w synapsach, natomiast syndekan-3 w aksonach [41]. Syndekan-3 wiąże HB-GAM (wiążąca heparynę cząsteczka związana z czynnikami wzrostu), który ulega ekspresji między innymi w rozwijającym się mózgu i odgrywa bardzo ważną rolę we wzroście neuronów. Przekazywanie sygnału przez HB-GAM odbywa się poprzez kinazę Src. Syndekan-3 i -4 występują w komórkach Schwanna otaczających komórki nerwu kulszowego szczura [89]. Syndekan-3 początkowo zlokalizowany jest w bliskim sąsiedztwie kanałów sodowych, a u dorosłych osobników razem z syndekaniem-4 w przewężeniach Ranviera.

Syndekany odgrywają również rolę w adhezji komórek nowotworowych, przez co wpływają na rozwój i inwazyjność nowotworów [45]. Spadek ekspresji syndekanu-1 obserwuje się w nowotworach nabłonka, szyjki macicy, płuc i szpiczakach. Z drugiej strony, w niektórych typach nowotworów obserwuje się wzrost ekspresji syndekanu-1, dotyczy to nowotworu trzustki, żołądka, sutka. Podwyższony poziom syndekanu-2 występuje w komórkach nowotworu płuc i okrężnicy. Wzrost syntezy syndekanu-4 jest obserwowany w komórkach raka wątroby i nabłonka surowiczego [45].

PIŚMIENNICTWO

1. Woods A, Couchman JR (1998) Syndecans: synergistic activators of cell adhesion. *Trend Cell Biol* 8: 189-192
2. Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Ann Rev Biochem* 68: 729-778
3. Carey DJ (1997) Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J* 327: 1-16

4. Bobinski R, Olczyk K, Wisowski G, Jarco K (2002) The Glypicans. *Adv Cell Biol* 28: 3-16
5. Tumova S, Woods A, Couchman JR (2000) Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Int J Biochem Cell Biol* 32(3): 269-288
6. Woods A (2001) Syndecans: transmembrane modulators of adhesion and matrix assembly. *J Clin Invest* 107(8): 935-941
7. Yoneda A, Couchman JR (2003) Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans. *Matrix Biol* 22(1): 25-33
8. Bellin R, Capila I, Lincecum J, Park PW, Reizes O, Bernfield MR (2003) Unlocking the secrets of syndecans: transgenic organisms as a potential key. *Glycoconjugate J* 19: 295-304
9. Steigemann P, Molitor A, Fellert S, Jackle H, Vorbruggen G (2004) Heparan sulfate proteoglycan syndecan promotes axonal and myotube guidance by slit/robo signaling. *Curr Biol* 14(3): 225-230
10. Kim CW, Goldberger OA, Gallo RL, Bernfield M (1994) Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol Biol Cell* 5: 797-805
11. Seidel C, Gulyas M, David G, Dobra K, Theocharis AD, Hjerpe A (2004) A sandwich ELISA for the estimation of human syndecan-2 and syndecan-4 in biological samples. *J Pharm Biomed Anal* 34(4): 797-801
12. Rapraeger AC (2001) Molecular interactions of syndecans during development. *Sem Cell Dev Biol* 12: 107-116
13. Woods A, Couchman JR (1994) Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell* 5: 183-192
14. Longley RI, Woods A, Fleetwood A, Cowling GJ, Gallagher JT, Couchman JR (1999) Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *J Cell Sci* 112: 3421-3431
15. Woods A, Couchman JR (2001) Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr Opin Cell Biol* 13: 578-583
16. Petit V, Thlery JP (2000) Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell* 92: 477-494
17. Sage EH (2001) Regulation of interactions between cells and extracellular matrix: a command performance on several stages. *J Clin Invest* 107 (7): 781-783
18. Ishiguro K, Kojima T, Muramatsu T (2002) Syndecan-4 as a molecule involved in defense mechanisms. *Glycocon J* 19(4-5): 315-318
19. Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, Muramatsu H, Nakamura E, Ito M, Nagasaka T, Kobayashi H, Kusugami K, Saito H, Muramatsu T (2000) Syndecan-4 deficiency impairs the fetal vessels in the placental labyrinth. *Dev Dyn* 219(4): 539-544
20. Echtermeyer F, Streit M, Wilcox-Adelman S, Saoncella S, Denhez F, Detmar M, Goetinck P (2001) Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest* 107(2): R9-R14
21. Spring SC, Terman BI (2002) Identification of a syndecan 4 pseudogene. *Dna Seq* 13(6): 353-357
22. Esko JD, Lindahl U (2001) Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest* 108(2): 169-173
23. Forsberg E, Kjellen LJ (2001) Heparan sulfate: lessons from knockout mice. *Clin Invest* 108(2): 175-180
24. Zimmermann P, David G (1999) The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *Faseb J* 13 Suppl: S91-S100
25. Iba K, Albrechtsen R, Gilpin BJ, Loechel F, Wewer UM (1999) Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. *Am J Pathol* 154: 1489-1501
26. Kim HR, Choi MS, Kim IS (2004) Role of Syndecan-4 in the cellular invasion of *Orientia tsutsugamushi*. *Microb Pathog* 36(4): 219-225
27. Iba K, Albrechtsen R, Gilpin B, Frohlich C, Loechel F, Zolkiewska A, Ishiguro K, Kojima T, Liu W, Langford JK, Sanderson RD, Brakebusch C, Fassler R, Wewer UM (2000) The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. *J Cell Biol* 149: 1143-1155
28. Thodeti CK, Albrechtsen R, Grauslund M, Asmar M, Larsson C, Takada Y, Mercurio AM, Couchman JR, Wewer UM (2003) ADA-M12/syndecan-4 signaling promotes beta 1 integrin-dependent cell spreading through protein kinase Alpha and RhoA. *J Biol Chem* 278(11): 9576-9584
29. McFall AJ, Rapraeger AC (1997) Identification of an adhesion site within the syndecan-4 extracellular protein domain. *J Biol Chem* 272(20): 12901-12904
30. Subramanian SV, Fitzgerald ML, Bernfield M (1997) Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem* 272: 14713-14720
31. Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, Murphy G, Bernfield M (2000) Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol* 148: 811-824
32. Kato M, Wang H, Kainulainen V, Ledbetter S, Ornitz DM, Bernfield M (1998) Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2. *Nat Med* 4: 691-697
33. Kainulainen V, Wang H, Schick C, Bernfield M (1998) Syndecans, heparan sulfate proteoglycans, maintain the proteolytic balance of acute wound fluids. *J Biol Chem* 273: 11563-11569
34. Holen I, Drury NL, Hargreaves PG, Croucher PI (2001) Evidence of a role for a non-matrix-type metalloproteinase activity in the shedding of syndecan-1 from human myeloma cells. *Br J Haematol* 114(2): 414-421
35. Oh ES, Woods A, Couchman JR (1997) Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for its ability to activate protein kinase C. *J Biol Chem* 272: 11805-11811
36. Rapraeger AC, Ott V (1998) Molecular interactions of the syndecan core proteins. *Curr Opin Cell Biol* 10: 620-628
37. Cohen AR, Woods DF, Marfatia SM, Walther Z, Chishti AH, Anderson JM (1998) Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol* 142: 129-138
38. Baciuc PC, Saoncella S, Lee SH, Denhez F, Leuthardt D, Goetinck PF (2000) Syndesmos, a protein that interacts with the cytoplasmic domain of syndecan-4, mediates cell spreading and actin cytoskeletal organization. *J Cell Sci* 113 Pt2: 315-324
39. Fanning AS, Anderson J (1996) Protein-protein interactions: PDZ domain networks. *Curr Biol* 6: 1385-1388
40. Grootjans JJ, Zimmermann P, Reekmans G, Smets A, Degeest G, Durr J, David G (1997) Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proc Nat Acad Sci Usa* 94: 136836-13688
41. Hsueh YP, Sheng M (1999) Regulated expression and subcellular localization of syndecan heparan sulfate proteoglycans and the syndecan-binding protein CASK/LIN-2 during rat brain development. *J Neurosci* 19: 7415-7425
42. Hsueh YP, Wang TF, Yang FC, Sheng M (2000) Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature* 404: 298-302
43. Gao Y, Li M, Chen W, Simons M (2000) Syntectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *J Cell Physiol* 184(3): 373-379
44. Ethell IM, Hagihara K, Miura Y, Irie F, Yamaguchi Y (2000) Synbindin, A novel syndecan-2-binding protein in neuronal dendritic spines. *J Cell Biol* 151: 53-68
45. Beauvais DM, Rapraeger AC (2004) Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol* 2(1): 3
46. Baciuc PC, Goetinck PF (1995) Protein kinase C regulates the recruitment of syndecan-4 into focal contacts. *Mol Biol Cell* 6: 1503-1513
47. Oh ES, Woods A, Couchman JR (1997) Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. *J Biol Chem* 272: 8133-8136

48. Oh ES, Woods A, Lim ST, Theibert AW, Couchman JR (1998) Syndecan-4 proteoglycan cytoplasmic domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate coordinately regulate protein kinase C activity. *J Biol Chem* 273: 10624-10629
49. Keum E, Kim Y, Kim J, Kwon S, Lim Y, Han I, Oh ES (2004) Syndecan-4 regulates localization, activity and stability of protein kinase C- α . *Biochem J* 378(Pt3): 1007-1014
50. Lee D, Oh ES, Woods A, Couchman JR, Lee W (1998) Solution structure of a syndecan-4 cytoplasmic domain and its interaction with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 273: 13022-13029
51. Lim ST, Longley RL, Couchman JR, Woods AJ (2003) Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of protein kinase C α (PKC α) increases focal adhesion localization of PKC α . *Biol Chem* 278(16): 13795-13802
52. Horowitz A, Simons M (1998) Regulation of syndecan-4 phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* 273: 10914-10918
53. Horowitz A, Simons M (1998) Phosphorylation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of protein kinase C α . *J Biol Chem* 273: 25548-25551
54. Horowitz A, Murakami M, Gao Y, Simons M (1999) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate mediates the interaction of syndecan-4 with protein kinase C. *Biochemistry* 38: 15871-15877
55. Volk R, Schwartz JJ, Li J, Rosenberg RD, Simons M (1999) The role of syndecan cytoplasmic domain in basic fibroblast growth factor-dependent signal transduction. *J Biol Chem* 274(34): 24417-24424
56. Couchman JR, Woods A (1999) Syndecan-4 and integrins: combinatorial signaling in cell adhesion. *J Cell Sci* 112: 3415-3412
57. Woods A, Longley RL, Tumova S, Couchman JR (2000) Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 374(1): 66-72
58. Mercurius KO, Morla AO (2001) Cell adhesion and signaling on the fibronectin 1st type III repeat; requisite roles for cell surface proteoglycans and integrins. *Bmc Cell Biol* 2(1): 18
59. Saoncella S, Echtermeyer F, Denhez F, Nowlen JK, Mosher DF, Robinson SD, Hynes RO, Goetinck PF (1999) Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc Nat Acad Sci Usa* 96: 2805-2810
60. Wilcox-Adelman SA, Denhez F, Goetinck PF (2002) Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem* 277(36): 32970-32977
61. Jeong J, Han I, Lim Y, Kim J, Park I, Woods A, Couchman JR, Oh ES (2001) Rat embryo fibroblasts require both the cell-binding and the heparin-binding domains of fibronectin for survival. *Biochem J* 356(Pt2): 531-537
62. Echtermeyer F, Baciu PC, Saoncell S, Ge Y, Goetinck PF (1999) Syndecan-4 core protein is sufficient for the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *J Cell Sci* 112: 3433-3441
63. Kusano Y, Oguri K, Nagayasu Y, Munesue S, Ishihara M, Saikil, Yonekura H, Yamamoto H, Okayama M (2000) Participation of syndecan 2 in the induction of stress fiber formation in cooperation with integrin α 5 β 1: structural characteristics of heparan sulfate chains with avidity to COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Exp Cell Res* 256(2): 434-444
64. Rapraeger AC (2000) Syndecan-regulated receptor signaling. *J Cell Biol* 149(5): 995-997
65. Rapraeger AC (1995) In the clutches of proteoglycans: how does heparan sulfate regulate FGF binding? *Chem Biol* 2: 645-649
66. Clasper S, Vekemans S, Fiore M, Plebanski M, Wordsworth P, David G, Jackson DG (1999) Inducible expression of the cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 (fibroglycan) on human activated macrophages can regulate fibroblast growth factor action. *J Biol Chem* 274(34): 24113-24123
67. Mali M, Elenius K, Miettinen HM, Jalkanen M (1993) Inhibition of basic fibroblast growth factor-induced growth promotion by overexpression of syndecan-1. *J Biol Chem* 268: 24215-24222
68. Mali M, Andtfolk H, Miettinen HM, Jalkanen M (1994) Suppression of tumor cell growth by syndecan-1 ectodomain. *J Biol Chem* 269: 27795-27798
69. Filla MS, Dam P, Rapraeger AC (1998) The cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates fibroblast growth factor-2 binding and activity. *J Cell Physiol* 174: 310-321
70. Alexander CM, Reichsman F, Hinkes MT, Lincecum J, Becker KA, Cumberledge S, Bernfield M (2000) Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet* 25: 329-332
71. Reichsman F, Smith L, Cumberledge S (1996) Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. *J Cell Biol* 135: 819-827
72. Haerry TE, Heslip TR, Marsh JL, O'Connor MB (1997) Defects in glucuronate biosynthesis disrupt Wingless signaling in *Drosophila*. *Development* 124: 3055-3064
73. Binari RC, Staveley BE, Johnson WA, Godavarti R, Sasisekharan R, Manoukian AS (1997) Genetic evidence that heparin-like glycosaminoglycans are involved in wingless signaling. *Development* 124: 2623-2632
74. Kramer KL, Yost HJ (2003) Heparan sulfate core proteins in cell-cell signaling. *Annu Rev Genet* 37: 461-484
75. Brockstedt U, Dobra K, Nurminen M, Hjerpe A (2002) Immunoreactivity to cell surface syndecans in cytoplasm and nucleus: tubulin-dependent rearrangements. *Exp Cell Res* 274(2): 235-245
76. Cornelison DW, Filia MS, Stanley HM, Rapraeger AC, Olwin BB (2001) Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Dev Biol* 239: 79-94
77. Gallo RL, Ono M, Povsic T, Page C, Eriksson E, Klagsbrun M, Bernfield M (1994) Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Nat Acad Sci Usa* 91: 11035-11039
78. Cizmeci-Smith G, Longan E, Youkey J, Showalter LJ, Carey D (1997) Thrombin stimulates syndecan-1 promoter activity and expression of a form of syndecan-1 that binds antithrombin III in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 172-180
79. Sutherland AE, Sanderson RD, Mayes M, Seibert M, Calarco PG, Bernfield M, Damsky Ch (1991) Expression of syndecan, a putative low affinity fibroblast growth factor receptor, in the early mouse embryo. *Development* 113: 339-351
80. Trautman MS, Kimelman J, Bernfield M (1991) Developmental expression of syndecan, an integral membrane proteoglycan, correlates with cell differentiation. *Development* 111: 213-220
81. Thesleff I, Jalkanen M, Vainio S, Bernfield M (1988) Cell surface proteoglycan expression correlates with epithelial-mesenchymal interaction during tooth morphogenesis. *Dev Biol* 129: 565-572
82. Vainio S, Jalkanen M, Vaahtokari A, Sahlberg C, Mali M, Bernfield M, Thesleff I (1991) Expression of syndecan gene is induced early, is transient, and correlates with changes in mesenchymal cell proliferation during tooth organogenesis. *Dev Biol* 147: 322-333
83. Solursh M, Reiter RS, Jensen KL, Kato M, Bernfield M (1990) Transient expression of a cell surface heparan sulfate proteoglycan (syndecan) during limb development. *Dev Biol* 140: 83-92
84. Modrowski D, Basle M, Lomri A, Marie PJ (2000) Syndecan-2 is involved in the mitogenic activity and signaling of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in osteoblasts. *J Biol Chem* 275: 9178-9185
85. Dealy CN, Seghatoleslami MR, Ferrari D, Koshier RA (1997) FGF-stimulated outgrowth and proliferation of limb mesoderm is dependent on syndecan-3. *Dev Biol* 184: 343-350
86. Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB (1991) Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252: 1705-1708

87. Fuentealba L, Carey DJ, Brandan E (1999) Antisense inhibition of syndecan-3 expression during skeletal muscle differentiation accelerates myogenesis through a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 274(53): 37876-37884
88. Brzoska E, Grabowska I, Wrobel E, Moraczewski (2003) Syndecan-4 distribution during the differentiation of satellite cells isolated from soleus muscle treated by phorbol ester and calphostin C. *J Cell Mol Biol Lett* 8(2): 269-278
89. Goutebroze L, Carnaud M, Denisenko N, Boutterin MC, Girault JA (2003) Syndecan-3 and syndecan-4 are enriched in Schwann cell perinodal processes. *Bmc Neurosci* 4(1): 29
90. Tumova S, Woods A, Couchman JR (2000) Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Int J Biochem Cell Biol* 32(3): 269-288

Syndecans in cell adhesion and differentiation

Edyta Brzoska , Iwona Grabowska

Faculty of Biology, Department of Cytology, Warsaw University, 1 Miecznikowa St., 02-096 Warsaw, Poland
e-mail: edbrzoska@biol.uw.edu.pl

Key words: syndecan, proteoglycan, differentiation, adhesion, focal adhesion, cytoskeleton

ABSTRACT

Syndecans are transmembrane proteoglycans expressed on adherent cells. They are a family of four proteins, which participate in cell-matrix adhesion, the regulation of growth factors (FGFs, VEGF, HGF) binding and signaling. The extracellular domain of syndecans contains heparan sulfate and chondroitin sulfate glycosaminoglycan chains. Syndecans have transmembrane region and a short cytoplasmic domain. The cytoplasmic domain attaches activated protein kinase C α , phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, syntenin, β -catenin and many others molecules. Syndecans bind numerous ligands, which are present in extracellular matrix: growth factors, enzymes, extracellular matrix molecules (fibronectin, laminin). They form connections with actin cytoskeleton. The changes in syndecan expression influence on cell adhesion and migration, structure of focal contacts and cytoskeleton. Syndecans participate in cell differentiation and tissue regeneration.

Specyficzność i selektywność działania czynnika transkrypcyjnego NFκB

Małgorzata Czyż✉

Zakład Chemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

✉ Zakład Chemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź, e-mail: mczyz@esk.am.lodz.pl, tel./faks: 42 678 42 77

Artykuł otrzymano 23 sierpnia 2004

Artykuł zaakceptowano 11 listopada 2004

Słowa kluczowe: regulacja transkrypcji, NFκB, ekspresja genów, czynniki transkrypcyjne, modyfikacje kowalencyjne

Wykaz skrótów: Akt, PKA, PKC – kinazy białkowe; AP-1, ATF2/c-Jun, C/EBPβ, c-Myc, CREB, E2F1, E2F4, HMGI, IRF-1, MyoD, Sp1 – czynniki transkrypcyjne; CBP – białko wiążące element odpowiedzi na c-AMP (ang. *cyclic AMP-response element binding protein*); HAT – acetylotransferaza histonowa; HDAC1,2,3 – deacetylazy histonowe 1,2,3; IκB – inhibitor NFκB; IKK – kinaza IκB; NCoA-1 (SRC-1) – koaktywator receptorów jądrowych; p/CAF – czynnik wiążący CBP.

Podziękowanie: Artykuł został przygotowany w ramach działalności Centrum Doskonałości, MolMed działającym przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi.

STRESZCZENIE

Geny regulowane przez czynnik transkrypcyjny NFκB są bardzo różnorodne. Należą do nich geny kodujące białka, kontrolujące odpowiedź immunologiczną organizmu i stany zapalne, geny antyapoptotyczne i geny kodujące białka regulujące proliferację komórek, a także białka hamujące aktywność NFκB. Czynnik transkrypcyjny NFκB, obecny niemal w każdej komórce, ulega aktywacji w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe takie jak interleukiny i czynniki wzrostu, infekcje wirusowe i bakteryjne oraz czynniki fizyczne (np. UV). Konstytutywna aktywacja NFκB przyczynia się do rozwoju nowotworów m.in. poprzez zwiększanie proliferacji komórek, hamowanie apoptozy, metastazę komórek nowotworowych i angiogenezę. Z kolei całkowite zahamowanie aktywności NFκB może prowadzić do braku odporności immunologicznej. Dimeryczne białka, objęte wspólną nazwą czynnik transkrypcyjny NFκB, wykazują dużą specyficzność i selektywność działania. Dzięki temu nie wszystkie geny zależne od NFκB i nie w każdej komórce ulegają ekspresji. W artykule przedstawiono specyficzność i selektywność działania czynników transkrypcyjnych NFκB jako wynik kombinacji wielu mechanizmów regulacyjnych.

WPROWADZENIE

Czynnik transkrypcyjny NFκB został odkryty w 1986 przez Sena i Baltimore [1] jako białko jądrowe wiążące sekwencję wzmacniającą w promotorze genu kodującego łańcuch lekki – kappa immunoglobuliny po stymulacji limfocytów B za pomocą lipopolisacharydów (LPS). Stąd nazwa NFκB (ang. *Nuclear Factor kappa B*). Wkrótce potem okazało się, że białko to występuje powszechnie, a nie tylko w limfocytach B, oraz że jego funkcja regulatorowa nie ogranicza się jedynie do genu kappa. Czynnik transkrypcyjny NFκB jest zaangażowany w odpowiedź immunologiczną organizmu i stany zapalne, organogenezę, wzrost komórki i rozwój nowotworu, jest zdolny do indukcji genów, których produkty białkowe kontrolują proliferację i wpływają na apoptozę.

Aktywacja czynnika transkrypcyjnego NFκB występuje w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe takie jak interleukiny i czynniki wzrostu, mitogeny, infekcje wirusowe i bakteryjne oraz działanie czynników fizycznych, na przykład promieniowania ultrafioletowego (Tab. 1). Mechanizm aktywacji czynni-

Tabela 1. Aktywatory NFκB i geny regulowane przez ten czynnik transkrypcyjny

Niektóre czynniki stymulujące NFκB	
cytokiny, mitogeny, czynniki wzrostu	IL-1, TNF-α, IFN-γ, estry forbolu, PDGF, VEGF
mikroorganizmy i cząsteczki z nich pochodzące	LPS, dwuniciowe RNA, <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Plasmodium falciparum</i>
czynniki fizyczne	promieniowanie γ i UV, szok termiczny
inne	trombina, homocysteina, metale ciężkie (Ni, Co), leptyna, komplement, stres oksydacyjny
Niektóre geny regulowane przez NFκB	
interleukiny i czynniki kolonizacji	IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-α, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, MCP-1, RANTES, MGSA
cząsteczki adhezyjne	Selektyna E, ICAM-1, VCAM-1, MAdCAM-1, RAGE
geny związane z apoptozą	A20, A1, XIAP, c-IAP1, c-IAP2
geny związane z odpowiedzią immunologiczną	MHC-I, MHC-II, IRF-1
inne	iNOS, COX-2, czynnik tkankowy, PAI-1, IκBα, MnSOD, MMP-2, MMP-9, PTX3

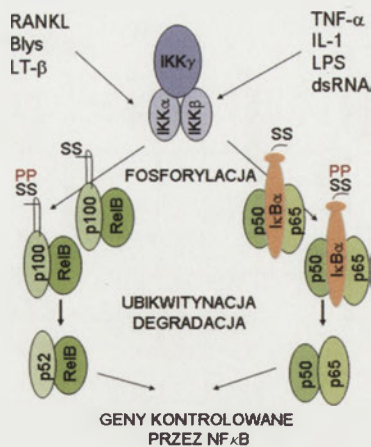
ka transkrypcyjnego NFκB przez czynnik martwicy nowotworu (TNF-α) został szczegółowo opisany w „Postęпах Biochemii” [2]. Wiele nowych oddziaływań molekularnych istotnych dla transdukcji sygnału TNF-α/NFκB zostało odkrytych dzięki zastosowaniu RNAi i metod proteomicznych [3].

RODZINA NFκB/IκB

Rodzina czynników transkrypcyjnych NFκB obejmuje wszystkie białka będące homo- i heterodimerami zbudowanymi z dwóch spośród pięciu podjednostek: RelA (p65), RelB, c-Rel, NFκB1 (p50) i NFκB2 (p52). N-końcowy fragment podjednostek białka NFκB, nazywany rejonem homologii Rel (około 300 aminokwasów), jest odpowiedzialny za asocjacje z białkiem inhibitorowym IκB, dimeryzację, lokalizację jądrową i wiązanie z DNA. W oparciu o sposób syntezy i zdolność do aktywacji transkrypcji, białka NFκB podzielono na dwie grupy. Pierwsza grupa obejmuje podjednostki RelA (p65), c-Rel i RelB, które są syntezowane w formie dojrzałej i zawierają w końcu karboksylowym domenę odpowiedzialną za aktywację transkrypcji. W drugiej grupie są białka NFκB1 i NFκB2, które są syntezowane jako wysokocząsteczkowe białka prekursorowe (odpowiednio p105 i p100) z powtórzeniami ankrynowymi w C-końcu. Zależna od ubikwitylacji degradacja proteolityczna końca ankrynowego przeksztalca p105 w p50 oraz p100 w p52 (Rys. 1). Obie podjednostki, p50 i p52, nie mają domen zdolnych do aktywacji transkrypcji. Czynnik transkrypcyjny NFκB w większości niestymulowanych komórek pozostaje w nieaktywnym kompleksie z jednym z białek inhibitorowych: IκBα IκBβ IκBγ (C-końcowa część p105, kodowana również przez osobny gen), IκBε, Bcl-3, p105, p100 lub IκBζ. Białka inhibitorowe mają wiele cech wspólnych m.in. strukturę przestrzenną (powtórzenia ankrynowe w C-końcu) i wykazują selektywność w stosunku do białek NFκB. Stymulacja komórek włącza szlaki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, które ostatecznie prowadzą do aktywacji specyficznej kinazy nazywanej IKK, fosforylującej białka inhibitorowe IκB [2]. IKK jest kompleksem złożonym z trzech podjednostek: IKKα (IKK1), IKKβ (IKK2) i IKKγ (NEMO). Dwie pierwsze podjednostki mają domeny katalityczne, NEMO jest podjednostką regulatorową. Ponadto w skład kompleksu wchodzi inne białka m.in. Cdc37 i Hsp90 [4]. Substratem kinaz IKKβ i IKKα są dwie reszty serynowe, odpowiednio w domenie regulatorowej białek IκB i p100. Fosforylacja uruchamia poliubikwitylację z udziałem specyficznej ligazy ubikwityny E3 [5]. Po ubikwitylacji białka IκB są degradowane przez proteasom 26S. Uwolniony czynnik transkrypcyjny NFκB przemieszcza się do jądra, wiąże się z DNA i aktywuje transkrypcję.

SPECYFICZNOŚĆ I SELEKTYWNOŚĆ DZIAŁANIA NFκB

Aktywacja czynników transkrypcyjnych NFκB nie wymaga syntezy białka. Ilość NFκB (podjednostki p65) wynosi około 125 000 cząsteczek w komórce [6]. Oznacza to, że uruchomienie szlaku sygnałowego NFκB umożliwia szybkie włączenie transkrypcji genów docelowych. Białka NFκB wykazują dużą specyficzność i selektywność działania. Dzięki temu nie wszystkie geny zależne od NFκB i nie w każdej komórce ulegają ekspresji. W jaki sposób osiąga-

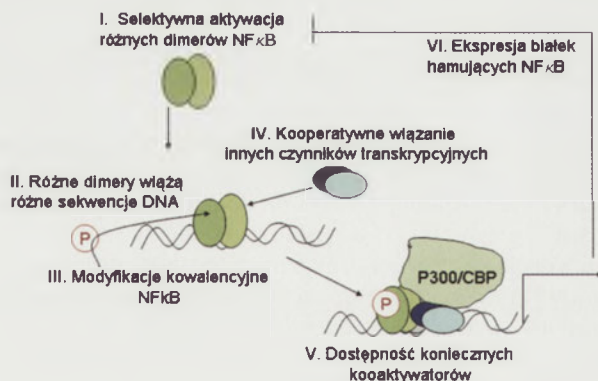


Rysunek 1. Różne dimery NFκB są selektywnie aktywowane. W odpowiedzi na szereg czynników prozapalnych (TNF-α, interleukina 1, lipopolisacharydy, dwuniciowy RNA) podjednostka IKKβ kompleksu kinaz IKK fosforyluje dwie reszty serynowe inhibitora IκB, co prowadzi do jego poliubikwitylacji i proteolitycznej degradacji. Uwolniony NFκB jest heterodimerem zbudowanym z p65 i p50 lub c-Rel. Alternatywna droga aktywacji uruchamiana jest przez RANKL, Blys czy LT α/β. Podjednostka IKKα fosforyluje heterodimer p100/RelB prowadząc do jego proteolitycznego przeksztalcenia w aktywny czynnik transkrypcyjny p52/RelB.

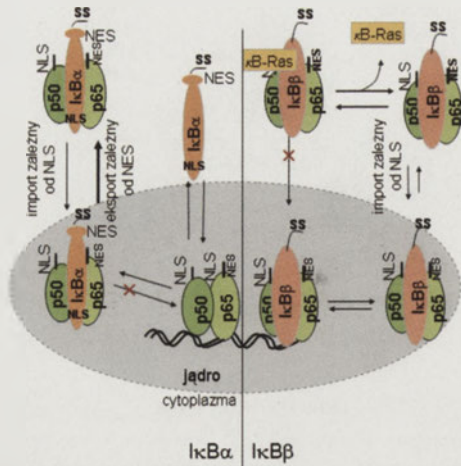
na jest specyficzność i selektywność działania czynników transkrypcyjnych NFκB obecnych w każdej komórce? Jest ona wynikiem kombinacji wielu mechanizmów regulacyjnych (Rys. 2).

LOKALIZACJA WEWNĄTRZKOMÓRKOWA

Przez wiele lat uważano, że w komórkach spoczynkowych nieaktywny kompleks NFκB/IκB pozostaje w cytoplazmie, ponieważ białko IκB przesłania sekwencję lokalizacji jądrowej (NLS; ang. *nuclear localization sequence*) znajdującą się w domenie homologii Rel białka NFκB i dopiero degradacja inhibitora odsłania sekwencję pozwalającą na import NFκB



Rysunek 2. Mechanizmy odpowiedzialne za specyficzność i selektywność odpowiedzi z udziałem NFκB. Selektowna aktywacja różnych dimerów NFκB (I) powoduje, że do jądra komórkowego wędrują dimery o różnej specyficzności w stosunku do miejsc wiążących w rejonach regulatorowych genów (II). Zdolność do wiązania DNA oraz do aktywacji transkrypcji jest regulowana przez modyfikacje kowalencyjne NFκB, głównie przez fosforylację (III). Zróżnicowana ekspresja genów zależnych od NFκB w różnych komórkach jest również efektem konieczności kooperatywnego wiązania innych czynników transkrypcyjnych (IV). Współzawodnictwo o koaktywatory konieczne do uruchomienia transkrypcji ostatecznie decyduje o wyborze genów, które ulegną ekspresji w danej komórce i w danych warunkach (V). NFκB aktywuje szereg genów, w tym geny kodujące białka hamujące aktywność NFκB, np. IκBα (VI). Negatywne sprzężenie zwrotne decyduje o tym, które dimery NFκB pozostaną w nieaktywnym kompleksie.



Rysunek 3. Regulacja lokalizacji jądrowej nieaktywnych kompleksów NFκB/IκB. Lewa strona rysunku dotyczy kompleksu NFκB/IκBα. Kompleks wędruje w sposób ciągły z cytoplazmy do jądra komórkowego i z powrotem. Za wędrowkę do jądra odpowiedzialna jest głównie sekwencja lokalizacji jądrowej (NLS) podjednostki p50, która nie jest całkowicie przesłonięta przez białko inhibitorowe IκBα. Sekwencje eksportu jądrowego (NES) obecne w IκBα i p65 są odpowiedzialne za dominujący w komórkach spoczynkowych proces przenoszenia kompleksu do cytoplazmy. Ponadto, do jądra komórkowego wędrują nowosyntezowane cząsteczki IκBα, które wiążąc białko NFκB usuwają je z promotorów genów i przenoszą do cytoplazmy. Prawa strona rysunku dotyczy kompleksu NFκB/IκBβ. W komórkach spoczynkowych, w obecności białka κB-Ras, sekwencje NLS obu podjednostek są maskowane, a więc kompleks pozostaje w cytoplazmie. Usunięcie κB-Ras prowadzi do odsłonięcia NLS podjednostki p50, co umożliwia wędrowkę kompleksu do jądra komórkowego. Kompleks ten ma zdolność wiązania się z DNA, ale nie może aktywować transkrypcji.

do jądra komórkowego. Sprawa lokalizacji jądrowej białka NFκB okazuje się być bardziej złożona (Rys. 3). Okazało się, że nowosyntezowane cząsteczki IκBα mogą przemieszczać się do jądra. Mechanizm przemieszczania się białka IκBα do jądra nie jest całkowicie poznany, aczkolwiek badania sugerują udział sekwencji lokalizacji jądrowej (NLS), która występuje w końcu ankirynowym cząsteczki [7]. Również kompleks NFκB/IκBα może wędrować do jądra komórkowego. Tu badania wskazują na dodatkowy udział NLS jednej z dwóch podjednostek NFκB pozostających w kompleksie z IκBα [8]. Tak jest w przypadku kompleksu IκBα z NFκB zawierającym podjednostkę p50. Sekwencja NLS podjednostki p50 nie jest do końca maskowana przez białko inhibitorowe [9]. Badania immunofluorescencyjne potwierdziły, że kompleksy NFκB/IκBα w sposób ciągły wędrują do jądra i z powrotem [10]. Powrót do cytoplazmy jest możliwy, gdyż cząsteczki IκBα posiadają bogatą w reszty leucyny sekwencję eksportu jądrowego (NES; ang. *nuclear export sequence*) [11]. Ponadto, eksport kompleksu z jądra do cytoplazmy jest wzmacniany przez obecność NES w domenie aktywacji transkrypcji podjednostki p65 [12]. Jednak główną lokalizacją kompleksu NFκB/IκBα jest cytoplazma, gdyż NES jest dominująca w stosunku do NLS. Transport przez błonę jądrową w obu kierunkach jest możliwy dla kompleksów NFκB/IκBα ale jest bardzo ograniczony w przypadku kompleksów zawierających IκBβ. Nie tylko brak jest sekwencji eksportu jądrowego w tym białku inhibitorowym [9,13], ale również IκBβ skuteczniej przesłania sekwencję lokalizacji jądrowej w obu podjednostkach białka NFκB. Do całkowitej blokady NLS przyczynia się wiązanie niewielkiego białka κB-Ras z sekwencją znajdującą się w obszarze powtórzeń ankirynowych IκBβ oraz fosforylacja IκBβ na C-

-końcu [14]. Stwierdzono również, że białko κB-Ras blokuje degradację IκBβ [15]. W komórkach spoczynkowych kompleksy NFκB/IκBβ pozostają w cytoplazmie. Nie wiadomo, co decyduje o wyborze inhibitora przy tworzeniu kompleksu z NFκB. Niewątpliwie ma to znaczenie regulacyjne. Degradacja IκBα prowadzi bowiem do gwałtownej, ale przejściowej aktywacji NFκB [16]. Natomiast inhibitor IκBβ wydaje się być obecny w kompleksach, z których czynnik NFκB uwalniany jest w formie aktywnej przez dłuższy czas. Dotyczy to m.in. rozwoju komórek limfoidalnych, funkcjonowania komórek śródbłonna i komórek mózgu oraz wielu stanów patologicznych i infekcji wirusowych [17-19]. W niniejszej pracy pominięto rolę pozostałych inhibitorów IκB w komórkowej lokalizacji białka NFκB [20]. Ponadto, nie wszystkie podjednostki NFκB i nie w każdym typie komórek są wydajnie kontrolowane przez inhibitory IκB. Przykładem może być podjednostka RelB, której stała aktywność jest istotna dla rozwoju komórek limfoidalnych [21].

SELEKTYWNA AKTYWACJA DIMERÓW NFκB

Odpowiedź z udziałem białek NFκB występuje praktycznie we wszystkich typach tkanek. Jednakże w poszczególnych tkankach wybiórczej aktywacji z różną kinetyką ulegają różne dimery NFκB [22]. Najbardziej rozpowszechnionym białkiem NFκB jest heterodimer p50/p65(RelA). Pozostaje on w kompleksie z IκB i ulega wczesnej aktywacji na przykład po stymulacji TNF-α. W spoczynkowych komórkach B stale aktywne są kompleksy NFκB zawierające podjednostki RelB i c-Rel [21]. Podczas stymulacji np. z udziałem CD40 w ciągu 2 godzin w jądrze pojawiają się heterodimery zawierające podjednostkę p65. W innych typach komórek tzw. wczesnej aktywacji często ulegają dimery zawierające podjednostkę p65, natomiast późnej aktywacji białka z udziałem c-Rel. U podstaw różnicy w składzie pojawiającego się w jądrze kompleksu leży m.in. fakt, że ekspresja genu *c-rel* zależy od NFκB. Ważnym mechanizmem regulacyjnym jest aktywowanie określonych podjednostek NFκB przez określone podjednostki kompleksu IKK (Rys. 1). Podjednostka IKKβ jest aktywna w odpowiedzi na szereg czynników prozapalnych np. TNF-α, interleukinę-1, lipopolisacharydy i dwuniciowy RNA, natomiast podjednostka IKKα jest uruchamiana przez RANKL (ang. *receptor activator of NFκB-ligand*) czy Blys/BAFF (ang. *B lymphocyte stimulator*). IKKβ przez fosforylację IκB indukuje jego degradację i translokację do jądra komórkowego uwolnionego białka NFκB zawierającego podjednostki p65, p50 lub c-Rel. IKKα razem z kinazą NIK (ang. *NFκB-inducing kinase*) jest konieczna do proteolitycznego przekształcenia heterodimeru p100/RelB w aktywny czynnik transkrypcyjny p52/RelB. W zależności od składu podjednostkowego białko NFκB może mieć różną funkcję. Podjednostki p50 i p52 jako homodimery są represorami [23], gdyż nie mają domeny aktywującej transkrypcję. W kompleksie z innymi podjednostkami np. p65 lub RelB są aktywatorami. Podjednostka RelB nie tworzy homodimerów. Heterodimery RelB z podjednostkami p50 lub p52 są aktywatorami, natomiast heterodimer RelB z p65 jest represorem, gdyż nie ma zdolności wiązania DNA [24].

Czynnik transkrypcyjny NFκB wiąże dziesięcionukleotydową sekwencję: 5'-GGGRNNTYCC-3' (R=puryna, Y=pirymidyna, N=dowolna zasada). Przykłady sekwencji wiążących dimery NFκB zawiera tabela 2. Analiza kompleksów nukleoproteinowych wykazała, że obie podjednostki oddziałują z DNA, przy czym określone konfiguracje podjednostek NFκB wykazują pewną selektywność w stosunku do sekwencji nukleotydowych [22, 25, 26]. Sekwencje całkowicie zgodne z powyższą sekwencją wiązane są zwykle przez heterodimer p50/p65. Miejsca NFκB w promotorach wielu genów aktywowanych w komórkach śródbłonna i monocytach (np. IL-8, ICAM-1), jeśli zamiast guaniny w pozycji pierwszej mają cytozynę, adeninę lub tyminę, to wiążą heterodimer c-Rel/p65. Tak jest również w przypadku genu kodującego czynnik tkankowy [27]. W badaniach *in vitro* zmiana sekwencji nukleotydowej miejsca wiązania oznaczała zmianę efektu biologicznego mierzonego poziomem ekspresji genu [28]. Badania z zastosowaniem metod krytalograficznych wykazały, że miejsca κB o różnej sekwencji powodują powstawanie różnych konformacji w regionie homologii Rel (RHR) białka NFκB, odpowiedzialnym za tworzenie dimerów i wiązanie z DNA [26, 29-32]. Każda z konformacji NFκB, powstała po związaniu określonej sekwencji κB, może tworzyć specyficzny kompleks aktywujący transkrypcję. Oznacza to, że sekwencja nukleotydowa miejsca κB wpływa pośrednio na zdolność białka NFκB do aktywacji transkrypcji. Na przykład, heterodimer p50/p65 wiązał trzy różne sekwencje κB: 5'-GGGACTTTCC-3' (promotor HIV-1), 5'-GGGACTCCTC-3' (promotor aktywatora plazminogenu typu urokinazowego, uPA), 5'-GGGAAAT-TCC-3' (promotor interferonu β, IFNβ) z bardzo zbliżonym powinowactwem, ale wydajność transkrypcji wymienionych

genów była różna [26]. Różnice w wydajności transkrypcji są konsekwencją niewielkich różnic w orientacji domen w białku p50/p65 oraz zmian w strukturze przestrzennej DNA w miejscu wiązania białka. Wykazano, że poszczególne miejsca wiązania NFκB mogą wydajnie uczestniczyć we włączaniu transkrypcji tylko w swoim natywnym otoczeniu. Oznacza to, że jedno miejsce κB nie może być zastąpione miejscem o innej sekwencji bez wpływu na wydajność transkrypcji [28]. Miejsce HIV-κB nie może funkcjonalnie zastąpić miejsca κB w promotorze interferonu β chociaż do obu miejsc czynnik transkrypcyjny NFκB wykazuje takie samo powinowactwo. Miejsce κB z promotora interferonu β wiąże dodatkowo czynnik transkrypcyjny HMG I(Y) (ang. *high mobility group protein I(Y)*), co wydaje się bardzo istotne dla utworzenia kompleksu kompetentnego transkrypcyjnie. Badania z zastosowaniem metod krytalograficznych wykazały, że HMG I(Y) wiąże się z sekwencją bogatą w reszty AT w bruzdzie mniejszej miejsca κB w promotorze interferonu β wywołując zmiany konformacyjne w związanym białku NFκB, umożliwiające utworzenie efektywnego transkrypcyjnie kompleksu zawierającego ponadto czynniki transkrypcyjne IRF-I oraz ATF2/c-Jun. Natomiast miejsce κB z promotora HIV-1 nie posiada sekwencji bogatej w reszty AT (Tab. 2) i nie może wiązać HMG(Y), a więc wstawione w miejsce κB w promotorze interferonu β uniemożliwia utworzenie aktywnego kompleksu [26].

MODYFIKACJE KOWALENCYJNE

Na aktywność czynnika transkrypcyjnego NFκB mają wpływ modyfikacje kowalencyjne cząsteczki białka. Mogą one wyraźnie zwiększyć powinowactwo do określonej sekwencji DNA miejsca wiążącego lub zdolność do aktywacji transkrypcji. Modyfikacje kowalencyjne białka NFκB uważa się za jeden z dwóch głównych mechanizmów kontrolujących aktywność czynnika transkrypcyjnego NFκB. Drugim mechanizmem kontroli jest opisane wcześniej uwolnienie czynnika NFκB z kompleksu z inhibitorem IκB poprzez fosforylację inhibitora. Badania *in vitro* sugerują, że fosforylacja podjednostek p50 i p65 zwiększa powinowactwo tych białek do określonych sekwencji wiążących [33,34]. Większość podjednostek NFκB posiada miejsce rozpoznawane przez kinazę białkową A (PKA). Znajduje się ono w odległości około 25 aminokwasów od sekwencji NLS w obrębie domeny homologii Rel (Ser-276). W procesie fosforylacji p65 może również uczestniczyć kompleks kinaz fosforylujących IκB (IKK) aktywowanych za pomocą TNF-α. Fosforylacji pod wpływem IKK ulega reszta seryny w pozycji 536 w C-końcowym fragmencie domeny aktywacji transkrypcji [35]. W czasie stymulacji IL-1, na fosforylację p65 pośrednio mają wpływ kinaza fosfatydyloinozytolu (PI3K) i kinaza białkowa B (Akt). Aktywowana przez PI3K kinaza Akt uruchamia kinazę IKKα, która z kolei fosforyluje resztę seryny 536 podjednostki p65 [36]. Zdolność podjednostki p65 do aktywacji transkrypcji wzrasta również po fosforylacji reszty seryny w pozycji 529 z udziałem seryno-treoninowej kinazy CKII (ang. *casein kinase II*) [37,38]. CKII jest aktywna w większości komórek, ale możliwość fosforylacji podjednostki p65 jest blokowana w komórkach spoczynkowych przez oddziaływanie p65 z IκBα. Dopiero uwolnienie NFκB z kompleksu z inhibitorem umożliwia indukowaną fosforylację z udziałem CKII. Podobny mechanizm regulacji występuje w przy-

Tabela 2. Sekwencje rozpoznawane przez NFκB w regionach regulacyjnych wybranych genów

Gen zależny od NFκB	Sekwencja wiążąca NFκB
sekwencja konsensowa	GGGRNNTYCC
HIV-1	GGGACTTTCC
wirus cytomegalii	GGGACTTTCC GGGGATTTCC
adenowirus	GGGACTTTCC GGGAAGTACC
SV 40	GGGACTTTCC
IFNβ	GGGAAATTC
GM-CSF	GGGAATACC
G-CSF	GGGGAATCTC
M-CSF	GGGACTTTCC
IL-2	GGGATTTAC
IL-8	TGGAATTTCC
TNF-α	GGGGCTTTCC
uPA	GGGAAAGTAC
czynnik tkankowy	CGGAGTTTCC
receptor limfocytów T β	GGGAGATTTCC
ELAM-1	GGGGATTTCC

R=puryna, Y=pirymidyna, N=dowolna zasada. Czerwoną czcionką zaznaczono zasady tworzące oś kompleksu białko/DNA. Zieloną zaznaczono zasady, które nie pokrywają się z sekwencją konsensową NFκB.

padku działania kinazy PKC. Fosforylowana podjednostka p65 oddziałuje z podstawowymi czynnikami transkrypcyjnymi tj. TBP, TFIIB i TAF105 [39].

Białko NFκB, a w szczególności p65 ulega również innej modyfikacji kowalencyjnej – acetylacji. Wydaje się, że fosforylacja p65 umożliwia przyłączenie do NFκB białek o aktywności acetylaz, HAT (ang. *histone acetyl transferase*). Wykazano, że PKA fosforylując resztę seryny w pozycji 276 wywołuje wzrost aktywności transkrypcyjnej p65 przez wzmocnienie oddziaływania z transkrypcyjnym aktywatorem CBP (*c-AMP responsive element binding protein*)/p300 [22, 40], a także z innym białkiem o aktywności acetylotransferazy – aktywatorem p/CAF (ang. *CBP associated factor*) [41]. Acetylacja p65 negatywnie wpływa na wydajność oddziaływania z IκBα [42]. Dopiero deacetylacja p65 z udziałem deacetylazy histonowej 3 (HDAC3) umożliwia przyłączenie IκBα i eksport do cytoplazmy i w konsekwencji hamowanie aktywności NFκB.

ODDZIAŁYWANIA Z INNYMI CZYNNIKAMI TRANSKRYPCYJNYMI

Różne podjednostki NFκB stymulują transkrypcję w różny sposób, ponieważ istnieje niewielka homologia ich domen odpowiedzialnych za aktywację transkrypcji. O tym, że poszczególne podjednostki mogą uczestniczyć w aktywacji różnych genów świadczą doświadczenia, w których inaktywacja genów (ang. *knockouts*) kodujących podjednostki NFκB dawała różne fenotypy [43]. Następnym poziomem regulacji polega na oddziaływaniu za pomocą domeny aktywacji transkrypcji z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, takimi które są specyficzne tylko dla danej tkanki lub pojawiają się w jądrze komórkowym w odpowiedzi na sygnał przekazywany przez określony szlak sygnalizacji komórkowej. Na przykład, podjednostka p65 oddziałuje z podjednostką c-Jun białka AP-1 [26, 44], czynnikiem transkrypcyjnym C/EBPβ (ang. *CCAAT/enhancer binding protein beta*) [45], Sp1 (ang. *specificity protein 1*) [46] i IRF-1 (ang. *interferon regulatory factor-1*) [47]. Efektem tych oddziaływań jest kooperatywne wiązanie DNA powodujące podwyższenie poziomu transkrypcji, a więc jest to dodatkowy poziom specyficzności odpowiedzi z udziałem NFκB. Niektóre z tych oddziaływań możliwe są w obrębie miejsca wiązania NFκB, jak na przykład opisane wcześniej oddziaływanie p50/p65 z HMG I(Y) w promotorze interferonu β. Podobną sytuację obserwujemy w promotorze interleukiny-2 (IL-2), w którym z tzw. elementem CD28, CD28RE (ang. *CD28 response element*) wiążą się homodimer c-Rel i HMG I(Y) umożliwiając synergistyczną aktywację genu IL-2 [48].

Wiele genów ulega ekspresji tylko wówczas, gdy wszystkie wymagane czynniki transkrypcyjne są związane z rejonem regulatorowym tworząc złożone kompleksy. Przyłączenie wyłącznie NFκB może być niewystarczające, aby wystąpiła ekspresja genu na poziomie potrzebnym do realizacji określonej funkcji w komórce. W ten sposób aktywność NFκB jest zintegrowana z różnymi szlakami sygnalizacji wewnątrzkomórkowej i to, które geny ulegają aktywacji zależy od typu komórki i jej otoczenia. Kompleksy aktywne transkrypcyjnie stanowią również bazę dla kowalencyj-

nych modyfikacji histonów, wywołujących lokalne zmiany w strukturze chromatyny.

AKTYWACJA GENÓW Z UDZIAŁEM NFκB WYMAGA WIELE KOAKTYWATORÓW

Białka jądrowe zwane koaktywatorami pełnią w procesie transkrypcji dwie bardzo istotne funkcje: modyfikują chromatynę oraz łączą ze sobą czynniki transkrypcyjne rozpoznające specyficzne sekwencje nukleotydowe, z podstawowymi czynnikami transkrypcyjnymi. Aktywacja genów z udziałem czynnika transkrypcyjnego NFκB wymaga szeregu koaktywatorów. Inaktywacja CBP (ang. *cyclic AMP response element binding protein; [CREB]- binding protein*), koaktywatorów grupy p160 lub białka p/CAF uniemożliwia aktywację transkrypcji zależną od NFκB. Interesująca wydaje się obserwacja, że żaden z tych koaktywatorów osobno nie jest wystarczający, aby *in vivo* powstał funkcjonalny kompleks.

RÓŻNE PODJEDNOSTKI BIAŁKA NFκB – RÓŻNE KOAKTYWATORY

Homodimer p50 nie przyłącza koaktywatorów. Kompleks koaktywatorów charakterystyczny dla p50/p65 jest zbliżony do kompleksu, jaki powstaje z receptorami jądrowymi. Aktywacja transkrypcji z udziałem p65 wymaga przyłączenia CBP lub jego homologu strukturalnego p300 [49,50]. Dla ekspresji genów zależnej od heterodimeru p50/p65 istotne są trzy regiony CBP. Rejon N-końcowy CBP oddziałuje z podjednostką p65. Fosforylacja białka p65 z udziałem PKA wzmacnia to oddziaływanie [40,51]. CBP za pośrednictwem rejonu N-końcowego może oddziaływać z różnymi czynnikami transkrypcyjnymi, przez co uważa się, że białko to funkcjonuje jako integrator sygnałów na poziomie transkrypcji przez koordynację różnych szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Współzawodnictwo o CBP pomiędzy różnymi czynnikami transkrypcyjnymi może regulować aktywację transkrypcji z udziałem białka NFκB zawierającego w swoim składzie podjednostkę p65 [6]. Drugi krytyczny rejon CBP to segment C/H3, który oddziałuje z adenowirusową onkoproteiną E1A [52], polimerazą RNA II [53] oraz p/CAF. p/CAF został znaleziony w kompleksie składającym się z ponad 20 białek [54]. Aktywator ten ma w rejonie N-końcowym unikalną domenę, która może oddziaływać z wieloma białkami jądrowymi, w tym CBP, SRC-1 / NCoA-1 oraz z receptorami jądrowymi. Trzeci ważny fragment CBP znajduje się w rejonie C-końcowym białka i oddziałuje z koaktywatorami z rodziny p160 np. z białkiem SRC-1 / NCoA-1 (ang. *steroid receptor coactivator 1 / nuclear receptor coactivator-1*). Oddziaływanie to odbywa się za pośrednictwem dwóch domen helikalnych zawierających sekwencje LXXLL [55]. Białko SRC-1/NCoA-1 oddziałuje również z podjednostką p50, ale tylko, jeśli jest ona składnikiem heterodimeru NFκB [56]. Prawdopodobnie przyłączenie koaktywatora SRC-1 do podjednostki p50 umożliwia wiązanie CBP. Z kolei oddziaływanie CBP z podjednostką p65 wzmacnia wiązanie SRC-1/NCoA-1 z p50 i CBP. Również inne białka z grupy p160 uczestniczą w ekspresji genów zależnej od NFκB np. GRIP-1 (ang. *glucocorticoid receptor interaction protein-1*) oraz TIF-2 (ang. *transcriptional intermediate factor-2*) [57].

KOAKTYWATORY PRZYŁĄCZANE PRZEZ NFκB REGULUJĄ TRANSKRYPCJĘ PRZEZ INTEGRACJĘ SYGNAŁÓW I MODYFIKACJĘ STRUKTURY CHROMATYNY

Jedną z głównych modyfikacji chromatyny pozwalających na specyficzną ekspresję genów jest reakcja acetylacji grupy ε-aminowej reszt lizyny histonów. Powoduje ona osłabienie oddziaływania elektrostatycznego pomiędzy białkami histonowymi i DNA, co w konsekwencji oznacza rozluźnienie chromatyny w miejscach modyfikowanych i umożliwia przyłączenie czynników transkrypcyjnych. CBP oraz p/CAF [58,59] mają domenę HAT o bardzo dużej aktywności, natomiast SRC-1 ma niską aktywność HAT [60]. CBP może oddziaływać z białkami rodziny p160 oraz białkiem p/CAF, co sugeruje możliwość powstania kompleksu ze zwielokrotnioną aktywnością HAT. Tymczasem okazuje się, że poszczególne czynniki transkrypcyjne wymagają aktywności HAT określonego koaktywatora. Np. czynnik transkrypcyjny CREB wymaga aktywności HAT koaktywatora CBP [61], podczas gdy czynnik transkrypcyjny MyoD [62], niektóre receptory jądrowe oraz czynnik transkrypcyjny NFκB wymagają aktywności HAT białka p/CAF [57]. Wynika z tego, że istnieje selektywność nie tylko na poziomie wyboru koaktywatora, ale również na poziomie wykorzystania określonych funkcji tych białek.

POWSTAWANIE KOMPLEKSU AKTYWNEGO TRANSKRYPCYJNIE ZALEŻNEGO OD NFκB

Najlepiej poznanym przykładem kompleksu aktywnego transkrypcyjnie (ang. *enhanceosome*) jest kompleks opisany dla genu IFN-β [63]. Przykładem kompleksu, którego powstanie wydaje się zależeć od NFκB jest kompleks tworzony w regionie regulatorowym genu kodującego inhibitor apoptozy Bfl-1/A1 [64] (Rys. 4). Wcześniej wykazano, że czynniki indukujące NFκB wywołują wzrost ekspresji genu *bfl-1* w różnych komórkach [65]. Pojedyncze miejsca κB jest odpowiedzialne za powstawanie kompleksu przez kooperatywne wiązanie NFκB (p50/c-Rel), a następnie C/EBPβ i AP-1, a także HMGI-C, koaktywatorów transkrypcji (p300, TAFII250), czynników modyfikujących chromatynę BRG-1 (SWI/SNF) oraz czynników tzw. maszynierii podstawowej, TBP i TFIIB (Rys. 4). Wykazano, że dla stabilności powstałego kompleksu istotna jest orientacja miejsca κB. Przeniesienie miejsca κB na drugą stronę helisy DNA destabilizuje kompleks. Chociaż kontakt AP-1 i C/EBPβ z DNA nie jest absolutnie konieczny przy tworzeniu kompleksu *in vitro*, to jednak zarówno oddziaływania białko-białko jak i białko-DNA wydają się być konieczne dla powstania kompleksu zdolnego do optymalnej aktywacji ekspresji genu *bfl-1* *in vivo*. Jednoczesne zaangażowanie NFκB, AP-1 i C/EBPβ w ekspresję genu *bfl-1* odgrywa istotną rolę w hamowaniu apoptozy komórek układu immunologicznego.

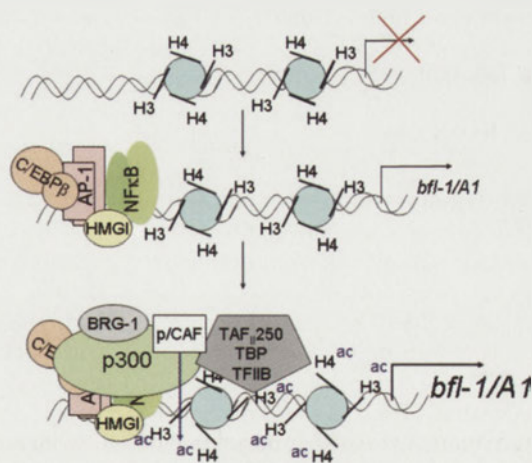
HAMOWANIE AKTYWNOŚCI NFκB

W komórkach istnieje wiele negatywnych sprzężeń zwrotnych gwarantujących, że aktywacja NFκB, a w szczególności aktywacja dimerów z udziałem podjednostki p65, jest przejściowa i samoograniczająca się. NFκB aktywuje geny, które kodują białka będące inhibitorami aktywności

NFκB np. IκBα [66]. Pozwala to na ponowną syntezę inhibitora po jego degradacji. Białko IκBα ma sekwencję lokalizacji jądrowej i sekwencję eksportu, a więc może przemieszczać się do jądra komórkowego, usuwać NFκB z regionów regulatorowych genów i przenosić je do cytoplazmy [10,67]. Nie bez znaczenia dla mechanizmów regulacyjnych ma ilość IκBα oraz lokalizacja komórkowa tego inhibitora. Wydaje się, że zarówno ilość jak i lokalizacja są charakterystyczne dla typu komórki i stanu, w jakim znajduje się komórka. W spoczynkowych neutrofilach bardzo dużo cząsteczek IκBα występuje w jądrze komórkowym, natomiast w monocytach i w wielu innych komórkach inhibitor ten, występujący w mniejszej ilości, zlokalizowany jest głównie w cytoplazmie [68,69]. W odpowiedzi na cząsteczki zapalne IκBα może być degradowany zarówno w cytoplazmie jak i jądrze komórkowym [69].

Efekt hamujący mogą wykazywać niektóre podjednostki NFκB. Powstanie homodimerów p50 lub p52, po pierwsze usuwa te podjednostki z puli podjednostek, które mogą tworzyć aktywne dimery NFκB, po drugie wiążąc miejsca κB homodimery blokują ekspresję genów, ze względu na brak domen aktywacji transkrypcji zarówno w p50 jak i w p52. Podobnie RelB usuwa z puli podjednostkę p65 tworząc z nią heterodimer, który z kolei nie ma zdolności wiązania DNA. Wykazano, że aby otrzymać odpowiedź z udziałem aktywowanych komórek T konieczna jest proteolityczna degradacja RelB [70].

Istotną rolę w hamowaniu aktywacji transkrypcji z udziałem NFκB odgrywają korepresory o aktywności HDAC. HDAC1 bezpośrednio oddziałuje z domeną homologii Rel podjednostki p65, co ogranicza ekspresję genów zależnych od NFκB np. IL-8. HDAC2 nie wiąże NFκB bezpośrednio, ale reguluje aktywność NFκB poprzez asocjacje z HDAC1 [71]. Inne białko z grupy deacetylaz histonowych, HDAC3



Rysunek 4. Regulacja ekspresji *bfl-1/A1* przez kompleks zależny od NFκB. W komórkach w stanie spoczynku białka histonowe w regionie regulatorowym *bfl-1/A1* nie są acetylowane i gen nie ulega ekspresji. W wyniku stymulacji komórek np. przez cytokiny czynnik transkrypcyjny NFκB (p50/c-Rel) wędruje do jądra, wiąże się z regionem regulatorowym genu zapoczątkowując powstanie kompleksu aktywnego transkrypcyjnie. Przyłączane są inne czynniki (AP-1, C/EBPβ, HMGI), co z kolei powoduje rekrutację koaktywatorów zdolnych do acetylacji histonów i wiązania czynników tzw. maszynierii podstawowej. Powstanie tego złożonego kompleksu uruchamia ekspresję *bfl-1/A1*. *Bfl-1/A1* odgrywa istotną rolę w ochronie komórek układu immunologicznego przed apoptozą.

deacetyluje podjednostkę p65, co umożliwia przyłączenie I κ B α i eksport do cytoplazmy [42]. Represja z udziałem HDAC wydaje się być istotnym mechanizmem hamowania aktywności transkrypcyjnej NF κ B w jądrze komórkowym.

Istnieją również mechanizmy, które ograniczają rozprzestrzenianie się odpowiedzi z udziałem czynnika transkrypcyjnego NF κ B. Przeciwwapalna cytokina IL-10 hamuje zarówno aktywność IKK jak i wiązanie NF κ B z DNA [72]. Podobnie indukowana przez NF κ B ekspresja genu kodującego cyklooksygenazę 2 (COX-2) powoduje powstawanie pochodnej prostaglandyny, która z kolei hamuje aktywność IKK [73]. Receptory glukokortykoidów, działające przeciwzapalnie i antyproliferacyjnie, wpływają również na aktywność czynnika transkrypcyjnego NF κ B. Odbywa się to przez indukcję ekspresji I κ B α [74,75] lub przez bezpośrednie oddziaływanie z NF κ B [76]. Stwierdzono również, że jedna z domen receptorów glukokortykoidów odpowiedzialna za dimeryzację i wiązanie z DNA może wiązać domenę dimeryzacji p65 [77]. Ponadto, receptory glukokortykoidów współzawodniczą z NF κ B o CBP/p300, przez co zmniejszają aktywację transkrypcji z udziałem NF κ B.

Innym mechanizmem ograniczającym aktywność NF κ B jest oddziaływanie z białkiem p202a indukowanym przez interferon α . Interesujący jest fakt, że interferon α może również aktywować NF κ B przez uruchamianie degradacji I κ B α . Aktywacja NF κ B rozpoczyna się już po kilku minutach od stymulacji interferonem i trwa około 4 godzin [78]. Natomiast hamowanie aktywności NF κ B przez białko p202a następuje po kilkunastu godzinach i utrzymuje się przez około 48 godzin [79]. Białko p202a jest zaangażowane w proliferację i apoptozę, a także w proces różnicowania prowadzący do powstania komórek mięśniowych. Hamuje aktywność wielu czynników transkrypcyjnych np. zdolność do wiązania się z DNA białek c-Fos, c-Jun, E2F1, E2F4, MyoD i c-Myc. W przypadku NF κ B, białko p202a wiąże się z podjednostkami p50 i p65 i hamuje wiązanie z DNA aktywnego transkrypcyjnie heterodimeru p50/p65 oraz homodimeru p65 oraz wzmacnia wiązanie z DNA nieaktywnego homodimeru p50 [80].

UWAGI KOŃCOWE

Geny regulowane przez czynnik transkrypcyjny NF κ B są bardzo różnorodne. Należą do nich geny kodujące białka kontrolujące odpowiedź immunologiczną organizmu i stany zapalne, geny antyapoptotyczne i geny kodujące białka regulujące proliferację komórki, a także białka hamujące aktywność NF κ B [81]. Zaburzenia w mechanizmach regulacyjnych, które kontrolują specyficzność i zakres odpowiedzi z udziałem NF κ B są przyczyną powstawania i rozwoju szeregu chorób np. autoimmunologicznych. Konstytutywna aktywacja dimerów NF κ B jest istotnym elementem procesów związanych z rozwojem nowotworów m.in. poprzez zwiększenie proliferacji komórek, hamowanie apoptozy, metastazę komórek nowotworowych i angiogenezę. Z kolei całkowite zahamowanie aktywności NF κ B może prowadzić do braku odporności immunologicznej [82]. Z tego powodu konieczne jest zbadanie różnych dróg aktywacji NF κ B, w różnych typach komórek oraz określenie ich roli w powstawaniu i rozwoju chorób tak, aby w każdym przypadku

można było ustalić najbardziej korzystną strategię leczenia. Poszerzenie wiedzy o mechanizmach działania białek NF κ B, biorąc pod uwagę ich specyficzność i selektywność, może doprowadzić do odkrycia nowych leków, które będą stosowane w leczeniu stanów zapalnych lub będą wspierać terapię przeciwnowotworową.

PIŚMIENNICTWO

1. Sen R, Baltimore D (1986) Multiple nuclear factors interact with immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46: 705-716
2. Doszczak MM, Kaszubowska L, Pierchalski A, Bigda J (2002) Mechanizm aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF κ B przez czynnik martwicy nowotworu (TNF). *Post Biochem* 48: 54-65
3. Bouwmeester T, i wsp. (2004) A physical and functional map of the human TNF- α /NF κ B signal transduction pathway. *Nature* 6: 97-105
4. Chen G, Cao P, Goeddel DV (2002) TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell* 9: 401-410
5. Ben-Neriah Y (2002) Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol* 3: 20-26
6. Hottiger MO, Felzien LK, Nabel GJ (1998) Modulation of cytokine-induced HIV gene expression by competitive binding of transcription factors to the co-activator p300. *EMBO J* 17: 3124-3134
7. Sachdev S, Bagchi S, Zhang DD, Mings AC, Hannink M (2000) Nuclear import of I κ B α is accomplished by a ran-independent transport pathway. *Mol Cell Biol* 20: 1571-1582
8. Turbin P, Hay RT, Dargemont C (1999) Characterization of I κ B α nuclear import pathway. *J Biol Chem* 274: 6804-6812
9. Malek S, Chen Y, Huxford T, Gosh G (2001) I κ B β , but not I κ B α , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κ B dimers by masking both NF- κ B nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem* 276: 45225-45235
10. Huang TT, Kudo N, Yoshida M, Miyamoto S (2000) A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B α controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/I κ B α complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1014-1019
11. Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL, Dargemont C (1997) Nuclear localization of I κ B α promotes active transport of NF κ B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 110: 360-378
12. Harhaj EW, Sun SC (1999) Regulation of RelA subcellular localization by a putative nuclear export signal and p50. *Mol Cell Biol* 19: 7088-7095
13. Cheng JD, Ryseck RP, Attar RM, Dambach D, Bravo R (1998) Functional redundancy of the nuclear factor kappa B inhibitors I κ B α and I κ B β . *J Exp Med* 188: 1055-1062
14. Chen Y, Wu J, Ghosh G (2003) κ B-Ras binds to the unique insert within the ankyrin repeat domain of I κ B β and regulates cytoplasmic retention of I κ B β /NF- κ B complexes. *J Biol Chem* 278: 23101-23106
15. Chen Y, Vallee S, Wu J, Vu D, Sondek J, Ghosh G (2004) Inhibition of NF- κ B activity by I κ B β in association with kappaB-Ras. *Mol Cell Biol* 24: 3048-3056
16. Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D (2002) The I κ B α -NF- κ B signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 298: 1241-1245
17. Bourke E, Kennedy EJ, Moynagh PN (2000) Loss of I κ B β is associated with prolonged NF- κ B activity in human glial cells. *J Biol Chem* 275: 39996-40002.
18. Hiscott J, Kwon H, Genin P (2001) Hostile takeovers: viral appropriation of the NF- κ B pathway. *J Clin Invest* 107: 143-151.
19. Stasiolek M, Gavrilyuk V, Sharp A, Horvath P, Selmaj K, Feinstein DL (2000) Inhibitory and stimulatory effects of lactacystin on expression of nitric oxide synthase type 2 in brain glial cells. The role of I κ B β . *J Biol Chem* 275: 24847-24856

20. Moorthy AK, Ghosh G (2003) p105I κ B γ and prototypical I κ Bs use a similar mechanism to bind but a different mechanism to regulate the subcellular localization of NF κ B. *J Biol Chem* 278: 556-566
21. Lernbecher T, Kistler B, Wirth T (1994) Two distinct mechanisms contribute to the constitutive activation of RelB in lymphoid cells. *EMBO J* 13: 4060-4069
22. Perkins ND (1997) Achieving transcriptional specificity with NF κ B. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1433-1448
23. Zhong H, May MJ, Nimi E, Ghosh S (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell* 9: 625-636
24. Marienfeld R, May MJ, Berberich I, Serfling E, Ghosh S, Neumann M (2003) RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *J Biol Chem* 278: 19852-19860
25. Kunsch C, Ruben SM, Rosen CA (1992) Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12: 4412-4421
26. Berkowitz B, Huang DB, Chen-Park FE, Sigler PB, Ghosh G (2002) The x-ray crystal structure of the NF-kappa B p50.p65 heterodimer bound to the interferon beta -kappa B site. *J Biol Chem* 277: 24694-24700
27. Moll T, Czyz M, Holzmuller H, Hofer-Warbinek R, Wagner E, Winkler H, Bach FH, Hofer E (1995) Regulation of the tissue factor promoter in endothelial cells. *J Biol Chem* 270: 3849-3857
28. Chen-Park FE, Huang DB, Noro B, Thanos D, Ghosh G (2002) The kappa B DNA sequence from the HIV long terminal repeat functions as an allosteric regulator of HIV transcription. *J Biol Chem* 277: 24701-24708
29. Chen YQ, Ghosh S, Ghosh G (1998) A novel DNA recognition mode by the NF-kappa B p65 homodimer. *Nat Struct Biol* 5: 67-73
30. Cramer P, Larson CJ (1997) Structure of the human NF-kappaB p52 homodimer-DNA complex at 2.1 Å resolution. *EMBO J* 16: 7078-7090
31. Ghosh G (1995) *Nature* 373: 303-310.
32. Muller CW, Rey FA, Sodeoka M, Verdine GL, Harrison SC (1995) Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* 373: 311-317
33. Naumann M, Scheiderei C (1994) Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *EMBO J* 13:4597-4607
34. Li CC, Dai RM, Chen E, Longo DL (1994) Phosphorylation of NF-KB1-p50 is involved in NF-kappa B activation and stable DNA binding. *J Biol Chem* 269: 30089-30092
35. Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W (1999) IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem* 274: 30353-30356
36. Madrid LV, Wang CY, Guttridge DC, Schottelius AJ, Baldwin AS, Mayo MW (2000) Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 20: 1626-1638
37. Wang D, Baldwin AS Jr (1998) Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem* 273: 29411-29416.
38. Wang D, Westerheide SD, Hanson JL, Baldwin AS Jr (2000) Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem* 275: 32592-32597
39. Xu X, Prorock C, Ishikawa H, Maldonado E, Ito Y, Gelinas C (1993) Functional interaction of the v-Rel and c-Rel oncoproteins with the TATA-binding protein and association with transcription factor IIB. *Mol Cell Biol* 13: 6733-6741
40. Zhong H, Voll RE, Ghosh S (1998) Phosphorylation of NF κ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the co-activator CBP/p300. *Mol Cell* 1: 661-671
41. Sheppard K-A, Rose DW, Haque ZK, Kurokawa R, McInerney E, Westin S, Thanos D, Rosenfeld MG, Glass CK, Collins T (1999) Transcriptional activation by NF- κ B requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol* 19: 6367-6378
42. Chen L, Fischle W, Verdin E, Greene WC (2001) Duration of nuclear NF- κ B action regulated by reversible acetylation. *Science* 293: 1653-1657
43. Gerondakis S, Grossmann M, Nakamura Y, Pohl T, Grumont R (1999) Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. *Oncogene* 18: 6888-6895
44. Stein B, Baldwin AS Jr, Ballard DW, Greene WC, Angel P, Herrlich P (1993) Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J* 12:3879-3891
45. Stein B, Cogswell PC, Baldwin AS Jr. (1993) Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol Cell Biol* 13: 3964-3974
46. Perkins ND, Edwards NL, Duckett CS, Agranoff AB, Schmid RM, Nabel GJ (1993) A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J*. 12: 3551-3558
47. Neish AS, Read MA, Thanos D, Pine R, Maniatis T, Collins T (1995) Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF-kappa B as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1. *Mol Cell Biol* 15: 2558-2569
48. Himes SR, Coles LS, Reeves R, Shannon MF (1996) High mobility group protein I(Y) is required for function and for c-Rel binding to CD28 response elements within the GM-CSF and IL-2 promoters. *Immunity* 5: 479-489
49. Gerritsen ME, Williams AJ, Neish AS, Moore S, Shi Y, Collins T (1997) CREB-binding protein/p300 are transcriptional co-activators of p65. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2927-2932
50. Perkins ND, Felzien LK, Betts JC, Leung K, Beach DH, Nabel GJ (1997) Regulation of NF κ B by cyclin-dependent kinases associated with the p300 co-activator. *Science* 275: 523-527
51. Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Gosh S (1997) The transcriptional activity of NF κ B is regulated by the I κ B-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 89: 413-424
52. Yang XJ, Ogrzyk VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382: 319-324
53. Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, Le CG, Hurwitz J, Parvin JD, Montminy M (1997) RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* 90: 1107-1112
54. Vassilev A, Yamauchi J, Kotani T, Prives C, Avantaggiati ML, Qin J, Nakatani Y (1998) The 400 kDa subunit of the pCAF histone acetylase complex belongs to the ATM superfamily. *Mol Cell* 2: 869-875
55. McInerney EM, Rose DW, Flynn SE, Westin S, Mullen TM, Krones A, Inostroza J, Torchia J, Nolte RT, Assa-Munt N, Milburn MV, Glass CK, Rosenfeld MG (1998) Determinants of co-activator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev* 12: 3357-3368
56. Na S-Y, Lee S-K, Han S-J, Choi H-S, Im S-Y, Lee JW (1998) Steroid receptor co-activator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor κ B-mediated transactivation. *J Biol Chem* 273: 10831-10834
57. Sheppard K-A, Rose DW, Haque ZK, Kurokawa R, McInerney E, Westin S, Thanos D, Rosenfeld MG, Glass CK, Collins T (1999) Transcriptional activation by NF- κ B requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol* 19: 6367-6378
58. Ogrzyzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996) The transcriptional co-activators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87: 953-959
59. Bannister AJ, Kouzarides T (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384: 641-643
60. Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Assis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1997) Steroid receptor co-activator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 289: 194-198

61. Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, Mullen TM, Glass CK, Rosenfeld MG (1998) Transcription factor specific requirement of co-activators and their acetyltransferase functions. *Science* 279: 703-707
62. Puri PL, Sartorelli V, Yang X-J, Hamaori Y, Ogryzko VV, Howard BH, Kedes L, Wang JYJ, Graessmann A, Nakatani Y, Levvero M (1997) Differential roles of p300 and pCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell* 1: 35-45
63. Yie J, Senger K, Thanos D (1999) Mechanism by which the IFN- β enhansome activates transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13108-13113
64. Edelstein LC, Lagos L, Simmons M, Tirumalai H, Gelinas C (2003) NF κ B-dependent assembly of an enhanceosome-like complex on the promoter region of apoptosis inhibitor Bfl-1/A1. *Mol Cell Biol* 23: 2749-2761
65. Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gelinas C (1999) The pro-survival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF κ B that blocks TNF α -induced apoptosis. *Genes Dev* 13: 382-387
66. Baldwin AS Jr (1996) The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev Immunol* 14: 649-683
67. Johnson C, Van Antwerp D, Hope TJ (1999) An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of I κ B α . *EMBO J* 18: 6682-6693
68. Vancurova I, Miskolci V, Davidson D (2001) NF- κ B activation in tumor necrosis factor alpha-stimulated neutrophils is mediated by protein kinase C δ . Correlation to nuclear I κ B α . *J Biol Chem* 276: 19746-19752
69. Castro-Alcaraz S, Miskolci V, Kalasapudi B, Davidson D, Vancurova I (2002) NF- κ B regulation in human neutrophils by nuclear I κ B α : correlation to apoptosis. *J Immunol* 169: 3947-3953
70. Marienfeld R, Berberich-Siebelt F, Berberich I, Denk A, Serfling E, Neumann M (2001) Signal-specific and phosphorylation-dependent RelB degradation: a potential mechanism of NF- κ B control. *Oncogene* 20: 8142-8147
71. Ashburner BP, Westerheide SD, Baldwin AS Jr (2001) The p65 (RelA) subunit of NF- κ B interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol* 21: 7065-7077
72. Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS Jr (1999) Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of κ B kinase activity and nuclear factor κ B DNA binding. *J Biol Chem* 274: 31868-31874
73. Poligone B, Baldwin AS (2001) Positive and negative regulation of NF- κ B by COX-2: roles of different prostaglandins. *J Biol Chem* 276: 38658-38664
74. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmsberg A, Karin M (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 270: 286-290.
75. Almawi WY, Melemedjian OK (2002) Negative regulation of nuclear factor- κ B activation and function by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol* 28: 69-78
76. Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, Rice N, Okamoto S, Kasahara T, Matsushima K (1994) Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor- κ B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem* 269:13289-13295
77. Nissen RM, Yamamoto KR (2002) The glucocorticoid receptor inhibits NF κ B by interfering with serine-2 phosphorylation of RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 14: 2314-2329
78. Yang CH, Murti A, Pfeffer SR, Basu L, Kim JG, Pfeffer LM (2000) IFN- α /beta promotes cell survival by activating NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13631-13636
79. Min W, Ghosh S, Lengyel P (1996) The interferon-inducible p202 protein as a modulator of transcription: inhibition of NF- κ B, c-Fos, and c-Jun activities. *Mol Cell Biol* 16: 359-368
80. Ma X-Y, Wang H, Ding B, Zhong H, Gosh S, Lengyel P (2003) The interferon-inducible p202a protein modulates NF κ B activity by inhibiting the binding to DNA of p50/p65 heterodimers and p65 homodimers while enhancing the binding of p50 homodimers. *J Biol Chem* 278: 23008-23019
81. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW (2002) NF κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Rev Cancer* 2: 301-310
82. Greten FR, Karin M (2004) The IKK/NF- κ B activation pathway – a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* 206: 193-199

Specificity and selectivity of the NF κ B response

Małgorzata Czyż[✉]

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

[✉]e-mail: mczyz@csk.am.lodz.pl

Key words: regulation of transcription, NF κ B, gene expression, transcription factors, covalent modifications

ABSTRACT

NF κ B target genes are very diverse. This transcription factor regulates expression of the genes which are involved in immunity and inflammation, cell proliferation and apoptosis, as well as genes that encode negative regulators of NF κ B. Detected in the cytoplasm of almost all cell types, NF κ B is activated in response to several external stimuli, including interleukines, growth factors, viral and bacterial infections, and physical factors (e.g. UV light). Constitutively activated NF κ B has been associated with many aspects of tumour development, including promoting cancer cell proliferation, preventing apoptosis, and increasing a tumour's angiogenic and metastatic potential. The inhibition of NF κ B activity, in turn, may affect the induction of genes that are required for immunity. Dimeric NF κ B proteins, show high specificity and selectivity. This is why not all NF κ B-dependent genes are expressed in every cell. In this review, specificity and selectivity of the NF κ B response are presented as a result of a combination of many regulatory mechanisms.

Insulinopodobny czynnik wzrostu i białka z nim współdziałające

STRESZCZENIE

Insulinopodobny czynnik wzrostu - IGF-I jest małym 70-aminokwasowym peptydem o działaniu mitogennym, biorącym udział w procesach wzrastania, kancerogenezy, apoptozy, gojenia ran i wielu innych. Jest składnikiem tzw. 'osi somatotropowej GH-IGF', w skład której wchodzi również wiele innych czynników. Jest ona odpowiedzialna za regulację procesów metabolicznych, a jej właściwe funkcjonowanie warunkuje homeostazę organizmu. Niniejsza praca przedstawia syntetyczny przegląd literatury dotyczącej budowy, funkcji oraz ekspresji IGF-I, a także białek wpływających na regulację jego aktywności, syntezy i krążenia.

WPROWADZENIE

Wzrost jest zmianą makroskopową, którą można zaobserwować u wszystkich organizmów żywych, polegającą na zwiększaniu się liczby oraz wymiarów komórek. Reguluje go szereg czynników wewnętrznych, takich jak hormony, cząsteczki sygnałowe, białka regulatorowe, enzymy oraz czynniki środowiskowe, jak również dostarczane z pożywieniem: pierwiastki, witaminy czy aminokwasy. Nieprawidłowości związane z zaburzeniami wzrastania wpływają na metabolizm organizmu i są przyczyną licznych schorzeń. Głównymi regulatorami procesu wzrastania są hormon wzrostu i insulinopodobny czynnik wzrostu IGF-I [1-3].

Linearny wzrost organizmu człowieka zachodzi podczas jego rozwoju. Proces ten wynika z kostnienia śródchrzęstnego w płytkach wzrostu kości długich i jest głównie regulowany przez ogólnoustrojowe hormony i czynniki para- i autokryne.

Wśród czynników wpływających na wzrost człowieka, poza hormonem wzrostu i IGF-I, ważną rolę odgrywają: hormony podwzgórza stymulujące lub hamujące wydzielanie hormonu wzrostu, białka wiążące hormon wzrostu, receptor hormonu wzrostu, białka wiążące insulinopodobne czynniki wzrostu oraz ich receptory. Poza tym istotny wpływ mają inne hormony, takie jak androgeny, estrogeny, hormony tarczycy, insulina, glukokortykosteroidy, hormon adrenokortykotropowy, oraz leptyna i dieta [4].

WPLYW HORMONU WZROSTU NA METABOLIZM ORGANIZMU

Hormon wzrostu (GH) reguluje postnatalny rozwój organizmu poprzez oddziaływanie na liczne procesy komórkowe odpowiedzialne za wzrost i metabolizm tkanki tłuszczowej, mięśni szkieletowych oraz kości. Białko to ma wpływ na katabolizm tłuszczów (poprzez indukcję lipolizy w adipocytach), oksydację lipidów i węglowodanów, wzrost zużycia glukozy oraz efekt przeciwinulinowy w mięśniach [5,6]. Ponadto reguluje stężenie krążących we krwi wolnych kwasów tłuszczowych i ketokwasów, stanowiących dostępne źródło energii podczas hipoglikemii. U chorych z niedoborem hormonu wzrostu podawanie hormonu prowadzi do spadku poziomu triglicerydów w surowicy i wzrostu poziomu lipoprotein o wysokiej gęstości - HDL oraz cholesterolu [7]. Lipoproteiny o niskiej gęstości - LDL i cholesterol u osób zdrowych były zredukowane o 10-30% [8]. Egzogeny hormon wzrostu zmniejsza tłuszczową, a zwiększa beztłuszczową masę ciała [9]. Działania te zachodzą przy współdziałaniu hormonu wzrostu i IGF-I.

Aleksandra Obrepalska-
Sęplowska^{1,2}

Łukasz Durzyński²

Anna Goździcka-Józefiak²

¹Międzyzakładowa Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Ochrony Roślin, Poznań

²Zakład Wirusologii Molekularnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

³Międzyzakładowa Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Ochrony Roślin, ul. Miecuzina 20, 60-318 Poznań, e-mail: ao.stepowska@ior.poznan.pl, tel. (61) 864 90 90

Artykuł otrzymano 24 czerwca 2004

Artykuł zaakceptowano 7 października 2004

Słowa kluczowe: insulinopodobny czynnik wzrostu - IGF-I, oś somatotropowa, przekaz sygnału wywołany IGF-I, IGFBP

Wykaz skrótów: ADAM9 - (ang. *a disintegrin and metalloproteinase 9*) - metaloproteaza; ALS - (ang. *acid-labile subunit*) - podjednostka kwasowolabilna; C/EBP - (ang. *CCAAT/enhancer binding protein*) - czynnik transkrypcyjny; ERK 1/2 - (ang. *extracellular-signal regulated kinase*) - kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym; FHL - (ang. *four-and-a-half LIM domains*) - białko zawierające 4,5 domeny LIM; GH - (ang. *growth hormone*) - hormon wzrostu; GHR - (ang. *growth hormone receptor*) - receptor dla hormonu wzrostu; HDL - (ang. *high density lipoprotein*) - lipoproteina o wysokiej gęstości; HNF 1/3 - (ang. *hepatocyte nuclear factor 1/3*) - czynnik transkrypcyjny; HS3D - (ang. *3 hypersensitive DNA-se site*) - miejsca wrażliwe na trawienie DNA-za; IGF-1/II - (ang. *insulin-like growth factor-I/II*) - insulinopodobny czynnik wzrostu 1/II; IGF-1/IIr - (ang. *insulin-like growth factor-I/II receptor*) - receptor insulinopodobny czynnika wzrostu 1/II; IGFBP - (ang. *insulin growth factor binding protein*) - białko wiążące IGF; IR - (ang. *insulin receptor*) - receptor insulinowy; IRBP - (ang. *insulin-responsive binding protein*) - białko wiążące wrażliwe na insulinę; IRS-1/2 - (ang. *insulin receptor substrate 1/2*) - substrat receptora insulinowego 1/2; LDL - (ang. *low density lipoprotein*) - lipoproteina o niskiej gęstości; M-6-P - mannozo-6-fosforan; MAP - (ang. *mitogen-activated protein*) - białko aktywowane przez czynniki mitogenne; MAPK - (ang. *MAP kinase*) - kinaza MAP; MEK - (ang. *mitogen-activated protein kinase kinase*) - kinaza kinazy MAP; PGE₂ - (ang. *prostaglandin E₂*) - prostaglandyna E₂; PKA/PKC - (ang. *protein kinase A/C*) - kinaza białkowa A/C; RGD - motyw aminokwasowy: arginina, glicyna, asparaginian; rhGHR - (ang. *recombinant human growth factor*) - rekombinowany hormon wzrostu człowieka; RXR α - receptor kwasu retinowego; SH2 - (ang. *src homology 2*) - domena kinaz tyrozynowych odpowiedzialna za oddziaływanie kinazy na substrat; TGF - (ang. *transforming growth factor*) - transformujący czynnik wzrostu; TSH - (ang. *thyroid stimulating hormone*) - hormon stymulujący gruczoł tarczycy; 5'/3' UTR - (ang. *5'/3' untranslated region*) - 5'/3' region nieulegający translacji.

OŚ SOMATOTROPOWA HORMON WZROSTU - INSULINOPODOBNY CZYNNIK WZROSTU

Hormon wzrostu wywiera większość swoich efektów metabolicznych poprzez indukcję syntezy insulinopodobnych czynników wzrostu: IGF-I i IGF-II. Aktywność hormonu wzrostu i IGF-I stanowi tzw. oś somatotropową (Rys. 1), której składnikami są także liczne czynniki wydzielane przez komórki wątroby oraz innych tkanek, w tym takie jak receptor hormonu wzrostu (GHR), białka wiążące hormon wzrostu (GHBP) oraz wiążące insulinopodobne czynniki wzrostu (IGFBP), jak również ich specyficzne receptory. Centrum kontrolującym jest podwzgórze. Oś somatotropowa odgrywa kluczową rolę w regulacji procesów metabolicznych, w której biorą udział także insulina, leptyna, glukokortykoidy i hormony tarczycy [10].

Ekspresję *IGF-I* i wielu *IGFBP* reguluje hormon wzrostu. Dotychczas jednak tylko w promotorze genu jednego z białek osi somatotropowej - ALS (podjednostki kwasolabilnej) zidentyfikowano element wrażliwy na ten hormon [11]. Badania z wykorzystaniem hybrydyzacji *in situ* wykazały, że mRNA dla IGF-I, IGFBP-3 i ALS nie występują w tych samych komórkach wątroby. W hepatocytach ulega ekspresji mRNA kodujący IGF-I i ALS, zaś mRNA dla IGFBP-3 był identyfikowany wyłącznie w przyległych komórkach nabłonkowych zatoki wątrobowej. W komórkach sinusoidalnych nabłonka wątroby, w przeciwieństwie do hepatocytów nie stwierdzono obecności mRNA GHR, natomiast w hepatocytach nie ulega ekspresji gen *receptora IGF-I* [12].

INSULINOPODOBNE CZYNNIKI WZROSTU - IGF

Insulinopodobne czynniki wzrostu (IGF), nazywane również somatomedinami, należą do peptydów spokrewnionych z insuliną. Znane są dwa polipeptydy IGF-I i IGF-II o budowie podobnej do proinsuliny, które mogą reagować krzyżowo z receptorami insuliny.

Oba czynniki IGF (I i II) są zbudowane z pojedynczych łańcuchów peptydowych, strukturalnie podobnych do in-

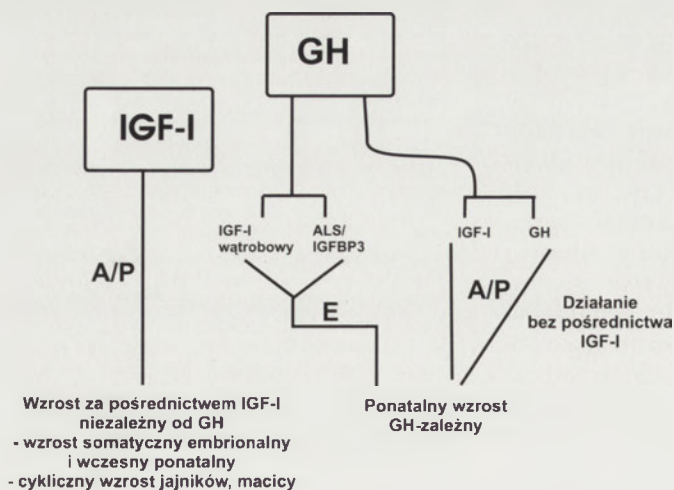
suliny. W cząsteczce dojrzałych peptydów można wyróżnić cztery domeny wysoce zachowawcze wśród białek ssaków i innych kręgowców [14], oznaczone odpowiednio: B, C, A i D, licząc od końca N do C-końca cząsteczki, podobnie jak w insulynie. W rejonie C-końcowym cząsteczki prekursorowej występuje bardziej zmienny fragment E, wycinany podczas dojrzewania tych białek [15]. Gen kodujący IGF-I znajduje się na długim ramieniu chromosomu 12 (12q22-24.1), a IGF-II na krótkim ramieniu chromosomu 11 (11p15.5).

IGF-I jest zbudowany z 70 aminokwasów. Jego prekursor występuje w dwóch formach: IGF-IA (zawierającej 153 aminokwasów) i IGF-IB (zawierającej 195 aminokwasów). IGF-II jest zbudowany z 67 aminokwasów i wykazuje 65% homologii z IGF-I [16]. W budowie przestrzennej obu białek można rozróżnić trzy prawoskrętne helisy α i dwie struktury β . W cząsteczce występują trzy mostki dwusiarczkowe. Białka te są syntetyzowane głównie w wątrobie, a także w fibroblastach, mioblastach, chondroblastach, osteoblastach, w komórkach mózgu, w nabłonku przewodu pokarmowego i nerek, w tkance tłuszczowej. Poziom ich w surowicy krwi (zwłaszcza IGF-I) jest zależny od stężenia hormonu wzrostu. Krążące w krwiobiegu insulinopodobne czynniki wzrostu są głównie związane z białkami IGFBP. Czynniki te oddziałują na komórki poprzez specyficzne receptory błonowe i mogą aktywować replikację DNA, transkrypcję RNA, syntezę białek, np. kolagenu i proteoglikanów, regulować podział i wzrost komórek, w tym chondroblastów i chondrocytów. IGF-I jest również odpowiedzialny za włączanie siarczanów do chrząstek i kości, ma wpływ na mineralizację kości i zwiększa resorpcję fosforanów w nerkach [17].

IGF-I

Badania na transgenicznym myszom pozbawionych genu kodującego IGF-I wykazały, że białko to ma ważny wpływ na pre- i postnatalny wzrost i rozwój organizmu [18]. IGF-I pełni istotną rolę w regulacji wzrostu kości na długość. Jego brak lub niedobór w organizmie powoduje np. niskorosłość u człowieka i zwierząt [19]. Wykazano, że poziom IGF-I w osoczu człowieka jest skorelowany z rozmiarami ciała. Dlatego podawanie egzogennej rhIGF-I zwiększa zarówno masę ciała i wzrost. Stwierdzono, że hormon wzrostu jest bardziej efektywny w stymulowaniu wzrostu, np. w kościach, podczas gdy IGF-I w nerkach i śledzionie [20], co sugeruje, że IGF-I może działać w niektórych tkankach niezależnie od hormonu wzrostu i jego receptora. Potwierdzają to obserwacje prowadzone na myszach, wykazujące, że zwierzęta te pozbawione GHR są płodne, zaś przy braku IGF-I nie [21].

IGF-I najprawdopodobniej sam (bez stymulacji ze strony hormonu wzrostu) jest także zdolny do indukowania różnicowania się mioblastów w dojrzałe komórki [22]. W tkance tłuszczowej białko to za pośrednictwem specyficznych receptorów insuliny wywiera efekty podobne do tego hormonu. Działanie to jest jednak 16 razy słabsze. IGF-I powoduje zahamowanie lipolizy, nasilenie transportu glukozy do adipocytów i jej utlenianie oraz zmniejsza uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych. Może również być odpowiedzialne za hipoglikemię. Metaboliczne efekty działania IGF-I przez



Rysunek 1. Model działania osi somatotropowej GH-IGF, wg [13] zmodyfikowane. A/P - działanie autokrynne lub parakrynne, E - działanie endokrynne.

receptory insulinowe są przeciwstawne skutkom wywołanym przez hormon wzrostu. Nie wyjaśniono dotychczas związków pomiędzy wpływem IGF-I i hormonu wzrostu na homeostazę płynów ustrojowych. Stwierdzono jedynie, że IGF-I nasila produkcję estrogenów w jajnikach, zaś w komórkach tarczycy działa synergistycznie z TSH, stymulując proliferację komórek pęcherzykowych.

Fizjologiczne znaczenie endokrynnego wydzielania IGF-I badano na zwierzętach pozbawionych genu *IGF-I* w wątrobie, która jest głównym miejscem jego syntezy. Wykazano, że poziom IGF-I w surowicy krwi obwodowej spadł o około 75%, a wzrost zwierząt był możliwy tylko dzięki 6-krotnemu zwiększeniu produkcji hormonu wzrostu przez przysadkę (na zasadzie sprzężenia zwrotnego) [23]. Myszy całkowicie pozbawione genu *IGF-I* rodziły się z mniejszą masą urodzeniową, stanowiącą około 60% masy myszy dzikich, a ich wzrost postnatalny był osłabiony. W 7 tygodniu życia postnatalnego zwierzęta te były nieplodne, a ich masa ciała stanowiła już tylko 30% masy zwierząt zdrowych [24]. Stwierdzono, że u szczurów chorych na cukrzycę poziom krążącego IGF-I jest zredukowany i powraca do normy po leczeniu insuliną [25]. IGF-I wzmacnia także wychwyt glukozy do tkanek obwodowych. Jest to efekt insulinopodobny, który może zachodzić za pośrednictwem receptora IGF-I lub insulinowego [13].

Pierwsze badania dotyczące roli IGF-I w cyklu komórkowym sugerowały, że białko to przyspiesza przejście z fazy G_1 cyklu do fazy S i było ono określane jak czynnik progresji fazy G_1 . Najnowsze badania wskazują, że proces ten jest znacznie bardziej złożony. Komórki pozbawione genu *IGF-I* prawidłowo przechodzą z fazy G_1 do S cyklu komórkowego, jednak spowolniony jest czas ich wejścia z fazy G_2 do M [26]. Wydłużenie czasu trwania wszystkich faz cyklu komórkowego obserwowano także w fibroblastach zarodków mysich z delecją genu receptora IGF-I [27]. IGF mogą promować progresję cyklu komórkowego albo przez bezpośrednią asocjacje z innymi czynnikami wzrostu, albo pośrednio przez interakcje z czynnikami odpowiedzialnymi za rozwój i promocję kancerogenezy, takimi jak hormony steroidowe i integryny.

Wzrost proliferacji komórek w odpowiedzi na IGF-I, obserwowano dla keratynocytów, osteoblastów, komórek mięśni gładkich i mięśni szkieletowych, komórek nerek, komórek pęcherzykowych tarczycy, chondrocytów, komórek nabłonka macicy czy prekursorów erytrocytów. IGF-I stymuluje również różnicowanie i przeżycie neuronów. W dojrzałej tkance mózgowej jest on neuromodulatorem regulującym plastyczność synaptyczną, jak również bierze udział w odpowiedzi komórek tkanek nerwowych na ich uszkodzenie [28]. Udowodniono również antyapoptotyczne działanie IGF-I [13].

GEN KODUJĄCY IGF-I

W porównaniu z relatywnie prostą budową peptydu IGF-I, struktura jego genu oraz kontrola ekspresji jest bardzo skomplikowana. Gen ten jest zachowany ewolucyjnie, zajmuje obszar około 90 kbp i składa się z 6 eksonów podzielonych bardzo długimi (1,9 do 50 kb) sekwencjami nie-

kodującymi (Rys. 2). Zgodnie z obecną nomenklaturą eksony 1 i 2 są alternatywnymi eksonami liderowymi, które ulegają rozszczepieniu do eksonu 3 dając klasę transkryptów odpowiednio 1 i 2 [29]. Eksony 3 i 4 kodują dojrzały peptyd IGF-I, zaś alternatywnie składane eksony 5 i 6 kodują peptyd E, obecny w cząsteczce prekursorowej (odpowiednio Eb i Ea w cząsteczkach preIGF-IB i preIGF-IA), razem z przylegającym do genu rejonem 3'UTR [20]. Transkrypcja genu IGF-I jest pod kontrolą dwóch promotorów: głównego, umiejscowionego przed eksonem 1 - oznaczanego P1 IGF-I oraz z promotora P2 IGF-I, który występuje przed eksonem 2. Jego transkrypty stanowią tylko nieznaczną część ogólnej puli transkryptów IGF-I. W początkowym okresie postnatalnym, kiedy IGF-I bierze udział w regulacji procesów wzrostowych organizmu, transkrypty z P1 stanowią ponad 90%, natomiast w wieku dorosłym stosunek ten się zmienia na korzyść transkryptów klasy 2, które np. w komórkach dorosłych szczurów stanowią już ok. 35% mRNA IGF-I [30-32]. O różnorodności transkryptów genu IGF-I decyduje również obecność licznych miejsc inicjacji transkrypcji w obu promotorach oraz wykorzystanie wielu miejsc poliadenylacji występujących w rejonie eksonu 6.

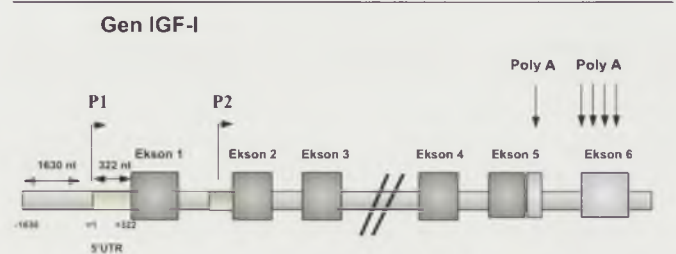
W komórkach wątroby znaleziono także tzw. formę C IGF-I, w której ulegają transkrypcji eksony 3, 4, 49 pz eksonu 5 i ekson 6, przy czym ekson 6 jest krótszy niż w formie A, ponieważ w wyniku insercji wprowadzony został dodatkowy kodon stop. Transkrypt taki stanowi 10% ilości transkryptu formy IGF-IA [15].

REJONY REGULATOROWE GENU IGF-I

Regulacja ekspresji *IGF-I* odbywa się głównie na poziomie transkrypcji oraz translacji i jest pod kontrolą czynników specyficznych dla danej tkanki lub etapu rozwoju organizmu.

Transkrypcja genu IGF-I zachodzi z dwóch rejonów promotorowych P1 i P2 IGF-I. Mechanizm molekularny odpowiedzialny za ich aktywność jest słabo poznany. Obydwa promotory mają liczne miejsca inicjacji transkrypcji [33,34].

Promotor P1. Rejon promotorowy P1 w genomie człowieka składa się z 322 nukleotydów zlokalizowanych rejonie 5'UTR eksonu 1 (+1 - +322) oraz 1630 nukleotydowego obszaru regulatorowego (-1630 - - 1) [32]. Odcinek 322 nt jest najbardziej zachowawczą częścią genu i wykazuje homologię rzędu 95% z odpowiednimi fragmentami genów szczurzego i kurzego [32,35]. Sugeruje się, że ten zachowany w ewolucji fragment 5'UTR pełni ważną funkcję w kon-



Rysunek 2. Gen IGF-I z miejscami promotorowymi P1 i P2 oraz miejscami poliadenylacji.

troli biosyntezy IGF-I w trakcie translacji [36]. 5'UTR jest niezbędny dla transkrypcji podstawowej w liniach komórkowych produkujących IGF-I. W promotorze P1 brak jest typowych dla promotorów sekwencji TATA, CCAAT czy rejonów szczególnie bogatych w reszty GC. W rejonie promotora P1 znajduje się 5 obszarów wrażliwych na DNAzę: HS3A, B, C, D, E.

Najważniejszym hormonalnym regulatorem ekspresji *IGF-I* jest hormon wzrostu [37]. Badania pokazują, że hormon ten stymuluje transkrypcję genu *IGF-I* w wątrobie przez skoordynowaną aktywację obydwu promotorów i nie wymaga to syntezy dodatkowych białek [38,39]. Nie udało się jednak zidentyfikować w sekwencji promotorowej genu *IGF-I* elementu indukowanego przez hormon wzrostu. Być może stymulacja hormonalna zachodzi przez oddziaływanie białko-białko, a nie w wyniku bezpośredniego działania na DNA.

Wykazano, że zrekombinowany plazmid zawierający cały 322 nt 5' UTR i 1630 nt segment 5' sekwencji regulatorowej stymuluje aktywność transkrypcji lucyferazy prawie 70-krotnie w porównaniu do plazmidów pozbawionych tych elementów. Rejon od -15 do +5 zawiera optymalne miejsca wiązania dla członków oktamerowej rodziny czynników transkrypcyjnych (OCT). Jednak nie udało się za pomocą przeciwciał potwierdzić, że powstający tam kompleks tworzy białko OCT, [32]. W rejonie +20 do +37 (5'UTR) zidentyfikowano potencjalne miejsca wiążące dla dwu rodzin wątrobowych czynników transkrypcyjnych: C/EBP α i β oraz HNF-1 α [40,41].

W rejonie promotora P1 *IGF-I* szczura zlokalizowano także sekwencje wiążące tzw. czynniki GATA-A oraz GATA-B, zawierające palce cynkowe, wiążące się z elementami DNA o sekwencji (A/T)GATA(A/G), odpowiednio w rejonach +108 oraz +183. Zmiana w sekwencji wiążącej czynnik GATA-A powodowała wzrost aktywności promotora o ok. 68%, zaś w GATA-B hamowała ją ok. 4,4-krotnie, w komórkach różnych linii komórkowych [42].

Wykazano także, że synteza *IGF-I* w osteoblastach jest stymulowana przez hormon przytarczyc oraz przez lokalnie produkowane prostaglandyny E_2 - PGE_2 [43-44], dwa hormony, które są związane z reorganizacją, resorpcją i formowaniem *de novo* kości, oraz hamowana przez glukokortykoidy, które zmniejszają ich tworzenie. Zarówno parathormon jak i PGE_2 podnoszą wewnątrzkomórkowy poziom cAMP w osteoblastach [43,44]. Funkcjonalny element odpowiedzi na cAMP (CRE) został zmapowany w 5'UTR eksonu 1 *IGF-I* między +202 do +209 nt (w genie szczura) w miejscu wrażliwym na DNAzę zwanym HS3D [45]. Stwierdzono, że C/EBP δ jest głównym czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym przez cAMP w osteoblastach, który wiąże się z elementem sekwencji CGCAATCG, aktywując promotor P1 *IGF-I*. Białko to należy do rodziny czynników transkrypcyjnych C/EBP zawierających w cząsteczce moduł o strukturze zamka leucynowego. W rejonach C-końcowych w cząsteczce tych białek występują motywy odpowiedzialne za dimeryzację i wiązanie DNA. Do grupy tej należą także C/EBP α i β , działające jako aktywatory transkrypcyjne, odgrywające główną rolę w różnicowaniu adipocytów i re-

gulowaniu ekspresji genów w wątrobie i innych tkankach [46]. C/EBP δ pełni także rolę w kontroli adipogenezy i pośredniczy w odpowiedzi ostrej fazy reakcji zapalnej [46]. C/EBP α i β izolowane z wątroby wzmacniają podstawową transkrypcję z promotora P1 około 12-krotnie. Transaktywacja P1 przez te czynniki jest także zależna od obecności miejsc je wiążących zlokalizowanych w rejonie -119 [47].

Ważny wpływ na ekspresję genu *IGF-I* mają glukokortykoidy, które obniżają jego ekspresję w osteoblastach, zmniejszają ich proliferację, obniżają ekspresję *kolagenu I typu*, zwiększają ekspresję *kolagenazy 3* [48], oraz stymulują apoptozę w wielu typach komórek, w tym w dojrzałych osteoblastach [49]. Wykazano, że w wyniku działania kortyzolu ekspresja genu *IGF-I* spada około 50%. W tych działaniach kortyzolu pośredniczy również C/EBP, dla którego miejsce wiążące jest zlokalizowane pomiędzy +144 i +152, przyległe do trzeciego miejsca startu transkrypcji, które jest szczególnie aktywne w osteoblastach [50]. Wykazano, że C/EBP α oraz C/EBP β oddziałują z miejscem regulowanym za pośrednictwem glukokortykoidów w komórkach osteoblastów niestymulowanych, podczas gdy w komórkach traktowanych kortyzolem na element ten oddziałują C/EBP α , β i δ .

W regulacji ekspresji genu *IGF-I* biorą także udział kinazy białkowe C i A. Kinaza białkowa A jest zaangażowana w aktywację genu *IGF-I* indukowaną hormonem przytarczyc i prostaglandynami E_2 , natomiast aktywność kinazy białkowej C obserwowano w kancerogenezie. Wykazano, że PKC aktywuje transkrypcję C/EBP β oraz wiąże się z miejscem C/EBP (+23 do +29) [51].

Silniejszymi od C/EBP transaktywatorami promotora P1 są czynniki HNF-1 α , które mogą wzmocnić podstawową transkrypcję w komórkach Hep3B około 16-krotnie. Białka te należą do rodziny czynników transkrypcyjnych zawierających w cząsteczce motyw helisa-pętla-helisa. W P1 występują dwa miejsca je wiążące (w rejonie -282 oraz -119). Element wiążący w -119 całkowicie zachodzi na miejsce wiążące C/EBP i chociaż wiąże HNF-1 z mniejszym powinowactwem, to odgrywa ważniejszą rolę w transaktywacji promotora P1 *IGF-I* [41]. W rejonie P1 odkryto również obecność dwóch konserwowanych ewolucyjnie miejsc wiążących HNF-3, które są niezbędne dla maksymalnej transaktywacji transkrypcji genu *IGF-I*. W hepatocytach HNF-3 pełnią funkcję aktywatorów genów transkrybowanych w wątrobie. W przypadku genu *IGF-I*, HNF-3 oddziałują one na elementy znajdujące się między -34 do -21 oraz +2 a +18 nukleotydem w rejonie promotorowym genu [52].

W miejscach +42 i +129 genu *IGF-I* szczura zidentyfikowano elementy wiążące czynniki transkrypcyjne, których aktywność jest zależna m. in. od poziomu insuliny [53]. W rejonie tym występują miejsca wiązania SP1 oraz element bogaty w AT, który jest rozpoznawany przez słabo poznane białko wiążące wrażliwe na insulinę. Interakcje promotora z SP1 są ułatwiane przez wiązanie IRBP [54]. Znany regulatorem ekspresji *IGF-I* jest estrogen działający na komórki za pośrednictwem receptora wiążącego się w formie homodimeru zwykle do specyficznej sekwencji DNA, znanej jako element wrażliwy na estrogen (ERE). Miejscem takim

w promotorze P1 genu IGF-I jest miejsce odporne na trawienie DNAzą (HS3D). Jednak ER prawdopodobnie oddziałuje z przypuszczalnym miejscem wiążącym AP1, czynnikiem stanowiącym kompleks białek c-FOS i c-JUN [55]. W obszarze regulatorowym promotora P1 IGF-I stwierdzony został polimorfizm reszt CA, który ma prawdopodobnie wpływ na rozwój cukrzycy typu 2, tolerancję glukozy, wzrost płodowy oraz proces kancerogenezy i zawał serca [56].

Promotor P2 jest słabiej poznany niż P1, prawdopodobnie w związku z mniej ważną funkcją w ekspresji genu IGF-I. Znajduje się on przed eksonem 2 genu i badany był głównie w komórkach szczura. Miejsca inicjacji transkrypcji są w nim zlokalizowane w dwóch rejonach ok. 1,8 kb poniżej 3' końca eksonu 1. Główne miejsca inicjacji transkrypcji znajdują się w rejonie 62-68 bp i 52-53 bp przed 3' końcem eksonu 2. Rejony te są otoczone prawdopodobnie przez elementy wiążące czynniki regulujące aktywność promotora. Dwa przypuszczalne miejsca wiązania TTAA i CCAAT występują odpowiednio w -27 nt i -80 nt. Promotor P2 ma prawdopodobne motywy: TTAA w -27 nt i CCAAT -80 nt przed pierwszym miejscem startu transkrypcji, ale ich znaczenie dla procesu transkrypcji nie zostało potwierdzone. Wykazano, że w promotorze P2 genu szczura z sekwencją CACCC zlokalizowaną pomiędzy -53 a -46 wiąże się czynnik SP1 [55].

IGF-II

IGF-II jest 67 aminokwasowym peptydem wykazującym działanie mitogenne na komórki wielu typów. Białko to jest ważnym modulatorem wzrostu i różnicowania mięśni. Ulega ono szerokiej ekspresji podczas rozwoju prenatalnego, a jego aktywność jest regulowana przez piętnowanie genów (tzw. imprinting genomowy). W większości komórek tkanek prawidłowych gen zlokalizowany na chromosomie odziedziczonym od matki jest nieaktywny w wyniku piętnowania, a wymazanie jego imprintingu jest ważnym krokiem w inicjacji rozwoju różnych typów nowotworów [57]. Gen kodujący IGF-II składa się z dziewięciu eksonów. Pierwsze sześć to eksony niekodujące. Kontrola ekspresji zachodzi z czterech promotorów (P1-P4) zlokalizowanych przed eksonami 1, 4, 5 i 6. Podczas rozwoju płodowego, ekspresja IGF-II jest znacznie wyższa niż w okresie postnatalnym lub w wieku dorosłym.

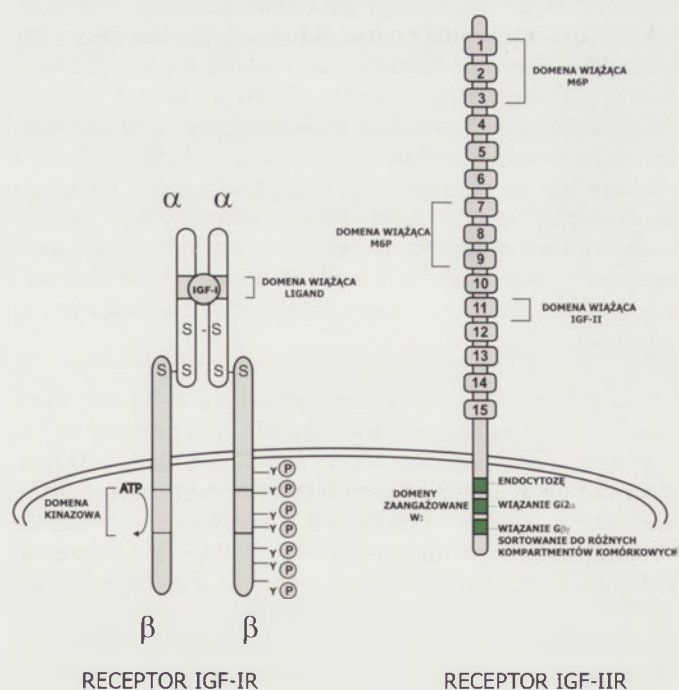
RECEPTORY INSULINOPODOBNYCH CZYNNIKÓW WZROSTU

Wpływ IGF na wzrost i metabolizm organizmu zachodzi za pośrednictwem specyficznych receptorów: IGF-IR i IGF-IIR oraz receptora insulinowego zlokalizowanych w komórkach docelowych (Rys. 3). Receptor IGF-I (IGF-IR) jest podobny strukturalnie do receptora insulinowego i wykazuje z nim przeszło 50% homologii sekwencji aminokwasowej. Jest to heterotetrameryczna glikoproteina złożona z dwóch wiążących ligand podjednostek α , zbudowanych z 706 aminokwasów oraz dwóch transbłonowych podjednostek β , zawierających 627 aminokwasów. Gen *IGF-IR* człowieka składa się z 21 eksonów i jest zlokalizowany na chromosomie 15q25-26. Receptor ten jest syntetyzowany jako jednolana łańcuchowa preproteina zbudowana z 1367

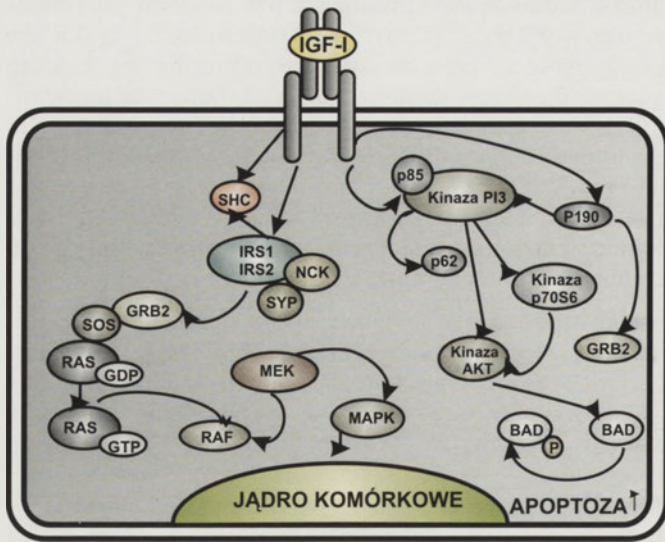
aminokwasów, z której następnie jest usuwany 30 aminokwasowy peptyd sygnałowy, a reszta cząsteczki białka jest glikozylowana i cięta na dwie podjednostki: α i β , które łączą się mostkami dwusiarczkowymi. Dwie cząsteczki $\alpha\beta$ połączone wiązaniem dwusiarczkowym tworzą właściwą cząsteczkę receptora IGF-IR. Rejon wiążący ligand jest bogaty w reszty cysteinowe i zlokalizowany w podjednostce α . Receptor ten ma największe powinowactwo do IGF-I, kilkukrotnie niższe do IGF-II oraz ponad 100 razy mniejsze do insuliny [58].

Podjednostka β składa się z krótkiej domeny zewnątrzkomórkowej i śródbłonowej oraz dużej domeny wewnątrzkomórkowej zawierającej rejon odpowiedzialny za jej aktywność kinazy tyrozynowej. Fosforylacji ulegają reszty tyrozyny i seryny [59]. Wiązanie liganda do podjednostki α stymuluje wewnątrzkomórkową kinazę tyrozynową, prawdopodobnie przez wywołanie zmian konformacyjnych w podjednostce β , prowadzących do autofosforylacji receptora. Niezwiązana z ligandem podjednostka α działa jako represor wewnątrzkomórkowej kinazy tyrozynowej receptora. Wewnątrzkomórkowa domena kinazowa receptora IGF-I i receptora insulinowego (IR) wykazują 84% homologii sekwencji aminokwasowej i aktywują kilka podobnych białek, np. substraty receptora insulinowego - IRS oraz SHC [59].

Podobna struktura i sekwencja aminokwasowa receptorów IGF-I i insulinowego umożliwia obu białkom formowanie cząsteczek hybrydowych, złożonych z dimerów $\alpha\beta$ IGF-IR połączonych z dimerami $\alpha\beta$ receptora insulinowego [60]. Ich właściwości wiązania liganda są podobne do IGF-IR.



Rysunek 3. Receptory insulinopodobnych czynników wzrostu, Y-P - miejsca fosforylacji reszt tyrozyny.



Rysunek 4. Przekaz sygnału do jądra w komórce wywołany działaniem IGF-I. Na terenie jądra komórkowego znajdują się czynniki transkrypcyjne indukujące procesy proliferacji, różnicowania oraz apoptozy.

Receptor IGF-I jest wymagany dla aktywności biologicznej czynnika wzrostu naskórka (EGF) i czynnika wzrostu płytek krwi (PDGF) [61]. Poza tym aktywuje on duży antygen T wirusa SV40 oraz białko RAS, które może stymulować proliferację komórek [62]. Wykazano, że myszy pozbawione genu IGF-IR miały obniżony ciężar ciała o 55% w porównaniu z osobnikami dzikimi i umierały zaraz po urodzeniu z powodu niewydolności układu oddechowego [63].

Receptor IGF-II - IGF-IIR jest glikoproteiną o pojedynczym łańcuchu, znaną także jako receptor mannozo-6-fosforanu niezależny od kationów. Dojrzała cząsteczka receptora człowieka składa się z 2451 aminokwasów i można w niej wyróżnić trzy rejony: duży 2264 aminokwasowy rejon zewnątrzkomórkowy, 23 aminokwasowy rejon błonowy i 164 aminokwasowy C-końcowy rejon wewnątrzkomórkowy. Zewnątrzkomórkowa część IGF-IIR wiąże ligand, zaś wewnątrzkomórkowa reguluje transport pomiędzy różnymi kompartmentami komórkowymi. Gen *IGF-IIR* człowieka znajduje się na chromosomie 6q25-27. Domenę receptora kontaktującą się ze środowiskiem zewnętrznym można podzielić na 15 segmentów zawierających od 134-191 aminokwasów, o 16 do 38% homologii. W każdym z nich występuje 8 reszt cysteiny zlokalizowanych w analogicznych pozycjach [64].

IGF-IIR ma jedno miejsce wiązania dla IGF-II i dwa miejsca dla ligandów zawierających M-6-P. Receptor ten wykazuje największe powinowactwo do IGF-II i około 500 razy mniejsze do IGF-I. Białko to wiąże się najprawdopodobniej także z kwasem retinowym i receptorem aktywatora plazminogenu typu urokinazy [65]. IGF-IIR bierze udział w regulacji działania IGF-II, transporcie enzymów lizosomalnych z ich miejsc syntezy do odpowiednich przedziałów komórkowych oraz w regulacji białek zawierających mannozo-6-fosforan. Wykazano, że myszy z delecją IGF-II miały wzrost prawidłowy, natomiast pozbawione IGF-IIR wykazywały przerost płodowy, który był letalny. Stwierdzono także, że IGF II może również być wiązany przez je-

den z wariantów receptora insulinowego, który ulega silnej ekspresji w komórkach tkanek płodowych i neoplastycznych [66].

PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU WYWOŁANE IGF-I

Receptor IGF-I po związaniu ligandu ulega fosforylacji. W rejonach zawierających ufosforylowane reszty tyrozyny dochodzi do akumulacji białek, należących do rodziny IRS. Białka te mają co najmniej 20 miejsc fosforylacji. Fosforylacja reszt tyrozyny IRS powoduje asocjację z nim białek zawierających domenę SH2, takich jak podjednostka regulatorowa p85 kinazy 3' fosfatydyloinozytolu (kinaza PI3), fosfataza tyrozynowa białek SH-PTP2 (znana także jako SYP lub PTP1D), białko adaptorowe NCK zawierające SH2 i SH3 i białko 2 związane z receptorem czynnika wzrostu - GRB2 (ang. *growth factor receptor-bound protein-2*). GRB2 jest zasocjowane z SOS (czynnikiem wymiany GTP/GDP) biorącym udział w przekształcaniu nieaktywnego RAS-GDP w aktywny RAS-GTP. Aktywacja białka RAS prowadzi do aktywacji kinaz MEK za pośrednictwem białka RAF. Kinaza MEK aktywuje kinazę MAP. Sygnał ten może być przekazany do jądra komórkowego za pośrednictwem kinazy ERK 1/2.

IGF-I poprzez receptor może także aktywować kinazę PI3, która fosforyluje białko p62. Proteina ta została zidentyfikowana w adipocytach szczura [67]. Kinaza PI3 może także aktywować kinazę p70S6 (kinaza białka S6 o masie 70 kDa), zaangażowaną w mitogenezę oraz aktywującą kinazę AKT, która może indukować fosforylację białka proapoptycznego BAD z rodziny BCL-2. Ufosforylowane białko BAD spowalnia proces apoptozy. Schemat przekazu sygnału indukowanego przez IGF-I przedstawia rys. 4.

BIAŁKA WIĄŻĄCE IGF - IGFBP

Zdolność do formowania kompleksów IGF z IGFBP ma wpływ na transport tych czynników do receptorów błonowych oraz stymulowanie proliferacji komórek. W chwili obecnej dobrze poznanych i scharakteryzowanych jest sześć białek wiążących, IGFBP-1 do -6, oraz nieco słabiej dwa kolejne (IGFBP-7 i -8). Nie wyklucza się również istnienia większej ich liczby w krwiobiegu. Stała powinowactwa sześciu najlepiej poznanych IGFBP do IGF jest podobna dla IGF-I i IGF-II (odpowiednio: 2-20 i 3-30 $\times 10^9$ l/mol) z wyjątkiem IGFBP-6, który ma od 20 do 70 razy wyższe powinowactwo do IGF-II niż do IGF-I [68]. IGFBP modulują działanie IGF endokrynnie, parakrynnie lub autokrynnie. Ich aktywność jest z kolei regulowana przez specyficzne proteazy IGFBP, zależne od specyficznych aktywatorów i inhibitorów.

Komórki niektórych typów tkanek produkują więcej niż jeden rodzaj IGFBP. Ekspresja tych białek może być regulowana przez różne hormony. Np. w osteoblastach przez hormon wzrostu, hormon przytarczyc, glukokortykoidy, 1,25 dihydroksywitaminę D3 oraz lokalne czynniki wzrostu (w tym IGF), białka odpowiedzialne za morfogenezę kości, TGF- β i interleukiny [69]. W surowicy IGF występuje przeważnie w 150 kDa kompleksie, złożonym z IGF-I/II, IGFBP-3 i ALS, a niekiedy także z IGFBP-5. Kompleks ten jest źródłem IGF oraz wydłuża czas jego półtrwania (15-

-20 godzin), jak również uniemożliwia mu przekraczanie bariery śródbłonna naczyń [69]. Pozostały IGF występuje w kompleksach 40-50 kDa, związany z jednym z IGFBP, które mogą przekroczyć śródbłonek naczyń, udostępniając pulę IGF-I dla komórek w tkankach. Surowicy IGF transportowany z naczyń włosowatych do płynów zewnątrzkomórkowych jest niezbędny w tkankach docelowych. Przez śródbłonek naczyń przechodzić może łatwo wolny IGF (<1%) [70]. W wyniku proteolizy IGFBP w kompleksie 50 kDa IGFBP-IGF, IGF jest w tkankach docelowych uwalniany. Zatem biologiczna aktywność krążącego IGF dla tkanek jest determinowana przez mechanizmy związane z przesunięciem IGF z kompleksu 150 kDa do 50 kDa i następnie z proteolizą IGFBP przez proteazę, uwalnającą IGF do krwioobiegu lub lokalnych płynów ciała [69,70].

Zidentyfikowano także kilka peptydów o niskim powinowactwie do IGF, zwanych peptydami pokrewnymi do IGFBP, które wykazują znaczną homologię strukturalną do rejonu N-końcowego IGFBP i są kodowane przez pierwszy ekson genów IGFBP. Znaczenie ich nie jest znane.

CECHY STRUKTURALNE IGFBP

Sześć rodzajów białek wiążących IGFBP u ssaków wykazuje 50% homologię sekwencji aminokwasowej, a każde z nich ma 80% homologię do białek pochodzących z komórek ssaków różnych gatunków [71]. Geny dla IGFBP mają podobną organizację, posiadają cztery eksony, z których eksony 1 i 4 kodują zachowawcze rejony N i C końcowe w białku. Część cząsteczki IGFBP zawierają 18 reszt cysteinowych, z których sześć znajduje się na C-końcu, a 12 na N-końcu ich cząsteczek. Białka te ulegają co najmniej trzem rodzajom modyfikacji potranslacyjnych: proteolizie, fosforylacji i wiązaniu z białkami zewnątrzkomórkowej macierzy.

Proteoliza IGFBP. Proteazy IGFBP są zdolne do cięcia IGFBP do form o znacznie zredukowanym powinowactwie do IGF lub całkowitym braku. Jeden z takich enzymów, wykazujący specyficzność dla IGFBP-3, jest aktywny od pierwszego trymestru ciąży u kobiet [71]. Inne proteazy zo-

stały zidentyfikowane w płynach ustrojowych i pożywkach kultur komórkowych [72]. W osoczu ciężarnych występuje białko PAPP-A, specyficzne dla IGFBP-4, natomiast komplement C1s, specyficzny dla IGFBP-5, produkowany jest przez komórki mięśni gładkich [69]. Białko to jest trawione przez proteazę ADAM9 syntetyzowaną przez ludzkie osteoblasty [69]. Oprócz proteaz specyficznych dla IGFBP, białka te mogą być degradowane przez proteazy trawiące również: plazminę, katepsynę D i inne białka. Zależy to od stężenia tych enzymów, ich aktywatorów i inhibitorów oraz obecności lub braku innych substratów. Modulatorami proteaz mogą być także IGF, np. IGF stymuluje proteolizę IGFBP-4 przez wiązanie do IGFBP-4 i ekspozycję miejsca cięcia dla PAPP-A [72].

Fosforylacja IGFBP. Niektóre IGFBP w komórkach określonych typów są wydzielane jako fosfoproteiny. W przypadku IGFBP-1 człowieka jego fosforylacja ma wpływ na wiązanie IGF-I. Wykazano, że białko to po ufosforylowaniu jest sześciokrotnie bardziej aktywne w wiązaniu liganda niż nieufosforylowane, natomiast w przypadku IGFBP-3 fosforylacja nie ma wpływu na jego powinowactwo do IGF [73].

Wiązanie IGFBP do białek zewnątrzkomórkowej macierzy. Niektóre IGFBP np. 1, -3 i -5 wiążą się z powierzchnią komórki lub białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Takie białka wykazują mniejsze powinowactwo do IGF, mają jednak wpływ na regulację jego aktywności [70].

FUNKCJE IGFBP

IGFBP poza pełnieniem roli białek nośnikowych mogą także funkcjonować niezależnie od IGF jako modulatory wzrostu (Tab. 1). Np IGFBP-5 stymuluje wzrost osteoblastów przy braku funkcjonalnego IGF, prawdopodobnie poprzez wiązanie się z odpowiednim receptorem na błonie komórkowej. Przypuszcza się także, że te proteiny biorą udział w regulacji transkrypcji. W cząsteczce IGFBP-3 i -5 występuje sygnał odpowiedzialny za ich transport do jądra komórkowego, który w komórkach raka piersi zachodzi za pośrednictwem białka - transportera jądrowego importyny- β . Znalaziono również dowody wskazujące na obecność IGFBP-5 w osteoblastach człowieka [74]. Sugeruje się, że wewnątrzkomórkowym mediatorem działania IGFBP-5 w tych komórkach jest białko FHL. Wykazano, że FHL2 może pełnić funkcję czynnika transkrypcyjnego lub koaktywatora w innych typach komórek. Ponieważ FHL2 nie zawiera sekwencji lokalizacji jądrowej, możliwe, że IGFBP-5 wiąże to białko lub inne czynniki transkrypcyjne i przenosić do jądra komórkowego, gdzie stymulują transkrypcję określonych genów docelowych, które prawdopodobnie są zaangażowane w regulację proliferacji i różnicowania osteoblastów [69].

Kości zawierają znacznie więcej IGF niż innych czynników wzrostowych. Wyniki badań wskazują, że może być za to odpowiedzialne IGFBP-5 [69]. IGFBP może działać również niezależnie od IGF, wpływając na migrację i wzrost komórek oraz apoptozę. Badania Jonesa i wsp. [75] ujawniły, że transfekcja IGFBP-1 komórek nabłonka jajników chomika chińskiego powoduje wzrost migracji tych komórek niezależny od IGF-I. Zachodzi to w wyniku wiązania się domeny

Tabela 1. Funkcje białek wiążących IGF - IGFBP

IGFBP	Potencjalne funkcje
IGFBP-1	mniejsze surowicze białko nośnikowe dla IGF; wzmacnia lub hamuje działanie IGF; niezależnie od IGF zwiększa migrację komórek i ich apoptozę; wiąże się do macierzy zewnątrzkomórkowej
IGFBP-2	mniejsze surowicze białko nośnikowe dla IGF; wzmacnia lub hamuje działanie IGF
IGFBP-3	główne surowicze białko nośnikowe dla IGF; wzmacnia/hamuje działanie IGF; niezależny od IGF modulator proliferacji i apoptozy komórek; wiąże się do macierzy zewnątrzkomórkowej
IGFBP-4	hamuje działanie IGF
IGFBP-5	wzmacnia lub hamuje działanie IGF; wiąże się do macierzy zewnątrzkomórkowej
IGFBP-6	wzmacnia lub hamuje działanie IGF (?); niezależnie od IGF moduluje wzrost komórek

RGD IGFBP-1 z integryną $\alpha 5\beta 1$ (receptorem fibronektyny). Efektem tego jest aktywacja kinazy ognisk przylegania FAK i stymulacja kinazy MAP. Podobny mechanizm powoduje wzrost apoptozy w komórkach raka piersi.

Stwierdzono, że IGFBP-3 może także hamować syntezę DNA stymulowaną przez czynnik wzrostu fibroblastów w zarodkach kurcząt, powodować wzrost komórek ludzkiego raka piersi Hs578T przez mechanizm niezależny od IGF oraz indukować apoptozę [69]. Liu i wsp. [76] wykazali, że IGFBP-3 oddziałuje także z receptorem α dla kwasu retinowego (RXR α). Traktowanie komórek kostniakomięsaka człowieka MG63 IGFBP-5 zwiększało ich różnicowanie. Białko to może również sprzyjać wzrostowi aktywności fosfatazy zasadowej i ekspresji osteokalcyny [77].

PODJEJMIENIE KWASOWO-LABILNE - ALS

Jednym ze składników trzeciorzędowego kompleksu IGF-I o masie 150 kDa jest glikoproteina ALS. Białko ALS podobnie jak pozostałe składniki tego kompleksu jest syntetyzowane przez komórki wątroby w odpowiedzi na hormon wzrostu. Ilość ALS po urodzeniu wzrasta wraz ze zwiększającą się wrażliwością komórek na hormon wzrostu. Po początkowym wzroście w syntezie ALS po okresie dojrzewania, jego stężenie zasadniczo pozostaje niezmienione [78].

Gen kodujący ALS został sklonowany w 1996 roku. W genomie człowieka znajduje się on na chromosomie 16 (16p13.3) w pojedynczej kopii, składa się z ok. 3,3 kb i posiada 2 eksony oddzielone 1126-nukleotydowym intronem. Ekson 1 koduje pierwszych 5 aminokwasów peptydu sygnałowego, a ekson 2 pozostałe 22 aminokwasy peptydu sygnałowego i 576 aminokwasów dojrzałego białka. Jego struktura jest konserwowana w genomie ssaków różnych gatunków.

Białko ALS człowieka ma masę cząsteczkową 84-86 kDa, a po enzymatycznej deglikozylacji 66 kDa. Białko to nie ma powinowactwa do wolnego IGF-I lub IGF-II i bardzo niskie powinowactwo do wolnego IGFBP-3, natomiast łatwo wiąże się z podwójnym kompleksem IGF i IGFBP-3. Powinowactwo ALS do takiego kompleksu jest jednak 300-1000 razy niższe niż IGFBP-3 do IGF-I lub -II [78].

IGFBP-1, -2, -4, -6 nie mogą zastąpić IGFBP-3 w formowaniu kompleksu z ALS. Natomiast zdolny jest do tego IGFBP-5, o największej homologii do IGFBP-3. IGFBP-5 w przeciwieństwie do IGFBP-3 może także słabo asocjować z ALS w nieobecności IGF. W wiązaniu ALS ważna jest domena C-końcowa IGFBP-3 i -5 złożona głównie z zasadowych i dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych, natomiast w przypadku IGFBP-5 również jego domena centralna [79].

IGF A RYZYKO NOWOTWORU

Badania populacyjne dostarczyły dowodów na związek pomiędzy poziomem IGF-I i IGFBP-3 w surowicy, a ryzykiem występowania nowotworów, w tym premenopauzalnego raka piersi, raka okrężnicy, prostaty i raka płuc [80]. Sugeruje się, że wysoki poziom IGF-I w osoczu zwiększa

ryzyko rozwoju nowotworu, zaś wysoki poziom IGFBP-3 zmniejsza ryzyko rozwoju procesu neoplazmatycznego.

Na działanie IGF mają wpływ różne leki. Przykładem mogą być antyestrogeny, antyandrogeny, czy analogi witaminy D, które zwiększają ekspresję IGFBP w odpowiednich komórkach, jakkolwiek związek przyczynowo-skutkowy między ich działaniem terapeutycznym a zmianami w ekspresji genów nie został jeszcze określony. Obecne metody terapeutyczne dotyczą docelowego blokowania receptora IGF-I [81] i farmakologicznej redukcji aktywności hormonu wzrostu [82]. Antyestrogeny oraz retinoidy, które redukują lub co najmniej opóźniają rozwój raka piersi, obniżają poziom IGF-I i zwiększają poziom IGFBP-3 [83]. Poziom IGF-I jest pozytywnie skorelowany z wysoką gęstością mammograficzną, która jest związana ze zwiększonym ryzykiem raka piersi [84]. Wykazano też, że niższa ekspresja TGF β w komórkach piersi zwiększa ryzyko wystąpienia raka piersi. Stwierdzono, że IGF-I jest supresorem ekspresji TGF β w gruczolach sutkowych [85].

W porównaniu z tkankami prawidłowymi poziom IGF jest większy w tkankach zmienionych nowotworowo, zarówno pochodzenia embrionalnego, mezenchymalnego, neuroendokrynowego jak i nabłonkowego. IGF-I i IGF-II ulegają także nadekspresji zarówno w łagodnych jak i złośliwych rakach mięśni gładkich człowieka. Wykazano, że gen IGF-II jest odmiennie metylowany w komórkach mięśni gładkich zmienionych nowotworowo złośliwie i łagodnie. W prawidłowych komórkach mięśni gładkich i w leiomyoma jest metylowany całkowicie, natomiast częściowo jest demetylowany w leiomyosarcoma i demetylowany w leiomyosarcoma, co odpowiada za wysoki poziom jego ekspresji [86]. IGF-II ulega nadekspresji w mięśniakomięsaku prążkowanym (rhabdomyosarcoma). Ekspresja IGF-I i IGF-II była obserwowana również w kilku rodzajach raka okrężnicy. Dwa promotory IGF-II aktywne w okresie płodowym są także aktywowane w 30% raków okrężnicy i w przyległej błonie śluzowej [87]. Zmiany w piętnowaniu IGF-II stwierdzono w kilku przypadkach raka Wilm'sa (zarodkowego typu raka), któremu towarzyszy często utrata heterozygotyczności w rejonie 11p15 [88].

UWAGI KOŃCOWE

IGF-I jest jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za wzrost i rozwój organizmu. Zmiany w jego funkcjonowaniu prowadzą do nieprawidłowości rozwojowych oraz powstawania nowotworów. Jak ważne ma to znaczenie dla organizmu wskazuje fakt, że jedna z nowoczesnych terapii antynowotworowych jest oparta na wyciszeniu ekspresji genu IGF-I poprzez technikę antisensu (antisensowny oligonukleotyd komplementarny do fragmentu promotora IGF-I) [89], natomiast w terapii niskorosłości niezależnej od poziomu GH rozważana była możliwość wprowadzenia iniekcji IGF-I w celu przyspieszenia procesów wzrostowych. Jednak z powodu licznych skutków ubocznych ten sposób leczenia nie jest stosowany.

PIŚMIENNICTWO

1. Kopchick JJ, Andry JM. (2000) Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol Genet Metab* 71: 293-314

2. Cotterill AM, Savage MD (1995) Growth hormone resistant states. *W Brook CGD (red) Clinical Paediatric Endocrinol.* Blackwell Scientific Publications, Wyd. 3, str. 187-194
3. Carter-Su C, Schwartz J, Smit LS (1996) Molecular mechanism of growth hormone action. *Ann Rev Physiol* 58, 187-207
4. Jorgensen JO, Ovesen P, Juul A, Hansen TK, Skakkebaek NE, Christiansen JS (1999) Impact of growth hormone administration on other hormonal axes. *Horm Res* 51: 121-6
5. Cameron CM, Kostyo JL, Adamafo NA, Brostedt P, Roos P, Skottner A, Forsman A, Fryklund LSB (1988) The acute effects of growth hormone on amino acid transport and protein synthesis are due to its insulin-like action. *Endocrinology* 122: 471-474
6. Davidson MB (1987) Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Endocrin Rev* 8: 115-131
7. Eden S, Wiklund O, Oscarson J (1993) Growth hormone treatment of growth hormone-deficient adults results in a marked increase in Lp(a) and HDL cholesterol concentrations. *Arterioscler Thromb* 13: 296-301
8. Olivercrona H, Ericksson S, Bergund L, Angelin P (1993) Increased concentration of serum lipoprotein (a) in response to growth hormone treatment. *British Med J* 306: 1726-1727
9. Kaplan SL (1999) Hormonal regulation of growth and metabolic effects of growth hormone. *W: Kostyo (red) Handbook of Physiology* t5, Oxford University Press, str 129-143
10. Renaville R, Hammadi M, Portetelle D (2002) Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domestic Animal Endocrinol* 23: 351-360
11. Boisclair YR, Seto D, Hsieh S, Hurst KR, Ooi GT (1996) Organization and chromosomal localization of the gene encoding the mouse acid labile subunit of the insulin-like growth factor binding complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 100028-10033
12. Chin E, Zhou J, Dai J, Baxter RC, Bondy CA (1994) Cellular localization and regulation of gene expression for components of the insulin-like growth factor ternary binding protein complex. *Endocrinology* 134: 2498-2504
13. Le Roith D, Bondy C, Yahakr S, Liu JL, Butler A (2001) The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 22: 53-74
14. Shambloott MJ, Chen TT (1992) Identification of a second insulin-like growth factor in a fish species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8913-7.
15. Chew SL, Lavender P, Clark AJ, Ross RJ (1995) An alternatively spliced human insulin-like growth factor-I transcript with hepatic tissue expression that diverts away from the mitogenic IBE1 peptide. *Endocrinology* 136: 1939-44.
16. Van der Brande (1992) *W: Schofield P (red) The Insulin-like growth factors*, Oxford University Press, str. 12-37
17. Inzucchi SE, Robbins RJ (1996) Growth hormone receptor signalling and potential interaction with other cytokine receptors. *Endocrinol Metab* 4: 51-55
18. Liu P, Baker J, Perkins AS, Rotertson EJ, Efradiatis A (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type I IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75: 59-72
19. Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ (1996) Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 335: 1363-1367
20. Guler HP, Zapf J, Scheiwiller E, Froesch ER (1988) Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4889-4893
21. Zhou Y, Xu BC, Maheshwari HG, He L, Reed M, Lozykowski M, Okada S, Cataldo L, Coschigamo K, Wagner TE, Baumann G, Kopchick JJ (1997) A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13215-13220
22. Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA (1996) Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 17: 481-517
23. Sjogren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, Le Roith D, Tornell J, Isaksson OG, Jansson JO, Ohlsson C (1999) Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7088-7092
24. Liu JL, Grinberg A, Westphal H, Sauer B, Accili D, Karas M, LeRoith D (1998) Insulin-like growth factor-I affects perinatal lethality and postnatal development in a gene dosage-dependent manner: manipulation using the Cre/loxP system in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 12: 1452-1462
25. Pao C-I, Farmer PK, Begovic S, Goldstein S, Wu G-J, Philips LS (1992) Expression of hepatic insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 genes is transcriptionally regulated in streptozotocin-diabetic rats. *Mol Endocrinol* 6: 969-977
26. Adesanya OO, Zhou J, Samathanam C, Powell-Braxton L, Bondy CA (1999) Insulin-like growth factor 1 is required for G2 progression in the estradiol-induced mitotic cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3287-3291
27. Moses AC, Young SC, Morrow LA, O'Brien M, Clemmons DR (1996) Recombinant human insulin-like growth factor I increases insulin sensitivity and improves glycemic control in type II diabetes. *Diabetes* 45: 91-100
28. Cardona-Gomez GH, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitio I, Garcia-Segura LM (2001) Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection. *Brain Res Rev* 37: 320-334
29. Pell JM, Saunders JC, Gilmour RS (1993) Differential regulation of transcription initiation from insulin-like growth factor-I (IGF-I) leader exons and of tissue IGF-I expression in response to changed growth hormone and nutritional status in sheep. *Endocrinology* 132: 1797-1807
30. Lowe Jr WL, Lasky SR, LeRoith D, Roberts Jr CT (1988) Distribution and regulation of rat insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acids encoding alternative carboxyterminal E-peptides: evidence for differential processing and regulation in liver. *Mol Endocrinol* 2: 528-535
31. Zarrilli R, Bruni CC, Riccio A (1994) Multiple levels of control of insulin-like growth factor gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 101: R1-R14
32. Mittanck DW, Kim SW, Rotwein P (1997) Essential promoter elements are located within the 5' untranslated region of human insulin-like growth factor-I exon I. *Mol Cell Endocrinol* 126: 153-163
33. Hall LJ, Kajimoto Y, Bichell DP, Kim SW, James PL, Counts D, Nixon L, Tobin G, Rotwein P (1992) Functional analysis of the rat insulin-like growth factor I gene and identification of an IGF-I gene promoter. *DNA Cell Biol* 11 301-313
34. Jansen E, Steenbergh PH, LeRoith D, Roberts Jr CT, Sussenbach JS (1991) Identification of multiple transcription start sites in the human insulin-like growth factor-I gene. *Mol Cell Endocrinol* 78: 115-125
35. Ohlsen SM, Dean DM and Wong EA (1993) Characterization of multiple transcription initiation sites of the ovine insulin-like growth factor-I gene and expression profiles of three alternatively spliced transcripts. *DNA Cell Biol* 12: 243-251
36. Yang H, Adamo ML, Koval AP, McGuinness MC, Ben-Hur H, Yang Y, LeRoith D, Roberts CT (1995) Alternative leader sequences in insulin-like growth factor I mRNAs modulate translational efficiency and encode multiple signal peptides. *Mol Endocrinol* 9: 1380-1395
37. Adamo ML (1995) Regulation of insulin-like growth factor expression. Implications for normal and pathological growth. *Diabetes Rev* 3: 2-27
38. Gronowski AM, Zhong Z, Wen Z, Thomas MJ, Darnell Jr JE, Rotwein P (1995) In vivo growth hormone treatment rapidly stimulates the tyrosine phosphorylation and activation of Stat3. *Mol Endocrinol* 9: 171-177

39. Gronowski AM, Le Stunff C, Rotwein P (1996) Acute nuclear actions of growth hormone (GH): cycloheximide inhibits inducible activator protein-1 activity, but does not block GH-regulated signal transducer and activator of transcription activation or gene expression. *Endocrinology* 137: 55-64
40. Nolten LA, van Schaik, FMA, Steenburgh PH, Sussenbach JS (1994) Expression of the insulin-like growth factor I gene is stimulated by the liver-enriched transcription factors C/EBP alpha and LAP. *Mol Endocrinol* 8, 1636-1645
41. Nolten LA, Steenburgh PH, Sussenbach JS (1995) Hepatocyte nuclear factor 1 alpha activates promoter 1 of the human insulin-like growth factor I gene via two distinct binding sites. *Mol Endocrinol* 9: 1488-1499
42. Wang L, Wang X, Adamo ML (2000) Two putative GATA motifs in the proximal exon 1 promoter of the rat insulin-like growth factor I gene regulate basal promoter activity. *Endocrinology* 141: 1118-1126
43. Ji C, Chang W, Centrella M, McCarthy TL (2003) Activation domains of CCAAT enhancer binding protein delta: regions required for native activity and prostaglandin E2-dependent transactivation of insulin-like growth factor I gene expression in rat osteoblasts. *Mol Endocrinol* 17: 1834-1843
44. Bikle DD, Sakata T, Leary C, Elalieh H, Ginzinger D, Rosen CJ, Beamer W, Majumdar S, Halloran BP (2002) Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. *J Bone Miner Res* 17: 570-8
45. Thomas MJ, Umayahara Y, Shu H, Centrella M, Rotwein P, McCarthy TL (1996) Identification of the cAMP response element that controls transcriptional activation of the insulin-like growth factor-I gene by prostaglandin E2 in osteoblasts. *J Biol Chem* 271: 21835-21841
46. Mandrup S, Lane MD (1997) Regulating adipogenesis. *J Biol Chem* 272: 5367-70
47. Umayahara Y, Billiard J, Ji C, Centrella M, McCarthy TL, Rotwein P (1999) CCAAT/enhancer-binding protein delta is a critical regulator of insulin-like growth factor-I gene transcription in osteoblasts. *J Biol Chem* 274: 10609-10617
48. Canalis E (1996) Clinical review 83: Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3441-3447
49. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC (1998) Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 102: 274-282
50. Delany AM, Durant D, Canalis E (2001) Glucocorticoid suppression of IGF I transcription in osteoblasts. *Mol Endocrinol* 15: 1781-1789
51. Umayahara Y, Kajimoto Y, Fujitani Y, Gorogawa S, Yasuda T, Kuroda A, Ohtoshi K, Yoshida S, Kawamori D, Yamasaki Y, Hori M (2002) Protein kinase C-dependent, CCAAT/enhancer-binding protein beta-mediated expression of insulin-like growth factor I gene. *J Biol Chem* 277: 15261-15270
52. Nolten LA, Steenburgh PH, Sussenbach JS (1996) The hepatocyte nuclear factor 3beta stimulates the transcription of the human insulin-like growth factor I gene in a direct and indirect manner. *J Biol Chem* 271: 31846-31854
53. Pao CI, Zhu J, Robertson DG, Lin KM, Farem PK, Begovic S, Wu G, Phillips L (1995) Transcriptional regulation of the rat insulin-like growth factor-I gene involves metabolism-dependent binding of nuclear proteins to a downstream region. *J Biol Chem* 270: 24917-24923
54. Kaytor EN, Zhu JL, Pao C-I, Phillips LS (2002) Insulin-responsive nuclear proteins facilitate Sp1 interactions with the insulin-like growth factor-I gene. *J Biol Chem* 276: 36896-36901
55. Wang X, Talamantez JL, Adamo ML (1998) A CACCC box in the proximal exon 2 promoter of the rat insulin-like growth factor I gene is required for basal promoter activity. *Endocrinology* 139:1054-66
56. Frayling TM, Hattersley AT, McCarthy A, Holly J, Mitchell SM, Gloyne AL, Owen K, Davies D, Smith GD, Ben-chlomo Y (2002) A putative functional polymorphism in the IGF-I gene: association studies with type 2 diabetes, adult height, glucose tolerance, and fetal growth in U.K. populations. *Diabetes* 51: 2313-2316
57. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE (2000) The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 21:215-244
58. Stewart CEH, Rotwein P (1996) Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 76: 1005-1026
59. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16: 143-163
60. Allander SV, Larsson C, Ehrenborg E, Suwanich-Kul A, Weber G, Morris SL, Bajalica S, Keifer MC, Luthman H, Powell DR (1994) Characterization of the chromosomal gene and promoter for human insulin-like growth factor binding protein-5. *J Biol Chem* 269: 10891-10898
61. Deangelis T, Ferber A, Baserga R (1995) Insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the platelet-derived growth factor receptor. *J Cell Physiol* 164: 214-221
62. Valentini B, Purcu PL, Quinn, Baserga R (1994) The role of the insulin-like growth factor I receptor in the transformation by simian virus 40 T antigen. *Oncogene* 9: 825-831
63. Butler AA, LeRoith D (2001) Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 142: 1685-1688
64. Szebenyi G, Rotwein P (1994) The mouse insulin-like growth factor II/cation-independent mannose 6-phosphate (IGF-II/MPR) receptor gene: molecular cloning and genomic organization. *Genomics* 19: 120-129
65. Lau MMH, Stewart CEH, Liu Z, Bhatt H, Rotwein P, Stewart CL (1994) Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev* 8: 2953-2963
66. Frasca F, Pandini G, Sciala P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R (1999) Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 19: 3278-3288
67. Sung CK, Sanchez-Margalet V, Goldfine I (1994) Role of p85 subunit of phosphatidylinositol-3-kinase as an adaptor molecule linking the insulin receptor, p62, and GTPase-activating protein. *J Biol Chem* 269: 503-512
68. KostECKA Z, Blahovec J (1999) Insulin-like growth factor binding proteins and their functions (minireview). *Endocr Regul* 33: 90-94
69. Mohan S, Baylink DJ (2002) IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms. *J Endocrinol* 175: 19-31
70. Baxter RC (2000) Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol* 278: E967-E976
71. Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Lamson G, Rosenfeld RG (1990) Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: effects of a pregnancy-associated serum protease activity. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 806-816
72. Maile LA, Holly JM (1999) Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteolysis: occurrence, identification, role and regulation. *Growth horm IGF Res* 9: 85-95
73. Coverley JA, Baxter RC (1997) Phosphorylation of insulin-like growth factor binding proteins. *Mol Cell Endocrinol* 128: 1-5
74. Aamar YG, Thompson GR, Linkhart TA, Chen ST, Baylin DJ, Mohan S (2002) Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5) interacts with a four and a half LIM protein 2 (FHL2). *J Biol Chem* 277: 12053-12060

75. Jones JL, Gockerman A, Busby WH Jr, Wright G, Clemmons DR (1993) Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *PNAS* 90: 10553-10557
76. Liu B, Lee HY, Weinzimer SA, Powell DR, Clifford JL, Kurie JM, Cohen P (2000) Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and retinoid X receptor-alpha regulate transcriptional signaling and apoptosis. *J Biol Chem* 275: 33607-33613
77. Miyakoshi N, Qin X, Kasukawa Y, Richman C, Srivastava AK, Baylink DJ, Mohan S (2001) Evidence that IGF-binding protein-5 functions as a growth factor. *J Clin Invest* 107: 73-81
78. Boisclair YR, Rhoads RP, Ueki I, Wang J, Ooi GT (2001) The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system. *J Endocrinol* 170: 63-70
79. Twigg SM, Kiefer MC, Zapf J, Baxter RC (2000) A central domain binding site in insulin-like growth factor binding protein-5 for the acid-labile subunit. *Endocrinology* 141: 454-457
80. Pollak M (2000) Insulin-like growth factor physiology and cancer risk. *Eur J Cancer* 36: 1224-1228
81. Dunn SE, Ehrlich M, Sharp NJ (1998) A dominant negative mutant of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits the adhesion, invasion, and metastasis of breast cancer. *Cancer Res* 58: 3353-3361
82. Pollak M, Schally AV (1998) Mechanisms of antineoplastic action of somatostatin analogs. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: 143-152
83. Veronesi U, D'PG, Marubini E, et al. (1999) Randomized trial of fenretinide to prevent second breast malignancy in women with early breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 1847-1856
84. Maskarinec G, Williams AE, Kaaks R (2003) A cross-sectional investigation of breast density and insulin-like growth factor I. *Int J Cancer* 107: 991-996
85. Huynh H, Beamer W, Pollak M, Chan TW (2000) Modulation of transforming growth factor beta1 gene expression in the mammary gland by insulin-like growth factor I and octreotide. *Int J Oncol* 16: 277-281
86. Gloudemans T, Pospiech I, Van Der Ven LT, Lips CJ, Schneid H, Den Otter W, Sussenbach JS (1992) Expression and CpG methylation of the insulin-like growth factor II gene in human smooth muscle tumors. *Cancer Res* 52: 6516-21.
87. Lambert S, Vivario J, Boniver J, Gol-Winkler R. (1990) Abnormal expression and structural modification of the insulin-like growth-factor-II gene in human colorectal tumors. *Int J Cancer* 46: 405-10
88. Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, Smith PJ, Reeve AE (1993) Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature* 362 :749-751.
89. Liu Y, Wang H, Zhao J, Ma J, Wei L, Wu S, Xie T, Shen F, Trojan J, Habib N, Anthony DD, Wu M, Guo Y (2000) Enhancement of immunogenicity of tumor cells by cotransfection with genes encoding antisense insulin-like growth factor-1 and B7.1 molecules. *Cancer Gene Ther* 7 :456-65.

Insulin-like growth factor and interacting proteins

Aleksandra Obrepalska-Stęplowska^{1,✉}, Łukasz Durzyński², Anna Goździcka-Józefiak²

¹Interdepartmental Laboratory of Molecular Biology, Plant Protection Institute, 20 Mieczurina St., 60-318 Poznan, Poland

²Department of Molecular Virology, Adam Mickiewicz University, 5 Miedzichodzka St., 61-375 Poznan, Poland

✉ e-mail: ao.steplowska@ior.poznan.pl

Key words: insulin-like growth factor - IGF-I, somatotropic axis, IGF-I induced signal transduction, IGFBP

ABSTRACT

Insulin-like growth factor – IGF-I is a small, 70 aminoacid mitogenic peptide, contributing to processes of growing, cancerogenesis, apoptosis, wound healing and many others. It constitutes so called 'somatotropic axis GH-IGF', composed of many other components. This axis is responsible for regulation of metabolic processes, and its proper functioning conditions organism's homeostasis. Presented work describes concise review of publications concerning IGF-I structure, function, expression and proteins affecting its activity, synthesis and circulation.

Katarzyna Bąbol

Janusz Błasiak

Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, Poland

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

Artykuł otrzymano 23 sierpnia 2004

Artykuł zaakceptowano 25 października 2004

Słowa kluczowe: receptor β_3 -adrenergiczny, metabolizm tłuszczów, otyłość, cukrzyca typu 2, polimorfizm genetyczny

Wykaz skrótów: β_3 -AR - receptor β_3 -adrenergiczny; BMI - indeks masy ciała; e1-e4 - pętłe zewnątrzkomórkowe receptora β_3 -adrenergicznego; G_s , G_i - białka regulacyjne typu G; i1-i4 - pętłe wewnątrzkomórkowe receptora β_3 -adrenergicznego; OR - iloraz szans; RT-PCR - reakcja łańcuchowa z udziałem odwrotnej transkryptazy; tm1-tm7 - domeny błonowe receptora β_3 -adrenergicznego.

STRESZCZENIE

Receptor β_3 -adrenergiczny (β_3 -AR), należący do rodziny receptorów metabotropowych, odgrywa ważną rolę w procesach energetycznych oraz w utrzymywaniu prawidłowego poziomu glukozy we krwi człowieka. Występuje głównie w adipocytach i pobudzany jest m. in. przez adrenalinę i noradrenalinę, które aktywując receptor stymulują procesy lipolizy i termogenezy. Wpływ receptora β_3 -adrenergicznego na bilans energetyczny i utrzymywanie stałego poziomu glukozy we krwi pozwala sądzić, że może on mieć związek z otyłością i cukrzycą. Są to choroby metaboliczne, związane m. in. z zaburzeniami gospodarki lipidowej, dlatego istotne znaczenie w ich występowaniu może mieć receptor β_3 -adrenergiczny oraz jego mutacja w kodonie 64. Wyniki wielu badań świadczą o tym, że polimorfizm W64R receptora β_3 -adrenergicznego oprócz wpływu na otyłość i cukrzycę typu 2, może mieć również związek z występowaniem nadciśnienia tętniczego w chorobie wieńcowej oraz nowotworów złośliwych, w tym raka endometrium. Wskazują również na związek polimorfizmu W64R z występowaniem tych chorób u osób otyłych. W obliczu problemu otyłości jako choroby cywilizacyjnej, identyfikacja genów takich jak gen receptora β_3 -adrenergicznego, wydaje się jednym z najważniejszych zadań genomiki.

WPROWADZENIE

Otyłość i cukrzyca typu 2 należą do powszechnych schorzeń typowych dla rozwiniętych cywilizacji zachodnich. Wskaźnik otyłości (indeks masy ciała mierzony stosunkiem liczbowym masy wyrażonej w kilogramach do kwadratu wzrostu w metrach, BMI > 30) w USA wynosi 22,5%, podczas gdy w Japonii tylko 2,4% [1,2]. Występowanie tych przypadłości może być związane z energetycznym metabolizmem komórkowym. Jednakże trudno jest połączyć zmiany wielkości biochemicznych, takich jak na przykład poziom cholesterolu, występujących w okresie kilku miesięcy, z chorobami związanymi z otyłością, rozwijającymi się przez lata. Istnieją silne różnice, tak osobnicze jak i etniczne, w stopniu otyłości. Średnie dzienne zapotrzebowanie energetyczne dla Kanadyjczyków w wieku 19-24 lat wynosi 3000 kcal, podczas gdy dla Japończyków w tym samym wieku – tylko 2300 kcal [3]. Ta różnica może wynikać z różnic w zmienności genomów poszczególnych grup etnicznych i naturalnej selekcji mutacji, pozwalających na lepsze przystosowanie się do środowiska i typu rolnictwa w danym regionie. Na przykład Kanadyjczycy, aby lepiej przystosować się do funkcjonowania w chłodnym klimacie, mogą wykorzystywać termogenezę przy dużej masie ciała.

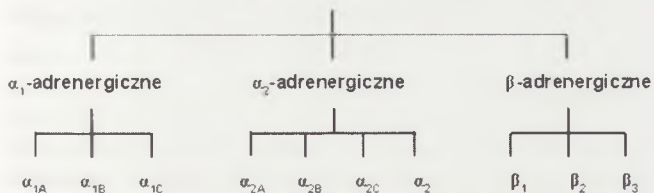
Identyfikacja genów związanych z otyłością, a pośrednio także z towarzyszącymi jej chorobami, wydaje się jednym z najważniejszych zadań genomiki. Jednym z tych genów może być gen receptora β_3 -adrenergicznego (β_3 -AR).

RODZINA RECEPTORÓW ADRENERGICZNYCH

Receptory adrenergiczne należą do rodziny receptorów metabotropowych (serpentynowych) i pobudzane są przez klasyczne neuroprzekaźniki – adrenalinę i noradrenalinę. Rodzina receptorów adrenergicznych zawiera trzy podrodziny: α_1 , α_2 i β różniące się między sobą strukturą i funkcją oraz kodowane przez oddzielne geny (Rys. 1). Ich wspólną cechą jest to, że składają się z siedmiu domen błonowych i związane są z białkami G [4].

Receptory α_1 -adrenergiczne są sprzężone z układem sygnalizacyjnym, wykorzystującym Ca^{2+} - poprzez białko G regulują kanały wapniowe, zwiększając stężenie Ca^{2+} w cytoplazmie, a także aktywują fosfolipazę C. Występują one w dużych ilościach w mózgu i regulują wiele procesów fizjologicznych, w tym przyczyniających się do utrzymania ciśnienia tętniczego [5]. Receptory α_2 -adrenergiczne, sprzężone z białkiem G_i , hamują aktywność cykazy adenylanowej

RECEPTORY ADRENERGICZNE



Rysunek 1. Podział receptorów adrenergicznych (zmodyfikowano wg [16]).

oraz syntezę cAMP. Mogą one występować jako receptory presynaptyczne, hamujące uwalnianie neuroprzekaźnika z zakończeń nerwowych, a także jako receptory postsynaptyczne, hamujące sygnał wewnątrzkomórkowy, przekazywany przez cAMP [5].

Receptory β -adrenergiczne są sprzężone z białkiem Gs i aktywują cyklazę adenylanową, powodując wzrost stężenia cAMP w komórce. Na podstawie różnic w sposobie wiązania ligandów receptory β podzielono na 3 kategorie: β_1 , β_2 i β_3 . Wykazują one homologie względem siebie, na przykład receptor β_3 -adrenergiczny człowieka ma w 49% homologiczną sekwencję aminokwasową z receptorem β_2 i w 51% z receptorem β_1 [6,7]. Receptor β_1 występuje w mózgu, nerkach i sercu człowieka, gdzie oprócz aktywacji cyklazy adenylanowej powoduje także zwiększony napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórek mięśnia sercowego. Receptor β_2 występuje głównie w mięśniach gładkich i wątrobie [8]. Pobudzenie receptora β -adrenergicznego powoduje wzrost glukoneogenezy w wątrobie i mięśniach oraz wzrost uwalniania insuliny, glukagonu i reniny [9].

RECEPTOR β_3 -ADRENERGICZNY

Największe znaczenie w metabolizmie lipidów ma receptor β_3 -adrenergiczny. Znajduje się głównie w tkance tłuszczowej i przewodzie pokarmowym, gdzie jest związany z błoną adipocytów [10]. Pobudzony przez agonistę stymuluje lipolizę w żółtej tkance tłuszczowej oraz termogenezę w tkance brunatnej i mięśniach szkieletowych [6,11]. Wpływa również na bilans energetyczny i utrzymywanie stałego poziomu glukozy we krwi [12,13]. Jest to receptor szczególnie, ponieważ oprócz tego, że – w odróżnieniu od pozostałych receptorów β -adrenergicznych – ma inną lokalizację, a co za tym idzie wywołuje inne efekty, jego aktywność nie jest regulowana na poziomie agonisty. Receptor β_3 -adrenergiczny pobudzany jest przez adrenalinę i noradrenalinę, które wpływają na redukcję masy ciała poprzez zwiększenie metabolizmu lipidów w tkance tłuszczowej żółtej i wzrost aktywności procesów termogenezy w tkance tłuszczowej brunatnej [6,9].

STRUKTURA

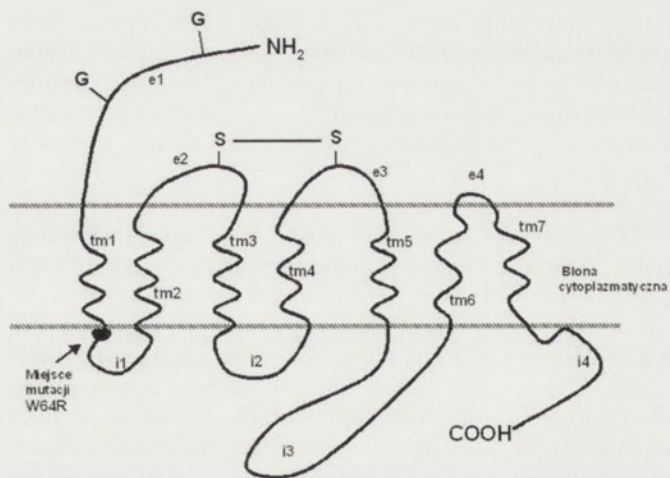
Receptor β_3 -adrenergiczny jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym o masie 42,8 kDa. Zbudowany jest z 408 reszt aminokwasowych tworzących strukturę α -helisy (Rys. 2). Gen β_3 -AR człowieka znajduje się w krótszym ramieniu chromosomu 8p-p11.2 i składa się z dwóch eksonów, z których pierwszy, o długości 1,4 kbp, koduje 402 aminokwa-

sy, natomiast drugi, o długości 0,7 kbp – 6 aminokwasów z C-końcowego fragmentu receptora oraz cały pre-mRNA intronowy [6,14,15]. Miejsce startu transkrypcji znajduje się w obszarze 5' genu między 150 a 200 nukleotydem od kodonu ATG, który jest miejscem startu translacji [14]. W rejonie promotorowym genu występują sekwencje mogące brać udział w jego regulacji poprzez oddziaływanie z glukokortykoidami, kwasem masłowym, estrami forbolu oraz insuliną [6,14,15].

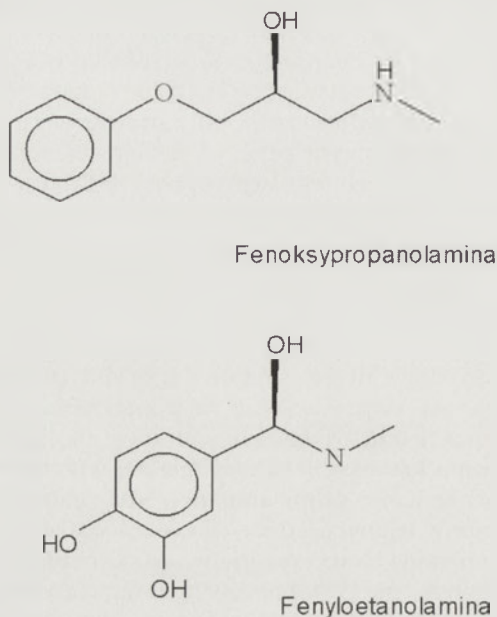
W cząsteczce receptora β_3 -adrenergicznego występuje siedem hydrofobowych domen błonowych składających się z 22-28 aminokwasów. Pomiędzy nimi znajdują się odcinki hydrofilowe tworzące pętle – trzy zewnątrzkomórkowe (e2, e3, e4), odpowiadające za przestrzenną konfigurację receptora, i trzy wewnątrzkomórkowe (i1, i2, i3). Końcowa grupa karboksylowa znajduje się w cytoplazmie, natomiast końcowa grupa aminowa – na zewnątrz komórki. Receptor w rejonie C-końcowym jest dodatkowo połączony z wewnętrzną błoną komórkową za pośrednictwem kwasu palmitynowego. W N-końcowym fragmencie łańcucha występuje mostek dwusiarczkowy pomiędzy dwoma pętlami, a dokładnie pomiędzy resztami Cys¹¹⁰ a Cys¹⁸⁹, a także dwa miejsca glikozylacji – w pozycjach Asn⁸ i Asn²⁶. Odpowiadają one za strukturę receptora i jego zakotwiczenie w błonie komórkowej. Za wiązanie liganda są odpowiedzialne zanurzone w błonie odcinki hydrofobowe, które tworzą kieszeń wiążącą. Początkowy i końcowy odcinek trzeciej pętli cytoplazmatycznej odpowiada za przyłączanie białka G – określa, z jakim typem białka G będzie się sprzęgał receptor [8]. Miejsca odpowiedzialne za regulację aktywności receptora, która przebiega na drodze fosforylacji przez odpowiednie kinazy białkowe, występują w trzeciej pętli cytoplazmatycznej oraz na C-końcu łańcucha białka receptorowego [6,16].

WIĄZANIE LIGANDÓW

Można rozważać 3 grupy ligandów receptorów adrenergicznych: 1. agonści receptorów β_1 , β_2 i β_3 ; 2. agonści receptora β_3 i antagonisty receptorów β_1 i β_2 oraz 3. antago-



Rysunek 2. Schemat receptora β_3 -adrenergicznego człowieka z zaznaczonymi miejscami glikozylacji (G) we fragmencie N-końcowym. tm1-tm7 – domeny błonowe, e1-e4 – pętle kontaktujące się ze środowiskiem zewnętrznym, i1-i4 – pętle wewnątrzkomórkowe (zmodyfikowano wg [8]).



Rysunek 3. Struktura fenoksypropanolaminy i fenyletanolaminy.

niści receptorów wszystkich trzech typów. Do pierwszej grupy należą: noradrenalina, adrenalina, izoproterenol, salbutamol, BRL 37344, BRL 35135, SR 58611A i clenbuterol. Do grupy drugiej, czyli agonistów β_3 i jednocześnie antagonistów β_1 i β_2 należą: bucindolol, ICI 201651, CGP 12177A, oksyprenolol, pindolol, cyano-pindolol, alprenolol, nadolol, CL 316,243, cerazolol oraz tetratolol. Antagonistami wszystkich trzech typów receptorów są: bupranolol, ICI 118551 i CGP 20712A [17].

Podstawę struktury wszystkich ligandów stanowią dwa związki: fenyletanolamina (np. BRL 37344) i fenoksypropanolamina (np. bucindolol) zbudowane z pierścienia benzenowego i alkiłowego łańcucha bocznego (Rys. 3). Związki te różnią się między sobą ilością atomów węgla w łańcuchu bocznym. Łańcuchy te mają określone konformacje przestrzenne i mogą występować w formie skupionej, czyli z minimalnymi odległościami między atomami, oraz w formie rozciągniętej. Konformacje te są istotne dla funkcji ligandu i efektu, jaki wywołuje on reagując z odpowiednim receptorem. Na przykład pindolol i cyanopindolol z łańcuchem bocznym w formie rozciągniętej są agonami receptora β_3 -adrenergicznego, natomiast w formie skupionej wykazują działanie antagonistyczne w stosunku do receptorów β_1 i β_2 [17].

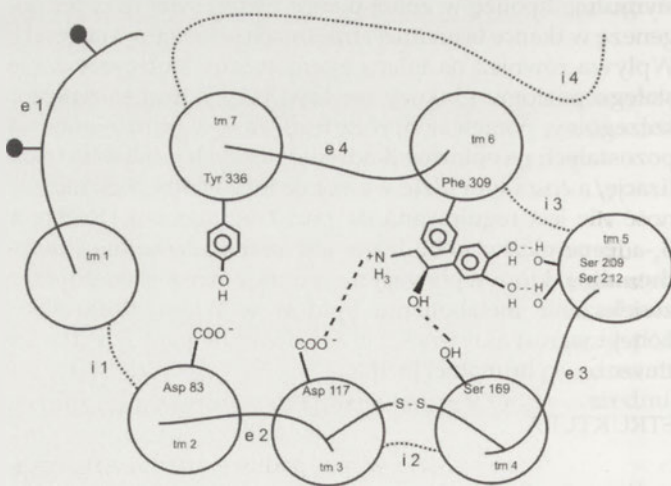
Miejsce receptora wiążące ligand znajduje się wewnątrz błony, a w jego tworzeniu biorą udział reszty aminokwasowe należące do różnych odcinków transbłonowych. By umożliwić zakotwiczenie się grupy aminowej ligandu, domena rozpoznająca i wiążąca musi zawierać grupy kwasowe. W receptorze β_3 -adrenergicznym miejscem zakotwiczenia ligandu jest reszta Asp¹¹⁷ znajdująca się w odcinku błonowym 3. Grupy hydroksylowe w położeniu *meta* i *para* pierścienia benzenowego ligandu tworzą wiązania wodorowe z resztami Ser²⁰⁹ i Ser²¹² występującymi w tm5, natomiast grupa hydroksylowa znajdująca w części alkiłowej ligandu tworzy wiązanie hydrofobowe z resztą Ser¹⁶⁹ w tm4 (Rys. 4). Wiązanie to stabilizowane jest przez oddziaływania hy-

drofobowe pomiędzy pierścieniem aromatycznym a resztą Phe³⁰⁹ w tm6 [17]. Po związaniu liganda następuje aktywacja sprzężonego z receptorem białka G_s oraz przenoszenie sygnału na odpowiedni układ efektorowy.

AKTYWACJA

Receptor β_3 -adrenergiczny związany jest z białkiem G_s sprzężonym z cyklazą adenylanową. Miejsce wiązania białka G_s znajduje się w trzeciej pętli cytoplazmatycznej (i3), której końcowy odcinek wpływa na aktywację białka G_s. Sprzężenie z białkiem G pociąga za sobą aktywację cyklazy adenylanowej, przekształcającej ATP w cAMP [4,14]. Cykliczny AMP aktywuje kinazę białkową A oraz kinazy BARK – fosforylujące receptory β (ang. *β adrenergic receptor kinase*). Fosforylacja receptora, będąca konsekwencją przyłączenia ligandu, powoduje jego desensytyzację, czyli uniewrażliwienie na białko G. Jest to forma regulacji aktywności receptorów typu β . Jedynie β_3 -AR nie wykazuje desensytyzacji, co wynika z jego budowy, dlatego aktywność tego receptora zależy tylko od jego gęstości na powierzchni komórki [11].

Kinaza białkowa A, po aktywacji fosforyluje nieaktywną adipocytową lipazę triglicerydową. W konsekwencji następuje zmniejszona akumulacja triglicerydów w żółtej tkance tłuszczowej, ponieważ uaktywniona lipaza hydroлізуje triglicerydy do monoacyloglicerolu i wolnych kwasów tłuszczowych, które uwalniane są do krwioobiegu [4,12,13]. W adipocytach brunatnej tkanki tłuszczowej pobudzenie β_3 -AR przez noradrenalinę indukuje ekspresję genu kodującego lipazę lipoproteinową. Lipaza lipoproteinowa hydroлізуje triglicerydy związane z lipoproteinami, które transportują triglicerydy do żółtej tkanki tłuszczowej gdzie są one akumulowane. Zwiększona aktywność lipazy lipoproteinowej prowadzi do zmniejszenia poziomu lipoprotein bogatych w triglicerydy zapobiegając w ten sposób akumulacji lipidów. Poza tym pobudzenie β_3 -AR przez noradrenalinę



Rysunek 4. Receptor β_3 -adrenergiczny – region wiążący ligand, widok z wewnątrz komórki. tm1-tm7 – domeny transbłonowe, e1-e4 – pętle kontaktujące się ze środowiskiem zewnętrznym, i1-i4 – pętle wewnątrzkomórkowe, fragment N-końcowy z zaznaczonymi miejscami glikozylacji. W każdej domenie zaznaczono aminokwasy biorące udział w wiązaniu ligandu (zmodyfikowano wg [15]).

w komórkach brunatnej tkanki tłuszczowej indukuje termogenezę [12,13].

Receptor β_3 -adrenergiczny może występować także poza tkanką tłuszczową, co wiąże się z pełnieniem przez niego dodatkowej funkcji, występuje on bowiem w mięśniach gładkich układu pokarmowego, w którym bierze udział w regulacji perystaltyki jelit – jego stymulacja powoduje relaksację mięśni [18].

β_3 -AR występuje także w mięśniu sercowym, co może mieć znaczenie dla funkcjonowania układu krążenia. Po stymulacji β_3 -AR syntetycznymi agonami obserwowano zmniejszenie kurczliwości serca, rozkurcz naczyń obwodowych głównie w skórze i tkance tłuszczowej oraz obniżenie ciśnienia tętniczego [19,20]. Ponadto receptor β_3 -adrenergiczny wpływa na utrzymanie prawidłowego poziomu glukozy we krwi, gdyż jego aktywacja pośrednio stymuluje wydzielanie insuliny poprzez wywoływanie wzrostu stężenia we krwi wolnych kwasów tłuszczowych [6,12,13].

Wysoki poziom mRNA β_3 -AR stwierdzono u noworodków w okołonerkowej brunatnej tkance tłuszczowej. U osobników dorosłych wysoki poziom mRNA β_3 -AR występuje w adipocytach głęboko położonych tkanek tłuszczowych, natomiast niski – w tkankach tłuszczowych podskórnych. Ekspresję mRNA β_3 -AR na wysokim poziomie stwierdzono również w woreczku żółciowym i w jelicie grubym. W tkance mięśni poprzecznie prążkowanych, mięśniu sercowym, wątrobie, płucach, nerkach, tarczycy oraz w limfocytach stwierdzono znacznie niższy poziom mRNA β_3 -AR [11]. Tabela 1 przedstawia zestawienie wyników badań ekspresji mRNA β_3 -AR w różnych tkankach metodą RT-PCR.

POLIMORFIZM GENU β_3 -AR

Opisany polimorfizm genu β_3 -AR to tranzycja T → C w kodonie 64, powodująca podstawienie tryptofanu w pozycji 64 arginina [21]. Mutacja ta ma wpływ na funkcję β_3 -AR – ogranicza proces lipolizy, przyczyniając się do zwiększenia masy ciała [12,13,22]. Takie zaburzenia gospodarki lipidowej mogą prowadzić do wzrostu insulinooporności, a w konsekwencji do zachorowania na cukrzycę typu 2 [22]. U osób, u których występuje polimorfizm, czyli mających genotyp Trp/Arg lub Arg/Arg zamiast Trp/Trp, wzrasta BMI. W przypadku heterozygot Trp/Arg, BMI jest wyższe o 1 kg/m², a w przypadku homozygot Arg/Arg, o 3 kg/m² od BMI dla homozygot Trp/Trp. Ponadto u osób otyłych stosujących dietę zaobserwowano mniejszy spadek masy ciała w przypadku osobników mających wariant Arg w porównaniu z nosicielami wariantu Trp [22].

Do głównych mechanizmów biochemicznymi leżących u podstaw zaburzeń gospodarki tłuszczowej należą zmniejszenie wrażliwości receptora na agona oraz obniżenie zdolności do syntezy cAMP – w przypadku wariantu Arg, zdolność ta jest nawet 10-krotnie mniejsza [12]. Konsekwencją tych procesów jest akumulowanie triglicerydów w żółtej tkance tłuszczowej, ponieważ nie są one hydrolizowane do wolnych kwasów tłuszczowych.

Przeprowadzono wiele badań na różnych populacjach i grupach etnicznych. Wykazały one znaczące różnice w występowaniu wariantu Arg w poszczególnych grupach. W populacji kaukaskiej częstość występowania wynosiła 8-10%, w grupie Japończyków 20%, wśród Eskimosów 40%, a wśród Indian Pima 32% [12,23-25]. W grupach tych zaobserwowano także związek pomiędzy wariantem polimorficznym Arg a zwiększonym BMI i występowaniem otyłości [10,11,13].

OTYŁOŚĆ

U osób, u których występował polimorfizm, czyli posiadających genotyp Trp/Arg lub Arg/Arg zamiast Trp/Trp, obserwowano wzrost BMI, który wynosił 1kg/m² dla heterozygot Trp/Arg i 3 kg/m² dla homozygot Arg/Arg [24,25]. W niektórych przypadkach obserwowano dwukrotnie większą częstość allelu Arg w grupie otyłych [13,26-28]. Ponadto u osób otyłych stosujących niskokaloryczną dietę zaobserwowano mniejszy spadek masy ciała w przypadku osobników z wariantem Arg w porównaniu z nosicielami wariantu Trp [12,29,30]. Zaobserwowano także związek polimorfizmu W64R z tzw. syndromem insulinooporności (otyłość androidalna, hyperinsulinemia, nadciśnienie) i wczesnym pojawieniem się cukrzycy, zwłaszcza u kobiet [31]. Z drugiej jednak strony wyniki szeregu badań świadczą o braku zależności pomiędzy polimorfizmem genu β_3 -AR a występowaniem otyłości i to w przypadku takich samych grup etnicznych, gdyż badania te dotyczą populacji kaukaskiej, skandynawskiej i japońskiej [10,12,29,30]. Także z naszych własnych badań przeprowadzonych na mieszkańcach regionu łódzkiego wynika, że może nie być zależności pomiędzy polimorfizmem β_3 -AR a występowaniem otyłości, gdyż nie znaleziono znaczących różnic w częstości występowania allelu zmutowanego (Arg) w grupie pacjentów otyłych i w grupie kontrolnej [32]. Przyczyna tkwi prawdopodobnie w tym, że w badanych grupach została uwzględniona sama otyłość, bez uwzględniania jej przyczyn, które mogły mieć związek, lub nie, z polimorfizmem

Tabela 1: Występowanie mRNA β_3 -AR w tkankach człowieka (wyniki uzyskane metodą RT-PCR, wg [11]).

Tkanka	Poziom mRNA
centralny układ nerwowy	-
wątroba	-
pęcherzyk żółciowy	++++
trzustka	-
żołądek	++
jelita	+++
mięśnie szkieletowe	-
tkanka tłuszczowa żółta	++++
tkanka tłuszczowa brunatna	++++
naczynia sercowe	+
płuca	-
prostata	++
nerki	-
pęcherz moczowy	+

- brak sygnału

++++ największy sygnał

W64R. Prawdopodobnie ważną rolę w ekspresji wariantu Trp64Arg odgrywają predyspozycje genetyczne do niektórych chorób (cukrzyca typu 2, otyłość), mogą modyfikować efekt wywoływany przez mutację W64R [31].

CUKRZYCA TYPU 2

Otyłość jest jednym z głównych czynników sprzyjających cukrzycy typu 2. Zarówno stopień otyłości, jak i długość jej trwania, a także rozmieszczenie tkanki tłuszczowej mają wpływ na ryzyko zachorowania na cukrzycę typu 2 [10,12]. Aktywacja β_3 -AR pośrednio stymuluje wydzielanie insuliny, poprzez wzrost stężenia we krwi wolnych kwasów tłuszczowych, dlatego też polimorfizm β_3 -AR może wpływać na nabywanie insulinooporności, a w konsekwencji prowadzić do cukrzycy [6,10,12]. Przeprowadzono szereg badań, których wyniki wskazują na istnienie zależności pomiędzy występowaniem allelu Arg a cukrzycą. Na przykład wśród Indian Pima, gdzie częstość allelu Arg wynosi 0,32, a także w populacji fińskiej i japońskiej odkryto zależność pomiędzy homozygotami Arg/Arg a wczesnym pojawianiem się cukrzycy typu 2 [22-24,33]. Badano też związek cukrzycy z otyłością porównując BMI cukrzyków i zdrowych wśród Japończyków i stwierdzono zależność polimorfizmu W64R z występowaniem cukrzycy u osób otyłych [28,33]. Z naszych badań wynika, że może istnieć związek pomiędzy polimorfizmem receptora β_3 -adrenergicznego, a występowaniem cukrzycy typu 2, jak również związek tego polimorfizmu z występowaniem cukrzycy u osób otyłych. Świadczą o tym istotne różnice w częstości allelu Arg pomiędzy chorymi na cukrzycę a zdrowymi, a także pomiędzy otyłymi cukrzykami a kontrolą (otyli bez cukrzycy) [32].

Wyniki wielu badań sugerują jednakże brak zależności pomiędzy polimorfizmem W64R a cukrzycą typu 2 i jej związkiem z otyłością. Badania przeprowadzone na populacjach japońskiej i fińskiej stwierdzają brak związku polimorfizmu z wczesnym pojawieniem się cukrzycy [7,34]. Nie stwierdzono również związku między występowaniem allelu Arg a pojawianiem się cukrzycy u pacjentów otyłych porównując BMI zdrowych i chorych na cukrzycę. Badania te przeprowadzono na populacjach japońskiej, kaukaskiej i wśród Indian Pima a ich wyniki sugerują, że w tych populacjach mutacja W64R nie przyczynia się do powstawania cukrzycy typu 2 [7,10,34].

NADCIŚNIENIE TĘTNICZE I CHOROBA WIEŃCOWA

Otyłość, insulinooporność oraz cukrzyca typu 2 są czynnikami wpływającymi na pojawianie się nadciśnienia tętniczego i występowanie choroby wieńcowej serca. Szacuje się, że otyłość zwiększa ryzyko nadciśnienia od 2 do 5,6 razy [35]. Poza tym czynnikami ryzyka dla nadciśnienia są również: zaawansowany wiek i dziedziczne obciążenie tym schorzeniem [35-37]. Nadciśnienie ma duży wpływ (oprócz otyłości i cukrzycy) na występowanie choroby wieńcowej [38] i jest jednocześnie jednym z trzech czynników (obok wysokiego poziomu cholesterolu oraz palenia tytoniu) przyczyniających się do powstania miażdżycy i zawału [39]. Istnieją przesłanki wskazujące na to, że mutacja receptora β_3 -adrenergicznego wpływając na zwiększanie masy

ciała, insulinooporność i cukrzycę, wpływa pośrednio także na zwiększenie ryzyka chorób serca i układu krążenia [10,12,22,40].

Do tej pory przeprowadzono niewiele badań nad związkiem pomiędzy polimorfizmem β_3 -AR a występowaniem choroby wieńcowej i nadciśnienia tętniczego. Badania prowadzone na dużej grupie Niemców wykazały, że zarówno genotyp Trp/Arg jak i Arg/Arg nie wpływają na wczesne pojawianie się i rozwój choroby wieńcowej [41]. W badaniach na grupie Amerykanów liczącej ponad 15 000 osób, stwierdzono różnice w częstości allelu Arg pomiędzy grupą badaną (0,081) a kontrolną (0,069), jednak nie stwierdzono w ich wyniku zależności pomiędzy polimorfizmem W64R a występowaniem choroby wieńcowej [9]. Wyniki naszych badań, przeprowadzonych na populacji regionu łódzkiego, mających na celu określenie zależności pomiędzy polimorfizmem W64R a występowaniem choroby wieńcowej i nadciśnienia tętniczego oraz związkiem tych chorób z otyłością, wykazały te zależności w przypadku choroby wieńcowej. Stwierdzono istotne różnice w występowaniu allelu Arg pomiędzy grupą pacjentów z chorobą wieńcową a grupą kontrolną oraz między osobami otyłymi z chorobą wieńcową a szczupłymi. W przypadku nadciśnienia wykazano brak istotnych różnic w występowaniu allelu Arg pomiędzy pacjentami z nadciśnieniem tętniczym a grupą kontrolną, ale wystąpiły różnice istotne statystycznie pomiędzy osobami otyłymi z nadciśnieniem a szczupłymi. Powyższe wyniki mogą wskazywać na istnienie zależności pomiędzy badanym polimorfizmem a występowaniem nadciśnienia u osób otyłych [32].

NOWOTWORY ZŁOŚLIWE

Zaburzenia funkcjonowania receptora β_3 -adrenergicznego mogą być związane z występowaniem raka endometrium, gdyż czynnikami ryzyka dla rozwoju tego nowotworu są otyłość, cukrzyca i nadciśnienie tętnicze, czyli schorzenia, do pojawiania których może przyczyniać się polimorfizm receptora β_3 -adrenergicznego. Prawidłowo funkcjonujący β_3 -AR aktywuje lipazę lipoproteinową, która hydrolizując lipidy zmniejsza ich akumulację w tkance tłuszczowej. Powoduje to zmniejszenie produkcji estronu, powstającego w tkance tłuszczowej na drodze konwersji z androstendionu, a którego nadmiar może sprzyjać inicjacji transformacji nowotworowej. Mutacja zaburza prawidłowe funkcjonowanie receptora, w związku z tym istnieje prawdopodobieństwo, że wariant Arg receptora β_3 -adrenergicznego zwiększa ryzyko zachorowania na raka endometrium [42].

Z naszych badań przeprowadzonych na grupie pacjentek z rakiem endometrium wynika, że polimorfizm receptora może mieć wpływ na powstawanie nowotworu u osób z wariantem polimorficznym Arg oraz, że powstawanie tego nowotworu może być związane z otyłością. Stwierdziłiśmy występowanie różnic istotnych statystycznie w częstości allelu Arg pomiędzy grupą pacjentek z rakiem endometrium a grupą kontrolną, poza tym współczynnik OR (iloraz szans określający szanse zachorowania na raka osób posiadających wariant polimorficzny w porównaniu z osobami o genotypie Trp/Trp) dla sumy genotypów Trp/Arg

i Arg/Arg oraz dla homozygoty Arg/Arg był równy odpowiednio 2,5 i 2,3. Podobne wyniki dało porównanie otyłych pacjentek z rakiem ze szczupłymi chorymi na raka, z tym, że OR dla sumy genotypów Trp/Arg i Arg/Arg wynosi 3,6, co może świadczyć o zależności pomiędzy polimorfizmem W64R receptora β_3 -adrenergicznego a występowaniem raka endometrium u pacjentek otyłych [43].

Otyłość oraz insulinooporność zwiększają ryzyko raka jelita grubego, szczególnie wśród mężczyzn [44-46]. Istnieje zatem podejrzenie, że pośrednio wpływ na występowanie tego raka może mieć również polimorfizm receptora β_3 -adrenergicznego. Wyniki badań przeprowadzonych na 131 chorych sugerują związek polimorfizmu W64R z występowaniem raka okrężnicy u osób otyłych. Najprawdopodobniej ma to związek z wpływem tego polimorfizmu na czynniki ryzyka raka jelita grubego, czyli obniżenie lipolizy prowadzące do otyłości, obniżenie termogenezy i wzrost insulinooporności [47].

ZASTOSOWANIE KLINICZNE AGONÓW RECEPTORA β_3 -ADRENERGICZNEGO

Odkrycie faktu, że stymulacja receptora może powodować redukcję masy ciała poprzez rozkład lipidów z tkanki tłuszczowej żółtej do wolnych kwasów tłuszczowych oraz znaczący wzrost aktywności metabolicznej tkanki tłuszczowej brunatnej w procesach termogenezy, spowodowało, że zaczęto postrzegać agonistów receptora jako potencjalne leki przeciwcukrzycowe i przeciw otyłości. Sądzi się także, że agony β_3 -AR mogą mieć znaczenie w leczeniu niewydolności serca, gdyż receptor β_3 -adrenergiczny może wpływać na regulację kanałów jonowych w sercu. Badania wykazały, że po zawale następuje 2-3-krotne zwiększenie proggu pobudliwości receptora β_3 [48]. Skoro stymulacja β_3 -AR syntetycznymi agonistami związana jest ze zmniejszeniem się kurczliwości mięśnia sercowego i obniżeniem ciśnienia krwi, to agony β_3 -AR mogą mieć duże znaczenie także dla pacjentów z niewydolnością serca i chorobami układu krążenia [49].

Badania wpływu agonów β_3 -AR na ewentualny wzrost metabolizmu tłuszczów, przeprowadzone na gryzoniach dawały satysfakcjonujące wyniki – stymulacja receptora odpowiednimi agonistami powodowała znaczącą utratę masy wśród otyłych gryzoni – głównie przez wzrost zużycia energii [50-53]. Zaczęto więc intensywne badania nad wpływem agonistów receptora β_3 -adrenergicznego na cukrzycę i otyłość u ludzi, rezultaty nie były jednak satysfakcjonujące [54,55]. Nie tylko nie dawały oczekiwanych wyników, ale również związki stosowane w badaniach, które nie były selektywnymi agonistami β_3 -AR, stymulowały dodatkowo receptory β_1 i β_2 , wywołując efekty uboczne (tachykardię i drgawki) [56,57]. Odkryto jednak związek, który okazał się wysoce selektywnym agonistą receptora β_3 -adrenergicznego – CL-316,243. Badania wykazały, że powoduje on wzrost lipolizy, utlenianie tłuszczów, wydzielanie insuliny (zależnie od stężenia) i nie wywołuje ubocznych efektów [53,58]. Nie nadaje się on jednak do klinicznego zastosowania, gdyż jest tylko częściowym agonistą β_3 -AR i jest słabo przyswajalny, a ponadto nie powoduje utraty masy [58-60]. Pomimo to badania nad farmakologicznymi właściwościami zarówno

receptora β_3 , jak i jego agonistów wciąż trwają, gdyż związki te mogą skutecznie służyć w walce z otyłością, cukrzycą czy też chorobami układu krążenia.

UWAGI KOŃCOWE

Odkrycie receptora β_3 -adrenergicznego we wczesnych latach osiemdziesiątych i stwierdzenie, że jego stymulacja poprzez selektywnych agonistów może prowadzić do redukcji masy ciała zwierząt doświadczalnych, głównie poprzez zwiększony wydatek energetyczny, stworzyło nadzieję, że związki te będą mogły być wykorzystane jako leki termogeneiczne i przeciwdziałające otyłości u ludzi. Co więcej w wielu zwierzęcych modelach otyłości i cukrzycy typu 2, agoniści wywoływali efekt przeciwcukrzycowy, poprzedzający, lub będący niezależny od efektu przeciwdziałania otyłości. Przy stopniu rozpowszechnienia otyłości i cukrzycy typu 2, porównywalnym czasem do epidemii, połączone właściwości przeciwcukrzycowe i przeciwdziałania otyłości czynią receptor β_3 -adrenergiczny atrakcyjnym celem terapii. Próby terapeutyczne z niektórymi agonistami receptora, powodującymi zwiększoną lipolizę, utlenienie tłuszczów i stymulację wydzielania insuliny, bez ubocznych efektów związanych z receptorami β_1 i β_2 , pozwalają patrzeć z nadzieją na planowanie i rozwój strategii terapeutycznych skierowanych na receptor β_3 -adrenergiczny. Postęp w wykorzystaniu receptora β_3 -adrenergicznego jako celu terapeutycznego uwarunkowany jest w pierwszym rzędzie postępami w poznaniu funkcjonalnych właściwości genomu człowieka oraz zrozumieniu różnic farmakologicznych związków oddziałujących z receptorem człowieka i gryzoni.

PIŚMIENNICTWO:

1. Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL (1998) Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 39-47
2. Yoshiike N, Matsumura Y, Zaman M M, Yamaguchi M (1998) Descriptive epidemiology of body mass index in Japanese adults in a representative sample from the National Nutrition Survey 1990-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 684-647
3. Kagawa Y, Yanagisawa Y, Hasegawa K, Suzuki H, Yasuda K, Kudo H, Abe M, Matsuda S, Ishikawa Y, Tsuchiya N, Sato A, Umetsu K (2002) Single nucleotide polymorphisms of thrifty genes for energy metabolism: evolutionary origins and prospects for intervention to prevent obesity-related diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 207-222
4. Kwiatkowska J (1998) Białka G jako „uniwersalny łącznik” w transmisji sygnałów z receptorów błonowych na ich efekторы. *Post Biochem*, 34: 123-136
5. Bylund DB (1992) Subtypes of α_1 and α_2 -adrenergic receptor. *FASEB J*, 6: 832-839
6. Emorine LJ, Marullo S, Beind-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutcho C, Strosberg AD (1989) Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. *Science* 245:1118-1121
7. Awata T, Katayama S (1996) Genetic variation in the β_3 -adrenergic receptor in Japanese NIDDM patients. *Diabetes Care* 19: 271-272
8. Watson S, Arkininstall S (1994) *The G-Protein Linked Receptor. Facts Book*. Academic Press, London.
9. Morrison AC, Brancati FL, Folsom AR, Smith L, Boerwinkle E (1999) β_3 -adrenergic receptor Trp64Arg polymorphism does not predict incident CHD or carotid intima-media thickness in a community-based sample of whites: the ARIC study. *Hum Genet*, 105: 314-319
10. Kim-Motoyama H, Yasuda K, Yamaguchi T, Yamada N, Katakura T, Shuldiner AR, Akanuma Y, Ohashi Y, Yazaki Y, Kadowaki T (1997)

- A mutation of the β_3 -adrenergic receptor is associated with visceral obesity but decreased serum triglyceride. *Diabetologia* 40: 469-472
11. Krief S, Lonqvist F, Raimbault S, Baude B, Van Spronsen A, Arner P, Strosberg AD, Ricquier D, Emorine LJ (1993) Tissue distribution of β_3 -adrenergic receptor mRNA in man. *J Clin Invest* 91: 344-349
 12. Clément K, Vaisse C, Manning BSJ, Basdevant A, Guy-Grand B, Ruiz J, Silver KD, Shuldiner AR, Froguel P, Strosberg AD (1995) Genetic variation in the β_3 -adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N Engl J Med*, 333:352-354
 13. Walston J, Silver K, Borgardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, Manning BSJ, Strosberg AD, Stern MP, Raben N, Sorkin JD, Roth J, Shuldiner AR (1995) Time of onset of non-insulin dependent diabetes mellitus and genetic variation in the β_3 -adrenergic receptor gene. *N Engl J Med* 333:343-347
 14. Van Spronsen A, Nachmias C, Krief S. (1993) The human and mouse β_3 -adrenergic receptor genes: promotor and intron/exon structure. *Eur J Biochem*, 213:1117-1124
 15. Strosberg AD (1997) Structure and function of the β_3 -adrenergic receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37: 421-450
 16. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Jr, Trendelenburg U (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*, 46: 121-136
 17. Blin N, Camoin L, Maigret B, Strosberg AD (1993) Structural and conformational features determining selective signal transduction in the β_3 -adrenergic receptor. *Mol Pharmacol*, 44: 1094-1104
 18. Anthony A, Bahl AK, Oakley IG, Spraggs CF, Dhillon AP, Trevethick MA (1996) The β_3 -adrenoceptor agonist CL 316243 prevents indomethacin-induced jejunal laceration in the rat by reversing early villous shortening. *J Pathol*, 179: 340-346
 19. Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Lemarec H (1996) Functional β_3 -adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest*, 98: 556-562
 20. Kaumann AJ, Molenaar P (1996) Differences between the third cardiac β_3 -adrenoceptor in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 118: 2085-2098
 21. Ghosh S, Langefeld CD, Ally D, Watanabe RM, Hauser ER, Magnuson VL, Nyland SJ, Valle T, Eriksson J, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M (1999) The W64R variant of the β_3 -adrenergic receptor is not associated with Type II diabetes or obesity in a large Finnish sample. *Diabetologia*. 42: 238-244
 22. Widén E, Lehto M, Kanninen T, Walston J, Shuldiner AR, Groop LC (1995) Association of a polymorphism in the β_3 -adrenergic receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N Engl J Med* 333:348-351
 23. Karasaki Y, Kashiwazaki H (2004) Polymorphism of Trp64Arg in beta3-adrenergic receptor gene among Bolivian people in rural areas at high and low altitudes *Ann Clin Biochem* 41: 57-60.
 24. Nonogaki K (2000) New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 43: 533-549
 25. Arner P, Hoffstedt J (1999) Adrenoceptor genes in human obesity. *J Int Med*, 245: 667-672
 26. Kurabayashi T, Carey DGP, Morrison NA (1996) The β_3 -adrenergic receptor gene Trp/Arg mutation is overrepresented in obese women. *Diabetes*, 45: 1358-1363
 27. Higashi K, Ishikawa T, Ito T, Yonemura A, Shige H, Nakamura H (1997) Association of a genetic variation in the β_3 -adrenergic receptor gene with coronary heart disease among Japanese. *Biochem Biophys Res Commun*, 323: 728-730
 28. Kadowaki H, Yasuda K, Iwamoto K, Otabe S, Shimokawa K, Silver K, Walston J, Yoshinaga H, Kosaka K, Yamada N (1995) A mutation in the β_3 -adrenergic receptor gene is associated with obesity and hyperinsulinemia in Japanese subjects. *Biochem Biophys Res Commun*, 215: 555-560
 29. Oksanen L, Mustajoki P, Kaprio J, Kainulainen K, Janne O, Kontula K (1996) Polymorphism of the β_3 -adrenergic receptor gene in morbid obesity. *Int J Obesity*, 20: 1055-1061
 30. Clement K, Ruiz J, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D, Basdevant A, Guy-Grand B, Froguel P (1996) Additive effect of Arg: G (-3826) variant of the uncoupling protein gene and the Trp/Arg mutation of the β_3 -adrenergic receptor gene or weight gain in morbid obesity. *Int J Obesity*, 20: 1062-1066
 31. Silver K, Mitchell BD, Walston J, Sorkin JD, Stern MP, Roth J, Shuldiner AR (1997) Trp64Arg β_3 -adrenergic receptor and obesity in Mexican Americans. *Hum Genet*, 101: 306-311
 32. Majsterek I, Kasznicki J, Blasiak J, Drzewoski J (2004) Związek polimorfizmu Trp64Arg genu receptora β_3 -adrenergicznego z nadwagą, cukrzycą typu 2 i nadciśnieniem tętniczym w populacji łódzkiej. *Med Metab*, 8: 8-14.
 33. Fujisawa T, Ikegami H, Yamato E, Takekawa K, Nakagawa Y, Hamada Y, Oga T, Ueda H, Shintani M, Fukuda M, Ogihara T (1996) Association of Trp/Arg mutation of the β_3 -adrenergic receptor with NIDDM and body weight gain. *Diabetologia*, 39: 349-352
 34. Rissanen J, Pihlajamaki J, Heikkinen S, Kekalainen P, Mykkanen L, Kuusisto J, Kolle A, Laakso M (1997) New variants in the glycogen synthase gene (Gln71His, Met416Val) in patients with NIDDM from eastern Finland. *Diabetologia*, 40: 1313-1319
 35. Van Itallie TB (1985) Health implications of overweight and obesity in the United States. *Ann Intern Med*, 103: 983-988
 36. Holm SS, Sorensen TI, Jensen G, Schnohr P (1989) Independent effects of weight change and attained body weight on prevalence of arterial hypertension in obese and non-obese men. *BMJ*, 299: 767-770
 37. Foster CJ, Weinsier RL, Birch R, Norris DJ, Bernstein RS, Wang J, Pierson RN, Van Itallie TB (1986) Obesity and serum lipids; an evaluation of the relative contribution of body fat and fat distribution to lipid levels. *Int J Obesity*, 11: 151-161
 38. Manson JAE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, Speizer FE, Hennekens CH (1990) A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*, 322: 882-889
 39. De Fronzo R, Ferrannini E (1991) Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 14: 173-194
 40. Gensini GF, Comeglio M, Colella A (1998) Classical risk factors and emerging elements in the risk profile for coronary artery disease. *Eur Heart J*, 19: A53-A61
 41. Stangl K, Cascorbi I, Laule M, Stangl V, Meisel C, Wernecke K-D, Ziemer S, Baumann G, Roots I, Hauner H (2001) The β_3 -adrenergic receptor Trp/Arg mutation is not associated with Coronary Artery Disease. *Metabolism*, 2: 184-188
 42. Swanson CA, Potischman N, Wilbanks GD, Twiggs LB, Mortel R, Berman ML, Barrett RJ, Baumgartner RN, Brinton LA (1993) Relationship of endometrial cancer risk to past and contemporary body size and body fat distribution. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2: 321-327
 43. Babol K, Przybyłowska K, Lukaszek M, Pertynski T, Blasiak J (2004) An association between the Trp64Arg polymorphism in the β_3 -adrenergic receptor gene and endometrial cancer and obesity. *J Exp Clin Cancer Res*, 23: 699-674
 44. World Cancer Research Fund In Association with American Institute for Cancer Research (1997) *American Institute of Cancer Research*, Washington DC, pp 216-251
 45. Bruce WR, Wolever TM, Giaca A (2000) Mechanisms linking diet and colorectal cancer: the possible role of insulin resistance. *Nutr Cancer* 37: 19-26
 46. Nilsen TI, Vatten LJ (2001) Prospective study of colorectal cancer risk and physical activity, diabetes, blood glucose and BMI: exploring the hyperinsulinaemia hypothesis. *Br J Cancer*, 84: 417-422
 47. Takezaki T, Hamajima N, Matsuo K, Tanaka R, Hirai T, Kato T, Ohashi K, Tajima K (2001) Association of polymorphism in the β_2 and β_3 adrenoceptor genes with risk of colorectal cancer in Japanese. *Int J Clin Oncol*, 6: 117-122

48. Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C, Balligand JL (2001) Upregulation of β_1 -adrenoceptors and altered contractile response to ionotropic amines in human failing myocardium. *Circulation*, 103: 1649-1655
49. Conrath CE, Ophhof T (2002) β_1 -Adrenoceptors in the heart. *Cardiovasc Res*, 56: 353-356
50. Smith SA, Levy AL, Sennitt MV, Simson DL, Cawthorne MA (1985) Effects of BRL 26830, a novel beta-adrenoceptor agonist, on glucose tolerance, insulin sensitivity and glucose turnover in Zucker (fa/fa) rats. *Biochem Pharmacol*, 34: 2425-2429
51. Yen TT, Fuller RW, Hemrick-Leukkce SK, Dinninger NB (1988) Effects of LY104119, a thermogenic weight-reducing compound, on norepinephrine concentrations and turnover in obese and lean mice. *Int J Obes*, 12:59-67
52. Holloway BR, Howe R, Rao BS, Stribling D (1992) ICI D7114: a novel selective adrenoceptor agonist of brown fat and thermogenesis. *Am J Clin Nutr*, 55: 262S-264S
53. Sum FW, Gilbert A, Venkatesan AM, Lim K, Wong V, O'Dell M, Francisco G, Chen Z, Grosu G, Baker J, Ellingboe J, Malamas M, Gunawan I, Primeau J, Largis E, Steiner K (1999) Prodrugs of CL316243: a selective β_3 -adrenergic receptor agonist for treating obesity and diabetes. *Bioorg Med Chem Letters*, 9: 1921-1926
54. Goldberg GR, Prentice AM, Murgatroyd PR, Tuersley MD (1995) Effects on metabolic rate and fuel selection of a selective beta-3 agonist (ICI D7114) in healthy lean men. *Int J Obes*, 19: 625-631
55. Smith SA, Cawthorne MA, Fay LC, McCullough DA, Mitchell TH (1984) *Diabetologia*, 37(Suppl. 1): 15A
56. Connacher AA, Lakie M, Powers N, Elton RA, Walsh EG, Jung RT (1990) Tremor and the anti-obesity drug BRL 26830A. *Br J Clin Pharmacol*, 30: 613-615
57. Wheeldon NM, McDevitt DG, Lipworth BJ (1994) Cardiac effects of the beta 3-adrenoceptor agonist BRL35135 in man. *Br J Clin Pharmacol*, 37(4):363-369
58. Weyer C, Tataranni PA, Snitker S, Danforth E Jr, Ravussin E (1998) Increase in insulin action and fat oxidation after treatment with CL 316,243, a highly selective beta3-adrenoceptor agonist in humans. *Diabetes*, 47:1555-1561
59. Bloom JD, Dutia MD, Johnson BD, Wissner A, Burns MG, Largis EE, Dolan JA, Claus TH (1992) Disodium (R,R)-5-[2-[[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-amino] propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate (CL 316,243). A potent beta-adrenergic agonist virtually specific for beta 3 receptors. A promising antidiabetic and antiobesity agent. *J Med Chem*, 35: 3081-3084
60. Dolan JA, Muenkel HA, Burns MG, Pellegrino SM, Fraser CM, Pietri F, Strosberg AD, Largis EE, Dutia MD, Bloom JD (1994) Beta-3 adrenoceptor selectivity of the dioxolane dicarboxylate phenethanolamines J. *Pharmacol Exp Ther*, 269: 1000-1006

β_3 -adrenergic receptor

Katarzyna Bąbol, Janusz Błasiak✉

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

✉ e-mail: janusz.b@biol.uni.lodz.pl

Key words: β_3 -adrenergic receptor, lipid metabolism, obesity, type 2 diabetes mellitus, gene polymorphism

ABSTRACT

The β_3 -adrenergic receptor (β_3 -AR) may play a key role in the regulation of lipid metabolism and glucose homeostasis. Adrenaline and norepinephrine β_3 -AR stimulate lipolysis and thermogenesis in human fat cells and increase glucose uptake in skeletal muscle. Therefore, the β_3 -AR gene may be associated with obesity and related diseases, such as type 2 diabetes, coronary heart disease and hypertension. Many studies in different ethnic groups showed an association of β_3 -AR gene polymorphism with insulin resistance, obesity and its metabolic disorders such as type 2 diabetes, coronary heart disease and hypertension. A Trp64Arg mutation in the β_3 -AR gene has been reported to be correlated with the occurrence of those disorders among obese. Several studies revealed also the influence of the Trp/Arg polymorphism on carcinogenesis and its contribution to the link between cancer and obesity. Since obesity is a serious problem as a civilization-related disease, it is very important to investigate genes suspected to be connected with it.

Lizosomalna błonowa glikoproteina lamp2a – receptor dla cytosolowych białek przeznaczonych do selektywnej proteolizy

Katarzyna Roszek

Jadwiga Gniot-Szulżycka

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, Katarzyna Roszek, e-mail: kroszek@biol.uni.torun.pl, tel. (56) 611 45 40; Jadwiga Gniot-Szulżycka, e-mail: jgsz@biol.uni.torun.pl, tel. (56) 611 45 01

Artykuł otrzymano 19 stycznia 2004
Artykuł zaakceptowano 20 grudnia 2004

Słowa kluczowe: lizosomy, glikoproteiny błony lizosomalnej, glikoproteina lamp2a, autofagia zależna od białek opiekuńczych, proteoliza

Wykaz skrótów: AP – białko adaptorowe; Hsp – białko szoku termicznego; Hsc – białko pokrewne Hsp; lamp, limp – integralne białka błony lizosomu; lgp – glikoproteina lizosomalna; PPCA – katepsyna A z aktywnością karboksypeptydazy serynowej.

STRESZCZENIE

W artykule przedstawiono dane dotyczące budowy kilku glikoprotein błon lizosomalnych (lamp1, lamp2, limpI i limpII). Szerzej omówiono znaczenie receptorowej glikoproteiny lamp2a oraz białek Hsc 73 i innych białek opiekuńczych uczestniczących w procesie selektywnej proteolizy białek cytosolowych z sekwencją KFERQ. Przedstawiono także niektóre mechanizmy regulacji tego ważnego procesu aktywowanego w warunkach głodu i stresu.

WPROWADZENIE

Lizosomy, po raz pierwszy opisane w latach 1949-1955 przez Christiana de Duve, to subkomórkowe organelle o strukturze pęcherzykowej otoczone pojedynczą dwuwarstwą lipidową. Zawierają zestaw co najmniej 50 enzymów hydrolitycznych aktywnych w niskim pH, umożliwiających degradację większości makrocząsteczek [1, 2]. Powszechnie uważa się, że lizosomy stanowią końcowy przedział na szlaku niespecyficznego degradacji materiału zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego. Substraty ulegające degradacji docierają do lizosomów różnymi drogami, między innymi na drodze endocytozy (absorpcyjnej, receptorowej lub fazy płynnej), krinofagii, makroautofagii i mikroautofagii [3-7].

W lizosomach zachodzi również selektywna proteoliza niektórych białek cytosolowych tzw. autofagia zależna od białek opiekuńczych (ang. *chaperone mediated autophagy*) [8-13]. Proces ten uaktywniany jest w warunkach długotrwałego głodu lub stresu oraz w odpowiedzi na ekspozycję komórek na niektóre toksyny i umożliwia degradację białek zbędnych w określonych warunkach. Takimi białkami w okresie głodu są np. białka enzymatyczne o długim okresie półtrwania, uczestniczące w katabolizmie węglowodanów.

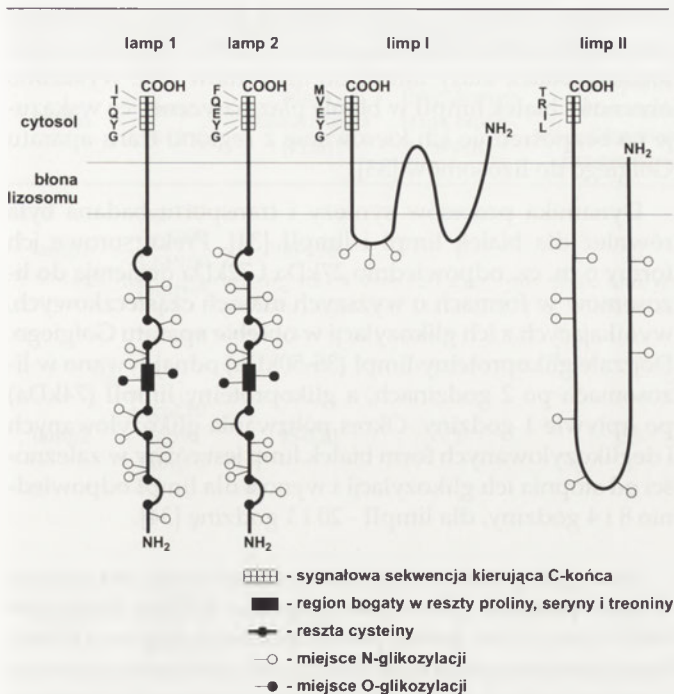
W niniejszym artykule omówiona zostanie budowa i funkcje kilku glikoprotein błony lizosomalnej ze szczególnym uwzględnieniem glikoproteiny lamp2a, pełniącej rolę receptora w procesie autofagii zależnej od białek opiekuńczych.

GLIKOPROTEINY BŁONY LIZOSOMALNEJ

Glikoproteiny błony lizosomalnej (lgps – ang. *lysosomal membrane glycoproteins*) stanowią 50% wszystkich białek w błonie lizosomu [14]. Ze względu na strukturę łańcucha polipeptydowego oraz komponenty cukrowcowe zostały podzielone na dwie rodziny: białka lamp (ang. *lysosome-associated membrane protein*) o masie cząsteczkowej 90-120 kDa oraz białka limp (ang. *lysosomal integral membrane protein*) o masie cząsteczkowej 30-85 kDa [2, 4]. Dane porównawcze dotyczące budowy i roli białek obu rodzin zebrano w tabeli 1, a uproszczoną strukturę przedstawia rysunek 1.

Glikoproteiny rodziny lamp to integralne białka błonowe typu I, wykazujące znaczne podobieństwo w budowie. Dominującym elementem jest glikozylowana domena N-końcowa zwrócona do światła pęcherzyka lizosomalnego. Pojedynczy region błonowy zbudowany jest z około 20 aminokwasów. Cytosolowa domena C-końca składa się z 10-12 reszt aminokwasów, z których część to sygnałowa sekwencja sortująca. Warunkuje ona właściwe kierowanie białka do lizosomu [3, 4].

Wśród glikoprotein rodziny lamp wyróżnia się dwie homologiczne lecz odrębne klasy białek: lamp1 (nazywane też lgpA) i lamp2 (nazywane lgpB). Białka te są kodowane przez odrębne, ale ewolucyjnie spokrewnione geny. Według Grangera i wsp. [15] białka lamp1 i lamp2 odróżnicowały się od siebie jeszcze



Rysunek 1. Struktura glikoprotein błony lizosomalnej (zmienione wg. [3, 4]).

przed ewolucyjnym rozdzieleniem się linii rozwojowych ptaków i ssaków. W obrębie lamp2 zidentyfikowano trzy izoformy (nazwane odpowiednio a, b i c) wykazujące znaczne podobieństwo sekwencji aminokwasów jedynie w regionie luminalnym [4, 16].

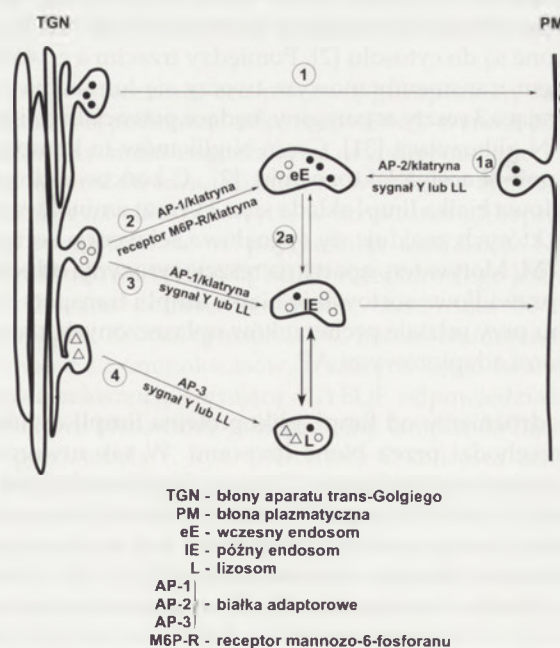
W pierwszorzędowej strukturze domeny luminalnej białek lamp stwierdzono między innymi obecność 8 reszt cysteiny w konserwatywnych pozycjach 13, 52, 127, 163, 203, 241, 310 i 347. Sąsiadujące reszty łączą się między sobą mostkami dwusiarczkowymi tworząc pętlę o długości 36-39 aminokwasów [17]. W domenie luminalnej białek lamp wyróżnia się także dwa odcinki o wysokim stopniu homologii oddzielone przez region łącznikowy. Region ten zbudowany jest z 20-35 reszt aminokwasowych, wśród których dominują reszty proliny oraz seryny lub treoniny (Rys. 1). Rejon łącznikowy stanowi domenę o dużej zmienności – białko lamp1 zawiera głównie reszty seryny w rejonie łącznikowym, podczas gdy białko lamp2 jest bogate w treoninę [15]. Grupy hydroksylowe tych aminokwasów stanowią potencjalne miejsca przyłączenia O-glikanów. Zarówno białko lamp1 jak i lamp2 wyodrębnione z komórek człowieka podlegają O-glikozylacji w regionie łącznikowym [18]. W przypadku białek wyodrębnionych z komórek myszy, tylko w formie lamp2 stwierdzono ten typ glikozylacji, natomiast w białku lamp1 nie wykazano obecności reszt O-glikozydowych [15].

Pozostała część domeny luminalnej białek lamp zawiera ponadto 16-20 potencjalnych miejsc N-glikozylacji. W przypadku białka lamp1 i lamp2 glikozylowanych jest odpowiednio 18 (17-20) i 16 (16-17) reszt asparaginy [15, 18]. Przyłączane oligosacharydy to głównie heterogenne rozgałęzione N-glikany trój- i czteroantenne (w 70%) oraz dwuantenne (30%). Łańcuch cukrowcowy zawiera głównie rzadko występujące kompleksy typu poli-N-acetylolak-

tozoamin [18]. Ich obecność stwierdzono również w antygenach grup krwi AB0 i w strukturze ludzkiego erycytarnego transportera anionów (tzw. białko pasma 3) [cyt. za 18]. Końcowe reszty N-glikanów są sialowane, w wyniku czego dojrzale glikoproteiny rodziny lamp charakteryzują się niskim punktem izoelektrycznym - pI w zakresie wartości 2-4 [15].

W żadnej z izoform białek lamp nie stwierdzono obecności reszt fosforanowych, co wskazuje, iż białka te nie ulegają fosforylacji, a wśród reszt cukrowcowych nie ma mannozo-6-fosforanu (M6P) wiązane przez receptory M6P (M6P-R) [15, 19]. W fibroblastach człowieka z brakiem aktywności fosfotransferazy oznakowującej mannozę do mannozo-6-fosforanu nie stwierdzono zaburzeń transportu glikoprotein lamp1 i lamp2 do lizosomów [15]. Z danych tych wynika, iż w transporcie powyższych białek do lizosomów nie uczestniczy receptor mannozo-6-fosforanu.

Za prawidłowe sortowanie i kierowanie białek lamp1 i lamp2 z aparatu Golgiego (AG) do błony lizosomalnej odpowiedzialna jest sekwencja sygnałowa w domenie cytosolowej C-końca. Sekwencja ta występuje w postaci motywu zawierającego resztę tyrozyny w układzie GYXXΦ (gdzie X oznacza dowolny aminokwas, Φ - aminokwas z rozbudowaną domeną hydrofobową) [3, 4, 14] – patrz tabela 1, Rys. 1. Motyw GYXXΦ rozpoznawany jest w regionie trans aparatu Golgiego przez odpowiednie jednostki białek adaptorowych AP, co inicjuje ukierunkowany transport glikoprotein [20, 21]. Do miejsca przeznaczenia białka lamp docierają prawdopodobnie drogą bezpośredniego transportu pęcherzykowego przy udziale klatryny i białek adaptorowych AP [4, 14]. W proces ten zaangażowane są jednak pęcherzyki odmienne od tych, które transportują rozpuszczalne białka oznakowane ugrupowaniem mannozo-6-fosforanowym [22]. Droga pośrednia (sekrecyjna) polega na wbudowaniu glikoprotein lamp do błony komórkowej z następującym po tym transportem do lizosomów [3, 4]. Na rysunku 2 przedstawiono drogi transportu białek docelowo kierowanych



Rysunek 2. Główne drogi transportu białek do lizosomów.

do lizosomów. Większość białek lizosomalnych oznakowanych resztą mannozo-6-fosforanu, po interakcji z receptorem M6P-R dociera przy współdziałaniu białek adaptorowych AP-1 do wczesnych endosomów (droga 2, 2a) a także częściowo do późnych endosomów (droga 3) [3, 19, 23]. Wysockoglikozylowane i sjalowane białka błon lizosomalnych lamp i limp dostarczane są głównie bezpośrednio do lizosomów (droga 4) z udziałem białek adaptorowych AP-3 [2, 14, 24]. Niektóre białka, np. kwaśna fosfataza, docierają do lizosomów drogą sekrecyjną (droga 1, 1a) z udziałem białek adaptorowych AP-2 [3, 4, 25]. Procesy segregacji i transportu nowosyntetyzowanych białek zostały szczegółowo omówione w artykułach 3, 19, 23, 26, 27.

Badania dynamiki syntezy i transportu glikoproteiny lamp1 wykazały, że prekursorowe nieglikozylowane białko o m. cz. 45kDa w ciągu 12-14 minut zostaje przetransportowane z błon siateczki śródplazmatycznej do błon aparatu Golgiego, gdzie następuje końcowy etap N-glikozylacji i sjalilacja. W ciągu 45 minut dojrzała glikoproteina dociera do lizosomów [15]. Krótki czas transportu może wskazywać, że białka lamp docierają do lizosomów drogą transportu bezpośredniego. Jednakże obecność zarówno lamp1 jak i lamp2 w błonie plazmatycznej nie wyklucza kierowania tych glikoprotein drogą pośrednią poprzez transport do błony plazmatycznej [2]. Po dotarciu do lizosomów białka lamp występują głównie w błonie lizosomalnej, choć pewne formy odnajdywane są także w świetle lizosomu [25, 29, 30]. Izoforma lamp2a w 57-78% występująca w błonie lizosomu, stanowi przeciętnie 25% całkowitej zawartości białek klasy lamp2. W świetle lizosomu zawartość lamp2a waha się w granicach 22-43% i stanowi 10% ogólnej puli białek klasy lamp2 [16].

Glikoproteiny rodziny limp to integralne białka błonowe typu III, wielokrotnie przechodzące przez błonę lizosomu (Rys. 1). Wyróżnia się wśród nich dwie klasy białek: limpI oraz limpII, znacznie różniące się budową. W strukturze białek limpI stwierdzono obecność czterech hydrofobowych domen transbłonowych, które zakotwiczą glikoproteinę w błonie lizosomalnej. Zarówno C- jak i N- koniec zwrócone są do cytosolu [2]. Pomiędzy trzecim a czwartym regionem transmembranowym tworzy się luminalna pętla zawierająca 3 reszty asparaginy, będące potencjalnymi miejscami N-glikozylacji [31]. Część N-glikanów to kompleksy typu poli-N-acetylolaktozamin [2]. C-końcowa domena cytosolowa białka limpI składa się z 11 reszt aminokwasów, wśród których znajduje się sygnałowa sekwencja sortująca -GYEVM. Motyw ten, oparty na reszcie tyrozyny, odpowiada za prawidłowe sortowanie białka limpI i transport do lizosomu przy udziale pęcherzyków oplaszczonych klatryną i białkami adaptorowymi AP.

W odróżnieniu od limpI, glikoproteina limpII dwukrotnie przechodzi przez błonę lizosomu. W tak utworzonej pętli luminalnej znajduje się 11 miejsc N-glikozylacji. W sekwencji aminokwasów pętli luminalnej stwierdzono także obecność 5 reszt cysteiny, które mogą być zaangażowane w tworzenie mostków dwusiarczkowych [4, 32]. Cytosolowy C-koniec złożony jest z 20-21 reszt aminokwasowych i obejmuje sekwencję sygnałową (LIRT) zawierającą dwie reszty leucyny [32]. Motyw ten, podobnie jak domena boga-

ta w reszty tyrozyny, rozpoznawany jest przez odpowiednie podjednostki białek adaptorowych AP i umożliwia sortowanie białek klasy limpII do lizosomów. Nie wykazano obecności białek limpII w błonie plazmatycznej, co wskazuje na bezpośrednie ich kierowanie z regionu trans aparatu Golgiego do lizosomów [33].

Dynamika procesów syntezy i transportu badana była również dla białek limpI i limpII [34]. Prekursorowe ich formy o m. cz. odpowiednio 27kDa i 72kDa docierają do lizosomów w formach o wyższych masach cząsteczkowych, wynikających z ich glikozylacji w obrębie aparatu Golgiego. Dojrzałe glikoproteiny limpI (35-50kDa) odnajdywano w lizosomach po 2 godzinach, a glikoproteiny limpII (74kDa) po upływie 1 godziny. Okres półtrwania glikozylowanych i deglikozylowanych form białek limp jest różny w zależności od stopnia ich glikozylacji i wynosi dla limpI odpowiednio 8 i 4 godziny, dla limpII - 20 i 1 godzinę [34].

Rola glikoprotein błon lizosomalnych nie jest jeszcze w pełni poznana. Silnie glikozylowane domeny luminalne białek lamp i limp pełnią prawdopodobnie rolę w ochronie błony lizosomu przed hydrolitycznym działaniem enzymów lizosomalnych [3, 4, 34, 35]. Różnice w sekwencji krótkiego odcinka cytosolowego wskazują na możliwość uczestniczenia białek lamp i limp w różnych interakcjach z białkami cytosolu, cytoszkieletem i organellami subkomórkowymi. Rola białek lamp i limp w biogenezie lizosomów i funkcjonowaniu systemu endocytarnego jest także odmienna [2].

Wiadomo, iż różne formy białek lamp ulegają wybiórczej ekspresji w określonych typach tkanek, co wskazuje na specyficzność ich działania [30]. W ostatnim czasie wyjaśniono rolę glikoproteiny lamp2a jako receptora dla białek cytosolowych podlegających selektywnej proteolizie w warunkach stresu i głodu. Proces ten przebiega z udziałem białek szoku termicznego (białek opiekuńczych, chaperonów) i nazywany jest autofagią zależną od białek opiekuńczych. Dalsza część niniejszego artykułu przedstawia ostatnie doniesienia dotyczące tego zagadnienia.

SELEKTYWNA PROTEOLIZA BIAŁEK CYTOSOLOWYCH Z SEKWENCJĄ KFERQ

Pierwszym doświadczalnie zidentyfikowanym białkiem degradowanym w lizosomach na drodze selektywnej proteolizy zależnej od białek opiekuńczych była rybonukleaza A [36]. Na tej drodze ulegają także degradacji: dehydrogenaza 3-fosfogliceroaldehydu [8], aldolaza i fosfogliceromutaza [12], podjednostki proteasomu [9], czynniki transkrypcyjne [37] i ich regulatory [11], cytosolowa forma α_2 -mikroglobuliny [12] oraz niektóre aneksyny [38]. Wszystkie poznane do tej pory białka cytosolowe przeznaczone do specyficznej degradacji zawierają pentapeptyd KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln). Ogółem około 30% białek cytosolowych posiada motyw KFERQ, a więc są one potencjalnie substratami w procesie specyficznej degradacji [11]. W nerkach i wątrobie większość białek z motywem KFERQ to enzymy przemian glikolitycznych o długim okresie półtrwania [39].

Kolejnym etapem w poznaniu powyższego procesu było stwierdzenie, iż populacje lizosomów wyodrębnione z wą-

Tabela 1. Główne klasy białek błony lizosomalnej [wg 2, 3, 4, 14].

Białko	Inne nazwy	Masa cząsteczkowa (kDa)	Ilość domen trans-błonowych	Komponent cukrowcowy (% całkowitej masy cząsteczkowej)	Sygnalowa sekwencja sortująca (C-koniec)	Droga transportu	Udział innych białek w transporcie**	Rola w komórce
lamp1	Igp120 Igp107 LEP100 lamp-A	90-120	1	55	-GYQTI	AG → lizosomy, AG → PM → lizosomy	M6P-R (-) AP-1 (-) AP-2 (-) AP-3 (+)	-strukturalna ochrona przed hydrolazami
lamp2	Igp110 Igp96 lamp-B	95-120	1	55	-GYEQF	AG → lizosomy, AG → PM → lizosomy	M6P-R (-) AP-3 (+)	-strukturalna ochrona przed hydrolazami -receptor dla białek cytosolowych (lamp2a) -udział w biogenezie lizosomów
limpI	CD63 limp-1 limpIII	30-50	4	35	-GYEVM	AG → lizosomy, AG → PM → lizosomy	M6P-R (-) AP-3 (+)	-udział w fuzji błon struktur sekrecyjnych
limpII	Igp85 limp-2 limpIV	74-85	2	20	-LIRT	AG → lizosomy	M6P-R (-) AP-1 (-) AP-2 (-) AP-3 (+)	-udział w biogenezie endosomów i lizosomów

* Inne nazwy stosowane przed wprowadzeniem ujednoczonego podziału na klasy białek lamp1 i lamp2 oraz limpI i limpII. Nie wyklucza się istnienia jeszcze innych białek o strukturze lamp i limp, np. limpV [wg 32].

** Symbolem (+) oznaczono białka uczestniczące w transporcie, symbolem (-) białka nie uczestniczące w transporcie.

Zastosowane w tabeli skróty: AG – aparat Golgiego; AP – białko adaptorowe; lamp, limp – integralne białka błony lizosomu; Igp – glikoproteina lizosomalna; M6P – mannozo-6-fosforan; M6P-R – receptor mannozo-6-fosforanu; PM – błona plazmatyczna.

troby szczone, szczególnie aktywnie uczestniczące w selektywnej degradacji białek cytosolowych z sekwencją KFERQ, są bogate w białko szoku termicznego Hsc73 i wyróżniają się zwiększoną zawartością białka lamp2a [16]. Ustalono, iż białko szoku termicznego Hsc73 uczestniczy w rozpoznaniu cytosolowych białek z sekwencją KFERQ, natomiast glikoproteina lamp2a pełni w błonie lizosomalnej funkcję receptora dla kompleksu Hsc73-białko przeznaczone do degradacji.

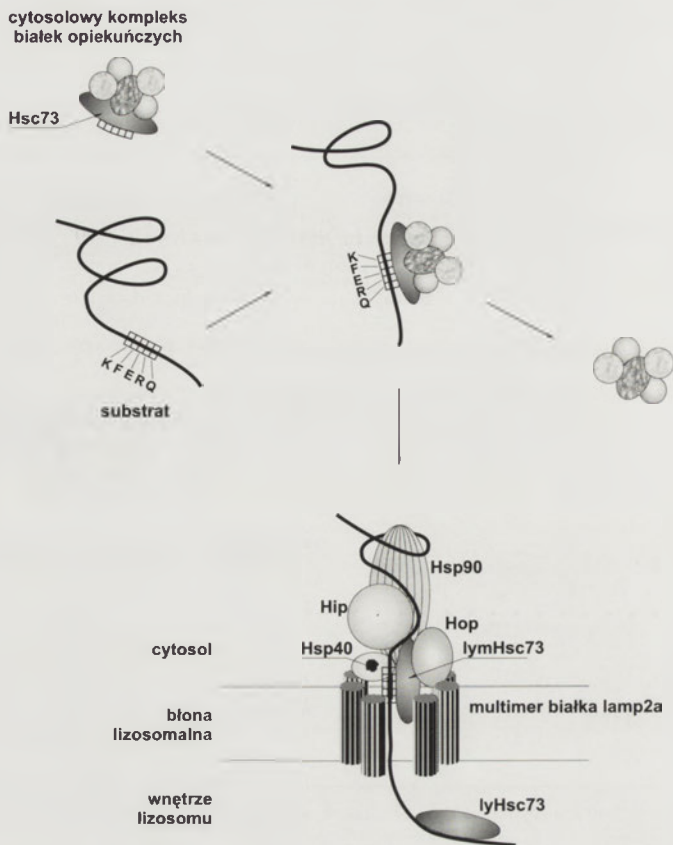
Cytosolowe białko Hsc73 z aktywnością ATPazy uczestniczy w ATP-zależnym rozpoznaniu sekwencji KFERQ białek cytosolowych [40], jak również jest odpowiedzialne za rozfałdowanie substratu przeznaczonego do degradacji. Ten ostatni proces jest nieodzowny dla translokacji białka przez błonę lizosomalną [41].

Oprócz cytosolowego białka Hsc73 istnieją jeszcze dwie inne jego izoforymy obecne odpowiednio w świetle lizosomu (tzw. ly-Hsc73) i w błonie lizosomalnej od strony cytosolu (tzw. lym-Hsc73) [42]. Białka te wspomagają przemieszczanie substratu do wnętrza lizosomu [10, 43].

Najnowsze badania wykazały ponadto udział wielu innych białek szoku termicznego w procesie selektywnej degradacji białek w lizosomach [40, 42, 44]. Na cytosolowej powierzchni błony lizosomalnej oprócz białka lym-Hsc73 występuje również kompleks białek opiekuńczych, nieodzowny dla przemieszczania substratu przez błonę lizosomu. W skład kompleksu wchodzi białko Hsp40 wzmac-

niające aktywność ATP-azową cytosolowego białka Hsc73, co ułatwia identyfikację substratu z sekwencją KFERQ. Kolejne elementy kompleksu to białko Hsp90, białko Hip (ang. *Hsc73 interacting protein*) oraz białko Hop (ang. *Hsc73-Hsp90 organizing protein*), które stabilizują połączenie pomiędzy Hsc73, a substratem białkowym kierowanym do lizosomalnej degradacji. Tak utworzony funkcjonalny kompleks zostaje następnie rozpoznany przez białko receptorowe lamp2a.

Masa cząsteczkowa receptorowej glikoproteiny lamp2a określona na podstawie sekwencji cDNA wynosi 45 kDa, podczas gdy masa cząsteczkowa wyodrębnionego z błon białka wynosi 96 kDa. Różnica ta wynika ze znacznej zawartości reszt cukrowcowych w strukturze glikoproteiny (dane przedstawione w poprzednim rozdziale). Najbardziej rozbudowaną częścią białka receptorowego jest silnie glikozylowana domena luminalna, stanowiąca N-koniec polipeptydu. Krótki, cytosolowy C-koniec zbudowany jest zaledwie z 12 aminokwasów, z których część tworzy sygnalową sekwencję sortującą -GYEQF odpowiedzialną za prawidłowe kierowanie glikoproteiny lamp2a do lizosomu [8] – patrz tabela 1, Rys. 1. Domena C-końcowa uczestniczy także w rozpoznawaniu substratów przeznaczonych do degradacji czyli białek z sekwencją KFERQ. Obecność w regionie C-końca czterech dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych (KHHH) jest konieczna dla prawidłowej interakcji receptora z substratami kierowanymi do degradacji [16].



Rysunek 3. Mechanizm transportu białek cytosolowych do lizosomu (zmienione wg. [42, 44]).

Glikoproteina lamp2a może polimeryzować z wytworzeniem form tetra-, okta- i multimerycznych, co sugeruje możliwość tworzenia w błonie lizosomu kanałów o różnej średnicy, ułatwiających transport białek [16].

Hipotetyczny mechanizm transportu białek cytosolowych do lizosomu przedstawiono na rysunku 3 [dane wg. 42, 44]. Sekwencja wydarzeń prowadząca do degradacji polega na rozpoznaniu cytosolowego białka z sekwencją KFERQ przez cytosolową formę Hsc73, które przy współudziale innych białek opiekuńczych tworzy aktywny kompleks. Kolejny etap prowadzi do rozfaldowania białka i wytworzenia konformacji optymalnej dla translokacji. Na cytosolowej powierzchni błony lizosomu białko w kompleksie z Hsc73 zostaje rozpoznane przez białko receptorowe lamp2a i przy udziale dodatkowych białek opiekuńczych lym-Hsc73, Hsp40, Hsp90, Hip oraz Hop przechodzi przez błonę lizosomalną. Od strony światła lizosomu przechodzenie wspomaga białko ly-Hsc73.

REGULACJA PROCESU AUTOFAGII ZALEŻNEJ OD BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH

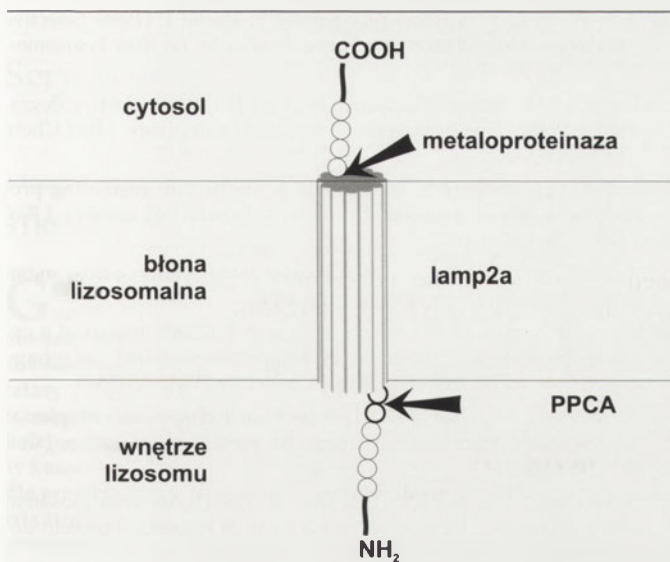
Regulacja selektywnej degradacji białek cytosolowych na drodze autofagii zależnej od białek opiekuńczych odbywa się głównie poprzez regulowanie zawartości białka lamp2a w błonie lizosomu [5, 8, 30] oraz poprzez kontrolę zawartości białek Hsc73, w szczególności izoformy lizosomalnej [10].

Ogólna ilość białka lamp2a w błonie lizosomalnej wynosi 5,8 μg na 100 μg białek błonowych i zależy od aktywności procesu autofagii zachodzącej z udziałem białek opiekuńczych [30]. Badania Cuervo i Dice [8] potwierdziły, iż wzrost zawartości białka lamp2a w fibroblastach człowieka powoduje zwiększenie wydajności specyficznej proteolizy. Zmiany w zawartości glikoproteiny lamp2a w błonie lizosomu nie zależą od poziomu ekspresji tego białka, ale od jego odporności na degradację oraz od dystrybucji pomiędzy błoną a wnętrzem lizosomu [28-30].

Badania Cuervo i Dice [30] nad procesami degradacji białka lamp2a wykazują, iż obecność białek cytosolowych podlegających autofagii z udziałem białek opiekuńczych chroni receptor lamp2a przed degradacją. Białka nie będące substratami dla proteolizy specyficznej np. owoalbumina nie wywierają efektu ochronnego. Uaktywnieniu degradacji białka lamp2a towarzyszy zmniejszanie się zawartości funkcjonalnej formy tego receptora w błonie lizosomu i pojawianie się fragmentu białka lamp2a o niższej masie cząsteczkowej, reagującego z przeciwciałami dla domeny luminalnej tego białka. Zastosowanie inhibitorów proteaz serynowych 4-(2-aminoetylo)-benzenosulfonylofluorek (AEBSF) a także związek chelatujący EDTA modyfikują proces proteolitycznego rozkładu lamp2a. AEBSF hamuje tworzenie się fragmentu luminalnego o niższej masie cząsteczkowej, natomiast EDTA całkowicie blokuje proces proteolizy białka lamp2a [30]. Według wspomnianych autorów degradacja receptora lamp2a wymaga obecności dwóch enzymów: katepsyny A wykazującej aktywność karboksypeptydazy serynowej (PPCA) oraz metaloproteazy. PPCA asocjuje z receptorem lamp2a na luminalnej powierzchni błony lizosomalnej. Asocjacja PPCA zależna jest od obecności kationów dwuwartościowych i hamowana w obecności EDTA. Jako miejsce cięcia enzym ten rozpoznaje wiązanie peptydowe pomiędzy resztami fenyloalaniny i leucyny znajdującymi się na granicy domeny transbłonowej i luminalnej białka lamp2a. Rozszczepienie lamp2a i uwolnienie domeny luminalnej do światła lizosomu uaktywnia (pośrednio lub bezpośrednio) drugi enzym - metaloproteazę w wyniku czego następuje odcięcie domeny cytosolowej i całkowita degradacja receptora lamp2a (Rys. 4) [45].

Komórki z niską aktywnością katepsyny A (PPCA) wykazują wysoki poziom lamp2a i tym samym wysoką wydajność autofagii z udziałem białek opiekuńczych. W warunkach stresu, na skutek zmian w składzie wnętrza lizosomu, PPCA oddysocjuje od błony lizosomalnej i uniemożliwia degradację białka lamp2a, wskutek czego zawartość receptora lamp2a w błonie jest również wysoka [45].

Transport substratów przez błonę lizosomu przy udziale receptora lamp2a powoduje częściową internalizację tej glikoproteiny do światła lizosomu, jednak dzięki procesowi reinsertacji receptor powraca do błony lizosomalnej [30]. W populacjach lizosomów z wysoką aktywnością autofagii z udziałem białek opiekuńczych aż 78% lamp2a znajduje się w błonie a 22% we wnętrzu lizosomu, natomiast w lizosomach z niską aktywnością tego procesu tylko 57% lamp2a pozostaje w błonie lizosomu a 43% obecne jest w jego wnętrzu.



Rysunek 4. Degradacja receptora lamp2a.

trzu [16]. Dane te wskazują, iż internalizacja i ponowne wstawianie glikoproteiny lamp2a są kolejnym mechanizmem regulującym intensywność procesu selektywnej proteolizy białek cytosolowych z sekwencją KFERQ.

Głównym mechanizmem regulującym stężenia białek Hsc73 jest kontrola procesów ich proteolitycznego rozkładu. Proteoliza Hsc73 zachodzi najefektywniej w pH 5.75 – 6.20. W warunkach stresu w komórkach dominuje populacja lizosomów o obniżonym pH [10], czego wynikiem jest niższy poziom degradacji białek Hsc73 w lizosomach i zwiększona wydajność selektywnej proteolizy na drodze autofagii zależnej od białek opiekuńczych. Wykazano ponadto, że cytosolowa forma białka Hsc73 zawiera dwa powtórzenia motywu KFERQ i może być dostarczana do lizosomu jako substrat dla specyficznej proteolizy. Jednak w zależności od pH wnętrza lizosomu ulega degradacji lub zwiększa pulę lizosomalnego Hsc73 wspomagającego proces transportu wybranych białek (Rys. 3) [8, 10].

W artykule omówiono jedynie najistotniejsze mechanizmy regulacji intensywności procesu autofagii zależnej od białek opiekuńczych, zachodzącej w warunkach stresu i głodu. Procesy wyżej opisane mogą być również w określonych tkankach i warunkach (np. pod wpływem epidermalnego czynnika wzrostu) hamowane poprzez obniżenie ekspresji białek uczestniczących w selektywnej proteolizie [39].

PIŚMIENNICTWO

1. Bowers WE (1998) Christian de Duve and the discovery of lysosomes and peroxisomes. *Trends Cell Biol* 8: 330-333
2. Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* 13: 137-145
3. Kornfeld S, Mellman I (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 5: 483-525
4. Hunziker W, Geuze HJ (1996) Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *BioEssays* 18: 379-389
5. Cuervo AM, Dice JF (1998) Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones and proteases. *J Mol Med* 76: 6-12

6. Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC (2000) Lysosome-endosome fusion and lysosomal biogenesis. *J Cell Sci* 113: 1515-1524
7. Luzio JP, Mullock BM, Pryor PR, Lindsay MR, James DE, Piper RC (2001) Relationship between endosomes and lysosomes. *Biochem Soc Trans* 29: 476-480
8. Cuervo AM, Dice JF (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273: 501-503
9. Cuervo AM, Palmer A, Rivett AJ, Knecht E (1995) Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver. *Eur J Biochem* 227: 792-800
10. Cuervo AM, Dice JF, Knecht E (1997) A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. *J Biol Chem* 272: 5606-5615
11. Cuervo AM, Hu W, Lim B, Dice JF (1998) IκB is a substrate for a selective pathway of lysosomal proteolysis. *Mol Biol Cell* 9: 1995-2010
12. Cuervo AM, Hildebrand H, Bomhard EM, Dice JF (1999) Direct lysosomal uptake of α₂-microglobulin contributes to chemically induced nephropathy. *Kidney Int* 55: 529-545
13. Roszek K, Gniet-Szulżycka J (2003) Budowa i funkcje białek błony lizosomalnej. *Kosmos* 52: 173-184
14. Winchester BG (2001) Lysosomal membrane proteins. *Europ J Paediatr Neurol* 5(Suppl A): 207-215
15. Granger BL, Green SA, Gabel CA, Howe CL, Mellman I, Helenius A (1990) Characterization and cloning of Igp110, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells. *J Biol Chem* 265: 12036-12043
16. Cuervo AM, Dice JF (2000) Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *J Cell Sci* 113: 4441-4450
17. Carlsson SR, Fukuda M (1989) Structure of human lysosomal membrane glycoprotein 1. Assignment of disulfide bonds and visualization of its domain arrangement. *J Biol Chem* 264: 20526-20531
18. Carlsson SR, Roth J, Piller F, Fukuda M (1988) Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polyactosaminoglycan. *J Biol Chem* 263: 18911-18919
19. Czartoryska B (1996) Wewnątrzkomórkowy transport enzymów lizosomalnych – rola receptorów mannozo-6-fosforanu. *Post Bioch* 42: 350-357
20. Marks MS, Woodruff L, Ohno H, Bonifacino JS (1996) Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J Cell Biol* 135: 341-354
21. Kirchhausen T, Bonifacino JS, Riezman H (1997) Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9: 488-495
22. Karlsson K, Carlsson SR (1998) Sorting of lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2 into vesicles distinct from mannose-6-phosphate receptor/-adaptin vesicles at the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 273: 18966-18973
23. Hoja-Łukowicz D (1999) Transport kwaśnych hydrolaz do lizosomów na przykładzie β-glukuronidazy. *Kosmos* 48: 117-126
24. Höning S, Sandoval IV, von Figura K (1998) A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP2 and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J* 17: 1304-1314
25. Sosa MA, Schmidt B, von Figura K, Hille-Rehfeld A (1993) In vitro binding of plasma membrane-coated vesicle adaptors to the cytoplasmic domain of lysosomal acid phosphatase. *J Biol Chem* 268: 12537-12543
26. Roszek K, Gniet-Szulżycka J (2000) Wielorakie formy pęcherzyków opłaszczonych klatryną w zależności od receptorów transporcji i segregacji makromolekuł. *Post Biol Kom* 27: 295-314
27. Roszek K, Gniet-Szulżycka J (2001) Transport makromolekuł pomiędzy siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego. Rola pęcherzyków COPI i COPII oraz przedziału pośredniego. *Post Biol Kom* 28: 443-465
28. Jadot M, Wattiaux R, Mainferme F, Dubois F, Claessens AM, Wattiaux-De Coninck S (1996) Soluble form of Lamp II in purified rat liver lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 223: 353-359

29. Jadot M, Dubois F, Wattiaux-De Coninck S, Wattiaux R (1997) Supramolecular assemblies from lysosomal matrix proteins and complex lipids. *Eur J Biochem* 249: 862-869
30. Cuervo AM, Dice JF (2000) Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic* 1: 570-583
31. Metzelaar MJ, Wijngaard PLJ, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, Clevers HC (1991) CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J Biol Chem* 266: 3239-3245
32. Vega MA, Segui-Real B, Garcia JA, Cales C, Rodriguez F, Vanderkerckhove J, Sandoval IV (1991) Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J Biol Chem* 266: 16818-16824
33. Vega MA, Rodriguez F, Segui B, Cales C, Alcalde J, Sandoval IV (1991) Targeting of lysosomal integral membrane protein LIMP II. The tyrosine-lacking carboxyl cytoplasmic tail of LIMP II is sufficient for direct targeting to lysosomes. *J Biol Chem* 266: 16269-16272
34. Barriocanal JG, Bonifacino JS, Yuan L, Sandoval IV (1986) Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J Biol Chem* 261: 16755-16763
35. Kundra R, Kornfeld S (1999) Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J Biol Chem* 274: 31039-31046
36. McElligott MA, Miao P, Dice JF (1985) Lysosomal degradation of ribonuclease A and ribonuclease S-protein microinjected into the cytosol of human fibroblasts. *J Biol Chem* 260: 11986-11993
37. Aniento F, Papavassiliou AG, Knecht E, Roche E (1996) Selective uptake and degradation of c-Fos and v-Fos by rat liver lysosomes. *FEBS Lett* 390: 47-52
38. Cuervo AM, Gomes AV, Barnes JA, Dice JF (2000) Selective degradation of annexins by chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* 275: 33329-33335
39. Franch HA, Sooparb S, Du J (2001) A mechanism regulating proteolysis of specific proteins during renal tubular cell growth. *J Biol Chem* 276: 19126-19131
40. Agarraberes FA, Dice JF (2001) Protein translocation across membranes. *Biochim Biophys Acta* 1513: 1-24
41. Salvador N, Aguado C, Horst M, Knecht E (2000) Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J Biol Chem* 275: 27447-27456
42. Agarraberes FA, Dice JF (2001) A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* 114: 2491-2499
43. Agarraberes FA, Terlecky SR, Dice JF (1997) An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J Cell Biol* 137: 825-834
44. Cuervo AM, Dice JF (2000) When lysosomes get old. *Exper Geront* 35: 119-131
45. Cuervo AM, Mann L, Bonten EJ, d'Azzo A, Dice JF (2003) Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *EMBO J* 22: 47-59

Lysosomal membrane glycoprotein lamp2a - receptor for chaperone-mediated degradation of cytosolic proteins

Katarzyna Roszek[✉], Jadwiga Gniot-Szulżycka

Department of Biochemistry, Institute of General and Molecular Biology, Nicolaus Copernicus University, 7 Gagarin St., 87-100 Torun, Poland
[✉]e-mail: kroszek@biol.uni.torun.pl

Key words: lysosomes, lysosomal membrane glycoproteins, glycoprotein lamp2a, chaperone-mediated autophagy, proteolysis

ABSTRACT

The structure of several lysosomal membrane glycoproteins (lamp1, lamp2, limpI and limpII) has been described. The significance of the receptor glycoprotein lamp2a in the chaperone-mediated autophagy of cytosolic proteins with KFERQ motif has been described in details as well as the chaperone protein Hsc73 and other chaperones involved in this process. Several modulatory mechanisms of the chaperone-mediated autophagy, which is activated in condition of stress and starvation, were also outlined.

Serynowo-treoninowe fosfatazy białkowe w *Bacillus subtilis*

STRESZCZENIE

Genom gram-dodatniej bakterii glebowej *Bacillus subtilis* koduje sześć serynowo-treoninowych fosfataz białkowych podobnych do eukariotycznych odpowiedników. Pełnią one szereg ważnych funkcji w komórce bakterii takich jak: kontrola odpowiedzi na warunki stresowe związane ze środowiskiem lub dostępnością składników odżywczych (trzy fosfatazy RsbX, RsbU i RsbP), proces formowania przetrwalników (fosfataza SpoIIIE) czy też transport cukrów do komórki (kinaza-fosfataza Hpr). W komórce obecne są również dwie kolejne fosfatazy (PrpC i PrpE) o nieustalonych do tej pory funkcjach. Przedstawione procesy komórkowe regulowane przez serynowo-treoninowe fosfatazy białkowe są bardzo istotne dla przetrwania bakterii w środowisku naturalnym. Fosfatazy białkowe muszą działać w powiązaniu z kinazami białkowymi, lecz nie powinny znajdować się w ich cieniu ponieważ pełnią równie istotne funkcje.

HISTORIA BADAŃ NAD FOSFORYLACJĄ BIAŁEK

Regulacja aktywności enzymów poprzez odwracalną fosforylację reszt seryny i treoniny w białkach została opisana po raz pierwszy na przykładzie komórki mięśni, gdzie odgrywa kluczową rolę w regulacji metabolizmu glikogenu. Wkrótce fosforylacja reszt Ser/Thr/Tyr została uznana za uniwersalny mechanizm regulacji funkcji życiowych komórek i ich adaptacji do zmiennych warunków środowiska czy pełnienia wyspecjalizowanych funkcji w organizmach wielokomórkowych [1]. Od tego czasu liczba opisanych enzymów biorących udział w fosforylacji i defosforylacji białek rośnie nieprzerwanie [2]. Rośnie również liczba prac poświęconych fosforylacji białek, w roku 1970 opublikowano ich 175, w 1980 - 723, w 1990 - 2355 a natomiast w roku 2000 aż 6718.

ZNACZENIE FOSFORYLACJI DLA ORGANIZMÓW ŻYWYCH

Organizmy żywe, zmagając się z różnorodnymi warunkami środowiskowymi, wykształciły w toku ewolucji wiele mechanizmów, które umożliwiają im przystosowanie się do zachodzących zmian w otoczeniu. Mechanizmy te funkcjonują na wszystkich poziomach budowy i organizacji świata ożywionego. Dla organizmów jednokomórkowych jedynym sposobem odpowiedzi na zmiany środowiskowe jest dostosowanie metabolizmu komórki do aktualnie panujących warunków. Odbywa się to poprzez syntezę odpowiednich enzymów lub produkcję bądź gromadzenie odpowiednich związków niskocząsteczkowych.

W toku ewolucji zostały wykształcone systemy kontroli ekspresji genów oraz regulacji aktywności powstałych białek tak, aby mogła mieć miejsce precyzyjna regulacja ich aktywności. Najbardziej rozpowszechnionym mechanizmem regulacji aktywności białek, znajdujących się w komórkach, jest odwracalna fosforylacja. Na uniwersalność tego sposobu regulacji składa się kilka faktów: niewielkie wymagania odnośnie miejsca fosforylacji, wysoka gęstość ładunku elektrycznego w przyłączanej grupie fosforanowej oraz duże możliwości tworzenia wiązań wodorowych z otaczającymi ją resztami aminokwasowymi [3]. W każdej grupie organizmów ten rodzaj regulacji pełni istotną rolę w przekazywaniu różnorodnych sygnałów wewnątrz komórki oraz pomiędzy nimi. Zmiana stanu fosforylacji białek wewnątrzkomórkowych prowadzi do zmian ich aktywności i/lub funkcji. Zmiany te w niektórych przypadkach mogą przebiegać spontanicznie lub przy udziale specyficznych enzymów: kinaz i fosfataz białkowych. Kinazy białkowe katalizują reakcję kowalencyjnego przyłączenia grupy ortofosforanowej do łańcuchów bocznych niektórych reszt aminokwasowych, fosfatazy natomiast dzięki reakcji hydrolizy je odłączają.

Duża część białek kodowanych przez genomy organizmów wyższych (około 30%) ulega fosforylacji na resztach Ser/Thr/Tyr. W związku z tym w genomach

Michał Obuchowski[✉]

Akademia Medyczna, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-AMG, Zakład Biologii Komórki, ul. Dębinki 1, 80-811 Gdańsk, Gdańsk

[✉] Akademia Medyczna w Gdańsku, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-AMG, Zakład Biologii Komórki, ul. Dębinki 1, 80-811 Gdańsk, e-mail: obuchowk@biotech.univ.gda.pl, tel. (58) 349 14 12, faks: (58) 349 14 45

Artykuł otrzymano 23 lutego 2004

Artykuł zaakceptowano 29 listopada 2004

Słowa kluczowe: *Bacillus subtilis*, fosfatazy białkowe, ogólna odpowiedź na stres, sporulacja, transport cukrów

Stosowane skróty: Ap_nA - diadenozyno-5',5''-P_n,P_n-tetrafosforan; Ap_nA - adenozylo(5')-ligo(5')adenozyna; EI - enzym pierwszy systemu transportu cukrów zależnego od fosforylacji; PPM - metalo-fosfatazy białkowe (ang. *metallo-protein phosphatase*); PPP - fosfatazy białkowe (ang. *protein phosphatase*).

organizmów eukariotycznych, na przykład człowieka, można znaleźć ogromną liczbę genów kodujących kinazy (ponad 500) i fosfatazy białkowe (ponad 100), które zajmują około 3% kodującej białko części genomu [1]. Organizmy prokariotyczne są uboższe w enzymy tego typu, lecz również posiadają po kilka lub kilkanaście kinaz i fosfataz białkowych [4].

Przyłączenie lub usunięcie grupy fosforanowej z cząsteczki białka może wpływać na jego aktywność i właściwości. Dla przykładu, fosforylacja białek pozwala na regulację aktywności enzymów poprzez allosteryczne zmiany ich konformacji, przez bezpośrednie blokowanie dostępu do centrum katalitycznego enzymu lub zmianę powinowactwa białko-białko. W niektórych wypadkach trudno jest wskazać bezpośredni wpływ przyłączonej grupy fosforanowej na strukturę białka, mimo to proces fosforylacji/defosforylacji zachowuje swoje znaczenie regulacyjne [3]. Do tej pory większym zainteresowaniem badaczy cieszyły się kinazy białkowe, natomiast fosfatazy białkowe były obiektem niewielu badań.

Z punktu widzenia fosforylacji białek, *Bacillus subtilis* jest ciekawym mikroorganizmem, ponieważ zawiera wiele systemów dwuskładnikowych (ang. *two-component systems*) [5], charakterystycznych dla bakterii. Jego genom koduje również enzymy wykazujące podobieństwo do eukariotycznych odpowiedników: dwie kinazy białkowe i dziesięć fosfataz. Spośród 4000 białek kodowanych w genomie *B. subtilis* ponad 100 ulega fosforylacji na resztach Ser/Thr/Tyr. Wzór fosforylowanych białek uzyskiwany dzięki elektroforezie dwukierunkowej zmienia się znacznie w zależności od odpowiedzi na różne warunki wzrostowe. Na podstawie tych wiadomości można przypuszczać, że genom *B. subtilis* koduje jeszcze wiele nieznanych do tej pory białek, które mogą funkcjonować jako kinazy lub fosfatazy serynowo-treoninowe.

KLASYFIKACJA FOSFATAZ BIAŁKOWYCH

Fosfatazy białkowe dzieli się na trzy duże rodziny enzymów: fosfatazy tyrozynowych (PTP), metalo-fosfataz białkowych (PPM) i fosfataz białkowych (PPP). Rodzina fosfataz tyrozynowych skupia enzymy podzielone na trzy podrodziny: konwencjonalne fosfatazy tyrozynowe, dwuspecyficzne fosfatazy tyrozynowe mogące wykorzystywać jako substrat wszystkie O-fosforany, oraz małe, kwaśne fosfatazy tyrozynowe. Niniejszy artykuł dotyczy fosfataz serynowo-treoninowych. W związku z tym rodzina fosfataz tyrozynowych nie będzie omawiana w dalszej części artykułu. Rodzina metalo-fosfataz białkowych skupia metalo-fosfatazy z najlepiej poznanym przedstawicielem PP2C. Rodzina fosfataz białkowych PPP stanowi najliczniej reprezentowaną grupę fosfataz białkowych w organizmach wyższych [6]. Do osobnej rodziny należy zaliczyć dwufunkcyjne białko – kinazę/fosfatazę Hpr [7].

CHARAKTERYSTYKA RODZINY METALO-FOSFATAZ BIAŁKOWYCH (PPM)

Pierwszy odkryty przedstawiciel tej rodziny, fosfataza PP2C pochodząca z wątroby szczura została pierwotnie za-

klasyfikowana jako fosfataza rodziny PPP. Dopiero po analizie sekwencji aminokwasowej i wykazaniu braku homologii względem innych przedstawicieli rodziny PPP, fosfataza ta została z niej wyłączona dając początek rodzinie metalo-fosfataz białkowych. Początkowo znano tylko izoformy α i β , później odkryto również izoformę γ . Na uwagę zasługuje wysoki stopień homologii przedstawicieli PP2C pomiędzy różnymi gatunkami. Na przykład, fosfataza PP2C człowieka i szczura wykazują 90% identyczności. Enzymy należące do tej rodziny działają zwykle jako pojedyncze białka bez udziału innych polipeptydów. Część katalityczna i części regulatorowe znajdują się w tym samym łańcuchu polipeptydowym. Przykładem może być białko ABI1 z *Arabidopsis thaliana* posiadające fosfatazę PP2C połączoną z czynnikiem wydłużania peptydu lub bakteryjna fosfataza SpoIIE, która posiada wiele rejonów błonowych, domenę centralną o nieustalonej funkcji i domenę fosfatazową [8]. Rdzeń katalityczny tych fosfataz składa się z około 200 reszt aminokwasowych, w których można wyróżnić 11 konserwowanych motywów z 14 niezmiennymi resztami aminokwasowymi zaangażowanymi w wiązanie atomów metalu oraz substratu [9, 10]. Najlepiej poznanym przedstawicielem eukariotycznych fosfataz PPM jest fosfataza PP2C α człowieka.

Centrum aktywne fosfataz z rodziny PPM jest położone na szczycie centralnej „kanapki” zbudowanej z β -struktur. Enzymy z tej rodziny posiadają w centrum aktywnym dwa atomy metalu, najczęściej Mg lub Mn, koordynowane przez 4 niezmiennie reszty kwasu asparaginowego oraz 6 cząsteczek wody. Atom manganu znajdujący się w miejscu M1 jest związany z czterema cząsteczkami wody, natomiast drugi, zlokalizowany w miejscu M2 z trzema cząsteczkami wody. Jedna cząsteczka wody jest koordynowana przez oba atomy metalu równocześnie. Atom metalu M1 jest związany z jedną resztą kwasu asparaginowego i glutaminowego oraz atomem tlenu pochodzącym z reszty glicyny. Jon Mn^{2+} , zajmujący miejsce M2, jest związany tylko z 3 resztami Asp. Reakcję defosforylacji przeprowadza aktywowana cząsteczka wody, która atakuje wiązanie estrowe pomiędzy grupą fosforanową a łańcuchem bocznym reszty aminokwasowej według mechanizmu S_N2 [9, 11]. Zaproponowany mechanizm wspiera również fakt, iż nie udało się do tej pory stwierdzić istnienia produktu przejściowego, fosfo-enzymu.

Inne jony, takie jak Ca^{2+} , Ni^{2+} czy Zn^{2+} są inhibitorami tych enzymów, gdyż prawdopodobnie konkurują z jonami Mg^{2+} lub Mn^{2+} o miejsce aktywne. Jednak Fjeld i Denu pokazali, że jony Fe^{2+} działają 1000-krotnie wydajniej z PP2C α [12].

Fosfataza PrpC jest enzymem zależnym od jonów Mn^{2+} . Gen kodujący ten enzym jest ekspresjonowany konstytutywnie w komórkach *B. subtilis* podczas wzrostu w hodowli płynnej. Wykazano również, że ufosforylowana forma kinazy PrkC jest dobrym substratem dla tego enzymu [13]. Kinaza PrkC okazała się być białkiem zakotwiczoną w błonie komórkowej, z domeną katalityczną znajdującą się wewnątrz komórki. Ponadto stwierdzono, że geny kodujące omawiane białka są ko-ekspresjonowane, co wspiera hipotezę zakładającą działanie wyżej wymienionych enzymów w tym samym procesie komórkowym. Istnieją również dane przemawiające za pewną rolą PrpC i PrkC w proce-

sie formowania przetrwalników przez komórki *B. subtilis* i tworzeniu biofilmu [14]. Dokładniejsza analiza cząsteczki kinazy PrkC pozwoliła ustalić, że jest ona fosforylowana w ośmiu miejscach (siedem reszt treoniny i jedna reszta seryny) znajdujących się w trzech rejonach. Dwa z nich znajdują się w obrębie części katalitycznej i są to cztery reszty treoniny w rejonie pętli aktywacyjnej oraz jedna reszta seryny znajdująca się w pewnym oddaleniu od pętli aktywacyjnej. Pozostałe reszty treoniny ulegające autofosforylacji tworzą trzeci rejon i znajdują się w części przymembranowej cząsteczki PrkC [15].

CHARAKTERYSTYKA RODZINY FOSFATAZ BIAŁKOWYCH (PPP)

Do rodziny fosfataz białkowych zaliczamy eukariotyczne fosfatazy typów: PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 i PP7; jednakże w organizmach prokariotycznych występują one stosunkowo nielicznie [4, 16]. Fizjologiczna funkcja bakteryjnych przedstawicieli tej rodziny również pozostaje słabo poznana. Można mówić wyłącznie o postulowanej funkcji fosfataz PrpA i PrpB z *Escherichia coli*, które wydają się być zaangażowane w usuwanie nieprawidłowo zwiniętych białek znajdujących się w cytoplazmie komórki [17]. Fosfatazy białkowe należące do rodziny PPP mają rdzeń katalityczny składający się z około 280 reszt aminokwasowych, w którym wyróżnia się trzy niezmiennie motywy: DXH(-25)-GDXXD(-25)-GNHD/E [18]. Pozostałe części cząsteczek fosfataz mogą nie wykazywać żadnej homologii pomiędzy sobą. W komórkach eukariotycznych rdzenie katalityczne fosfataz (np. PP1c, PP2A, PP2B itp.) występują w kompleksach z podjednostkami nadającymi im specyficzną substratową lub regulującymi ich aktywność. W komórkach bakteryjnych fosfatazy białkowe działają jako pojedyncze polipeptydy [17, 19, 20]. Zaznaczyć również należy podobieństwo konserwowanych motywów fosfataz białkowych z hydrolazami diadenozynopolifosforanów [21]. Enzymy należące do tej grupy zawierają w centrum aktywnym dwa dwuwartościowe jony metali takich jak Zn, Fe, Mg lub Ni. W przypadku fosfatazy PP1 są to jony Fe^{2+} i Mn^{2+} , a w przypadku PP2B Zn^{2+} i Fe^{2+} . Do tej pory brak jest danych krystalograficznych w odniesieniu do enzymów prokariotycznych. Jednak w przypadku fosfatazy PP1 bakteriofaga λ stwierdzono w szeregu doświadczeń wykorzystujących elektronowy rezonans paramagnetyczny, że są to jony Mn^{2+} [22]. Analizy biochemiczne umożliwiły przypuszczenie, że fosfatazy PrpA i PrpB z *E. coli* wykorzystują jony Mg^{2+} [17], a PrpE z *B. subtilis*, Ni^{2+} [20]. Jony metalu oddziałują z resztami kwasu asparaginowego, histydyny i asparaginy znajdującymi się w niezmiennych motywach wszystkich fosfataz rodziny PPP. Wspomniane reszty budują centrum aktywne enzymu i oddziałują pośrednio lub bezpośrednio z grupą fosforanową związaną z resztą seryny lub treoniny substratu. W kieszeni katalitycznej znajdują się również cząsteczki wody, związane z jonami metalu i pozostające w odległości van der Waalsa do grupy fosforanowej. Jedna z cząsteczek wody tam się znajdujących działa jako aktywowany metalem nukleofil. Hydroliza wiązania estrowego pomiędzy grupą fosforanową a łańcuchem bocznym defosforylowanego aminokwasu jest reakcją jednoetapową, prowadzoną przez aktywowaną cząsteczkę wody lub anion OH⁻ [11].

CHARAKTERYSTYKA KINAZY/FOSFATAZY Hpr

Dwufunkcyjny enzym, katalizujący fosforylację i defosforylację białka Hpr, zwany HprK, nie wykazuje homologii do żadnej grupy poznanych do tej pory enzymów zaangażowanych w fosforylację i defosforylację białek [7]. Kinazy/fosfatazy HprK, to białka zbudowane z 304-320 reszt aminokwasowych. Na uwagę zasługuje fakt, że wszystkie przebadane pod tym kątem gatunki bakterii zawierają zawsze tylko jeden gen kodujący białko HprK. Również organizacja genów otaczających gen *hprK* jest zbliżona pomiędzy różnymi gatunkami bakterii [23]. Enzym HprK jest regulowany allosterycznie przez fruktozo-1,6-bisfosforan spełniający funkcję aktywatora oraz fosforan nieorganiczny będący inhibitorem aktywności kinazy [24]. Kolejną cząsteczką mającą wpływ na aktywność enzymu HprK jest ATP. Jego wysokie stężenie faworyzuje aktywność kinazy, niskie zaś fosfatazy [25]. Wiązanie niskocząsteczkowych aktywatorów przez kompleksy białka HprK jest kooperatywne. Analiza mutacyjna enzymów tego typu, pochodzących z różnych gatunków bakterii wykazała, iż możliwe jest otrzymanie mutantów mających upośledzoną jedną z aktywności – fosfatazy bądź kinazy białkowej [26, 27]. W cząsteczkach kinazy białka Hpr znaleziono dwa silnie konserwowane rejony. Pierwszy, tworzący motyw A Walkera i odpowiadający za wiązanie nukleotydów oraz drugi charakterystyczny tylko dla kinaz/fosfataz HprK, zaangażowany w oddziaływanie z resztą seryny 46 białka Hpr [28]. Białko to w roztworze tworzy homoheksamery, wykazujące potrójną symetrię [29, 30]. Kolejne badania wykazały, że powinowactwo enzymu do białka Hpr wzrasta dziesięciokrotnie w obecności ATP oraz wskazały na obecność i rolę kationów metali w tym procesie. Dowiedziono również, że fosforan nieorganiczny hamuje aktywność kinazy białka HprK poprzez wiązanie się do miejsca zajmowanego przez ATP [31]. Mechanizm defosforylacji białka Hpr przez omawiany enzym jest również odmienny. Grupą funkcyjną atakującą resztę ortofosforanową związaną z aminokwasem jest druga grupa ortofosforanowa. Dlatego też defosforylacja przeprowadzana przez białko HprK jest reakcją fosfo-fosforolizy i prowadzi do powstania cząsteczki pirofosforanu. Reakcja ta może również przebiegać w przeciwnym kierunku, to znaczy, w warunkach dużego stężenia pirofosforanu może on służyć jako donor grupy ortofosforanowej w reakcji fosforylacji białka Hpr [32].

FUNKCJE PEŁNIONE PRZEZ FOSFATAZY Ser/Thr U *B. subtilis*

PRZEGLĄD FOSFATAZ KODOWANYCH PRZEZ GENOM *B. subtilis*

Fosfatazy kodowane w genomie *B. subtilis* są bardzo zróżnicowane. Pięć z nich (RsbX, RsbU, RsbP, SpoIIIE i PrpC) należy do rodziny metalo-fosfataz białkowych, jedna reprezentuje rodzinę PPP (PrpE), pozostałe cztery są fosfatazami tyrozynowymi. Dwie z nich są przedstawicielami konwencjonalnych fosfataz tyrozynowych (YtrC i YvcJ), a YfkJ i YwIE reprezentują małe, kwaśne fosfatazy tyrozynowe [33]. Fosfatazy RsbX, U i P tworzą system aktywacji czynnika σ^B , odpowiedzialnego za transkrypcję genów regulonu odpowiedzi na stres [34, 35]. Białko SpoIIIE uczestniczy we

wczesnych etapach sporulacji jako część systemu aktywacji podjednostki σ^F , działającej w formowanej presporze [36, 37]. Para kinaza-fosfataza białkowa PrkC-PrpC uczestniczy pośrednio w procesie sporulacji i tworzenia biofilmu [14]. Ostatnia z opisywanych fosfataz, PrpE, została scharakteryzowana tylko na poziomie biochemicznym [20] i jej rola komórkowa pozostaje jeszcze niewyjaśniona.

REGULACJA ODPOWIEDZI NA STRES

Bacillus subtilis jako wolno żyjąca bakteria glebowa jest bardzo często narażony na niekorzystne warunki środowiskowe, które ograniczają jego możliwości wzrostu. Osiągnięcie przez komórki *B. subtilis* fazy stacjonarnej lub poddanie ich działaniu stresu środowiskowego (tj. niekorzystnej temperaturze, wysokiemu stężeniu soli czy działaniu alkoholu) powoduje aktywację regulonu odpowiedzi stresowej. Ekspresja ponad 100 genów wchodzących w jego skład jest zależna od czynnika transkrypcyjnego σ^B . Bierze w nim udział 9 białek z rodziny genów *rsb* (ang. *regulator of sigma B*) oraz kilkanaście innych białek [38, 39]. Ogólnie przyjmowany schemat aktywacji czynnika σ^B przedstawia rysunek 1.

W komórkach niepodlegających żadnemu stresowi czynnik σ^B znajduje się w kompleksie z kinazą RsbW, będącą czynnikiem anty- σ^B , co powoduje jego inaktywację. Czynnikiem anty-anty- σ^B , czyli białko RsbV jest fosforylowane przez kinazę RsbW, czynnik any- σ^B . Zapobiega to jego wiązaniu do kompleksu kinazy RsbW z podjednostką σ^B i wypieraniu jej z kompleksu RsbW- σ^B . Gdy komórki *B. subtilis* wchodzi w stacjonarną fazę wzrostu, mają miejsce dwa zdarzenia: spada poziom wewnątrzkomórkowego ATP co czyni fosforylację białka RsbV mało wydajną oraz wzrasta aktywność fosfatazy RsbP [34, 40]. Należy dodać, że fosfataza RsbP jest aktywowana dzięki funkcji białka RsbQ o niewyjaśnionej jeszcze funkcji [34]. Rezultatem wyżej wymienionych procesów jest zwiększenie puli niefosforylowanej formy białka RsbV, powstanie kompleksu RsbW-RsbV, a w konsekwencji uwolnienie i aktywacja podjednostki σ^B . Postuluje się również, że istotnym czynnikiem podczas aktywacji regulonu odpowiedzi stresowej jest aktywność kinazy RsbW, na którą ma wpływ stosunek stężenia ATP do ADP w komórce. Aktywacja regulonu odpowiedzi na stres zachodzi według tego schematu wówczas, gdy obniżeniu ulega poziom energii w komórce.

W przypadku stresu środowiskowego aktywacja podjednostki σ^B przebiega odmiennie. Początkiem aktywacji σ^B w odpowiedzi na stres środowiskowy jest rozpad kompleksu RsbT-RsbS, w którym kinaza RsbT pozostawała nieaktywna [41]. Fosforyluje ona białko RsbS, które przestaje hamować jej aktywność. Wolna kinaza RsbT łączy się z fosfatazą RsbU, która defosforylując białko RsbV doprowadza do aktywacji podjednostki σ^B . Wytlumienie odpowiedzi stresowej zachodzi dzięki białku RsbX, które defosforyluje RsbS i umożliwia mu ponowne wytworzenie kompleksu z kinazą RsbT [42]. Należy dodać, że kinaza RsbT jest aktywowana przez białko Obg, RsbR oraz jego homologi [38, 43]. Współdziałanie odpowiedzi na stres z innymi procesami zapewnia znacznie podwyższoną przeżywalność komó-

rek i wydajność sporulacji podczas ich hodowli w niskiej temperaturze (20°C) [44].

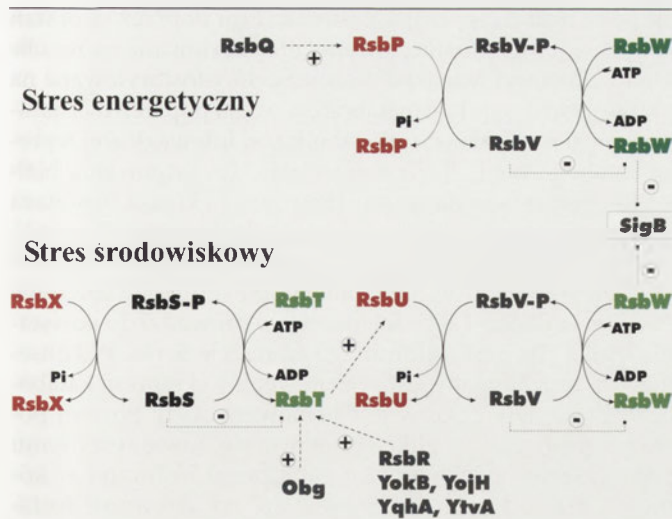
FOSFATAZA RsbX

Jest to najmniejsza fosfataza białkowa należąca do rodziny PPM kodowana przez genom *B. subtilis*. Częsteczką RsbX składa się z 199 reszt aminokwasowych i posiada masę około 22 kDa. Produkt genu *rsbX* był pierwszym poznany regulatorem aktywności podjednostki σ^B . Podejmowane próby wyjaśnienia roli białka RsbX w aktywacji podjednostki σ^B wskazywały na pośrednie działanie tego enzymu. Jednak wysoki poziom ekspresji genów zależnych od podjednostki σ^B w szczepach niosących mutację *rsbX* był trudny do wyjaśnienia. Badania genetyczne dowiodły, że regulacja poziomu odpowiedzi na stres przez RsbX jest zależna od obecności funkcjonalnego białka RsbU [45]. W przypadku braku lub obniżonej ilości białka RsbX aktywność σ^B utrzymuje się na wysokim poziomie mimo ustania warunków wywołujących stres [46]. Tak więc, białko RsbX jest czynnikiem ograniczającym poziom odpowiedzi stresowej w komórkach *B. subtilis*. Istnieje również inny mechanizm redukujący ilość wolnej podjednostki σ^B , niezależny od białka RsbX [47]. Fosfataza RsbX defosforyluje białko RsbS będące inhibitorem aktywności kinazy RsbT. Nieufosforylowana forma białka RsbS wiąże się z kinazą RsbT, co przerywa aktywację regulonu odpowiedzi na stres [42]. Budowa białka RsbX składającego się tylko z domeny katalitycznej, sugerowała brak mechanizmu regulacji aktywności enzymatycznej. Jednak aktywność fosfatazy RsbX jest jednak w pewnym zakresie regulowana przez stres środowiskowy [48]. Mechanizm ten jest niezależny od białek RsbR i Obg, uczestniczących w aktywacji odpowiedzi stresowej.

Podsumowując, fosfataza RsbX jest negatywnym regulatorem odpowiedzi stresowej komórki *B. subtilis*.

FOSFATAZA RsbU

Częsteczką fosfatazy RsbU składa się z 335 reszt aminokwasowych i ma masę 38,5 kDa. Badania przeprowadzone przez Wise i Price pokazały, iż produkt genu *rsbU* wykazuje znaczące podobieństwo sekwencji aminokwasowej względem białka RsbX oraz jest niezbędny do aktywacji czynnika σ^B podczas stresu środowiskowego [49]. Gen *rsbU* jest jednym z ośmiu genów położonych w jednym operonie z genem *sigB*. Ekspresja pierwszych czterech genów, *rsbR*, *rsbS*, *rsbT* i *rsbU*, nie zmienia się podczas odpowiedzi stresowej w odróżnieniu od *rsbV*, *rsbW*, *sigB* i *rsbX*, które podlegają indukcji. Doświadczenia filtracji żelowej i ko-immunoprecypitacji nie wykazały oddziaływania pomiędzy produktami pierwszej i drugiej czwórki genów [50]. Kolejne doniesienia wykazały, że produkt genu *rsbU* jest niezbędny do regulacji aktywności czynnika σ^B w szlaku zależnym od białka RsbX [45]. Niedługo potem stało się jasne, iż aktywacja σ^B jest spowodowana defosforylacją białka RsbV. Fosfataza RsbU jest aktywowana przez wytworzenie kompleksu z kinazą RsbT [42, 51]. Substratem dla tego enzymu jest fosforylowana forma białka RsbV, będącego czynnikiem anty-anty σ^B [52]. Utworzenie kompleksu RsbU-RsbT powoduje raptowną defosforylację białka RsbV i w konsekwencji uwolnienie czynnika σ^B . Podjęte próby skryształizowania białka RsbU



Rysunek 1. Schemat aktywacji czynnika σ^b w komórkach *B. subtilis*. Stres energetyczny: białko RsbQ aktywuje fosfatazę RsbP, która defosforyluje białko RsbV. Wolne białko RsbV łączy się z białkiem RsbW i powoduje uwolnienie czynnika σ^b . Stres środowiskowy: sygnał o niekorzystnych warunkach jest odbierany na dwa sposoby – poprzez rozpad kompleksu RsbS-RsbT oraz dzięki aktywatorom kinazy RsbT – białkom Obg, RsbR i jego paralogom. Wolna kinaza RsbT fosforyluje białko RsbS oraz łącząc się z fosfatazą RsbU aktywuje ją. Prowadzi to do defosforylacji białka RsbV. Wolne białko RsbV łączy się z białkiem RsbW i powoduje uwolnienie czynnika σ^b . Fosfataza RsbX defosforyluje białko RsbS powodując wygaszenie odpowiedzi stresowej. Fosfatazy – kolor czerwony, białka regulatorowe – kolor czarny, kinazy białkowe – kolor zielony. „+” oznacza aktywację „-” oznacza represję.

powinny umożliwić analizę mechanizmu regulacji działania tego enzymu (Rys. 1) [53].

FOSFATAZA RsbP

Fosfataza RsbP składa się z 403 reszt aminokwasowych i ma masę około 45,8 kDa. Gen *rsbP* jest zlokalizowany w operonie wraz z genem *rsbQ*. Udział fosfatazy RsbP w aktywacji odpowiedzi na stres został udowodniony przez Vijay i współpracowników [34]. Enzym ten uczestniczy w aktywacji podjednostki σ^b w odpowiedzi na obniżenie się potencjału energetycznego komórki [34]. W cząsteczce tej fosfatazy można wyróżnić domeny: fosfatazy oraz PAS. Ta druga spotykana jest w białkach będących czujnikami zmian potencjału oksydo-redukcyjnego, tlenu lub światła [54]. Obecność domeny PAS w cząsteczce fosfatazy sugeruje, iż mogłaby ona samodzielnie śledzić zmiany w poziomie energetycznym komórki. Jednak kolejne badania wykazały, że fosfataza RsbP tworzy stabilne kompleksy z produktem genu *rsbQ*. Funkcja tego białka jako pozytywnego regulatora jest niezbędna do aktywacji podjednostki σ^b [39]. Produkt genu *rsbQ* należy do rodziny α/β hydrolaz, która to skupia enzymy wykazujące całą gamę różnych aktywności enzymatycznych [55]. W odpowiedzi na stres energetyczny w komórkach *B. subtilis* powstaje kompleks RsbP-RsbQ, który defosforyluje białko RsbV, będące czynnikiem anty-anty σ^b umożliwia uwolnienie i aktywację σ^b , a w rezultacie dalszą odpowiedź na stres.

REGULACJA PROCESU SPORULACJI Z UDZIAŁEM ODWRACALNEJ FOSFORYLACJI BIAŁEK

Tworzenie przetrwalników przez *B. subtilis* jest jedną z strategii przetrwania niekorzystnych warunków środowi-

skowych przez dłuższy czas. Uruchomienie procesu sporulacji jest ważną decyzją rozwojową dla bakterii, dlatego też wymaga scalenia wszystkich dostępnych informacji o stanie komórki i środowiska zewnętrznego. Proces podejmowania decyzji o wytworzeniu przetrwalnika jest regulowany przez system białek uczestniczących w przenoszeniu grupy fosforanowej (ang. *phosphorelay*) [56]. Sygnał do rozpoczęcia sporulacji jest przekazywany za pośrednictwem pięciu kinaz histydynowych aktywowanych specyficznymi sygnałami [57]. Aktywowane kinazy ulegają autofosforylacji, następnie grupa fosforanowa jest przekazywana na białko Spo0F. Białko to jest substratem dla fosfotransferazy Spo0B, która przenosi grupę fosforanową na białko Spo0A będące czynnikiem transkrypcyjnym bezpośrednio odpowiedzialnym za aktywację ekspresji genów kluczowych dla rozpoczęcia procesu sporulacji [58]. Ufosforylowana forma białka Spo0A indukuje ekspresję ponad 100 genów, których produkty są niezbędne w procesie sporulacji. Przepływ grup fosforanowych od kinaz do białka Spo0A jest regulowany przez szereg fosfataz białkowych, takich jak RapA, B i E a także Spo0E [59]. Fosfatazy te są regulowane na poziomie transkrypcji, translacji oraz aktywności enzymatycznej. W inicjacji sporulacji biorą również udział: system dwuskładnikowy regulujący kompetencję komórek *B. subtilis* oraz system odpowiedzialny za gospodarkę fosforem [60]. Uruchomiony proces sporulacji jest następnie kontrolowany przez kaskadę czynników σ . Pierwszym czynnikiem σ jest podjednostka σ^H działająca w komórce macierzystej. W wyniku jej działania ekspresji ulegają między innymi białka SpoIIAA (kinaza), SpoIIAB (białko regulatorowe), SigF (czynnik transkrypcyjny) oraz SpoIIIE (fosfataza białkowa). Tworzą one system aktywujący podjednostkę σ^F wyłącznie w preporze oraz uczestniczą w niesymetrycznym podziale komórki bakteryjnej [61]. Kolejne etapy sporulacji prowadzące do aktywacji dalszych czynników transkrypcyjnych takich jak σ^E , σ^G i σ^K nie podlegają regulacji przez odwracalną fosforylację białek.

FOSFATAZA SpoIIIE

Cząsteczka SpoIIIE składa się z 827 reszt aminokwasowych i ma masę około 82 kDa. W cząsteczce tego białka wyróżnia się dwanaście rejonów transmembranowych położonych w N-terminalnej części białka, część globularną (reszty aminokwasowe 331 do 607) oraz C-terminalną domenę fosfatazową [8, 62]. Podobieństwo strukturalne i funkcjonalne domeny C-terminalnej białka SpoIIIE do metalo-fosfataz białkowych zostało potwierdzone szeregiem doświadczeń *in vitro* oraz mutagenezą ukierunkowaną konserwowanych ewolucyjnie reszt aminokwasowych w centrum katalitycznym fosfatazy [37, 63]. Fosfataza ta wymaga do swojej aktywności jonów Mg^{2+} lub Mn^{2+} w odróżnieniu od fosfataz Rsb, które są aktywowane tylko przez jony Mg^{2+} oraz PrpC, która wymaga jonów manganu. Fizjologiczną funkcją fosfatazy SpoIIIE jest aktywacja czynnika σ^F , który jest odpowiedzialny za transkrypcję wczesnych genów sporulacyjnych w powstającej preporze oraz niesymetryczny podział komórki podczas wczesnych etapów sporulacji [64]. Udział białka SpoIIIE w tworzeniu ściany komórkowej zachodzi poprzez jego interakcję z białkiem FtsZ [65]. Aby czynnik σ^F mógł być aktywowany, fosfataza SpoIIIE musi defosforylować białko regulatorowe SpoIIAA, będące czynnikiem

anty-anty σ^F . Nieufosforylowana forma białka SpoIIAA łączy się z kompleksem SpoIIAB- σ^F tworząc kompleks SpoIIAA-SpoIIAB i wolny czynnik σ^F [66]. Defosforylacja białka SpoIIAA zachodzi tylko w presporze, wskazując na istnienie mechanizmu regulacji lokalizacji i aktywności fosfatazy SpoIIIE [67]. Za istnieniem tego mechanizmu przemawia fakt, iż enzym ten jest zlokalizowany w powstającej ścianie komórkowej oddzielającej tworzącą się sporę od komórki macierzystej [62]. Wyjaśnienie to nie jest jednak pełne, ponieważ znane są mutanty genu *spoIIIE*, które niezależnie defosforylują białko SpoIIAA od lokalizacji fosfatazy [8, 68, 69]. Pokazano również, iż defosforylacja regulatora SpoIIAA może zachodzić przed ukończeniem podziału na komórkę macierzystą i presporę, co dowodzi, że lokalizacja fosfatazy SpoIIIE nie wystarcza do regulacji jej aktywności [36]. Na istnienie dodatkowego mechanizmu regulacji aktywności fosfatazowej białka SpoIIIE wskazują również pomiary kinetyki fosforylacji/defosforylacji białka SpoIIAA. Ilość kinazy SpoIIAB i fosfatazy SpoIIIE w komórkach *B. subtilis* podczas sporulacji jest podobna, lecz reakcja defosforylacji zachodzi prawie 100 razy szybciej niż fosforylacja [70]. Różnica w szybkości procesu fosforylacji/defosforylacji wynika z bardzo wolnego uwalniania produktów reakcji przez kinazę SpoIIAB [71]. Stąd wniosek, że aktywność fosfatazy musi być w jakiś sposób hamowana. W doświadczeniach z białkiem SpoIIAA, zawierającym treoninę w miejscu fosforylowanej przez kinazę SpoIIAB seryny 58, stwierdzono, że tak zmienione białko jest fosforylowane z normalną wydajnością, ale odporne na działanie fosfatazy SpoIIIE. Warto zwrócić uwagę również na fakt, że białko SpoIIAA jest fosforylowane na reszcie seryny znajdującej się na powierzchni cząsteczki. Przyłączona w tym miejscu grupa ortofosforanu pełni tylko pasywną rolę znacznika białka mającego dwa ujemne ładunki elektryczne. Badania krystalograficzne jak i wykorzystujące magnetyczny rezonans jądrowy nie wykazały znaczących zmian w konformacji regulatora SpoIIAA [72, 73]. Aktywność fosfatazy SpoIIIE odgrywa również kluczową rolę w powiązaniu czasowo-przeźrzymym niesymetrycznym podziału komórki *B. subtilis* oraz aktywacji genów zależnych od podjednostki σ^F w powstającej sporze [74]. Co więcej, wykazano, że nieufosforylowana forma białka SpoIIAA powstająca w presporze oddziałuje z białkiem Spo0A systemu przenoszenia grupy fosforanowej, odpowiedzialnym za inicjację sporulacji. Oddziaływanie to prowadzi do zahamowania fosforylacji białka Spo0A i w konsekwencji blokuje powtórny inicjację sporulacji w powstającej sporze [75].

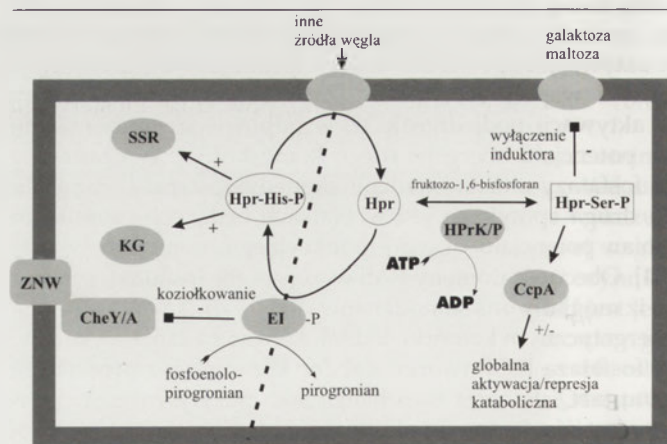
ROLA FOSFORYLACJI BIAŁEK W TRANSPORCIE CUKRÓW

Systemy transportu cukrów występują powszechnie wśród bakterii. Umożliwiają one wybranie najkorzystniejszego źródła węgla i energii spośród znajdujących się aktualnie w środowisku otaczającym bakterie [76]. Mikroorganizmy wypracowały skomplikowany mechanizm pozwalający na wykrywanie i transport wybranego związku przy jednoczesnym zablokowaniu pobierania innych. W toku ewolucji, bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie wykształciły odpowiednie systemy różniące się na poziomie molekularnym [77]. U tych pierwszych rolę głównego regulatora pełni białko CAP, w przypadku drugich natomiast tę funk-

cję pełni białko Hpr [78]. Cząsteczka Hpr poprzez swój stan fosforylacji (nie ufosforylowane, ufosforylowane na reszcie His15, ufosforylowane na reszcie Ser46, ufosforylowane na obu resztach) reguluje metabolizm węgla poprzez mechanizmy węglowej aktywacji katabolicznej lub węglowej represji katabolicznej [79]. Za fosforylację Hpr odpowiada białko EI (fosforylacja na reszcie histydy) i kinaza/fosfataza Hpr (fosforylacja na reszcie seryny). W komórce *B. subtilis* zidentyfikowano piętnaście systemów transportu cukrów [80]. Napływ cukrów do komórki powoduje zwiększenie stężenia fruktozo-1,6-bisfosforanu, co prowadzi do powstania białka Hpr fosforylowanego na reszcie Ser46. W konsekwencji uruchamiany jest system węglowej represji katabolicznej i napływ cukrów jest hamowany. Gdy poziom pośrednich substratów glikolizy obniża się, towarzyszy temu podwyższenie poziomu nieorganicznego fosforanu w komórce. Białko HprK „przestawia się” na aktywność fosfatazy i zmniejsza poziom białka Hpr, fosforylowanego na reszcie seryny. Staje się ono wtedy substratem dla EI, które przenosi grupę fosforanową z fosfoenolopirogronianu na resztę histydy białka Hpr, co ponownie uruchamia zależny od fosforylacji transport cukrów do wnętrza komórki [77]. Tak więc, białko Hpr stanowi centralny punkt regulacji metabolizmu węgla w komórkach bakterii Gram-dodatnich (Rys. 2) [81]. Również proces sporulacji jest zależny od stanu białka Hpr, które wiąże ten proces z metabolizmem węgla oraz replikacją DNA [82].

KINAZA/FOSFATAZA HPR

Pierwsze doniesienia mówiące o kinazie i fosfatazie białka HPr z *B. subtilis* pojawiły się w roku 1998. Wtedy to Galinier wraz ze współpracownikami opublikował pracę zawierającą charakterystykę dwóch genów: *hprK* i *hprP*. Pierwszy



Rysunek 2. Regulacja transportu cukrów do komórki *B. subtilis*. Rysunek przedstawia bakterie w dwóch stanach: w obecności alternatywnych źródeł węgla (część rysunku na prawo od przerywanej linii) oraz podczas ich braku (część rysunku na lewo od przerywanej linii). Aktywacja lub represja została zaznaczona odpowiednio znakiem „+” lub „-”. W obecności alternatywnych źródeł węgla białko Hpr jest głównie fosforylowane na reszcie Ser46. W tej formie aktywuje ono represorowe białko CcpA, które blokuje ekspresję genów odpowiedzialnych za wykorzystanie alternatywnych źródeł węgla. Jeśli w środowisku nie są obecne inne źródła węgla, białko Hpr jest głównie fosforylowane na reszcie His15. Ta forma białka HPr aktywuje systemy fosfo-przenośników cukrów do komórki, kinazę glicerolu (GK) oraz substrato-specyficzne regulatory (SSR). Zastosowane skróty: ZNW – zespół napędu wici, CheY/A – białka przenoszące sygnały chemoaktywne, GK – kinaza glicerolu, SSR – substrato-specyficzne aktywatory, EI – enzym pierwszy systemu transportu cukrów zależnego od fosforylacji, Hpr – fosfotransferaza Hpr, HprK/P – kinaza/fosfataza białka Hpr, CcpA – główne białko regulatorowe aktywacji/represji katabolicznej.

z nich kodował kinazę białka HPr zbudowaną z 310 reszt aminokwasowych. Białko to wykazywało aktywność kinazy Ser/Thr, której substratem komórkowym jest białko HPr ulegające fosforylacji na reszcie Ser46. Równocześnie został scharakteryzowany produkt genu *hprP*, kodującego białko składające się z 216 reszt. Białko HprP wykazywało aktywność fosfatazy białkowej w stosunku do fosforylowanego białka HPr. Aktywność fosfatazy białka HprP była stymulowana przez jony Mg^{2+} oraz fosforan nieorganiczny [7]. Niedługo później wykazano, że kinaza Hpr jest aktywowana allosterycznie przez fruktozo-1,6-bisfosforan oraz hamowana przez fosfor nieorganiczny [31, 79]. Następnie stwierdzono, że kinaza HprK wykazuje dodatkową aktywność enzymatyczną – fosfatazy białkowej [25]. W powyższej pracy wykazano, że aktywność fosfatazowa białka HprP jest niespecyficzna i znacznie niższa od znalezionej w HprK. Dlatego produkt genu *hprK* nazwano kinazą/fosfatazą HPr. Zaburzenie równowagi pomiędzy obiema aktywnościami tego enzymu prowadzi do dysfunkcji całego systemu zależnego od fosforylacji transportu cukrów i upośledzenia wzrostu bakterii [26, 28]. Jego homologi są znajdowane w bakteriach Gram-dodatnich oraz w niektórych Gram-ujemnych bakteriach patogennych. Fizjologiczną funkcją białka Hpr jest regulacja zależnego od fosforylacji transportu cukrów do wnętrza komórki bakteryjnej oraz kontrola ekspresji genów związanych z tym procesem [80, 83]. Produkt genu *hprK* występuje w komórce w postaci homo-oligomerów, zawierających zwykle sześć podjednostek [30, 84]. Wykazano również, że białko to może występować jako monomer lub dimer, w zależności od pH. Poziom aktywności kinazy lub fosfatazy można przedstawić jako funkcję pH. W warunkach fizjologicznych wartości pH białko HprK wykazuje aktywność kinazy, natomiast obniżenie pH powoduje przewagę aktywności fosfatazy białkowej. Aktywność fosfatazy faworyzuje również heksameryczny kompleks tego enzymu [85]. Białko HprK może wykorzystywać pirofosforan lub ATP jako donory grupy fosforanowej. Związanie aktywatora, fruktozo-1,6-bisfosforanu, powoduje allosteryczną zmianę konformacji enzymu faworyzującą wiązanie ATP. Jeśli donorem grupy fosforanowej jest pirofosforan, zmiana ta nie jest konieczna [86]. Produkcja białka HprK zachodzi konstytutywnie na niskim poziomie. Nie udało się również wykazać zmian w ilości tego białka w różnych fazach wzrostu hodowli *B. subtilis*, co sugeruje, że jego aktywność jest regulowana wyłącznie na poziomie funkcji enzymatycznej [28].

INNE FUNKCJE FOSFATAZ SERYNOWO-TREONINOWYCH W KOMÓRCIE *B. subtilis*

Fosforylacja białek na resztach Ser/Thr najprawdopodobniej zaangażowana jest również w proces tworzenia biofilmu bakteryjnego, skoordynowanego ruchu bakterii po powierzchni agaru czy wytwarzania spor. W ostatnim z wymienionych przykładów nie uczestniczy ona w regulacji tego procesu. W literaturze światowej ukazały się prace wskazujące na związek pomiędzy regulacją odpowiedzi na stres a wytwarzaniem biofilmu [87]. Udział fosfataz kodowanych przez *B. subtilis* był również postulowany w tym procesie [14]. Mechanizm regulacji tych procesów przez fosforylację pozostaje jednak ciągle niewyjaśniony.

FOSFATAZA PrpC

Cząsteczka fosfatazy PrpC składa się z 254 reszt aminokwasowych. Aktywność fosfatazy białkowej dla tego białka wykazano w stosunku do autofosforylowanej kinazy PrkC [13]. Opisane powyżej fosfatazy RsbX, U i P zależne są od jonów Mg^{2+} . PrpC charakteryzuje się odmiennym zapotrzebowaniem na jony metalu i wymaga jonów Mn^{2+} do swojej aktywności. Gen fosfatazy *prpC* jest eksprymowany konstytutywnie wraz z kinazą *prkC* w operonie składającym się z pięciu genów: *def*, *fmt*, *yloN*, *prpC* i *prkC*. Co więcej, istnieje możliwość ekspresji wyłącznie genów *prpC* i *prkC* z dodatkowego promotora zlokalizowanego bezpośrednio przed tymi genami (Iwanicki i in., dane nie publikowane). Cząsteczki PrkC ulegają trans-autofosforylacji, która stymuluje aktywność kinazy białkowej [15]. Z tego punktu widzenia fosfataza PrpC pełni rolę inhibitora kinazy, poprzez wpływ na poziom fosforylacji cząsteczek PrkC.

FOSFATAZA PrpE

Białko kodowane przez gen *prpE* *B. subtilis* jest białkową fosfatazą zaliczaną do rodziny PPP ze względu na podobieństwo sekwencji aminokwasowej. Charakterystyczne motywy strukturalne całej rodziny są dobrze zachowane w sekwencji aminokwasowej tego białka. Przedstawiciele tej grupy enzymów wykazują homologię względem symetrycznych hydrolaz diadenozynotetrafosforanów (Ap_4A). Występowanie nukleotydów takich jak diadeninopolifosforany (substratów dla hydrolaz Ap_nA), zostało wykazane w wielu różnych organizmach, na przykład: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae*, *Physarum polycephalum*, krewetek, myszy czy człowieka. Funkcja pełniona przez nukleotydy tego typu może być różna i zmieniać się w zależności od rodzaju dinukleozydopolifosforanu i organizmu, w którym występuje. Mogą one na przykład stymulować syntezę DNA, regulować mitozę czy aktywować transkrypcję genów [88-90].

Przeprowadzona w naszym laboratorium analiza biochemiczna wykazała, że białko kodowane przez gen *prpE* wykazuje trzy aktywności: fosfatazy białkowej, hydrolazy Ap_4A i ATPazy. Wszystkie wymienione aktywności są zależne od jonów Ni^{2+} . Dokładniejsze badania pozwoliły stwierdzić, iż badane białko jest w stanie usuwać grupy fosforanowe z reszt fosfotyrozyny, ale nie z fosfoseryny lub fosfotreoniny [19]. Białko badane w naszym laboratorium jest pierwszym enzymem z rodziny PPP, który *in vitro* wykazuje aktywność tylko w stosunku do fosfotyrozyny. Kolejną niespodzianką był fakt, że cząsteczka Ap_4A jest hydrolizowana niesymetrycznie do cząsteczek AMP i ATP. Najlepiej poznany enzym tego typu, ApaH, pochodzący z *E. coli* i wykazujący znaczną homologię z badanym białkiem (25% identyczności) jest symetryczną hydrolazą Ap_4A . Natura odmiennego sposobu degradacji Ap_4A przez PrpE pozostaje w dalszym ciągu niewyjaśniona. Ostatnia z wykrytych aktywności enzymatycznych - ATPazy - nie stanowi zaskoczenia, ponieważ może ona towarzyszyć hydrolazom Ap_4A . Kolejne doświadczenia mające na celu ustalenie, która ze znalezionych aktywności przeważa w warunkach *in vivo* wykazały,

że białko PrpE działa w komórce najprawdopodobniej jako fosfataza białkowa [20].

PODSUMOWANIE

Fosfatazy Ser/Thr kodowane w genomie *B. subtilis* uczestniczą w wielu procesach komórkowych warunkujących wzrost bakterii, odpowiedź na zmieniające się warunki środowiska oraz możliwość decyzji warunkującej różne drogi rozwoju. Wyżej opisane procesy są ze sobą nierozdzielnie powiązane, tak jak ma to miejsce w przypadku metabolizmu komórki. Rozpatrywanie ich jako pojedynczych układów nie oddaje całej złożoności oraz możliwości regulacyjnych jakie stwarzają. Istotność przedstawionych fosfataz białkowych dla komórek nie ulega wątpliwości, gdyż pełnią one kluczowe role w omówionych wyżej procesach. Przedstawiona ich charakterystyka jest również dowodem na to, że fosfatazy białkowe, pozostające w cieniu kinaz w większości badań naukowych, są równie ważnymi enzymami dla komórek jak kinazy.

LITERATURA

- Hunter T (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-36.
- Adams J A (2001) Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem Rev* 101: 2271-90.
- Johnson L N & Lewis R J (2001) Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev* 101: 2209-42.
- Kennelly P J (2002) Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiol Lett* 206: 1-8.
- Perego M, H J A (2002) in *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*, ed. al., S. e. (ASM Press, Washington), pp. 473-481.
- Barford D (1996) Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci* 21: 407-12.
- Galinier A, Kravanja M, Engelmann R, Hengstenberg W, Kilhoffer M C, Deutscher J & Haiech J (1998) New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1823-8.
- Arigoni F, Guerout-Fleury A M, Barak I & Stragier P (1999) The SpoIIIE phosphatase, the sporulation septum and the establishment of forespore-specific transcription in *Bacillus subtilis*: a reassessment. *Mol Microbiol* 31: 1407-15.
- Das A K, Helps N R, Cohen P T & Barford D (1996) Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J* 15: 6798-809.
- Bork P, Brown N P, Hegyi H & Schultz J (1996) The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues. *Protein Sci* 5: 1421-5.
- Barford D (1999) Colworth Medal Lecture. Structural studies of reversible protein phosphorylation and protein phosphatases. *Biochem Soc Trans* 27: 751-66.
- Fjeld C C & Denu J M (1999) Kinetic analysis of human serine/threonine protein phosphatase 2C α . *J Biol Chem* 274: 20336-43.
- Obuchowski M, Madec E, Delattre D, Boel G, Iwanicki A, Foulger D & Seror S J (2000) Characterization of PrpC from *Bacillus subtilis*, a member of the PPM phosphatase family. *J Bacteriol* 182: 5634-8.
- Madec E, Laszkiewicz A, Iwanicki A, Obuchowski M & Seror S J (2002) Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Mol Microbiol* 46: 571-86.
- Madec E, Stensballe A, Kjellstrom S, Cladiere L, Obuchowski M, Jensen O N & Seror S J (2003) Mass spectrometry and site-directed mutagenesis identify several autophosphorylated residues required for the activity of PrkC, a Ser/Thr kinase from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 330: 459-72.
- Kennelly P J (2003) Archaeal protein kinases and protein phosphatases: insights from genomics and biochemistry. *Biochem J* 370: 373-89.
- Missiakas D & Raina S (1997) Signal transduction pathways in response to protein misfolding in the extracytoplasmic compartments of *E. coli*: role of two new phosphoprotein phosphatases PrpA and PrpB. *EMBO J* 16: 1670-85.
- Zhuo S, Clemens J C, Stone R L & Dixon J E (1994) Mutational analysis of a Ser/Thr phosphatase. Identification of residues important in phosphoesterase substrate binding and catalysis. *J Biol Chem* 269: 26234-8.
- Shi L, Kehres D G & Maguire M E (2001) The PPP-family protein phosphatases PrpA and PrpB of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium possess distinct biochemical properties. *J Bacteriol* 183: 7053-7.
- Iwanicki A, Herman-Antosiewicz A, Pierechod M, Seror S J & Obuchowski M (2002) PrpE, a PPP protein phosphatase from *Bacillus subtilis* with unusual substrate specificity. *Biochem J* 366: 929-36.
- Barton G J, Cohen P T & Barford D (1994) Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. *Eur J Biochem* 220: 225-37.
- Reiter T A, Reiter N J & Rusnak F (2002) Mn²⁺ is a native metal ion activator for bacteriophage lambda protein phosphatase. *Biochemistry* 41: 15404-9.
- Hu K Y & Saier M H, Jr. (2002) Phylogeny of phosphoryl transfer proteins of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar-transporting phosphotransferase system. *Res Microbiol* 153: 405-15.
- Asanuma N & Hino T (2003) Molecular characterization of HPr and related enzymes, and regulation of HPr phosphorylation in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Arch Microbiol* 179: 205-13.
- Kravanja M, Engelmann R, Dossonnet V, Bluggel M, Meyer H E, Frank R, Galinier A, Deutscher J, Schnell N & Hengstenberg W (1999) The hprK gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol Microbiol* 31: 59-66.
- Monedero V, Poncet S, Mijakovic I, Fioulaine S, Dossonnet V, Martin-Verstraete I, Nessler S & Deutscher J (2001) Mutations lowering the phosphatase activity of HPr kinase/phosphatase switch off carbon metabolism. *EMBO J* 20: 3928-37.
- Steinhauer K, Jepp T, Hillen W & Stulke J (2002) A novel mode of control of *Mycoplasma pneumoniae* HPr kinase/phosphatase activity reflects its parasitic lifestyle. *Microbiology* 148: 3277-84.
- Hanson K G, Steinhauer K, Reizer J, Hillen W & Stulke J (2002) HPr kinase/phosphatase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene and effects of mutations on enzyme activity, growth and carbon catabolite repression. *Microbiology* 148: 1805-11.
- Fioulaine S, Morera S, Poncet S, Monedero V, Gueguen-Chaignon V, Galinier A, Janin J, Deutscher J & Nessler S (2001) X-ray structure of HPr kinase: a bacterial protein kinase with a P-loop nucleotide-binding domain. *EMBO J* 20: 3917-27.
- Allen G S, Steinhauer K, Hillen W, Stulke J & Brennan R G (2003) Crystal structure of HPr kinase/phosphatase from *Mycoplasma pneumoniae*. *J Mol Biol* 326: 1203-17.
- Lavergne J P, Jault J M & Galinier A (2002) Insights into the functioning of *Bacillus subtilis* HPr kinase/phosphatase: affinity for its protein substrates and role of cations and phosphate. *Biochemistry* 41: 6218-25.
- Mijakovic I, Poncet S, Galinier A, Monedero V, Fioulaine S, Janin J, Nessler S, Marquez J A, Scheffzek K, Hasenbein S, Hengstenberg W & Deutscher J (2002) Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr kinase/phosphorylase: a relic of early life? *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13442-7.
- Shi L, Potts M & Kennelly P J (1998) The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. *FEMS Microbiol Rev* 22: 229-53.

34. Vijay K, Brody M S, Fredlund E & Price C W (2000) A PP2C phosphatase containing a PAS domain is required to convey signals of energy stress to the sigmaB transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 35: 180-8.
35. Price C W, Fawcett P, Ceremonie H, Su N, Murphy C K & Youngman P (2001) Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 41: 757-74.
36. King N, Dreesen O, Stragier P, Pogliano K & Losick R (1999) Septation, dephosphorylation, and the activation of sigmaF during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 13: 1156-67.
37. Schroeter R, Schlisio S, Lucet I, Yudkin M & Borriss R (1999) The *Bacillus subtilis* regulator protein SpoIIE shares functional and structural similarities with eukaryotic protein phosphatases 2C. *FEMS Microbiol Lett* 174: 117-23.
38. Akbar S, Gaidenko T A, Kang C M, O'Reilly M, Devine K M & Price C W (2001) New family of regulators in the environmental signaling pathway which activates the general stress transcription factor sigma(B) of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183: 1329-38.
39. Brody M S, Vijay K & Price C W (2001) Catalytic function of an alpha/beta hydrolase is required for energy stress activation of the sigma(B) transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183: 6422-8.
40. Alper S, Dufour A, Garsin D A, Duncan L & Losick R (1996) Role of adenosine nucleotides in the regulation of a stress-response transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 260: 165-77.
41. Chen C C, Lewis R J, Harris R, Yudkin M D & Delumeau O (2003) A supramolecular complex in the environmental stress signalling pathway of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 49: 1657-69.
42. Yang X, Kang C M, Brody M S & Price C W (1996) Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. *Genes Dev* 10: 2265-75.
43. Scott J M, Ju J, Mitchell T & Haldenwang W G (2000) The *Bacillus subtilis* GTP binding protein obg and regulators of the sigma(B) stress response transcription factor cofractionate with ribosomes. *J Bacteriol* 182: 2771-7.
44. Mendez M B, Orsaria L M, Philippe V, Pedrido M E & Grau R R (2004) Novel roles of the master transcription factors Spo0A and sigmaB for survival and sporulation of *Bacillus subtilis* at low growth temperature. *J Bacteriol* 186: 989-1000.
45. Voelker U, Dufour A & Haldenwang W G (1995) The *Bacillus subtilis* rsbU gene product is necessary for RsbX-dependent regulation of sigma B. *J Bacteriol* 177: 114-22.
46. Voelker U, Luo T, Smirnova N & Haldenwang W (1997) Stress activation of *Bacillus subtilis* sigma B can occur in the absence of the sigma B negative regulator RsbX. *J Bacteriol* 179: 1980-4.
47. Smirnova N, Scott J, Voelker U & Haldenwang W G (1998) Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* sigB operon mutations that suppress the loss of the negative regulator RsbX. *J Bacteriol* 180: 3671-80.
48. Scott J M, Mitchell T & Haldenwang W G (2000) Stress triggers a process that limits activation of the *Bacillus subtilis* stress transcription factor sigma(B). *J Bacteriol* 182: 1452-6.
49. Wise A A & Price C W (1995) Four additional genes in the sigB operon of *Bacillus subtilis* that control activity of the general stress factor sigma B in response to environmental signals. *J Bacteriol* 177: 123-33.
50. Dufour A, Voelker U, Voelker A & Haldenwang W G (1996) Relative levels and fractionation properties of *Bacillus subtilis* sigma(B) and its regulators during balanced growth and stress. *J Bacteriol* 178: 3701-9 sigma.
51. Kang C M, Vijay K & Price C W (1998) Serine kinase activity of a *Bacillus subtilis* switch protein is required to transduce environmental stress signals but not to activate its target PP2C phosphatase. *Mol Microbiol* 30: 189-96.
52. Voelker U, Voelker A, Maul B, Hecker M, Dufour A & Haldenwang W G (1995) Separate mechanisms activate sigma B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J Bacteriol* 177: 3771-80.
53. Delumeau O, Dutta S, Brigulla M, Kuhnke G, Hardwick S W, Volker U, Yudkin M D & Lewis R J (2004) Functional and Structural Characterization of RsbU, a Stress Signaling Protein Phosphatase 2C. *J Biol Chem* 279: 40927-37.
54. Taylor B L & Zhulin I B (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 479-506.
55. Hotelier T, Renault L, Cousin X, Negre V, Marchot P & Chatonnet A (2004) ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic Acids Res* 32 Database issue: D145-7.
56. Sonenshein A L (2000) Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* 3: 561-6.
57. Jiang M, Shao W, Perego M & Hoch J A (2000) Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 38: 535-42.
58. Hoch J A (1998) Initiation of bacterial development. *Curr Opin Microbiol* 1: 170-4.
59. Perego M & Brannigan J A (2001) Pentapeptide regulation of aspartyl-phosphate phosphatases. *Peptides* 22: 1541-7.
60. Perego M (1998) Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis* development. *Trends Microbiol* 6: 366-70.
61. Helmann J D (1999) Anti-sigma factors. *Curr Opin Microbiol* 2: 135-41.
62. Barak I, Behari J, Olmedo G, Guzman P, Brown D P, Castro E, Walker D, Westpheling J & Youngman P (1996) Structure and function of the *Bacillus SpoIIE* protein and its localization to sites of sporulation septum assembly. *Mol Microbiol* 19: 1047-60.
63. Adler E, Donella-Deana A, Arigoni F, Pinna L A & Stragler P (1997) Structural relationship between a bacterial developmental protein and eukaryotic PP2C protein phosphatases. *Mol Microbiol* 23: 57-62.
64. Barak I & Youngman P (1996) SpoIIE mutants of *Bacillus subtilis* comprise two distinct phenotypic classes consistent with a dual functional role for the SpoIIE protein. *J Bacteriol* 178: 4984-9.
65. Lucet I, Feucht A, Yudkin M D & Errington J (2000) Direct interaction between the cell division protein FtsZ and the cell differentiation protein SpoIIE. *EMBO J* 19: 1467-75.
66. Magnin T, Lord M, Errington J & Yudkin M D (1996) Establishing differential gene expression in sporulating *Bacillus subtilis*: phosphorylation of SpoIIAA (anti-anti-sigmaF) alters its conformation and prevents formation of a SpoIIAA/SpoIIAB/ADP complex. *Mol Microbiol* 19: 901-7.
67. Pogliano K, Hofmeister A E & Losick R (1997) Disappearance of the sigma E transcription factor from the forespore and the SpoIIE phosphatase from the mother cell contributes to establishment of cell-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 179: 3331-41.
68. Feucht A, Daniel R A & Errington J (1999) Characterization of a morphological checkpoint coupling cell-specific transcription to septation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 33: 1015-26.
69. Feucht A, Abbotts L & Errington J (2002) The cell differentiation protein SpoIIE contains a regulatory site that controls its phosphatase activity in response to asymmetric septation. *Mol Microbiol* 45: 1119-30.
70. Lucet I, Borriss R & Yudkin M D (1999) Purification, kinetic properties, and intracellular concentration of SpoIIE, an integral membrane protein that regulates sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181: 3242-5.
71. Lee C S, Lucet I & Yudkin M D (2000) Fate of the SpoIIAB*-ADP liberated after SpoIIAB phosphorylates SpoIIAA of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 182: 6250-3.
72. Clarkson J, Campbell I D & Yudkin M D (2001) NMR studies of the interactions of SpoIIAA with its partner proteins that regulate sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 314: 359-64.
73. Seavers P R, Lewis R J, Brannigan J A, Verschueren K H, Murshudov G N & Wilkinson A J (2001) Structure of the *Bacillus* cell fate

- determinant SpoIIAA in phosphorylated and unphosphorylated forms. *Structure (Camb)* 9: 605-14.
74. Hilbert D W & Piggot P J (2003) Novel spoIIIE mutation that causes uncompartimentalized sigmaF activation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 185: 1590-8.
 75. Arabolaza A L, Nakamura A, Pedrido M E, Martelotto L, Orsaria L & Grau R R (2003) Characterization of a novel inhibitory feedback of the anti-anti-sigma SpoIIAA on Spo0A activation during development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 47: 1251-63.
 76. Bruckner R & Titgemeyer F (2002) Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization FEMS. *Microbiol Lett* 209: 141-8.
 77. Titgemeyer F & Hillen W (2002) Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 59-71.
 78. Stulke J & Hillen W (2000) Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol* 54: 849-80.
 79. Reizer J, Hoischen C, Titgemeyer F, Rivolta C, Rabus R, Stulke J, Karamata D, Saier M H, Jr. & Hillen W (1998) A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol Microbiol* 27: 1157-69.
 80. Reizer J, Bachem S, Reizer A, Arnaud M, Saier M H, Jr. & Stulke J (1999) Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 145: 3419-29.
 81. Huynh P L, Jankovic I, Schnell N F & Bruckner R (2000) Characterization of an HPr kinase mutant of *Staphylococcus xylosum*. *J Bacteriol* 182: 1895-902.
 82. Shafikhani S H, Nunez E & Leighton T (2004) Hpr (ScoC) and the phosphorelay couple cell cycle and sporulation in *Bacillus subtilis* FEMS. *Microbiol Lett* 231: 99-110.
 83. Saier M H, Jr., Chauvaux S, Cook G M, Deutscher J, Paulsen I T, Reizer J & Ye J J (1996) Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria. *Microbiology* 142 (Pt 2): 217-30.
 84. Jault J M, Fieulaine S, Nessler S, Gonzalo P, Di Pietro A, Deutscher J & Galinier A (2000) The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J Biol Chem* 275: 1773-80.
 85. Ramstrom H, Sanglier S, Leize-Wagner E, Philippe C, Van Dorsselaer A & Haiech J (2003) Properties and regulation of the bifunctional enzyme HPr kinase/phosphatase in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 278: 1174-85.
 86. Pompeo F, Granet Y, Lavergne J P, Grangeasse C, Nessler S, Jault J M & Galinier A (2003) Regulation and mutational analysis of the HPr kinase/phosphorylase from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 42: 6762-71.
 87. Knobloch J K, Bartscht K, Sabottke A, Rohde H, Feucht H H & Mack D (2001) Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J Bacteriol* 183: 2624-33.
 88. Sard L, Accornero P, Tornielli S, Delia D, Bunone G, Campiglio M, Colombo M P, Gramegna M, Croce C M, Pierotti M A & Sozzi G (1999) The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8489-92.
 89. Vartanian A, Alexandrov I, Prudowski I, McLennan A & Kisselev L (1999) Ap4A induces apoptosis in human cultured cells. *FEBS Lett* 456: 175-80.
 90. Nishimura A (1998) The timing of cell division: Ap4A as a signal. *Trends Biochem Sci* 23: 157-9.

Serine-threonine protein phosphatases from *Bacillus subtilis*

Michał Obuchowski[✉]

Medical University of Gdansk, Intercollegiate Faculty of Biotechnology UG-AMG, Department of Cell Biology, 1 Debinki St., 80-811 Gdansk, Poland
 ✉ e-mail: obuchowk@biotech.univ.gda.pl

Key words: *Bacillus subtilis*, protein phosphatase, general stress response, sporulation, sugar transport

ABSTRACT

Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis* possesses six eukaryotic-like serine-threonine protein phosphatases. These enzymes play an important role in the cell. The response to environmental or nutritional stress conditions are controlled by three Rsb phosphatases: RsbX, RsbU and RsbP. Phosphatases are also involved in endospore formation process (SpoIIIE) and sugar transport (kinase/phosphatase Hpr). Moreover in the cell there are phosphatases with still unknown function (PrpC and PrpE). Cellular processes, presented here are regulated by serine/threonine protein phosphatases and very important for bacterial survival in natural environment. Protein phosphatases must act in cooperation with protein kinases and deserve the same attention as kinases.

Kongres Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych Warszawa 2004



Jolanta Barańska,
Adam Szewczyk

ZARZĄD GŁÓWNY
POLSKIEGO TOWARZYSTWA
BIOCHEMICZNEGO
UL. LUDWIKA PASTEURA 3,
02-093 WARSZAWA
E-MAIL: ptbioch@nencki.gov.pl
TELEFON: (22) 658 20 99

W dniach od 26 czerwca do 1 lipca 2004 roku odbył się w Warszawie dwudziesty dziewiąty kongres Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (29th Congress of the Federation of European Biochemical Societies). Był to już drugi kongres FEBS, który miał miejsce w Warszawie. Pierwszy został zorganizowany w 1966 roku. Kongres w roku 2004 miał charakter specjalny, został on zorganizowany w czterdziestą rocznicę utworzenia Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych. Odbył się pod patronatem Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej Aleksandra Kwaśniewskiego, w zupełnie innych warunkach społeczno-politycznych niż w 1966 roku. Tym razem towarzyszyło mu niedawne przyjęcie Polski do Unii Europejskiej. Dlatego też atmosfera panująca w czasie kongresu miała w sobie coś ze święta i spełnienia od dawna



Fot. 1. Ceremonia otwarcia kongresu FEBS 2004 w Pałacu Kultury i Nauki w Warszawie. Od lewej: profesorowie Dawid Shugar, Kurt Wüthrich (laureat Nagrody Nobla), Piotr Węgleński (rektor Uniwersytetu Warszawskiego) i Włodzimierz Ostoja-Zagórski (przewodniczący Komitetu Naukowego Kongresu FEBS 2004).



Fot. 2. Skarbnik FEBS, profesor Iain Mowbray (pierwszy od prawej) na ceremonii otwarcia Kongresu FEBS 2004 w Pałacu Kultury i Nauki.

oczekiwanego powrotu naszego kraju do rodziny krajów europejskich.



Fot. 3. Obrady w centrum kongresowym „Gromada”. Od lewej: prof. Jolanta Barańska (przewodnicząca komitetu organizacyjnego) oraz prof. Julio Celis (sekretarz generalny FEBS).

Ceremonia otwarcia kongresu miała miejsce w Sali Kongresowej Pałacu Kultury i Nauki w Warszawie (Fot. 1 i 2). Po wystąpieniach honorowych gości, m.in. sekretarza generalnego FEBS, prof. Julio Celisa (Fot. 3), oraz prezesa Polskiej Akademii Nauk, prof. Andrzeja Legockiego (Fot. 4), zebrani wysłuchali wykładu inauguracyjnego pod tytułem “NMR views of soluble proteins and membrane proteins” (Datta Lecture), wygłoszonego przez laureata nagrody im. Alfreda Nobla, prof. Kurta

Wüthricha ze Szwajcarii. Po wykładzie wszyscy obecni uczestniczyli w porywającym koncercie polskiego wypróbowanego „produktu eksportowego”, zespołu „Mazowsze”.



Fot. 4. Pomiędzy wykładami. Od lewej: profesorowie Jan Barciszewski, Andrzej Legocki (prezes Polskiej Akademii Nauk) oraz Aleksander Włodawer.

W kongresie FEBS 2004 uczestniczyło ponad dwa tysiące naukowców, pochodzących z pięćdziesięciu krajów. Wykłady wygłosiło dwustu pięćdziesięciu sześciu wykładowców z trzydziestu dwóch krajów (Fot. 5 i 6). Wykłady zgrupowano w sześć sympozjów („DNA realm”, „RNA world”, „Proteins and peptides in work”, „Cell biochemistry”, „Biosphere and biochemistry” oraz „Towards a healthier life”) i trzydzieści pięć sesji naukowych. Wykłady sympozjalne były poprzedzone sześcioma wykładami plenarnymi.



Fot. 5. Przerwa na kawę w trakcie obrad kongresu. Od lewej: profesorowie Jerzy Duszyński (vice-przewodniczący komitetu naukowego kongresu FEBS 2004, dyrektor Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN), Lech Wojtczak i Ernesto Carafoli.



Fot. 6. Wykłady w czasie Kongresu FEBS 2004: w centrum prof. Andrzej Dzuga.

Oprócz wspomnianego wykładu prof. Wüthricha, wygłosili je profesorowie Ryszard Gryglewski („Pharmacology of vascular endothelium” - Sir Hans Krebs Lecture; Fot. 7), Iain Mattaj („The



Fot. 7. Rozmowa naukowa prof. Ryszarda Gryglewskiego (od prawej - prezentującego w czasie kongresu FEBS 2004 Hans Krebs Lecture) z prof. Stefanem Chłopcikiem (wykładowcą na kongresie).

Ran GTPase as a signal of chromosome position” - EMBO Lecture), Peter Sonderegger („Extracellular proteolysis at the synapse: regulatory roles in synaptic structure, function and plasticity” - IUMB Lecture), Claudina Rodrigues-Pousada („Yeast activator proteins and stress response: an overview” - PABMB Lecture) oraz Rosario Rizutto („Calcium signaling in apoptosis” - Theodor Bücher Lecture). Odbyły się także sesje, w których wystąpili: laureat nagrody „FEBS Letters Young Scientist Award” (dr J.-O. Lee) oraz laureat nagrody im. Jakuba Karola Parnasa (prof. Grzegorz Węgrzyn). Profesorowie Isabelle Mansuy i Anthony Hannan otrzymali „FEBS Special Anniversary Prize”.

Kongresowi towarzyszyły również sesje specjalne, otwarte dla szerokiej publiczności, takie na przykład jak „Problem based learning”, „Science and society - the use of stem cells in research and future medical practice” lub „FEBS/ELS meeting on the European Research Council”. W czasie kongresu przedstawiono także dziewięćset sześć

plakatów zjazdowych z czterdziestu siedmiu krajów.

Władze FEBS i Polskiego Towarzystwa Biochemicznego włożyły wiele trudu, aby zachęcić naukowców z Europy Wschodniej do przyjazdu do Polski. Na przykład, czterdziestu dwóm osobom z tej części świata FEBS ufundował stypendia. Opisane wysiłki sprawiły, że naukowcy z Europy Wschodniej, włączając polskich, stanowili sześćdziesiąt procent wszystkich uczestników kongresu w Warszawie. Na podkreślenie zasługuje także fakt, że naukowcy z niektórych krajów, na przykład z Bułgarii, Estonii, Słowacji, Łotwy, Ukrainy i Portugalii, po raz pierwszy w historii organizacji kongresów FEBS byli zaproszeni jako wykładowcy; wystarczy wspomnieć, że dwadzieścia trzy procent wszystkich wykładowców stanowili wykładowcy z Europy Wschodniej lub Centralnej. W poprzednich latach udział ten wynosił od ułamka do trzech procent. Inną nowością i ułatwieniem finansowym dla uczestników było szerokie otwarcie kongresu na polskie środowisko naukowe i umożliwienie pobytu na kongresie studentom, na podstawie dziennej przepustki, bez konieczności wnoszenia opłaty rejestracyjnej.

Forum Młodych Naukowców (FYS) odbyło się jak zwykle w terminie poprzedzającym kongres. Forum Młodych w Warszawie było zorganizowane przez dr Rafała Czajkowskiego z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN oraz Edytę Brzódkę z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.



Fot. 8. Koncert muzyki Fryderyka Chopina w Łazienkach Królewskich, zorganizowany specjalnie dla uczestników kongresu FEBS.



Fot. 9. Po koncercie w Łazienkach Królewskich: od prawej prof. Adam Szewczyk, prof. Jolanta Barańska i prof. Aleksander Włodawer.

Kongresowi towarzyszyły także liczne wydarzenia kulturalne, między innymi koncert muzyki Fryderyka Chopina w Parku Łazienkowskim, który został entuzjastycznie przyjęty przez uczestników kongresu (Fot. 8 i 9).

Sukces naukowy i organizacyjny kongresu stał się możliwy dzięki niezwyklej ofiarności i pracowitości wielu ludzi. Dwuletnia praca komitetu organizacyjnego kongresu zaowocowała organizacją spotkania, które w ocenie wielu uczestników było najlepszym kongresem FEBS w ostatnich latach. Wspaniali wykładowcy i ożywione dyskusje to jeden z elementów tego sukcesu, drugi to zaangażowanie i serce wielu wolontariuszy - studentów, magistrantów oraz doktorantów warszawskich uczelni oraz instytutów Polskiej Akademii Nauk (Fot. 10). Można z dużą dozą prawdopodobieństwa przypuścić, że wśród nich będą przyszli organizatorzy wielkich kongresów biochemicznych w Polsce.

W czasie trwania kongresu odbyły się wystawy sprzętu laboratoryjnego, aparatury badawczej oraz wydawnictw naukowych prezentowane przez trzydziestu dziewięciu wystawców (Fot. 11). Dodatkowo wystawcy ci zor-



Fot. 10. Niektórzy wolontariusze kongresu FEBS 2004.



Fot. 11. Stoisko Blackwell Publishing w czasie wystaw towarzyszących kongresowi FEBS w Warszawie.

organizowali seminaria oraz wykłady. W czasie kongresu przygotowano dla uczestników bezpłatny dostęp do Internetu oraz punkty dostępu bezprzewodowego (tzw. hot-spots). Informacje o kongresie były dostępne na domenie internetowej www.febs2004.pl, gdzie opublikowano informacje między innymi o programie naukowym, komitetach naukowym i organizacyjnym, zasadach przygotowania doniesień zjazdowych, o sponsorach i wystawach firm. Zanotowano ponad sto dwadzieścia tysięcy „odwiedzin” tej strony.

Komunikaty zjazdowe ukazały się w wydawnictwie Blackwell w czasopiśmie *European Journal of Biochemistry* (tom 271, dodatek 1, 2004). Są one również dostępne na stronie internetowej <http://www.blackwellpublishing.com/febsabstracts2004/>. Niektóre z wykładów zostały opublikowane w formie artykułów w czasopiśmie *FEBS Letters* (tom 567, numer 1, 2004). Są one bezpłatnie dostępne na stronie internetowej wydawcy <http://www.febsletters.org/>. Polskie Towarzystwo Biochemiczne przygotowało także specjalne wydanie kwartalnika *Acta Biochimica Polonica* (tom 51, numer 2, 2004) zawierające doniesienia zjazdowe niektórych wykładawców oraz uczestników kongresu, bezpłatnie dostępne pod adresem: http://www.actabp.pl/2_2004.html.

Patronat medialny nad kongresem objęły dziennik *Rzeczpospolita*, *Polish & Eastern Europe Biotechnology and Biobusiness News*, *Wiedza i Życie*, *Polityka*, *Laboratorium Przegląd Ogólnopolski „ELAMED”* oraz *The Warsaw Voice*. Wiele informacji o kongresie ukazało się w serwisie internetowym PAP „Nauka w Polsce”: <http://www.nauka.waw.pl/>.



Fot. 12. Israel Pecht, przewodniczący FEBS

nauka.pap.pl/cgi-bin/index.plb. Komitet organizacyjny przygotował także album (w postaci płyty CD) zawierający pięćset zdjęć dokumentujących wydarzenia kongresu.

Dwudziesty dziewiąty kongres Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych w Warszawie został wysoko oceniony przez uczestników, zarówno pod względem merytorycznym, jak i organizacyjnym. Został on także wysoko oceniony przez władze Europejskiej Federacji Towarzystw Biochemicznych (Fot. 12) w czasie ostatniego zebrania komitetu wykonawczego FEBS, w grudniu 2004 roku. Należy dodać, że kongres zakończył się dodatnim bilansem finansowym. Zaakceptowany, przez władze FEBS, raport komitetu organizacyjnego kongresu jest dostępny w siedzibie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Warszawie. Zgodnie z wytycznymi FEBS oraz zarządu głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego uzyskane fundusze będą wykorzystane na opłacenie wpisowego członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego na kolejny kongres FEBS, który odbędzie się w 2005 roku w Budapeszcie.



Fot. 13. Kongresowi towarzyszyły wystawy aparatury naukowej. Od lewej: dr Aleksander Jankowski, prezes Sigma-Aldrich, prof. Andrzej Rabaczko, skarbnik kongresu FEBS 2004, i prof. Adam Szewczyk, sekretarz komitetu organizacyjnego kongresu.

Do sukcesu kongresu przyczynili się w wydatny sposób jego sponsorzy - Ministerstwo Nauki i Informatyzacji oraz Sieć Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN. Na odnotowanie zasługuje również pomoc organizacyjno-finansowa ze strony różnych firm, szczególnie Sigma-Aldrich, Bio-Rad, Millipore oraz Olympus (Fot. 13). Dzięki wsparciu organizacyjnemu dwóch Instytutów Polskiej Akademii Nauk: Instytutu Biochemii i Biofizyki oraz Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, komitet organizacyjny miał pewny i wiarygodny „dach nad głową”.

Komitet organizacyjny kongresu FEBS stanowili prof. Jolanta Barańska (przewodnicząca), prof. Liliana Ko-



Fot. 14. Zakończenie kongresu FEBS 2004. Od lewej: prof. Liliana Konarska (vice-przewodnicząca komitetu organizacyjnego kongresu FEBS 2004) oraz prof. Włodzimierz Ostoja-Zagórski (dyrektor Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN).

narska (vice-przewodnicząca - Fot. 14), prof. Adam Szewczyk (sekretarz), prof. Andrzej Rabaczko (skarbnik) oraz prof. Edward Bańkowski, prof. Jan Barciszewski, dr Anna Dygas, prof. Andrzej Dżugaj, prof. Wirginia Janiszowska, prof. Teresa Jakubowicz, prof. Michał Komoszyński, dr Paweł Pomorski, prof. Michał Woźniak i dr Barbara Zabłocka. Program naukowy kongresu został przygotowany przez komitet naukowy, któremu przewodniczył prof. Włodzimierz Zagórski-Ostojka (dyrektor Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN - Fot. 14), a jego zastępcą był prof. Jerzy Duszyński (dyrektor Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN).

Fotografie: Komitet Organizacyjny oraz Piotr Bednarczyk, Renata Hordejuk, Jolanta Skalska i Antoni Wrzosek.



Polsko-ukraińskie konferencje im. Jakuba Karola Parnasa mają już długą tradycję. Pierwsza odbyła się w 1996 roku we Lwowie i była połączona z wmurowaniem tablicy pamiątkowej ku czci profesora Parnasa w ścianie gmachu dawnego Wydziału Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu Jana Kazimierza, w którym profesor Parnas pracował przez cały okres międzywojenny. W trakcie pierwszego spotkania w 1996 roku ustalono, że wspólnie organizowane konferencje będą odbywać się raz na dwa lata, naprzemiennie w Polsce i na Ukrainie. Druga konfe-

rencja została zorganizowana w Gdańsku w 1998 roku, trzecia znowu we Lwowie w 2000 roku, a czwarta w 2002 roku we Wrocławiu. Ponieważ w 2004 roku odbył się w Warszawie kongres Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych, zdecydowano by piąta konferencja im. J. K. Parnasa odbyła się w 2005 roku w Kijowie. Termin tej Konferencji strona ukraińska ustaliła na 26 - 29 kwietnia.

Szczegółowe informacje można znaleźć na stronie internetowej: <http://www.bioinfo.kiev.ua/parnas/>

prof. dr hab. Jolanta Barańska
prezes Polskiego Towarzystwa
Biochemicznego

Doroczny - XL Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, odbędzie się w Lublinie w dniach 19-23 września 2005 roku. W programie Zjazdu zaplanowano jedenaście sesji tematycznych: „Struktura i funkcja genów i genomów”, „Kwasy nukleinowe”, „Struktura a funkcja białek”, „Rola biologiczna fosforylacji białek”, „Receptory i mechanizmy transmisji sygnałów w komórkach”, „Starzenie i różnicowanie się komórek”, „Biochemia kliniczna”, „Diagnostyka molekularna i leczenie nowotworów”, „Biochemia żywności i żywienia”, „Dydaktyka biochemii, biologii molekularnej i biotechnologii”, „Doniesienia różne”. Podczas Zjazdu wygłoszonych zostanie około stu wykładów prezentowanych przez polskich naukowców oraz gości zagranicznych. Zachęcamy do udziału młodych pracowników naukowych, którzy będą mieli okazję przedstawienia swoich osiągnięć badawczych. Jednocześnie informujemy, że podczas trwania Zjazdu, w dniu 21 września, odbędzie się XVIII Walne Zebranie członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Informacje dotyczące rejestracji, rezerwacji hoteli, przygotowywania streszczeń komunikatów zjazdowych oraz imprez towarzyszących można znaleźć na naszej stronie internetowej: <http://www.umcs.lublin.pl/ptb2005>

prof. dr hab. Teresa Jakubowicz
Przewodnicząca Komitetu
Organizacyjnego

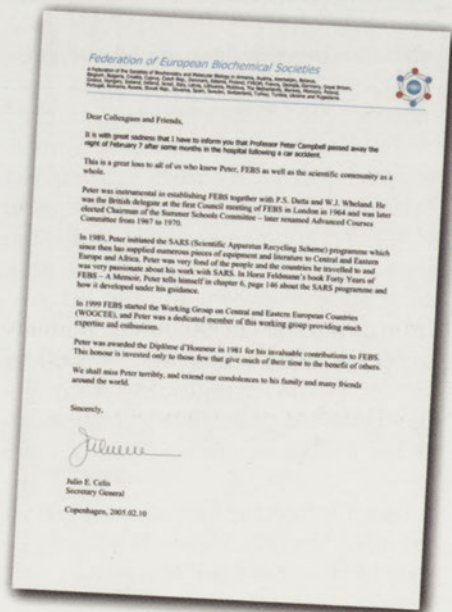
Profesor Peter Campbell nie żyje

Polska społeczność biochemiczna żegna z żalem profesora Petera Campbella, bardzo znaną postać w Polsce. Profesor Campbell stworzył i rozpoczął działalność SARS (Scientific Apparatus Recycling Scheme) w 1989 roku, kiedy rozpoczynała się polityczna transformacja w naszym kraju i nasze zasoby aparaturowe oraz dostęp do literatury naukowej były bardzo ograniczone. Dzięki wysiłkom profesora Campbella przez kilka kolejnych lat dostawaliśmy

aparaturę naukową, którą rozproszaliśmy po różnych, najbardziej potrzebujących polskich laboratoriach, a literaturę po bibliotekach.

Profesor Peter Campbell pozostanie na zawsze w naszej wdzięcznej pamięci.

prof. dr hab. Jolanta Barańska
prezes Polskiego Towarzystwa
Biochemicznego



Wskazówki dla Autorów

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

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

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

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

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

Każdy z Autorów otrzymuje jeden egzemplarz numeru „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 Re-

dakcji. 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 cytowanie co najwyżej 70 publikacji, w większości pochodzących z ostatnich 10 lat. Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania. W tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9-26]. Sposób cytowania prac oryginalnych (1) i przeglądowych (2), książek (3), rozdziałów z książek jednotomowych (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych

przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady:

1. Jiang QX, Wang 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 Ca²⁺-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 przysyłać w osobnych plikach.

Prace w formie elektronicznej prosimy przysyłać na adres:

postepy@nencki.gov.pl

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

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

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

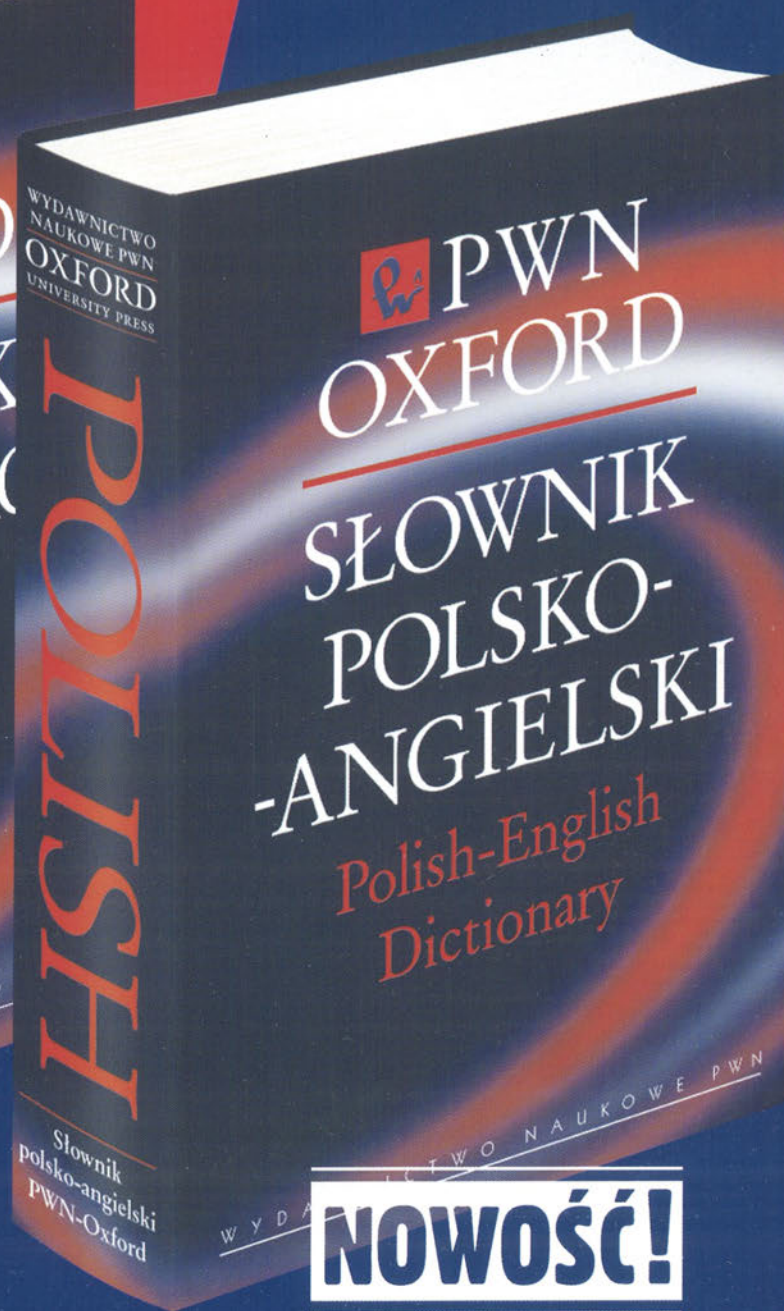
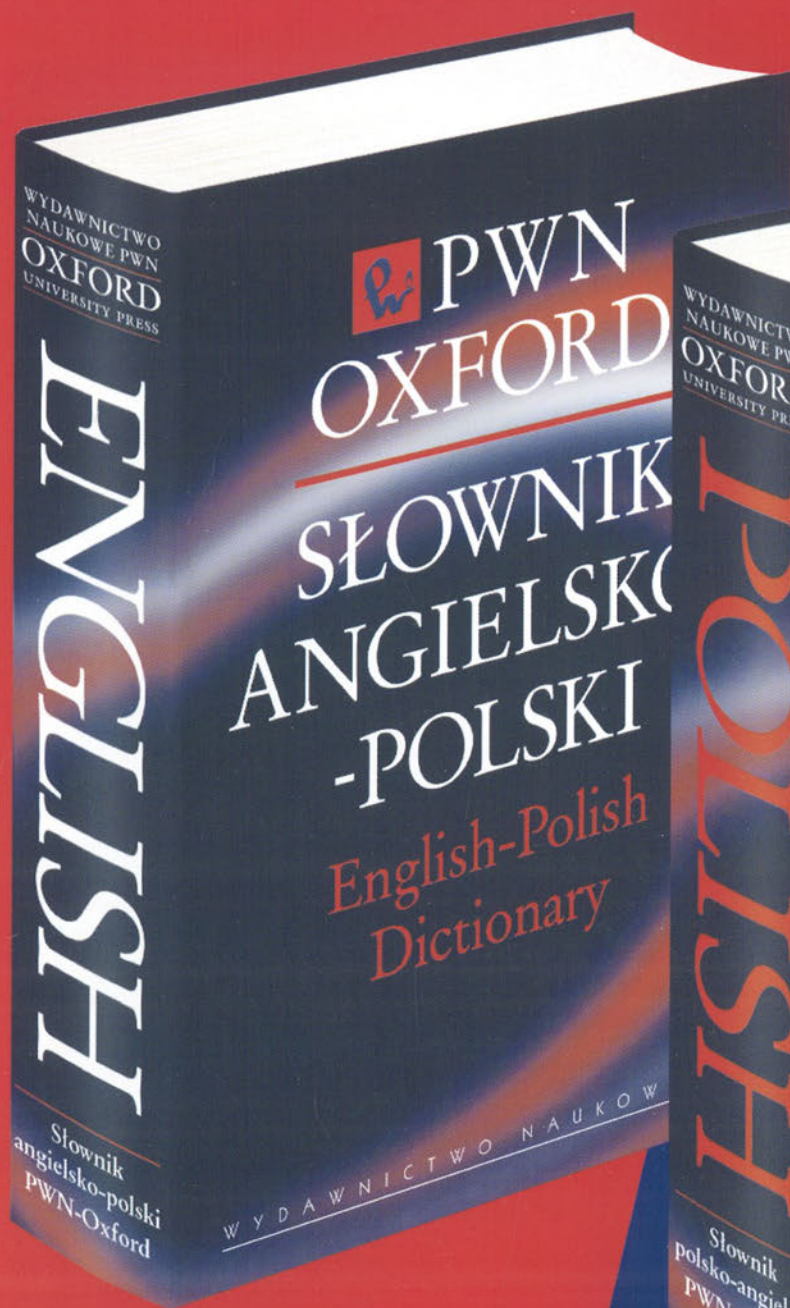
Składki członkowskie Towarzystwa i należności za prenumeratę kwartalnika „Postępy Biochemii” prosimy wpłacać na konto:

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



NOWOŚĆ!

 **PWN
OXFORD**

Słownik angielsko-polski Słownik polsko-angielski

600 000 angielskich i polskich znaczeń, typowych połączeń wyrazowych, fraz i idiomów zaczerpniętych ze wszystkich odmian języka!

komplet z płytą CD!

Zamów przez telefon: 0 801 33 33 88 (0,35 zł za 3 minuty) • Zamów przez Internet: www.pwn.pl

Biology of the *Cell*

Editor-in-Chief: H. Beverley Osborne

Submit your next paper to *Biology of the Cell*
<http://www.BiolCell.org/submit/>

Biology of the Cell offers authors:

- Immediate publication
– papers published online as soon as they are accepted
- Online submission and peer review
- PDF proofs
- No page charges
- Free multimedia
– enhance your paper with animations, movies or 3D
- 25 free offprints
- Increased frequency
– now 12 issues per year
- New improved layout
- International editorial board
- UK, France and US editorial offices

For Instructions to authors or further information visit:

www.BiolCell.org

Contact: Biology of the Cell | Third Floor, Eagle House,
16 Procter Street, London | WC1V 6NX, UK
Tel: +44 (0)20 7280 4110 | Fax: +44 (0)20 7280 4169
Email: editorial@portlandpress.com

Now published by Portland Press on behalf of the Société de Biologie Cellulaire de France
and the Société Française des Microscopies

<http://rcin.org.pl>



ZPPA2427

Image courtesy of Jan Ellenberg, EMBL, Heidelberg