

P939

# POSTĘPY BIOCHEMII

13106

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
WARSZAWA 2005  
TOM 51  
NUMER 4

## 50 lat Postępów Biochemii

Błona plazmatyczna – porządek czy chaos?  
Kalretikulina – białko opiekuńcze  
Aromataza w syntezie estrogenów

Białka jak góry lodowe  
w morzu lipidów



PL ISSN 0032-5422  
Indeksowane w Medline /PubMed  
[www.postepybiochemii.pl](http://www.postepybiochemii.pl)

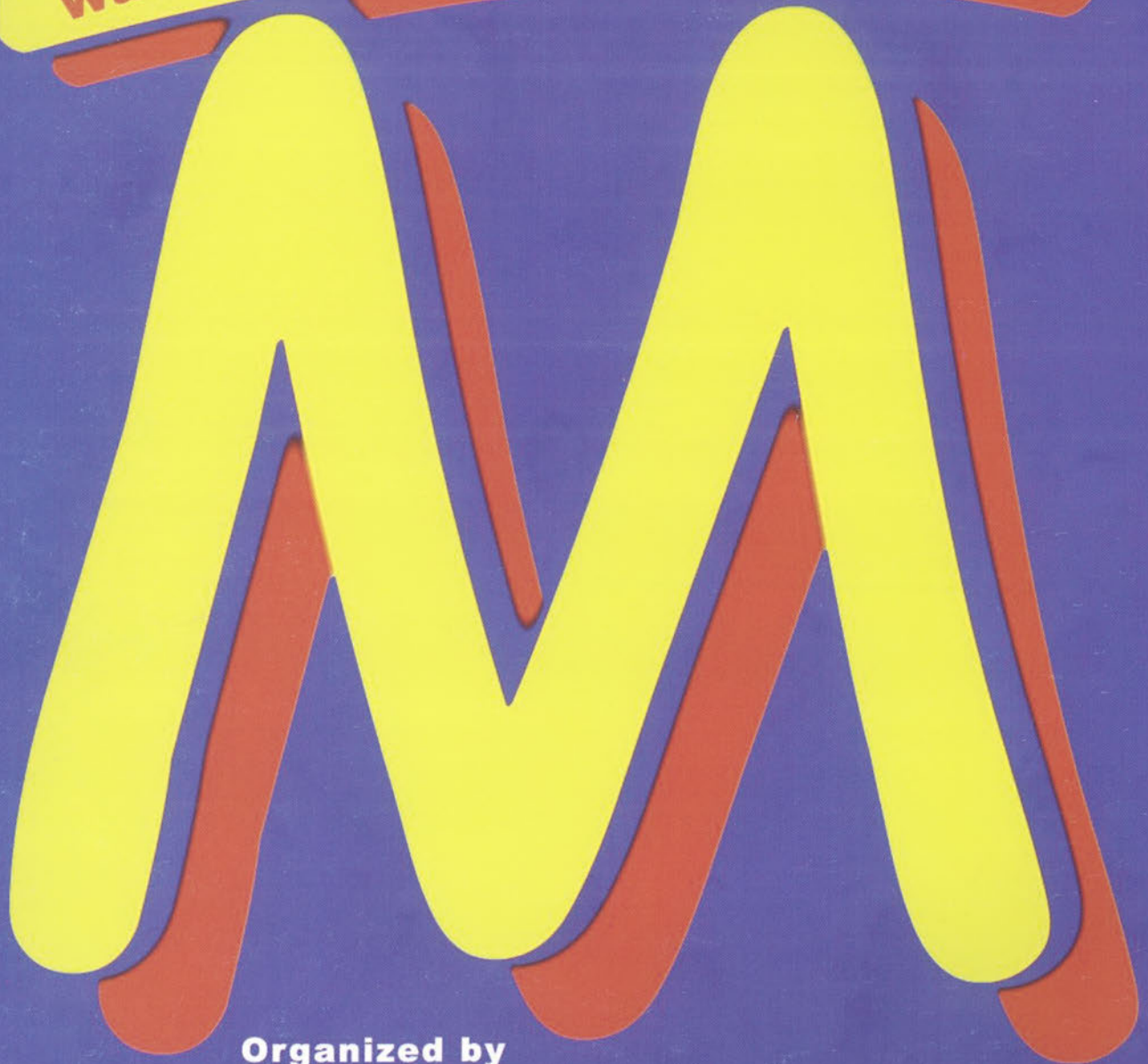
<http://rcin.org.pl>

FEBS Practical Course



# Frontiers in Molecular Biochemistry of Mitochondria

Warsaw, Poland, June 9-17, 2006



Organized by  
Adam Szewczyk and Jerzy Duszyński



More info:

<http://rcin.org.pl>  
[a.szewczyk@nencki.gov.pl](mailto:a.szewczyk@nencki.gov.pl)



W NASTĘPNYM NUMERZE:

**NASI ZA GRANICĄ**

**Tripeptydylo-peptydaza I – występowanie, biogeneza i mechanizmy aktywacji**

Adam A. Gołąbek

**ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE**

**Rola polo-kinaz(y) w regulacji i koordynacji cyklu komórkowego. Mechanizm translokacji i tworzenia kompleksów białkowych**

Janina Kaczanowska, Dominika Piwońska, Andrzej Kaczanowski

**Replikacja DNA bakteriofaga λ: nowe odkrycia dokonane przy użyciu starego modelu badawczego**

Grzegorz Węgrzyn, Alicja Węgrzyn

**Koniugaty transferyny – nadzieja w walce z nowotworami**

Dorota Łubgan, Agnieszka Marczak, Luitpold Distel, Zofia Józwiak

**Rysunek na okładce:**

Front cover image "Iceberg – photomontage of what a whole iceberg might look like under water" by professor Uwe Kils (Gal-  
loway, NJ, USA) with permission; <http://mywebpages.comcast.net/kils/iceberg/>.

**MAPA POLSKIEJ BIOCHEMII**

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie – instytut planowo nietypowy 353

**POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE**

Nowe władze Polskiego Towarzystwa Biochemicznego 357

Sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego XVII kadencji (2001–2005) 358

Sprawozdanie z XL Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Lublin, 19–23 września 2005 r. 370

**WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE**

Dział krajowy 371

80-lecie urodzin Profesora Mieczysława Chorążego 376

Sprawozdanie z Letniego Kursu Hodowli Komórek Zwierzęcych dla zaawansowanych 377

**LISTY DO REDAKCJI**

Mobilność a kariera naukowa po doktoracie 379

**NASI ZA GRANICĄ**

Kalretikulina, białko opiekuńcze regulujące stężenie  $Ca^{2+}$  w siateczce śródplazmatycznej 382

Małgorzata Szperl, Michał Opas

**ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE**

Kompleksowa rola białek niedokrwiłości Fanconiego w utrzymaniu stabilności genomu 387

Katarzyna Kluzek, Małgorzata Z. Zdzienicka

Mechanizm molekularny biotoksyczności homocysteiny – fakty i hipotezy 395

Wojciech Antoni Turski, Edward Bald

Wpływ tlenu azotu na regulację ekspresji inhibitora aktywatorów plazminogenu typu 1 oraz tkankowego aktywatora plazminogenu 407

Katarzyna Oszejka, Janusz Szemraj, Jacek Bartkowiak

Błona plazmatyczna – porządek czy chaos? 414

Grażyna Dąbrowska, Beata Głowacka

Kinazy receptorów sprzężonych z białkami G – ich regulacja i funkcja w komórce 421

Katarzyna Sobierajska, Hanna Fabczak, Stanisław Fabczak

Aromataza – kluczowy enzym biosyntezy estrogenów 430

Ryszard Milczarek, Jerzy Klimek

Białka PPR wiążące kwasy nukleinowe 440

Katarzyna Dorota Raczyńska, Halina Augustyniak

Białka przestrzeni międzybłonowej mitochondriów uczestniczące w procesie apoptozy 447

Jolanta Bednarek, Zofia M. Kiliańska

Periplazmatyczne oksydoreduktazy disiarczkowe bakterii *Escherichia coli* – budowa i funkcja 459

Joanna Skórko-Glonek, Anna Sobiecka

## ADVANCES IN BIOCHEMISTRY VOL. 51, NO. 4, 2005

International Institute of Molecular and Cell Biology in Warsaw	353
Polish Biochemical Society	357
Events/Opinions/Comments	371
Letters to the Editor	379

## REVIEWS

Calreticulin, Ca <sup>2+</sup> -binding chaperon of the endoplasmic reticulum	382
Complex role of the FA proteins in providing genome stability	387
Molecular mechanisms of biotoxicity of homocysteine – facts and hypotheses	395
The influence of nitric oxide on the regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 and tissue-type plasminogen activator expression	407
Plasmalemma – order or chaos?	414
Mechanisms of regulation and function of G-protein coupled receptor kinases	421
Aromatase – key enzyme of estrogen biosynthesis	430
Family of pentatricopeptide repeat proteins	440
Mitochondrial intermembrane space proteins in apoptosis process	447
Periplasmic disulfide oxidoreductases from <i>Escherichia coli</i> – their structure and function	459

## JESZCZE RAZ O ZNACZENIU POLSKIEGO CZASOPISMIENICTWA NAUKOWEGO

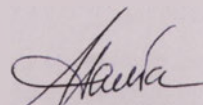
Szanowni Czytelnicy,

Wraz ze skierowaniem czwartego numeru kwartalnika „Postępy Biochemii” do drukarni, w redakcyjnej poczcie pojawił się list od Prezesa Polskiej Akademii Nauk, Pana Profesora Andrzeja B. Legockiego, który w ciepłych słowach wyraża poparcie dla naszego czasopisma i dla nurtu nowoczesnego polskojęzycznego czasopiśmiennictwa naukowego oraz gratuluje nam nowej, atrakcyjniejszej formy edytorskiej i merytorycznej. To bardzo zobowiązujące słowa, za które jesteśmy jako redakcja bardzo wdzięczni. Jesteśmy również niezmiernie dumni z powodu wielu dowodów aprobaty dla działań redakcji „Postępów Biochemii” w 2005 roku, spotykających nas ze strony Czytelników czasopisma i jego Autorów. To jest tym bardziej znamienne, że „Postępy Biochemii” borykają się z niedofinansowaniem, jak zresztą wiele dziedzin naszej rodzimej rzeczywistości i są zmuszone, o czym pisaliśmy, do dramatycznych posunięć finansowych zmierzających do zbilansowania kosztów czasopisma, tak by ukazywało się na czas i w jak najciekawszej formie edytorskiej. Jeśli się nam to dotąd udaje to niewątpliwie zasługa ustępującego zarządu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, przede wszystkim Prezesa Towarzystwa w kadencji 2001–2005, Pani Prof. Jolanty Barańskiej, v-ce Prezesa Pani prof. Liliany Konarskiej, Sekretarza Towarzystwa, Pana prof. Adama Szewczyka i Skarbnika, Pani dr Anny Dygas. To ich codzienna działalność, inspirujące pomysły i ciągłe słowa zachęty mobilizują redakcję do dalszych wysiłków. Redakcja jest przekonana, że nowo wybrane władze Towarzystwa odniosą się do naszego kwartalnika z podobną troską, uznając je za jeden z ważniejszych elementów kilkudziesięcioletniego dorobku naszej organizacji.

Oprócz pytań, czy „Postępy Biochemii” reprezentują wysoki poziom merytoryczny, czy trafiają w zapotrzebowanie jego Czytelników i czy są atrakcyjne, jawi się pytanie podstawowe, które powinniśmy sobie zadać jeszcze raz. Czy „Postępy Biochemii” są potrzebne? Czy kwartalnik w języku polskim publikujący artykuły przeglądowe z biochemii, biologii molekularnej, biologii komórki i nauk pokrewnych, ma rację bytu w dziedzinach zdominowanych przez język angielski, w których istnieją doskonale, o uznanej renomie czasopisma anglojęzyczne, legitymujące się wysokim współczynnikiem przebiecia (ang. *impact factor*)? Redakcja pozostawia to pytanie bez odpowiedzi, licząc na Państwa opinie, które z przyjemnością opublikujemy na łamach kwartalnika – nawet te opinie, a może właśnie te, które będą opowiadały się za likwidacją czasopisma jako przeżytku dawnej epoki. Z tymi ostatnimi opiniami będziemy polemizowali, ale to także te mniej pozytywne oceny stymulują redakcję do zmian i wskazują nam nowe kierunki, w których powinniśmy zmierzać. Jednym z nich jest towarzyszenie bogatemu życiu naukowemu w naszym kraju, czemu dajemy wyraz właśnie w tym numerze „Postępów Biochemii”, poświęcając aż 25% objętości numeru wydarzeniom związanym między innymi ze zjazdem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Lublinie.

Z okazji Świąt i Nowego 2006 Roku chciałbym Państwu złożyć najlepsze życzenia zdrowia, pomyślności oraz wielu sukcesów w życiu osobistym i na niwie zawodowej.

Życzę przyjemnej lektury



Sławomir Piłkuła

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

Redaktor działu krajowego: Teresa Wesolowska; e-mail: redbioch@sci.pam.szczecin.pl, Redaktor działu „Forum Młodych Biochemików”: Grzegorz Bartosz; e-mail: gbartosz@biol.uni.lodz.pl  
Redaktorzy: Joanna Bandorowicz-Pikuła, Jolanta Barańska, Andrzej Dżugaj, Krystyna Grzelak, Lilla Hryniewiecka, Danuta Hulanicka, Andrzej Jerzmanowski, Andrzej Kasprzak, Wanda Kłopocka, Liliana Konarska, Paweł Pomorski, Aleksander F. Sikorski, Anna Szakiel, Adam Szewczyk, Tomasz Twardowski, Marek Zembala, Krzysztof Zabłocki, Alicja Żylicz  
Sekretarz redakcji: Hanna Laskowska; e-mail: h.laskowska@nencki.gov.pl, tel. (022) 5892441; dyżur sekretarza redakcji: poniedziałki, czwartki, godz. 14-16;

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

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

Wydawca: Polskie Towarzystwo Biochemiczne; ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel/fax (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 Agrobibrex. Nakład 850 egz.

# BD LSR II

*Bardziej zmienny niż kiedykolwiek*



- w pełni cyfrowe przetwarzanie sygnałów
- BD Octagon® i BD Trigon® - super czuła optyka
- do 4 laserów
- do 18 fluorescencji
- podajnik z płytki wielodołkowej
- szybkie zbieranie danych

BD Biosciences, ul. Królowej Marysieńki 90, 02-954 Warszawa

tel.: +48 22 651 75 88, faks: +48 22 651 75 89

<http://rcin.org.pl>

[www.bdbeurope.com](http://www.bdbeurope.com)



# BD

# BD ARIA

*Pierwszy ultra szybki sorter,  
który możesz postawić na stole.*



- pełne cyfrowe przetwarzanie sygnałów
- pomiar w kuwecie kwarcowej:  
brak konieczności ustawiania optyki
- czułość pomiaru jak w analizatorze
- ultraszybkie sortowanie czterech populacji jednocześnie

BD Biosciences, ul. Królowej Marysieńki 90, 02-954 Warszawa

tel.: +48 22 651 75 88, faks: +48 22 651 75 89

<http://rcin.org.pl>

[www.bdbeurope.com](http://www.bdbeurope.com)



## Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie – instytut planowo nietypowy www.iimcb.gov.pl



**Michał Witt, Agnieszka Ziemka,  
Jacek Kuźnicki**

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa, tel.: (22) 597 07 00, faks: (22) 597 07 15, e-mail: sekretariat@iimcb.gov.pl

Z założenia w Międzynarodowym Instytucie od początku wszystko miało być nietypowe. Taka właśnie nietypowa była również cała dość skomplikowana jego geneza. Pod koniec lat 80-tych, na bazie rysujących się prze-



Fotografia 1. Budynek Instytutu.

mian politycznych i świadomościowych, zaczęła kiełkować nieśmiała idea, że może warto byłoby pomyśleć o stworzeniu w Polsce zupełnie nowego, niezależnego i nowoczesnego instytutu badawczego zajmującego się molekularnymi i komórkowymi podstawowymi badaniami biomedycznymi, jakiego tu jeszcze nikt nie widział. Dyskusje na ten temat prowadzone w kręgu młodych (wówczas) docentów Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego (Maciej J. Nałęcz, Jacek Kuźnicki, Leszka Kaczmarek) i wynikające z nich pomysły miały tym większą szansę na realizację, że spotykały się z przychylnością środowiska Instytutu oraz władz Polskiej Akademii Nauk (ówczesnego Prezesa prof. Leszka Kuźnickiego i Prezydium PAN), popierających powstawanie różnych centrów międzynarodowych (w tym czasie tworzone na przykład

Międzynarodowe Centrum Ekologii PAN w Łodzi) oraz wsparciem przedstawicieli UNESCO (prof. Angelo Azzi). To właśnie UNESCO, w osobie ówczesnego Dyrektora Generalnego prof. Federico Mayora (zresztą naukowca-biologa), z punktu zadeklarowało swoje wsparcie dla takiej inicjatywy. Szkic propozycji programowej, wstępnie stworzony przez Macieja J. Nałęcza i Angelo Azzi, zostaje ogłoszony drukiem w 1991 roku (Net-News, Bulletin of the Molecular and Cell Biology Network, UNESCO). W następnym roku na fali zapoczątkowanych zmian powstaje Polska Sieć Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO-PAN. W 1993 roku, w wyniku wielostronnych negocjacji, jeden z nowo budowanych na Kampusie Ochota budynków zostaje przeznaczony dla – i tutaj uwaga! – nie istniejącego jeszcze, jakkolwiek planowanego, międzynarodowego instytutu badawczego. Idea ta zostaje zaakceptowana i poparta oficjalnie przez 27 Sesję Konferencji Generalnej UNESCO. W 1994 roku zarówno nowo powstały Komitet Badań Naukowych, jak i Prezydium Polskiej Akademii Nauk akceptują inicjatywę UNESCO, co skutkuje podpisaniem w maju 1995 roku przez Dyrektora Generalnego



Fotografia 2. Po uroczystym podpisaniu umowy w siedzibie UNESCO w Paryżu. Od lewej prof. A. Łuczak, wicepremier Rządu RP i prof. F. Mayor, dyrektor generalny UNESCO.

UNESCO prof. F. Mayora oraz wicepremiera Rządu RP i przewodniczącego KBN prof. A. Łuczaka międzynarodowego porozumienia powołującego Międzynarodowy Instytut Biologii

Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. Zarys programu działania Instytutu zostaje przedstawiony w artykule J. Kuźnickiego opublikowanego w kwartalniku Nauka (Nr 4/1995). Pierwszym dowodem aktywności naukowej powołanego, jakkolwiek ciągle jeszcze nieistniejącego (typowe?) instytutu, staje się międzynarodowa konferencja naukowa „New Frontiers in Cell and Molecular Biology” zorganizowana w Warszawie w październiku 1995 roku, z udziałem sław światowej biologii. W tym samym czasie Sejm oraz Prezydent RP ratyfikują międzynarodowe porozumienie z maja tegoż roku. Wreszcie w 1996 roku Prezydium PAN powołuje do życia Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej PAN, którego jedynym zadaniem organizacyjnym ma być powołanie do życia Międzynarodowego Instytutu o analogicznej nazwie. Zakładem kieruje Maciej J. Nałęcz, od samego początku *spiritus movens* całego przedsięwzięcia. To głównie dzięki jego uporowi i umiejętnościom dyplomatycznym idea stworzenia Międzynarodowego Instytutu staje się coraz bardziej realna. Na tym etapie do wymienionych już wcześniej animatorów idei powołania międzynarodowego instytutu dołączają Ryszard Przewłocki z Krakowa i Michał Witt z Poznania. Ta 5-osobowa grupa, wspierana przez Małgorzatę Moszakowską i Andrzeja Sliwowskiego, w praktyce zabiera się za organizowanie mającego powstać instytutu. Nieocenioną pomoc w tym dziele niosą pracownicy Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Hanna Michalska (księgowość) oraz Zbigniew Przygoda wspierany przez Barbarę Wiackiewicz (sprawy administracyjne). Trzeba zaznaczyć, że początkowe etapy organizacji i działania Międzynarodowego Instytutu bez pomocy i wsparcia Instytutu im. Nenckiego nie byłyby możliwe. Właściwe podstawy prawne dla funkcjonowania Międzynarodowego Instytutu stwarza jednak dopiero ustawa sejmowa z 26 czerwca 1997 roku – do

tego momentu takie jednostki naukowe o międzynarodowym charakterze w polskim systemie prawnym w ogóle nie istniały. Sejm uchwalił ją głównie dzięki skutecznym staraniom posłów Unii Demokratycznej z Krzysztofem Dołowym na czele.

W 1998 roku po raz pierwszy zbiera się powołany Międzynarodowy Komitet Doradczy Instytutu. Dyrektorem tworzonego Instytutu wybrany zostaje Włoch, prof. Angelo Azzi, pracujący na Uniwersytecie w Bernie, zaś jego zastępcami zostają Jacek Kuźnicki i Michał Witt (ten pierwszy decyzją Prezesa PAN pełni faktycznie obowiązki dyrektora). Wreszcie 1 stycznia 1999 roku, po rozwiązaniu Zakładu PAN, swój nareszcie niezależny żywot rozpoczyna Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej. Problem w tym, że wtedy jeszcze kadrowo wyposażony wyłącznie w sztab administracyjny, bez pracowników badawczych. Co gorsza, w tamtym momencie jeszcze bez jakichkolwiek funduszy na działalność badawczą, zaledwie z bardzo mglistymi widokami na ich uzyskanie. Stan ten bardzo szybko się zmienia. W tym samym roku rozstrzygnięte zostają konkursy na stanowiska profesorskie i ruszają dwa pierwsze laboratoria badawcze dr Jarosława Dastycha (Laboratorium Immunologii Molekularnej) oraz prof. Macieja Żylicza (Zakład Biologii Molekularnej). Od 2002 roku prof. J. Kuźnicki zostaje dyrektorem Instytutu, a prof. M. Witt wicedyrektorem d/s naukowych – te nominacje *de facto* sankcjonowały stan faktyczny istniejący w MIBMiK od początku jego formalnej działalności. Od tego momentu sprawy toczą się jeszcze szybciej, choć następujący dalej dynamiczny rozwój Międzynarodowego Instytutu w dalszym ciągu wpisuje się w opowieść o bycie wielce nietypowym.

Poza samą genezę Międzynarodowego Instytutu, jego zasadniczą odmienną na tle innych krajowych jednostek badawczych zawarta jest w organizacyjnych założeniach wyjściowych, zwerbalizowanych w ustawie sejmowej o Instytucie. Zasadniczym elementem tej odmienności jest brak tradycyjnej Rady Naukowej, a funkcjonowanie w jej miejsce Międzynarodowego Komitetu Dorad-

czego (MKD). W jego skład wchodzi wybitni naukowcy różnych narodowości, którzy zbierają się na dorocznych posiedzeniach w Instytucie, zaś zasadniczą część pracy członkowskiej w ciągu roku wykonują na odległość przy użyciu poczty elektronicznej. Druga istotna odmienną wynika z faktu, że wszystkie stanowiska w Instytucie obsadzane są w drodze konkursu, a stanowiska kluczowe w drodze konkursu międzynarodowego. Dotyczy to stanowiska dyrektora oraz kierowników grup badawczych (laboratoriów), którzy po zatrudnieniu otrzymują w Instytucie pozycje profesorskie. Co istotne od kandydata na kierownika grupy badawczej wymagany jest tylko doktorat a nie habilitacja. Zasadniczym wstępnym kryterium oceny kandydatów jest głównie jakość dotychczasowego dorobku naukowego oraz naukowa atrakcyjność propozycji badawczej. Proces selekcji liderów grup badawczych jest dwustopniowy – najpierw napływające kandydatury są wstępnie oceniane



Fotografia 3. W przerwie posiedzenia Międzynarodowego Komitetu Doradczego Instytutu w dniu 11 czerwca 2005 r. Od lewej (pierwszy rząd): J. Kuźnicki, U. Bialek-Wyrzykowska, J. G. Sutcliffe, A. Azzi; rząd drugi: W. Stec, J. Mallet, M. J. Nałęcz, L. Kaczmarek, A. A. Bogdano; (górny rząd): W. Huttner, R. Przewłocki, R. P. Ericsson, M. Witt, J. Duszyński, M. Żylicz.

przez kilkusobową komisję, powołaną przez Międzynarodowy Komitet Doradczy. Kandydaci zakwalifikowani na krótką listę (z reguły od 4 do 6 osób) zapraszani są do wygłoszenia seminariów w obecności członków MKD. Po wysłuchaniu seminariów oraz przeprowadzeniu rozmów z kandydatami, członkowie MKD rekomendują Dyrektorowi Instytutu osobę (lub – jak bywało – osoby) do zatrudnienia w MIBMiK. Ta, wypracowana już przez ostatnich kilka lat, procedura kwalifikacyjna wydaje się gwarantować właściwą obiektywność

i efektywność w wyborze najlepszych kandydatów. Wybrani liderzy grup uzyskują zatrudnienie na zasadzie kontraktowej na 5 lat, powierzchnię laboratoryjną z meblami i często z podstawowym wyposażeniem, dostęp do aparatury ogólnoinstytutowej (a właściwie cała aparatura w MIBMiK może być tak nazwana), pakiet finansowy „start-up funds” oraz możliwość natychmiastowego zatrudnienia 2 doktorantów. Zatrudnienie dalszych pracowników może mieć miejsce już tylko w oparciu o zdobywane dodatkowe fundusze zewnętrzne. Zgodnie z założeniem, każdy lider grupy podlega formalnej ocenie po pierwszych trzech latach swej działalności – ocenę tę prowadzą wybrani członkowie Międzynarodowego Komitetu Doradczego, opierając się na opiniach zewnętrznych recenzentów. Wynik tej ewaluacji decyduje, czy kontrakt lidera grupy zostanie przedłużony na kolejne lata. Powtarzające się pozytywne wyniki oceny okresowej umożliwiają wejście w system „rolling tenure”; ocena negatywna równoznaczna jest z decyzją o zakończeniu w przeciągu dwóch lat działalności naukowej na terenie MIBMiK i rozwiązaniu grupy. Sama obserwacja dotychczasowych ośmiu konkursów na stanowiska profesorskie już dostarcza dowodów na rosnącą atrakcyjność MIBMiK w międzynarodowym środowisku naukowym. Do pierwszego konkursu ogłoszonego w roku 1998 stanęło 6 kandydatów, dwa ostatnie konkursy w latach 2004 i 2005 przyciągnęły każdorazowo 26 kandydatów, w tym większość z zagranicy.

Pokłosem tych ośmiu konkursów jest 6 obecnie funkcjonujących laboratoriów: Zakład Biologii Molekularnej Macieja Żylicza (biologia i biochemia białek opiekuńczych), Laboratorium Bioinformatyki i Inżynierii Białka Janusza Bujnickiego (analiza bioinformatyczna enzymów modyfikujących kwasy nukleinowe), Laboratorium Biologii Strukturalnej MPG/PAN Matthiasa Bochtlera (analiza krystalograficzna złożonych biomolekuł komórkowej), Laboratorium Neurodegeneracji Jacka Kuźnickiego (proteomika i genomika chorób neurodegeneracyjnych), Laboratorium Biomodelowania Sławomira Filipka (modelowanie białek błonowych) oraz Laboratorium Biologii Komórki Marty Miączyń-



skiej (komórkowe mechanizmy transdukcji sygnału). Najnowsze, siódme z kolei Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej Jacka Jaworskiego, które będzie się koncentrowało na badaniu mechanizmów rozwoju drzewa dendrytowego, jest w stadium organizacji – rozpoczyna działalność w listopadzie 2005 roku. Warto dodać, że na terenie Instytutu funkcjonowały wcześniej również: Laboratorium Bioinformatyki Leszka Rychlewskiego (1999–2002), Laboratorium Neurologii Molekularnej Michała Hetmana (2000–2003, przeniesione na University of Kentucky, Louisville, USA) i Laboratorium Immunologii Molekularnej Jarosława Dasty-



**Fotografia 4.** Wizyta prezesa Rady Ministrów, prof. M. Belki, w dniu 22 października 2004 r. Na zdjęciu w rozmowie z dr M. Bochtlerem, kierownikiem Pracowni Biologii Strukturalnej MPG/PAN.

cha (1999–2004). Ogólna liczba osób pracujących w MIBMiK to ponad 80, w tym 40 doktorantów i 20 pracowników naukowo-badawczych. W latach 2001–2004 liczba osób zatrudnionych na etatach wyniosła średnio 22.

Oddzielnej wzmianki wymaga Laboratorium Biologii Strukturalnej i jego – również nietypowa – historia. W wyniku kilku kolejnych wizyt w MIBMiK ówczesnego Wiceprezesa Max Planck Gesellschaft (MPG) prof. Klaus Hahlbrocka, zrodził się pomysł zorganizowania na terenie Instytutu laboratorium, które finansowane byłoby w całości przez MPG. W październiku 2000 roku Prezydent MPG oraz Prezes PAN podpisał umowę, zobowiązując się do wzajemnego zorganizowania i sfinansowania laboratoriów badawczych w ramach MPG/PAN Junior Research Group Program. W wyniku ogłoszonego międzynarodowego konkursu (7 kandydatów ubiegających się o pozycję), na szefa laboratorium w Warszawie wybrano dr Matthiasa Bochtlera, młodego, niezwykle obiecującego nie-

mieckiego krystalografa białkowego, ucznia noblisty prof. Roberta Hubera. Strona niemiecka w całości wyposażyła nowo powstające laboratorium, zakupując wysokiej klasy dyfraktometr rentgenowski wraz z oprzyrządowaniem – jest to prawdopodobnie najnowocześniejsza tego typu aparatura znajdująca się w Polsce. Matthias wkrótce objął laboratorium, mężnie biorąc na siebie ciężar walk ze sprawdzeniem skomplikowanej i kosztownej aparatury do Polski. Natychmiast też przystąpił do organizowania międzynarodowego zespołu badawczego, którego filarem organizacyjnym stał się Roman Szczepanowski. Po niełatwym okresie adaptacji do polskich warunków, Matthias rozpoczął bardzo intensywną pracę badawczą, przynosząc świetne efekty publikacyjne. Wszyscy pracownicy w jego grupie opłacani są przez MPG lub ich wynagrodzenia pochodzą z grantów zewnętrznych. Matthias Bochtler formalnie zatrudniony jest w Max Planck Institute for Cell Biology and Genetics (MPI-CBG) w Dreźnie.

W (nieco spóźnionej) odpowiedzi na ustanowienie laboratorium MPG w warszawskim Instytucie, w 2005 roku, zgodnie z umową międzynarodową, strona polska ogłosiła konkurs

korteksu komórkowego. Jej laboratorium w Dreźnie, formalnie wchodzące w skład struktury Międzynarodowego Instytutu w Warszawie (gdzie Ewa będzie zatrudniona wraz z postdokim, doktorantem i technikiem), ma rozpocząć działalność z początkiem 2006 roku.

O tym czy faktycznie idea stojąca u podstaw stworzenia nowego, innego niż pozostałe, międzynarodowego instytutu badawczego pociągnęła za sobą również sukces naukowy, świadczyć powinno przełożenie tych działań na powszechnie uznawany miernik produktywności naukowej: jakość publikacji. Od roku 2000 do połowy 2005 roku pracownicy MIBMiK opublikowali ponad 200 prac naukowych, w tym: 7 w *Biochemistry*, 4 w *EMBO Journal*, 5 w *FEBS Letters*, 2 w *Gene*, 27 w *Journal of Biological Chemistry*, 4 w *Journal of Molecular Biology*, 10 w *Nucleic Acids Research*, 8 w *Protein Science*, 1 w *Proceedings of National Academy of Sciences*, 1 w *Nature*, 2 w *European Journal of Biochemistry*, 3 w *Bioinformatics* oraz 4 w *Proteins*. Ponadto w tym samym okresie w Instytucie realizowano 29 projektów badawczych Komitetu Badań Naukowych (w tym 4 projekty zamawiane) oraz 2 projekty Fundacji na Rzecz



**Fotografia 5.** W przerwie sesji sprawozdawczej Instytutu. Mierki 2004 r.

na analogiczną pozycję finansowaną przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji (uchwała KBN z grudnia 2003 roku). Laboratorium ma zostać zorganizowane w dreźnieńskim MPI-CBG. Rozegrany międzynarodowy konkurs, na który zgłosiło się 17 kandydatów, wyłonił biofizyka Ewę Paluch, pracującą w Institute Curie w Paryżu, a zajmującą się mechaniką przepływu

Nauki Polskiej. Istotnym elementem finansowania działalności badawczej w MIBMiK stały się projekty międzynarodowe: w ramach 5 Programu Ramowego UE uzyskano tu 7 grantów (z tego jeden koordynowany przez MIBMiK), w 6 Programie Ramowym 7 grantów, ponadto 2 projekty finansowane przez National Institutes of Health (NIH), jeden przez Europe-

an Molecular Biology Organisation (EMBO), dwa przez Howard Hughes Medical Institute (HHMI), jeden wspólnie przez EMBO/HHMI oraz jeden przez Wellcome Trust.

Tak znaczny sukces w uzyskiwaniu finansowania zewnętrznego w istotny sposób wpływa na kształt budżetu MIBMiK. W 2004 roku budżet Instytutu wyniósł ponad 9 mln złotych, z czego 30% pochodziło z dotacji statutowej, 13% subwencji budżetowej zagwarantowanej zapisem ustawowym (via PAN), 6% z grantów krajowych, 24% z grantów zagranicznych i 27% z subwencji SPUB-M towarzyszącej grantom zagranicznym. Od 2001 roku Instytut nosi tytuł Centrum Doskonałości, uzyskany w ramach 5 Programu Ramowego UE (Centre of Excellence in Molecular Bio-Medicine).



Fotografia 6. Zajęcia Szkoły Festiwalu Nauki dla młodzieży. Izolacja DNA metodą kuchenną.

Choć MIBMiK nie ma własnego studium doktoranckiego, aktywnie uczestniczy w wielu różnych programach edukacyjnych. Od lat Instytut w istotny sposób wspiera, jako jeden ze współzałożycieli, działalność Studium Medycyny Molekularnej (SMM), głównie poprzez finansowanie części jego działalności z budżetu Centrum Doskonałości. Na terenie MIBMiK również organizowane są regularne, coroczne kursy SMM: kurs biologii molekularnej (organizator prof. L. Konarska) i kurs genetyki człowieka (organizator prof. M. Witt). Ciekawą inicjatywą edukacyjną, zainicjowaną przez rektora Uniwersytetu w Utrechcie i zarazem członka Międzynarodowego Komitetu Doradczego MIBMiK prof. Willema Gispena, stało się uruchomienie międzynarodowego programu doktoranckiego wspólnie z tamtejszym

Uniwersytetem. Zgodnie z podpisaną umową strona holenderska zapewnia 4-letnie stypendia doktoranckie oraz możliwość odbycia staży naukowych w Utrechcie; każdy doktorant ma polskiego promotora i holenderskiego ko-promotora, praca realizowana jest w laboratorium polskim, zaś dysertacja musi zostać obroniona na Uniwersytecie w Utrechcie, zgodnie z tamtejszymi zasadami formalnymi i standardami naukowymi. Doktoranci wykonują swoje prace doktorskie w kilku krajowych ośrodkach badawczych, a naukowo-organizacyjnym koordynatorem programu jest MIBMiK. Na przestrzeni lat w programie bierze udział 8 doktorantów (pięciu w MIBMiK), z czego dwie dysertacje już zostały w Utrechcie obronione (jedna *cum laude*).

Dużą wagę również przykłada się tutaj do popularyzacji nauki: na terenie Międzynarodowego Instytutu od 2002 roku działa nieprzerwanie Szkoła Festiwalu Nauki, kierowana przez Joannę Lilpop (wcześniej przez założyciela SFN, Jarosława Bryka), współfinansowana przez MIBMiK, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego i Instytut Biochemii i Biofizyki PAN. Celem jej działalności są szeroko rozumiane działania edukacyjne i popularyzujące zagadnienia biologii w Polsce, a w szczególności prowadzenie ogólnodostępnych wykładów, szkoleń, pokazów i warsztatów dla młodzieży i nauczycieli szkół gimnazjalnych i ponadgimnazjalnych, itp.

Reasumując, w drugiej połowie lat 90-tych powstał w Polsce nowoczesny instytut naukowy zajmujący się badaniami podstawowymi w zakresie nauk biomedycznych, który w ciągu niecałych 7 lat swej działalności zaistniał znacząco w europejskiej przestrzeni badawczej. Jednym z dowodów na dostrzeżenie Instytutu przez zagranicę są bardzo częste wizyty licznych gości: naukowców, organizatorów nauki, przedstawicieli przemysłu biotechnologicznego, polityków oraz dziennikarzy. Nowoczesna formuła Instytutu sprawdza się i pokazuje, że oparcie działalności instytutu badawczego wyłącznie o kompetytywne kryteria meryto-

ryczne, sprawną organizację, życzliwą atmosferę pracy możliwe jest również w Polsce: prowadzi do odmłodzenia kadry badawczej, umiędzynarodowienia działalności (zresztą zgodnie z nazwą Instytutu), a co za tym idzie do utrwalenia wysokich standardów pracy naukowej. W ten sposób wykreowane zostało miejsce, do którego warto wrócić po udanym stażu podoktorskim w renomowanym ośrodku zagranicznym. Tutaj, w Międzynarodowym Instytucie, tacy młodzi ludzie mogą się zmierzyć nie tylko z wyzwaniem naukowym, ale również mają okazję zasmakować wczesnej samodzielności w prowadzeniu grupy badawczej. Co więcej, przykład laboratorium Michała Hetmana, który w ciągu 3 lat stworzył w MIBMiK na tyle atrakcyjne laboratorium, że zostało ono „kupione” przez prężny Uniwersytet w USA świadczy, że danie takiej samodzielności odpowiednim osobom, nawet bez habilitacji, jest słuszne i przynosi pozytywne efekty naukowe. Co ciekawe, tym młodym ludziom wcale nie przeszkadza kontraktowość zatrudnienia w Instytucie i związany z tym brak stabilizacji, znają bowiem swoją wartość. Międzynarodowy Instytut *a priori* postawił na młodych zdolnych naukowców, oferując im wiele, ale jednocześnie wiele wymagając. Po pierwszych siedmiu latach działalności Instytutu wydaje się, żeby były to założenia słuszne.



Fotografia 7. Od lewej prof. Jacek Kuźnicki, dyrektor Instytutu i prof. Michał Witt, zastępca dyrektora d/s naukowych.

Dokładne informacje o Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie można znaleźć na stronie internetowej: [www.iimcb.gov.pl](http://www.iimcb.gov.pl)

## Nowe władze Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Walne Zebranie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, które odbyło się 21 września 2005 r. w czasie dorocznego Zjazdu Towarzystwa w Lublinie, powołało nowy Zarząd Główny i Komisję Rewizyjną na lata 2005–2008. Prezesem Towarzystwa wybrany został prof. Lech Wojtczak z Warszawy, a vice-prezesem ponownie prof. Liliana Konarska, również z Warszawy. W skład Zarządu weszli także prof. Edward Bańkowski (Białystok), prof. Jolanta Barańska (dotychczasowy Prezes, Warszawa), prof. Jan Barciszewski (Poznań), prof. Dariusz Chlubek (Szczecin), dr Anna Dygas (Warszawa), prof. Andrzej Dżugaj (Wrocław), prof. Marek Gniazdowski (Łódź), prof. Teresa Jakubowicz (Lublin), prof. Wiesława Jarmuszkiewicz (Poznań), prof. Piotr Laidler (Kraków), prof. Sławomir Pikuła (Warszawa), prof. Adam Szewczyk (Warszawa), dr Teresa Wesołowska (Szczecin) i prof. Michał Woźniak (Gdańsk). Z tego składu na posiedzeniu Zarządu Głównego Towarzystwa w dniu 15 listopada zostali wyłonieni Sekretarz, prof. Sławomir Pikuła i Skarbnik, dr Anna Dygas. Do Komisji Rewizyjnej wybrane zostały prof. Ewa Birkner (Zabrze), prof. Wirginia Janiszowska (Warszawa) i prof. Zofia Szwejkowska-Kulińska (Poznań). Poniżej zamieszczamy krótką wypowiedź nowowybranego Prezesa Towarzystwa.

### Redakcja

Szanowne Koleżanki, Szanowni Koledzy

### Członkowie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego!

Walne Zebranie powierzyło mi funkcję Prezesa Towarzystwa na najbliższe trzy lata. Przed laty miałem już zaszczyt kierować Towarzystwem przez dwie kadencje, a i później pozostawałem w ścisłym kontakcie z władzami Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Sprawy Towarzystwa nie są więc mi obce, chociaż zarówno stan polskiej biochemii, jak i sytuacja naszej organizacji ulegają nieustannej ewolucji. Zawsze jednak, nawet w trudnych czasach u zarania istnienia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, ogromną wagę przykładaliśmy do utrzymania przez naszych członków i przez nasze Towarzystwo bliskich kontaktów z nauką światową. Wyrazem tego był między innymi fakt, że Polskie Towarzystwo Biochemiczne zostało członkiem-założycielem Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS), a trzeci zjazd Federacji w 1966 odbył się w Warszawie. Również trzecim z kolei Przewodniczącym FEBS w latach 1966–1967 był nasz kolega, prof. Kazimierz Zakrzewski. Znacznie później przywilej reprezentowania Polski w Radzie FEBS oraz w jednej z komisji przypadł mnie. Nasz udział w tej międzynarodowej organizacji naukowej wzrósł jednak nieporównanie w ostatnich latach. Należy tu wymienić przede wszystkim ogromny sukces ubiegłorocznego Kongresu FEBS zorganizowanego w Warszawie w 40-tą rocznicę założenia FEBS oraz zajmowanie przez

naszych przedstawicieli kilku ważnych stanowisk we władzach FEBS. Na pierwszym miejscu przypomnę, że funkcję Przewodniczącego FEBS od teraz przez najbliższy rok będzie pełniła prof. Jolanta Barańska. Ponadto koledzy nasi zajmują kilka ważnych i odpowiedzialnych stanowisk we władzach Federacji, a mianowicie przewodniczącego Komisji Stypendialnej (prof. Maciej Nałęcz), członka Komisji Wydawniczej (prof. Jerzy Duszyński), członka Grupy Roboczej d/s krajów Centralnej i Wschodniej Europy (prof. Andrzej Dżugaj) oraz pełnomocnika d/s organizacji kongresów FEBS (prof. Adam Szewczyk). Sądzę, że obecny Zarząd naszego Towarzystwa winien dalej wspierać wymienionych kolegów w ich działalności na rzecz FEBS, a także podtrzymywać i umacniać naszą obecność we władzach Federacji.

Niemniej ważna będzie działalność w kraju. Mam tu na myśli przede wszystkim utrzymanie wysokiego poziomu naukowego dorocznego Zjazdu Towarzystwa. Idzie to w parze z udzielaniem daleko idącej pomocy, zarówno merytorycznej, organizacyjnej, jak i finansowej Oddziałom Towarzystwa, podejmującym się organizacji zjazdów. Poza ogólnokrajowymi zjazdami ważną rolę w rozwoju polskiej biochemii powinny pełnić mniejsze sympozja i konferencje o węższej problematyce naukowej. Widzę tu szerokie pole do działalności zarówno dla Oddziałów jak również, przy

wsparciu Zarządu Głównego Towarzystwa, dla konkretnych ośrodków naukowych.

Wizytówką Towarzystwa są jego wydawnictwa. *Postępy Biochemii* od stycznia bieżącego roku ukazują się w nowej, atrakcyjnej szacie graficznej. *Acta Biochimica Polonica* osiągnęły współczynnik cytowalności (ang. *impact factor*) powyżej jedności (1,032 za 2004 rok). Jest i będzie naszą wielką troską, by poziom obu czasopism nadal wzrastał. Może nie bez znaczenia będzie tu fakt, że w skład nowowybranego Zarządu Głównego wchodziły redaktorzy naczelni obu czasopism.

Do Towarzystwa należy wielu młodych naukowców, w tym duża rzesza uczestników studiów doktoranckich w całym kraju. Daje im to między innymi możliwość korzystania z pomocy finansowej FEBS przy ubieganiu się o udział w międzynarodowych kursach organizowanych przez Federację. Cieszył nas również udział młodych biochemików, którzy, jako wolontariusze, tak licznie i ochoczo pomagali przy organizacji ubiegłorocznego Kongresu FEBS w Warszawie. Będziemy w dalszym ciągu z wielką życzliwością patrzeć na zainteresowanie „młodzieży” biochemicznej sprawami Towarzystwa.

Dla realizacji tych i innych zadań potrzebna będzie harmonijna współpraca „centrum” z terenowymi Od-

działami Towarzystwa. Mam nadzieję, że sprzyjać temu będzie fakt, że znaczna większość członków nowo wybranego Zarządu Głównego to Koleżanki i Koledzy spoza Warszawy. Ponadto chciałbym utrzymać dotychczasową praktykę, że na plenarne zebrania Zarządu Głównego zapraszani są przedstawiciele Zarządów Oddziałów. Wierzę, że wspólnym wysiłkiem uda nam się realizować wytknięte cele Towarzystwa. Nie kryję jednak obaw, że czekają nas także trudne sprawy. Do takich należą przede wszystkim finanse Towarzystwa, a więc zdo-

bywanie funduszy i dotacji, w tym głównie na działalność wydawniczą Towarzystwa oraz organizację zjazdów. Składki członkowskie bowiem pokrywają tylko niewielką część wydatków Towarzystwa. Podkreślam przy tym, że nie zamierzamy zmieniać dotychczasowej wysokości składki członkowskiej, ale będziemy gorąco apelować o jej regularne opłacanie.

Jest bardzo prawdopodobne, że przed obecnymi władzami Polskiego Towarzystwa Biochemicznego stanie potrzeba modyfikacji statutu naszej

organizacji. Obecny statut przetrwał w niezmienionej postaci w zasadzie od momentu założenia Towarzystwa, czyli prawie pięćdziesiąt lat i okazał się na tyle elastyczny, że umożliwił niezakłóconą działalność naszej organizacji. Wydaje się jednak, że niektóre zawarte w nim zapisy wymagać będą zmian lub uzupełnień, by w pełni dostosować je do współczesnych realiów.

Liczymy na współdziałanie członków Towarzystwa w tych zamierzeniach.

**Lech Wojtczak**

## Sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego XVII Kadencji (2001–2005)

XVII kadencja Zarządu Głównego Towarzystwa związana z wyborem władz rozpoczęła pracę w dniu 12 września 2001r. Ustępujący Zarząd opublikował sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego XVI Kadencji w „Postęпах Biochemii” 47(4) str. 340–350, 2001.

**Zarząd Główny XVII kadencji** ukonstytuował się 14.01.2002 r i działał w składzie:

<b>Prezydium:</b>	prezes	– prof. dr hab. Jolanta Barańska
	wiceprezes	– prof. dr hab. Liliana Konarska
	sekretarz	– prof. dr hab. Adam Szewczyk
	skarbnik	– dr Anna Dygas
	członkowie	– prof. dr hab. Edward Bańkowski
		– prof. dr hab. Jerzy Duszyński

**Członkowie Zarządu:**

prof. dr hab. Michał Woźniak  
prof. dr hab. Tomasz Twardowski  
dr inż. Teresa Wesołowska  
prof. dr. Hab. Michał Komoszyński  
prof. dr hab. Maria Malicka-Błaszkiwicz  
dr hab. Iwona Żak  
dr hab. Dariusz Chlubek  
prof. dr hab. Marek Gniazdowski  
prof. dr hab. Teresa Jakubowicz  
prof. dr hab. Artur Jarmołowski

**Komisja Rewizyjna:**

prof. dr hab. Marta Stryjecka-Zimmer (Przewodnicząca)  
prof. dr hab. Barbara Grzelakowska-Sztabert  
prof. dr hab. Zofia Szweykowska-Kulińska

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

Białymstoku – przewodnicząca dr hab. Elżbieta Skrzydlewska  
Gdańsku – przewodniczący doc. dr hab. Michał Woźniak



***Fotografia.** Profesor Lech Wojtczak studiował biologię i chemię na Uniwersytecie Łódzkim, gdzie również uzyskał stopień doktora w zakresie biochemii w 1954 r. Jeszcze jako student rozpoczął pracę w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego. Tutaj przeszedł wszystkie stopnie kariery naukowej i pracuje dotychczas. Profesor jest autorem około 200 publikacji naukowych i pionierem badań w zakresie bioenergetyki i biochemii mitochondriów w Polsce. Jest członkiem rzeczywistym Polskiej Akademii Nauk. W latach 1974–1980 przez dwie kadencje był Prezesem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, a od 1995 r. jest honorowym członkiem Towarzystwa.*

Katowicach	– przewodniczący doc. dr hab. Iwona Żak, obecnie dr.hab. n. med. Ewa Birkner
Krakowie	– przewodniczący prof. dr hab. Zdzisław Żak
Lublinie	– przewodnicząca prof. dr hab. Teresa Jakubowicz, obecnie prof. dr hab. Jerzy Rogalski
Łodzi	– przewodniczący doc. dr hab. Alojzy Zgirski, obecnie dr hab. n. med. Ludmiła Żylińska
Olsztynie	– przewodniczący prof. dr hab. Jan Glogowski
Poznaniu	– przewodniczący prof. dr hab. Witold Walerych
Szczecinie	– przewodniczący doc. dr hab. Dariusz Chlubek
Toruniu	– przewodniczący doc. dr hab. Michał Komoszyński
Warszawie	– przewodniczący prof. dr hab. Jerzy Duszyński
Wrocławiu	– przewodnicząca prof. dr hab. Maria Malicka-Błaszkiwicz

## CELE STATUTOWE POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Statutowym celem Towarzystwa jest popieranie rozwoju biochemii i jej popularyzacja. Osiągnięcie celu Towarzystwo realizuje poprzez organizację zjazdów, sympozjów, zebrań naukowych, odczytów, wykładów i konkursów, wydawanie i popieranie czasopism naukowych, książek i innych publikacji z zakresu biochemii, opiniowanie o stanie i potrzebach biochemii polskiej i występowanie w jej sprawach wobec władz oraz współpraca z pokrewnymi stowarzyszeniami w kraju i za granicą.

## AKTYWNOŚĆ POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO NA FORUM KRAJOWYM

### ZJAZDY POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

W okresie sprawozdawczym odbyły się trzy coroczne Zjazdy PTBioch:

**2002 r.** – XXXVIII Zjazd, Wrocław, 18–22.09, sprawozdanie ze Zjazdu opublikowano w „Postęпах Biochemii” 48(4) 327–329, 2002.

**2003 r.** – XXXIX Zjazd, Gdańsk, 16–20.09, sprawozdanie ze Zjazdu opublikowano w „Postęпах Biochemii” 49(4) 319–321, 2003.

**2004 r.** – Zjazd nie odbył się z powodu Kongresu FEBS 2004 organizowanego przez PTBioch w Warszawie, sprawozdanie ze zjazdu FEBS, „Postępy Biochemii” 51(1) 105–107, 2005. **Z tego też względu został przesunięty o rok okres kadencji Zarządu PTBioch.**

**2005 r.** – XL Zjazd, Lublin, 19–23.09. Walne Zebranie odbyło się 21.09.2005 r. Wybory nowych władz PTBioch.

Tabela 1.

Rok	Miejsce zjazdu	Liczba uczestników ogółem
2002	Wrocław	800
2003	Gdańsk	900
2004	Warszawa	w Kongresie FEBS brało udział zarejestrowanych 678 Polaków (patrz poniżej)
2005	Lublin	zarejestrowanych około 600 osób

We wszystkich Zjazdach brali także udział koledzy biochemicy pochodzenia polskiego z Białorusi (Grodno) i Ukrainy (Lwów) a ich przyjazd był współfinansowany przez PTBioch i „Wspólnotę Polską”.

W Kongresie FEBS brało udział 678 zarejestrowanych Polaków, z których 263 (39%) uzyskało stypendia PTBioch na pokrycie części kosztów wpisowego. Liczba uczestników z Polski była jednak znacznie

większa, bowiem 276 osób korzystało z formy uczestnictwa w postaci tzw. „Daily-Pass” (10 EUR), a 28 doktorantów zakwalifikowało się do Forum Młodych Naukowców i uzyskawszy pełne stypendium FEBS uczestniczyło w Kongresie. Zważywszy także na znaczny udział wolontariuszy (100 osób), będących studentami uczelni Warszawskich, pomagających w pracach Kongresu i mających wstęp wolny na teren Centrum Kongresowego gdzie odbywały się obrady, należy uznać, że liczba polskich biochemików biorących udział w Kongresie wynosiła powyżej 1000 osób.

Następne zjazdy PTBioch odbędą się kolejno: w Białymstoku (2006 r.), w Szczecinie (2007 r.), w Łodzi (2008 r.), w Olsztynie (2009 r.) i w Katowicach (2010 r.).

## DZIAŁALNOŚĆ ZARZĄDU GŁÓWNEGO W OKRESIE SPRAWOZDAWCZYM

### POSIEDZENIA PREZYDIUM ZARZĄDU GŁÓWNEGO ORAZ POSIEDZENIA ZARZĄDU

Posiedzenia Prezydium Zarządu Głównego odbywały się, zależnie od potrzeb. Zgodnie ze Statutem Towarzystwa, każdego roku odbywały się także posiedzenia rozszerzonego Zarządu Głównego z udziałem przedstawicieli wszystkich Oddziałów, organizatorów Zjazdów naukowych i innych zapraszanych gości. W roku 2003, a szczególnie w 2004, Prezydium PTBioch oraz Komitety Organizacyjny i Naukowy FEBS 2004 odbyły bardzo wiele zebrań, na których omawiano sprawy związane z organizacją Kongresu FEBS 2004 w Warszawie. Większość członków Zarządu Głównego PTBioch była jednocześnie członkami Komitetów Organizacyjnego i Naukowego FEBS 2004. Przez cały okres maja i czerwca 2004 r. zebrań takie odbywały się raz w tygodniu, w każdy piątek. Chcemy jednocześnie podziękować członkom Towarzystwa pracującym w Oddziałach za ich trud i zaangażowanie w organizację Kongresu FEBS 2004. Przygotowanie międzynarodowego Kongresu FEBS 2004 było dowodem na wysoką sprawność organizacyjną Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

**14.01.2002** – Ukonstytuowanie Prezydium, sprawozdanie z przygotowań do IV Konferencji im. Jakuba K. Parnasa (wrzesień 2002 r., Wrocław), sprawozdanie z przygotowań do XXXVIII Zjazdu PTBioch we Wrocławiu (wrzesień 2002 r.), przyjęcia nowych członków.

**20.05.2002** – Kongres FEBS 2004 w Warszawie, kursy FEBS, przygotowanie i omówienie Kongresu FEBS w październiku 2003 r. (Turcja, Stambuł), omówienie konkursów nagrody im. J.K. Parnasa, B. Skarzyńskiego i A. Dmochowskiego, uhonorowanie prof. S. Angielskiego nagrodą im. A. Dmochowskiego na Zjeździe we Wrocławiu, propozycja uczynienia roku 2003 rokiem DNA – 50-lecie odkrycia struktury DNA, propozycja aby na Zjeździe w Gdańsku zorganizować sesję DNA, przyjęcia nowych członków, sprawy bieżące, wolne wnioski.

**18.09.2002 r.** – Zebranie Zarządu w trakcie Zjazdu PTBioch we Wrocławiu. Sprawozdanie z odbytej konferencji im. Jakuba K. Parnasa, omówienie bieżących spraw organizacyjnych FEBS 2004 w Warszawie, przygotowanie do XXXIX Zjazdu w Gdańsku (2003 r.), nowi członkowie, powołanie komisji konkursowych im. M. Mozołowskiego i J. Opieńskiej-Blauth, sprawy organizacyjne.

**7.03.2003 r.** – Sprawozdanie z Kongresu FEBS 2003 w Stambule, Turcja, sprawy organizacyjne FEBS 2004 Warszawa, wybór miejsca obrad FEBS 2004. Przyszłość sekcji biotechnologii PTBioch. Sprawozdanie z XXXVIII Zjazdu PTBioch we Wrocławiu, przygotowania do XXXIX Zjazdu w Gdańsku, uchwalenie składu komisji nagrody im. J.K. Parnasa i B. Skarzyńskiego, przyjęcia nowych członków, sprawozdanie redakcji „Postępy Biochemii”, informacja o zjeździe FEBS 2003 w Brukseli (lipiec 2003 r.), nowelizacja trybu przyjmowania nowych członków.

**16.09.2003 r.** – Zebranie Zarządu w trakcie Zjazdu PTBioch w Gdańsku. Sprawy organizacyjne FEBS 2004 Warszawa, 50-lecie odkrycia struktury DNA, informacje o XXXIX zjeździe PTBioch Gdańsk, omówienie konkursów nagrody im. J.K. Parnasa, B. Skarzyńskiego, Sigmy Aldrich, wybór członków komisji nagród im. M. Mozołowskiego, J. Opieńskiej-Blauth, sprawy organizacyjne, bieżące, wolne wnioski.

**23.02.2004 r.** – Kongres FEBS 2004 w Warszawie w tym Youth Forum, 40-lecie FEBS: rejestracja, stypendia dla biochemików z krajów Europy Wschodniej, abstrakty, o programie naukowym, uczestnictwo w FEBSie członków honorowych, emerytów, studentów i wolontariuszy. Informacja o XL Zjeździe PTBioch w Lublinie, omówienie spraw związanych z uchwaleniem nowego regulaminu przyjęć do PTBioch, sprawy bieżące, wolne wnioski.

**7.01.2005 r.** – Zmiany w składzie redakcji „Postępów Biochemii”, sprawozdanie z Kongresu FEBS 2004 w Warszawie, przygotowania do V Konferencji im. J.K. Parnasa w Kijowie (kwiecień 2005 r.), przygotowania do XL Zjazdu PTBioch w Lublinie, sprawy organizacyjne, sprawy bieżące, wolne wnioski.

**13.06.2005 r.** – Informacja o odbytej konferencji im. J.K. Parnasa w Kijowie, informacja o Zjeździe PTBioch w Lublinie, o przyszłych Zjazdach PTBioch, o Kongresie FEBS 2005 mającym się odbyć w końcu czerwca 2005 r. w Budapeszcie, o wyborach nowego Zarządu PTBioch, o planach wydawniczych, w tym o wprowadzeniu opłat za stronę drukowanego tekstu artykułów w „Postępiach Biochemii” i „Acta Biochimica Polonica”, o składkach w 2005 roku, informacje różne, wolne wnioski.

**19.09.2005 r.** – Zebranie Zarządu w czasie XL Zjazdu PTBioch w Lublinie. Informacja o Zjeździe PTBioch w Lublinie, o przyszłych Zjazdach PTBioch, o Kongresie FEBS 2005 w Budapeszcie, o wyborach nowego Zarządu PTBioch, o planach wydawniczych, o składkach w 2005 r., nagrody im. J.K. Parnasa, B. Skarzyńskiego,

Sigmy Aldrich, wybór komisji nagród im. M. Mozołowskiego i J. Opieńskiej-Blauth, sprawy organizacyjne, bieżące i wolne wnioski.

Powyższe zestawienie obrazuje, że sprawy organizacji Kongresu FEBS w Warszawie były wiodące.

## UCHWAŁY ZARZĄDU GŁÓWNEGO

Patrz tabela 2.

## SPRAWY CZŁONKOWSKIE

Stan osobowy członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego na dzień 30.06.2005 r. przedstawia tabela 3.

Jak widać z tabeli 3, porównując liczbę członków Towarzystwa w roku 2001 (1947) z rokiem 2005, w którym to liczba członków wynosiła 2350 osoby, że liczba ta wzrosła o 403 członków. Członkowie, którzy nieopłacają składek przez trzy kolejne lata przenoszeni są do bazy członków biernych, zawieszonych. Powrót do członkostwa aktywnego wiąże się ze zlikwidowaniem zadłużenia składkowego. W związku z Kongresem FEBS 2004 wielu biernych członków Towarzystwa uaktywniło się. Wielu z nich zlikwidowało swoje zadłużenie. Jednak, mimo energicznej akcji porządkowania i usuwania osób zalegających z opłatami ilość ich jest znaczna i na dzień 30.06.2005 r. wynosiła 1027 osoby. Po odjęciu od 2350 (liczba członków ogółem) liczby członków biernych (1027) uzyskujemy 1323 członków Towarzystwa.

## PRZYJĘCIA NOWYCH CZŁONKÓW PTBIOCH

Przyjmowaniu nowych członków do Towarzystwa odbywa się w oparciu o regulamin opublikowany na stronach [www.ptbioch.edu.pl](http://www.ptbioch.edu.pl) i [www.postepybiochemii.pl](http://www.postepybiochemii.pl). Ci, którzy mają już dorobek naukowy w postaci prac doświadczalnych wydrukowanych w pismach krajowych i zagranicznych przyjmowani są na status członka zwyczajnego bez względu na to czy są jeszcze studentami, studentami studiów doktoranckich, pracownikami inżynieryjno-technicznymi itp. Wpisani do bazy danych, ale zadłużeni w To-

Tabela 2.

Nr	Data	W sprawie:
1	14.01.2002 r.	ukonstytuowania się Prezydium i Zarządu Głównego PTBioch organizacji Kongresu FEBS w Polsce
2	20.05.2002 r.	wysokości wpisowego na XXXVIII Zjazd PTBioch, Wrocław, 2002
3	18.09.2002 r.	wysokości wpisowego na IV Konferencję im. Jakuba K. Parnasa
4	07.03.2003 r.	ustalenia roku 2003 jako roku DNA; zmiany wysokości składek członkowskich
5	16.09.2003 r.	powołania składu Komisji konkursów o nagrody PTBioch
6	23.02.2004 r.	przyznanie Prezydium ZG prawa przyjmowania nowych członków PTBioch
7	07.01.2005 r.	dofinansowania członków PTBioch chcących wziąć udział w Zjeździe FEBS 2004 poprzez rezygnację PTBioch z części dochodu z wpisowego
8	13.06.2005 r.	wręczenia nagrody im. Bronisława Filipowicza w listopadzie 2004 roku w Łodzi, na konferencji honorującej 100-ą rocznicę urodzin Profesora
		wysokości wpisowego na Zjazd Polskiego Towarzystwa w 2005 r. w Lublinie.
		zmiany na stanowisku Redaktora naczelnego „Postępów Biochemii”; powołanie na to stanowisko prof. S. Pikuly.
		powołania składu Komisji konkursowej nagrody im. Antoniego Dmochowskiego (M. Gniazdowski, T. Jakubowicz, A. Jarmoński, L. Konarska, M. Woźniak, I. Zak)
		dokooptowania profesorów (W.M. Krajewska i A. Zgirski) do komisji nagrody im. Antoniego Dmochowskiego
		powołania dr. T. Wesołowskiej w skład Komisji nagrody im. J. Opieńskiej-Blauth; pozostali członkowie Komisji zostaną wybrani na XL Zjeździe PTBioch w Lublinie
		uchwalenia Regulaminu Członków Wspierających akceptacji dla wprowadzenia opłat za stronę druku w „Postępach Biochemii” i „Acta Biochimica Polonica”
		funduszu stypendialnego IBB/PTBioch dla osób przyjeżdżających z Europy Wschodniej do ośrodków polskich

warzystwie członkowie nie otrzymują zniżki wpisowego na Zjazdy PTBioch, certyfikatów PTBioch, numerów „Postępów Biochemii” i „Listów”.

Dane z tabeli 4 można porównać z danymi stanu osobowego Towarzystwa XV Kadencji (lata 1996–1998), gdzie na dzień 30.06.1998 r. liczba członków ogółem wynosiła 1778 oso-

by, w tym zawieszonych 658, co po odjęciu daje liczbę 1120 osób (Sprawozdanie w „Postępach Biochemii” 44, 355–365, 1998). A zatem stale, w ciągu trzech kolejnych kadencji liczba członków zawieszonych, nie płacących składek, wynosi około 40% ogółu. Optymistycznie jednak nastraja fakt ogromnego wzrostu przyjęć w ostatnim okresie, bowiem w czasie XV Kadencji (lata 1996–1998) przyjęto jedynie 73 osoby w tym 13 na status członka-studenta, XVI Kadencji (lata 1999–2001) 223 osoby w tym 89 na status członka-studenta, a w czasie ostatniej XVII Kadencji Zarządu Głównego przyjęto 531 osób w tym 223 na status członka studenta (Tabela 4).

### SKŁADKI CZŁONKOWSKIE

Patrz tabela 5.

W ramach składki, członkowie mają prawo do:

1. Otrzymania bezpłatnie rocznej prenumeraty „Postępów Biochemii”.
2. Zniżki wpisowego na coroczne zjazdy PTBioch.
3. Starania się o zniżki i dofinansowania oferowane przez PTBioch.
4. Otrzymania certyfikatu PTBioch uprawniającego do starania się o stypendia FEBS.
5. Otrzymywania bezpłatnie „Listów do członków PTBioch”.

Członkowie honorowi i emeryci są zwolnieni z opłaty składki, emery-

Tabela 3.

Oddział	Liczba członków ogółem (3+4+5+7)	Honorowi	Emeryci	W tym członkowie którzy w latach 2002–2005 opłacili najmniej jedną składkę		
				Ogółem	W tym studenci	Zawieszeni
1	2	3	4	5	6	7
Białystok	71 (63)	–	7	30	1	34
Gdańsk	151 (120)	1	4	73	18	73
Katowice	146 (139)	2	6	92	23	46
Kraków	175 (128)	1	9	113	17	52
Lublin	138 (137)	–	21	77	7	40
Łódź	193 (180)	–	18	110	11	65
Olsztyn	56 (55)	–	3	17	1	36
Poznań	253 (202)	–	15	113	18	125
Szczecin	64 (63)	1	13	38	3	12
Toruń	48 (43)	–	2	19	3	27
Warszawa	855 (675)	5	48	375	119	427
Wrocław	200 (152)	2	10	98	30	90
<b>Razem</b>	<b>2350 (1947)</b>	<b>12 (14)</b>	<b>156 (120)</b>	<b>1155 (977)</b>	<b>251 (167)</b>	<b>1027 (826)</b>

Wartości w nawiasach podano dla porównania stanu na dzień 30.06.2001 r. ze stanem obecnym.

Tabela 4.

Oddział	Liczba osób przyjętych w roku:											Ogółem
	2001		2002		2003		2004		2005 (na 30.06.2005 r.)		Ogółem	
		W tym stud.		W tym stud.		W tym stud.		W tym stud.		W tym stud.		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Białystok	-	-	7	1	-	-	1	-	-	-	8	1
Gdańsk	7	3	4	-	7	4	6	2	14	6	38	15
Katowice	4	4	2	-	-	-	6	5	2	1	14	10
Kraków	9	-	9	2	17	4	22	9	6	2	63	17
Lublin	6	2	9	2	3	-	6	1	2	1	26	6
Łódź	6	2	5	2	7	3	7	2	12	4	37	13
Olsztyn	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Poznań	1	-	13	5	10	3	23	4	10	4	57	16
Szczecin	3	1	1	-	2	-	1	-	-	-	7	1
Toruń	4	2	-	-	3	1	1	1	-	-	8	4
Warszawa	23	12	19	12	26	12	119	58	18	12	205	106
Wrocław	17	7	14	6	13	5	20	15	3	1	67	34
Razem	81	33	83	30	88	32	212	97	67	31	531	223

ci opłacają w wysokości 30 zł roczną prenumeratę „Postępów Biochemii”, podczas gdy członkowie honorowi dostają czasopismo gratis.

#### NAGRODY POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Towarzystwo przyznaje 7 nagród. Cztery z nich mają wymiar finansowy w tym dwie z nich są nagrodą sponsorowaną. O przyznaniu nagrody decydują Komisje powoływane na zebraniach Zarządu Głównego lub rozszerzonego Zarządu Głównego z Przewodniczącymi Oddziałów Terenowych PTBioch. W ich skład wchodzi wybitni naukowcy z Polski i spoza niej. Komisje przedstawiają

kandydatów do nagród. Szczegółowe informacje o laureatach nagród były przedstawiane w Sprawozdaniach z kolejnych Zjazdów, drukowanych w „Postępkach Biochemii” oraz na stronie internetowej PTBioch.

#### Polskie Towarzystwo Biochemiczne przyznaje następujące nagrody:

**NAGRODĘ im. JAKUBA KAROLA PARNASA**, przyznawaną, co roku za najlepszą pracę doświadczalną z zakresu biochemii wykonaną w pracowni polskiej. Od 1997 r. nagroda ta jest sponsorowana przez Molecular Research Center Inc. (MRC) w Cincinnati, Ohio, USA, prowadzone przez dr Piotra Chomczyńskiego. Ma ona najwyż-

szą wartość finansową ze wszystkich nagród Towarzystwa. Wręczana jest co roku podczas uroczystości otwarcia Zjazdu PTBioch. W 2001 r. (za cykl prac opublikowanych w 2000 r.) otrzymał nagrodę zespół kierowany przez prof. J. Otlewskiego (sprawozdanie „Postępy Biochemii” 48, 151, 2002). W 2002 r. nagrodę otrzymał prof. Cz. Cierniewski z zespołem: J. Bącela, I. Papiewska, I. Fijałkowska, B. Walkowiak (sprawozdanie „Postępy Biochemii” 48, 327, 2002). W 2003 roku przyznano nagrodę zespołowi K. Sobczak i W. Krzyżosiak (sprawozdanie „Postępy Biochemii” 49, 319, 2003). W roku 2004 nagrodę otrzymał zespół uczonych gdańskich, G. Węgrzyn i J. Jasiołki, którą wręczono

Tabela 5.

	Składka członkowska					Prenumerata „Postępów Biochemii”				
	2001	2002	2003	2004	2005	2001	2002	2003	2004	2005
	W złotych					W złotych				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Członek rzeczywisty	60	70	80	80	80	-	-	-	-	-
Członek na statusie studenta	30	35	40	40	40	-	-	-	-	-
Małżeństwa	100	115	120	120	120	-	-	-	-	-
Członek emeryt	-	-	-	-	-	20	25	30	30	30
Członek Honorowy	-	-	-	-	-	gratis	gratis	gratis	gratis	gratis
Prenumeratory (poza członkami)	-	-	-	-	-	40	60	80	80	100
Biblioteki	-	-	-	-	-	80	100	120	120	140
ARS-POLONA zagr.	-	-	-	-	-	140	160	170	170	180
PRESS – zagr.	-	-	-	-	-	140	160	170	170	180
PRESS – kraj.	-	-	-	-	-	60	80	90	90	119



na Kongresie FEBS 2004 w Warszawie (sprawozdanie „Postępy Biochemii” 51, 105, 2005). W roku 2005 nagrodę uzyskał zespół prof. P.P. Stępnia. Za pracę R. Tomecki, A. Dmochowska, K. Gewartowski, A. Dziembowski, P.P. Stępień „Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase” *Nucleic Acid Research* (2004) 32: 6001-6014. Nagroda została wręczona na Zjeździe PTBioch w Lublinie.

Należy dodać, że od 2002 r. (Zjazd we Wrocławiu) laureaci Nagrody wygłaszają w czasie trwania Zjazdu wykład dotyczący tematyki nagrodzonej pracy. Poziom prac wykonanych w polskich laboratoriach ogromnie wzrósł i tak na przykład, wśród 10 najlepszych prac wytypowanych w 2005 r. przez Komisję konkursową, pięć to prace opublikowane w *J. Biol. Chem.*, trzy (w tym nagrodzona) w *Nucleic Acid Res.* i po jednej w *Mol. Microbiol.* i *J. Mol. Biol.*

W skład Komisji Konkursowej, w ciągu wszystkich lat ostatniej Kadencji wchodził: przewodniczący – prof. Grzegorz Węgrzyn (Uniwersytet Gdański, Gdańsk), członkowie – prof. Jerzy Duszyński (Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, Warszawa), doc. dr hab. Marek Figlerowicz (Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań), dr hab. Artur Jarmołowski (Uniwersytet A. Mickiewicza, Poznań), prof. Józef Kur (Politechnika Gdańska, Gdańsk), prof. Jacek Otlewski (Uniwersytet Wrocławski, Wrocław), prof. Anna Skorupska (Uniwersytet im. M. Curie-Skłodowskiej, Lublin), prof. Ewa Śledziwska-Gójska (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa), prof. Zygmunt Wasilewski (Uniwersytet Jagielloński, Kraków), prof. Mirosława Włodarczyk (Uniwersytet Warszawski, Warszawa).

**NAGRODĘ im. BOLESŁAWA SKARŻYŃSKIEGO** przyznawaną i fundowaną przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne za najlepszą pracę opublikowaną w czasopiśmie Towarzystwa „Postępy Biochemii”. Zwycięzca konkursu otrzymuje nagrodę pieniężną i dyplom. W okresie sprawozdawczym Towarzystwo przyznało nagrody za pracę opublikowaną

w 2000 r. – I. Grądzkiej („Postępy Biochemii” 46, 2); w 2001 r. – A. Trzeciakowi i J. Błasiakowi („Postępy Biochemii” 47, 38); w 2002 r. – B. Grzelakowskiej-Sztabert („Postępy Biochemii” 48, 34). W 2005 r., na XL zjeździe PTBioch w Lublinie, wręczono nagrody za prace opublikowane w latach 2003 i 2004. Nagrodę za rok 2003 otrzymał Michał Milewski za pracę „Struktura i funkcja białkowych domen PDZ” („Postępy Biochemii” 49, 257). Nagrodę za rok 2004 otrzymali M. Żywicki, M. Szymański, J. Barciszewski za pracę „Różnorodność i funkcje niekodujących regulatorowych RNA” („Postępy Biochemii” 50, 90).

Skład Komisji konkursu im. B. Skarżyńskiego jest zmienny i jest podawany corocznie w Sprawozdaniach z kolejnych Zjazdów PTBioch. W roku 2005 w skład Komisji Konkursowej wchodził: prof. Sławomir Pikula (przewodniczący), prof. prof. Andrzej Dżugaj, Teresa Jakubowska, Michał Komoszyński i Michał Woźniak.

**NAGRODĘ im. WŁODZIMIERZA MOZOŁOWSKIEGO** przeznaczoną dla biochemików do lat 30-u, którzy na zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przedstawiają swoje wyniki w formie komunikatu ustnego lub plakatu. Środki finansowe na nagrodę i wyróżnienia zapewnia Komitet Organizacyjny Zjazdu. Osoby nagrodzone nagrodą im. Wł. Mozołowskiego i osoby wyróżnione otrzymują stosowne dyplomy a ich nazwiska ogłaszane są na łamach kwartalnika „Postępy Biochemii”. W okresie sprawozdawczym Towarzystwo przyznało nagrody następującym osobom: w 2001 r., J. Wiek (w „Postępy Biochemii” 48, 152, 2002), w 2002 r., J. Grybel i D. Kaźmierczak („Postępy Biochemii” 48, 328, 2002), w 2003 r., K. Lemke („Postępy Biochemii”, 49, 312, 2003). W 2004 r. nie przeprowadzono konkursu w związku z Kongresem FEBS 2004 w Warszawie. W roku 2005 nagrodę uzyskała Anna Kloska (Polska), a trzy wyróżnienia Anna Janaszak, Jolanta Skalska (Polska) i Yevehen Filyak (Ukraina) (Fot. 1). W konkursie brały udział 26 osoby. Koledzy nie nagrodzeni uzyskali dyplomy uczestnictwa w Konkursie. Na czele Komisji Konkursowej stał prof. Michał Woźniak (Akademia Medyczna, Gdańsk).



Fotografia 1. Laureaci konkursu im. Włodzimierza Mozołowskiego (2005 r.) Fot. A. Szewczyk.

**NAGRODĘ im. JANINY OPIEŃSKIEJ-BLAUTH** przyznawaną w konkursie studentom pracującym w Studenckich Kołach Naukowych, przedstawiających swoje wyniki na zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Fundatorem nagrody jest Lubelski Oddział Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Wysokość nagrody ustala Zarząd Główny PTBioch w porozumieniu z Zarządem Oddziału Lubelskiego. Jest ona mniejsza od nagrody im. Wł. Mozołowskiego. Osoba nagrodzona otrzymuje stosowny dyplom, a nazwisko jej ogłaszane jest na łamach kwartalnika „Postępy Biochemii” i stronie internetowej PTBioch. Nagrodę w 2001 r. i 2002 r. otrzymali J. Kobiela i J. Krajewski („Postępy Biochemii” 48, 152, 2002; 48, 328, 2002), w 2003 r. M. Spiechowicz („Postępy Biochemii” 49, 320, 2003). W 2004 r. nie przeprowadzono konkursu w związku z Kongresem FEBS w Warszawie. W roku 2005 nagrodę uzyskał student Rafał Wiczorek (Fot. 2), a wyróżnienie za prezentację pracy wykonanej przez grupę studentów Jarosław Kobiela. Ponadto czterej studenci dostali dyplomy uczestnictwa w Konkursie. Na czele Komisji Konkursowej stała prof. Marta Stryjecka-Zimmer (UMCS, Lublin).



Fotografia 2. Laureat konkursu im. Janiny Blauth-Opińskiej (2005 r.) Fot. A. Szewczyk.

**NAGRODĘ im. ANTONIEGO DMOCHOWSKIEGO** przyznawaną **co dwa lata**, za wybitne osiągnięcia dydaktyczne w dziedzinie biochemii. Laureaci otrzymują medal, dyplom oraz kwotę pieniężną, której wysokość zależna jest od posiadanych funduszy. W 2001 r. na nagrodę imienia swojego Ojca 1000,00 euro przeznaczył syn prof. A. Dmochowskiego. W okresie sprawozdawczym Towarzystwo przyznało nagrodę w roku 2002, którą otrzymali A. Kozik, M. Rapała-Kozik i I. Guevara-Lora. Wyróżnienie specjalne otrzymał prof. S. Angielski za wybitne zasługi w nauczaniu biochemii klinicznej. Informacje o nagrodzie zamieszczono w „Postęпах Biochemii” 48, 327, 2002. **Ponieważ w 2004 r. nie odbywał się Zjazd PTBioch, następną nagrodą została wręczona na XL zjeździe PTBioch w Lublinie w roku 2005. Nagrodę tę uzyskał prof. Edward Bańkowski za podręcznik „Biochemia, podręcznik dla studentów uczelni medycznych”, wydany przez Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław, 2004. W skład Komisji Konkursowej wchodził: prof. Wanda Małgorzata Krajewska (przewodnicząca), oraz prof. prof.: Liliana Konarska, Teresa Jakubowicz, Marek Gniazdowski i Alojzy Zgirski.**

**NAGRODĘ im. BRONISŁAWA FILIPOWICZA** za specjalne zasługi w dziedzinie popularyzacji nauki przyznawana jest **co trzy lata**. Laureaci otrzymują dyplomy i medale z brązu. Pierwszą nagrodę w konkursie tego imienia otrzymała w roku 2001 prof. M. Fikus, a wyróżnienie prof. A. Kubicz („Postępy Biochemii” 48, 151, 2002). **Drugą nagrodę im. B. Filipowicza, którą przyznano za lata 2001–2004, otrzymał prof. T. Twardowski.** Wręczono ją wyjątkowo na specjalnej Sesji poświęconej 100-leciu urodzin prof. Bolesława Filipowicza w Łodzi (2004 r.). Sprawozdanie z Sesji opublikowano w „Postęпах Biochemii” 50, 392, 2004. Na czele Komisji Konkursowej stał prof. Marek Gniazdowski (Łódź).

Na Zjazdach Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Sekcja Kwasów Nukleinowych PTBioch i firma SIGMA-ALDRICH przyznają **NAGRODĘ ZA NAJLEPSZĄ PRACĘ Z CHEMII I BIOCHEMII KWASÓW NUKLE-**

**INOWYCH.** Sponsorem nagrody pieniężnej i dyplomu jest firma Sigma-Aldrich Polska. W 2001 r. nagrodę uzyskał dr J.M. Bujnicki („Postępy Biochemii” 48, 151, 2002). W 2002 r. nagrodę otrzymał zespół A. Łochowska, R. Iwanicka-Nowicka, D. Płochocka, i M.M. Hryniewicz („Postępy Biochemii” 48, 327, 2002), w 2003 r. zespół: M. Mińczuk, A. Dmochowska, M. Palczewska i P. Stępień („Postępy Biochemii” 49, 319, 2003). Następną nagrodą została wręczona w 2005 r. **na XL Zjeździe PTBioch w Lublinie. Nagrodę tę przyznano za osiągnięcia oraz wkład w rozwój badań kwasów nukleinowych w Polsce Profesorowi Mieczysławowi Chorążemu.** Ponieważ pan profesor nie mógł uczestniczyć w Zjeździe nagroda zostanie wręczona przy najbliższej okazji w Gliwicach. Na czele Kapituły rozstrzygającej konkurs stoi od lat prof. Jan Barciszewski (Poznań).

Rozstrzygnięcie wszystkich konkursów następuje na jesieni danego roku. Nagrody imienia prof. prof.: Parnasa, Skarżyńskiego, Dmochowskiego i Filipowicza wręczane są w dniu rozpoczęcia obrad w czasie uroczystego otwarcia Zjazdu PTBioch. Nagrody imienia prof. prof. Mozołowskiego i Opieńskiej-Blauth są wręczane w czasie uroczystości zakończenia Zjazdu. Regulaminy nagród i laureaci wszystkich konkursów dostępne są na internetowej stronie PTBioch [www.ptbioch.edu.pl](http://www.ptbioch.edu.pl).

Zarząd Towarzystwa gratuluje laureatom wszystkich nagród i serdecznie dziękuje kolegom oceniającym prace zgłoszone do konkursów, działającym w ramach poszczególnych Komisji Konkursowych.

#### **SPECJALNE KONFERENCJE NAUKOWE**

Na XXXVIII Zjeździe PTBioch we Wrocławiu zorganizowano Specjalną Sesję rozpoczynającą obchody ku czci odkrycia przez Watsona i Cricka modelu struktury DNA. Zgodnie z uprzednimi ustaleniami rok 2003 uznano ROKIEM DNA. W czasie tej Sesji wysłuchano wykładu prof. W. Zagórskiego-Ostoj „Podwójna spirala–historia intuicji” a także obejrzano film „Life story”. Poczynając od tej Sesji w czasie jesieni 2002 i całego roku 2003, J. Barciszewski, W. Zagórski-Ostoj i J. Barańska występowali trzykrotnie w audycjach telewizyjnych oraz

audycji radiowej. Odbyły się także specjalne Sesje „50 lat DNA” w Oddziałach Towarzystwa w Poznaniu, Gdańsku, Warszawie i Łodzi.

Konferencja zatytułowana „Muscle and Cell Motility: from Cell Physiology to Human Pathology” poświęcona pamięci profesorów Witolda Drabikowskiego i Marii Gabrieli Sarzały-Drabikowskiej odbyła się w dniach 5–6 listopada 2004 roku. Sprawozdanie z konferencji w „Postęпах Biochemii” 50, 388, 2004, wspomnienie i artykuły uczniów w „Acta Biochimica Polonica” 2, 2005.

Konferencja zatytułowana „Modyfikowane kwasy nukleinowe” poświęcona pamięci profesora Bolesława Filipowicza w stulecie jego urodzin odbyła się w dniach 5–6 listopada 2004 roku. Sprawozdanie z konferencji w „Postęпах Biochemii” 50, 392–394, 2004.

Konferencja poświęcona pamięci profesora Jerzego Popinigisa zatytułowana „1st International Conference: Progress in Biological Sciences” odbyła się 15–16.10.2004 r. (List do członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego nr 75).

#### **DZIAŁALNOŚĆ ODDZIAŁÓW PTBIOCH**

Środowisko biochemików polskich organizowało zjazdy, konferencje, sympozja, spotkania naukowe i wykłady, a informacje o tych wydarzeniach, krótkie noty, relacje czy sprawozdania publikowane były na łamach „Listów do Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego” lub „Postępów Biochemii”

W okresie sprawozdawczym Instytut Biochemii i Biofizyki (IBB) obchodził 50-lecie swojego powstania („Postępy Biochemii” 51, 225, 2005), z tej okazji wydano specjalny numer „Acta Biochimica Polonica” (1, 2005) zawierający prace oryginalne i przeglądowe pracowników IBB.

#### **WSPÓŁPRACA Z INNYMI POLSKIMI TOWARZYSTWAMI NAUKOWYMI**

PTBioch udziela łam „Listów” innym Towarzystwom Naukowym, które publikują tu swoje ogłoszenia,

zaproszenia na konferencje, relacje i noty. Poprzez swoich członków współpracuje też z Polskim Towarzystwem Chemicznym (PTCh), Fundacją na rzecz Nauki Polskiej itd. między innymi w sprawach edukacji przyrodniczej.

## DZIAŁALNOŚĆ WYDAWNICZA

Polskie Towarzystwo Biochemiczne wydaje:

Kwartalnik "Postępy Biochemii". Redaktorem Naczelnym pisma od dnia 1 stycznia 2001 roku do 1 stycznia 2005 roku była prof. Grażyna Palamarczyk. Wieloletni redaktor pisma prof. Zofia Zielińska pełni dzisiaj funkcję Redaktora Seniora. Od 1 stycznia 2005 roku redaktorem naczelnym pisma został prof. Sławomir Pikuła, powołany na okres 5 lat. Kwartalnik dotowany był przez Komitet Badań Naukowych a obecnie Ministerstwo Nauki i Informatyzacji. Sponsorem wydania czterech zeszytów 51 numeru kwartalnika Postępów Biochemii w 2005 roku jest między innymi Sieć Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN.

Od 1 czerwca 2005 roku "Postępy Biochemii" posiadają własną domenę internetową (<http://www.postepy-biochemii.pl>).

Kwartalnik "Acta Biochimica Polonica" wydawany wspólnie z Komitetem Biochemii i Biofizyki PAN, indeksowany przez Current Contents, Biochemistry & Biophysics Citation Index BIOSIS, Excerpta Medica, Medline. Naczelnym redaktorem pisma od 1999 roku jest prof. Liliana Konarska. Przewodniczącym Rady Redakcyjnej jest prof. Lech Wojtczak. Kwartalnik publikuje oryginalne prace doświadczalne i prace przeglądowe w języku angielskim. Kwartalnik dotowany jest przez Komitet Badań Naukowych a obecnie Ministerstwo Nauki i Informatyzacji a w 2005 roku także przez Komitet Biochemii i Biofizyki PAN. Redakcja wydaje także wersję on-line kwartalnika "Acta Biochimica Polonica" (<http://www.actabp.pl>).

Biuletyn Towarzystwa: "Listy do członków PTBioch" redagowany przez dr Teresę Wesołowską i wydawany w Szczecinie. W okresie spr-

wozdawczym ukazało się 15 numerów Listów (nr 62-63 w roku 2001, 64-67 w roku 2002, nr 68-71 w roku 2003, nr 72-75 w roku 2004 i nr 76-77 w roku 2005). Dzięki staraniom dr. Teresy Wesołowskiej biuletyn jest współfinansowany przez firmy prezentujące oferty towarowe z zakresu technik laboratoryjnych. Biuletyn przekazuje aktualne wiadomości dotyczące pracy Zarządu Głównego, pracy Oddziałów oraz informuje o naukowych imprezach w kraju i zagranicą, o nowościach wydawniczych, oraz przekazuje wszelkie informacje o członkach PTBioch uhonorowanych przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej „Polskim Noblem” i stypendiami, o cytowaniach, o wyróżnieniach nagrodą Prezesa Rady Ministrów, o nominacjach na profesora, o doktoratach honoris causa, innych nagrodach i wielu innych aktualnościach dotyczących naszego środowiska. Na lamach listów żegnamy też naszych członków, którzy odeszli od nas na zawsze. Rzetelna informacja, oraz serdeczny stosunek dr. Teresy Wesołowskiej do czytelników powoduje, że biuletyn ten jest ważnym ogniwem integrującym środowisko biochemiczne.

Wersja on-line „Leksykonu nowych nazw i pojęć w biochemii i biologii molekularnej” (<http://www.ptbioch.edu.pl>).

Monografie Biochemiczne – wydawnictwo nieciągłe PTBioch, redagowane od roku 1995 przez prof. Lilianę Konarską. W okresie sprawozdawczym, wydano dwie monografie (*Karnityna, rola fizjologiczna i terapeutyczna*, A. Wawrzeńczyk, Warszawa, 2002 oraz *Z dziejów biochemii lekarskiej w Warszawie, 1916-1999*, T. Szymczyk-Wosiluk, H. Wehr, E. Skalska-Hilger, Warszawa, 2002).

Zarząd Towarzystwa serdecznie dziękuje Komitetom redakcyjnym czasopism za ich pełną zaangażowania pracę. Specjalne podziękowania kierujemy do prof. Sławomira Piкуły za zmianę szaty graficznej i sposobu redagowania „Postępów Biochemii” i do prof. Liliany Konarskiej za trud włożony w podwyższenie impact factor „Acta Biochimica Polonica” wynoszący obecnie 1.03. Dziękujemy także dr Teresie Wesołowskiej za jej ofiarną pracę przy redagowaniu „Listów”,

oraz dr Markowi Tchórzewskiemu za administrowanie od roku 1997 strony internetowej Towarzystwa prowadzonej przez prof. Lilianę Konarską.

## BIURO PTBIOCH

Biuro PTBioch, przy Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, czynne jest we wtorki w godzinach 12:00-18:00. Biuro zajmuje się korespondencją z członkami Towarzystwa, prowadzeniem baz danych, dokumentacją, księgowością, przyjmuje i rejestruje składki członków Towarzystwa, wysyła czasopisma, udziela informacji. W biurze pracują trzy osoby, w tym Weronika Kamińska (kierownik biura) i Halina Domańska (księgowa).

## SPRAWY FINANSOWE

Towarzystwo mogło regularnie wydawać czasopisma dzięki dofinansowaniu ze strony Komitetu Badań Naukowych (obecnie Ministerstwo Nauki i Informatyzacji), Komitetu Biochemii i Biofizyki PAN oraz wsparciu finansowemu Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN oraz Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN. Także inna działalność Towarzystwa, jaką są coroczne Zjazdy dofinansowywana jest przez Komitet Badań Naukowych (obecnie Ministerstwo Nauki i Informatyzacji). Wpływy z prenumerat służą dofinansowaniu działalności wydawniczej Towarzystwa. Składki członkowskie przeznaczone są głównie na utrzymanie biura oraz sprawy związane z kolportażem „Postępów Biochemii”, utrzymaniem stron www, opłaty członkowskiej FEBS i EFB. Zarządzanie finansami Towarzystwa w okresie Sprawozdawczym podlegało Wiceprezes Towarzystwa, prof. Lilianie Konarskiej.

## SPONSORZY STALE WSPIERAJĄCY PTBIOCH

1. Komitet Badań Naukowych, od 2004 roku Ministerstwo Nauki i Informatyzacji są stałymi donatorami PTBioch. Dotacje przeznaczone były i są na wydawanie wydawnictw oraz organizowanie corocznych Zjazdów Towarzystwa.

2. Od 1993 roku stałym sponsorem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego jest Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, który udostępnia Towarzystwu pomieszczenia Instytutu przy ulicy Pasteura 3 w Warszawie na biuro Zarządu.

3. Dr Piotr Chomczyński, prowadzący Molecular Research Center, Inc (MCR), Cincinnati, Ohio, USA jest sponsorem corocznej nagrody im. Jakuba Parnasa.

4. SIGMA-ALDRICH, Polska, jest sponsorem corocznej nagrody za najlepszą pracę z chemii i biochemii kwasów nukleinowych.

Zarząd Główny PTBioch widzi potrzebę zreformowania finansów Towarzystwa, stąd na zebraniu Zarządu Głównego w czerwcu 2005 roku uchwalono Regulamin Członków Wspierających oraz konieczność wprowadzenia od stycznia 2006 r. opłat za stronę druku w wydawanych przez Towarzystwo czasopismach: „Postępy Biochemii” i „Acta Biochimica Polonica” (ang. page charge), która będzie uzupełnieniem kosztów wydawniczych. Liczymy, że środowisko biochemików poprze te formy finansowania i wspierania działalności PTBioch. Regulamin Członka Wspierającego znajduje się na stronie [www.ptbioch.edu.pl](http://www.ptbioch.edu.pl). W okresie sprawozdawczym PTBioch nie miało żadnych członków wspierających i nie pobrało opłat wydawniczych.

#### AKTYWNOŚĆ POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO NA FORUM MIĘDZYNARODOWYM

#### KONGRESY FEDERACJI EUROPEJSKICH TOWARZYSTW BIOCHEMICZNYCH

Kongresy te odbywają się co roku, na ogół na przełomie czerwca i lipca i każdy z nich organizowany jest w kraju, który po przedstawieniu odpowiedniej aplikacji został zakwalifikowany przez władze Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS). Polskie Towarzystwo Biochemiczne (PTBioch) jest członkiem FEBS od jego powstania w roku 1964, będąc członkiem zało-

życielem. Oplacamy przypadającą na nasze Towarzystwo roczną składkę członkowską. PTBioch starało się, od 2002 roku, o prawo zorganizowania Kongresu FEBS i otrzymało zgodę na zorganizowanie Kongresu w roku 2004, co było wielkim wyróżnieniem, był to bowiem nie tylko rok przyjęcia Polski do Unii Europejskiej, ale i 40-lecia działalności FEBS.

W okresie Sprawozdawczym odbyły się następujące Kongresy FEBS:

**2001 r.** 27 Kongres FEBS odbył się w dniach 30 czerwiec–5 lipiec w Lizbonie, Portugalia. W Kongresie brało udział 1889 osób, w tym 76 z Polski. Kongres był poprzedzony FEBS Young Scientists Forum (FYS), w którym zwyczajowo uczestniczy około 100 młodych ludzi z laboratoriów Europejskich. FYS odbył się w dniach 28–30 czerwca i uczestniczyło w nim 9 Polaków. Sprawozdanie z tego Kongresu jest włączone do Sprawozdania Zarządu Głównego PTBioch poprzedniej Kadencji („Postępy Biochemii” 47, 340, 2001) bowiem, nowa, ustępująca obecnie Kadencja została wybrana już po tym Kongresie, we wrześniu 2001r.

**2002 r.** 28 Kongres FEBS odbył się w dniach 20–25 października w Stambule, Turcja i był poprzedzony Kongresem FEBS Young Scientists Forum (FYS), który odbył się 18–20 października. Kongres FEBS organizowało Izraelskie Towarzystwo Biochemiczne. W Kongresie brało udział 900 uczestników, w tym 30 z Polski. W FYS uczestniczyło 97 młodych ludzi z Europy, w tym 5 Polaków. Sprawozdanie PTBioch z Kongresu FEBS opublikowano w „Postęпах Biochemii” 48, 330, 2002.

**2003 r.** Zamiast Kongresu, w dniach 3–8 lipca odbył się w Brukseli, Belgia, FEBS Special Meeting 2003 on Signal Transduction, poprzedzony Kongresem FYS w dniach 1–3 lipca. W Kongresie uczestniczyło 984 osoby, w tym 48 z Polski. W obradach FYS uczestniczyło 12 młodych ludzi.

**2004 r.** 29-ty Kongres FEBS odbył się w dniach 26 czerwca–1 lipca w Warszawie, Polska w Centrum Kongresowym „Gromady”. Kongres był poprzedzony Kongresem

FYS, który odbył się w dniach 24–26 czerwca. Sprawozdanie z Kongresu Polskie Towarzystwo Biochemiczne opublikowało w „Postęпах Biochemii” 51, 105, 2005. Ponadto, Komitet Organizacyjny opracował RAPORT z Kongresu. RAPORT ten (do wglądu w siedzibie Biura PTBioch) był przedstawiany przez Prezesa PTBioch, prof. Jolantę Barańską na zebraniu Komitetu Egzekutywy FEBS w Lublaniu, Słowenia, grudzień 2004 i na zebraniu władz FEBS (Council Meeting) na Kongresie FEBS w Budapeszcie, 7–8 lipca 2005 r. Wszyscy członkowie Egzekutywy FEBS otrzymali egzemplarze RAPORTU FEBS 2004. W związku z tak szerokim opracowaniem, bardzo skrótowo podajemy, że Kongres liczył 2027 uczestników z 50 krajów, w tym 678 Polaków. FYS liczył 127 uczestników, w tym 28 delegatów z Polski. W Kongresie brała udział znaczna ilość uczestników pochodzących ze Wschodniej i Środkowej Europy (61%). W czasie Kongresu obrady odbywały się w 7 Sympozjach „DNA realm”, „RNA world”, „Proteins and peptides at work”, „Cell biochemistry”, „Biosphere and biochemistry” i „Towards a healthier life” podzielonych na liczne Sesje. Wykłady wygłosiło 256 wykładowców z 32 krajów, w tym 31 z Polski. Podobnie jak w przypadku uczestnictwa, zwrócono uwagę na udział wykładowców z Europy Wschodniej i Centralnej. W porównaniu do innych Kongresów, gdzie wartość ta nie przekraczała 5%, na naszym Kongresie wynosiła ona około 25%. Wykład inauguracyjny wygłosił noblista, prof. Kurt Wutrich („NMR Views of soluble proteins and membrane proteins”) a prof. Ryszard Gryglewski, Kraków, wygłosił presizowy Sir Hans Krebs wykład („Pharmacology of vascular Endothelium”). Ponadto odbywały się liczne Sesje otwarte dla publiczności, jak np. „Science and Society”, „FEBS/ELS Meeting on the European Research Council”, czy „Problem based learning”. Uczestnicy prezentowali swoje wyniki na 900 posterach. **Kongres uznano za sukces organizacyjny i naukowy. Był także sukcesem finansowym. Zakończył się dodatnim bilansem w wysokości 6641,37 EUR.** Na spotkaniu Komitetu Egzekutywy FEBS w Lublaniu (grudzień, 2004 r.) władze FEBS zdecydowały, że suma

ta zostaje do dyspozycji Zarządu Głównego PTBioch i ma służyć jako finansowa pomoc kolegom, szczególnie młodym, wyjeżdżającym na Kongres do Budapesztu. Tak też się stało. Polskie Towarzystwo wpłaciło wpisowe za 6 osób dorosłych, które chciały wziąć udział w tym Kongresie, a najintensywniej pracowały przy organizacji Kongresu FEBS 2004 w Warszawie (wszystkie osoby pracujące przez organizację Kongresu pracowały społecznie, bez jakiegokolwiek wynagrodzenia), oraz 25-u młodym osobom z różnych ośrodków naukowych w Polsce.

2005 r. 30-ty Kongres FEBS/IUBMB odbył się w dniach 02–07 lipca w Budapeszcie (Węgry) poprzedzony FYS w dniach 30 czerwca–2 lipca. Sprawozdanie z Kongresu zostało opublikowane w „Postępach Biochemii” 51, 3, 2005. Kongres bardzo liczny, ponieważ był Kongresem obu organizacji FEBS i IUBMB. Brało w nim udział 2500 uczestników w tym 110 osób z Polski. Jak napisano powyżej, wśród

sach i innych aktywnościach (Tabela 6). Starających się o stypendia młodych Polaków jest coraz więcej i można przypuszczać, że jest to wynik zarówno starań PTBioch, wejścia Polski w skład Unii Europejskiej, jak i coraz powszechniejszego dostępu do informacji, a więc i wzrostu aktywności samych zainteresowanych.

W okresie sprawozdawczym tj. latach 2002–2005 (w przypadku 2005 r. dane na dzień 30 czerwca) do Komitetu Stypendialnego FEBS o przyznanie im stypendiów na udział w Kongresach FEBS, Kursach dla Zaawansowanych, bądź uzyskania stypendiów na długoterminowe, krótkoterminowe, letnie oraz inne stypendia pobytowe wystąpiło 194 członków PTBioch z wielu ośrodków naukowych, w tym z: Warszawy (132), Poznania (19), Wrocławia (15), Krakowa (11), Lublina (6), Łodzi (5), Gdańska (3), Katowic (1), Torunia (1) i Szczecina (1). Tabela 6 obrazuje, że starania te były bardzo skuteczne. Biorąc pod uwagę okres

umożliwiający udział w Forum Młodych FYS, władze FEBS pokrywają automatycznie również pełen koszt uczestnictwa w Kongresie FEBS (wpisowe i hotele).

W 2004 roku także PTBioch, organizator Kongresu FEBS 2004 w Warszawie, przyznał 263 stypendia członkom PTBioch z dofinansowania, jakie na ten cel otrzymał z Ministerstwa Nauki i Informatyzacji (MniI) oraz rezygnacji Towarzystwa z zysku z części wpisowego. Umożliwiło to członkom Towarzystwa (zwyczajnym i członkom studentom), na liczne wzięcie udziału w tym wydarzeniu. PTBioch wystąpił również do władz FEBS z prośbą o dofinansowanie przyjazdu na FEBS naszych kolegów ze Wschodniej Europy. FEBS przychylił się do tej prośby i 42 osoby (21 studentów i 21 osób starszych) uzyskało zwolnienie z kosztów wpisowego i hotelu, a także skromne diety pobytowe. Osoby te musiały jedynie opłacić koszty podróży.

Tabela 6.

Stypendia FEBS dla członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego na uczestnictwo w różnych aktywnościach FEBS

Rok	Liczba osób, które wystąpiły o certyfikat do PTBioch	Liczba przyznanych stypendiów			
		Na udział w Kongresach FEBS	Na Kursy FEBS dla zaawansowanych	Na inne	Razem
2002	35	5	16	14	35
2003	48	12	16	9	37
2004	72	28	16	17	61
2005*	39	4	jeszcze brak danych	jeszcze brak danych	4
<b>Razem</b>	<b>194</b>	<b>49</b>	<b>48</b>	<b>40</b>	<b>137</b>

\*na dzień 30.06.2005 r. Członkowie Towarzystwa, którzy otrzymują stypendia proszeni są informowanie o tym Towarzystwo. Niestety czynią to nieliczni.

tych osób 6 profesorom (6 x 390 EUR) oraz 25 PhD studentom (25 x 175 EUR) z różnych ośrodków naukowych Polski Zarząd Główny PTBioch opłacił wpisowe zgodnie z ustaleniami podanymi powyżej. W sumie wydatkowano **6715,00 EUR**, wywiązując się z zobowiązania. Wśród 100 uczestników FYS, w obradach uczestniczyły 4 osoby z Polski.

#### STYPENDIA FEBS

Zarząd Główny zachęca młodych członków PTBioch, aby występowali do władz FEBS o stypendia, które pozwalają na częściową lub całkowitą odpłatność udziału w Kongre-

3 lat, tj. lata 2002–2004, o różne stypendia FEBS wystąpiło 155 osób z Polski, a przyznano je 133 członkom PTBioch. Stanowi to ogromny procent, 86% wszystkich prośb zostało załatwionych pozytywnie. Bardzo zachęcamy zainteresowanych do korzystania z tej formy pomocy. Aby ubiegać się o stypendium FEBS w jego wszelkich formach, należy odpowiednim Komisjom FEBS dostarczyć zaświadczenie PTBioch potwierdzające przynależność danej osoby do Towarzystwa (tzw. certyfikat).

Od Kongresu FEBS 2004 w Warszawie wszystkim młodym osobom, które uzyskują stypendia FEBS

FEBS przyznaje także stypendia pozwalające pokryć koszty uczestnictwa w kursach dla zaawansowanych (Tabela 6). W okresie sprawozdawczym Polska jedynie raz (2002 r., Gliwice) organizowała kursy dla zaawansowanych. Planowane jest także zorganizowanie takiego Kursu w 2006 r. w Warszawie, w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego.

FEBS przyznaje ponadto stypendia na kursy letnie, krótko- i długoterminowe wyjazdy naukowe (na tzw. post-doc), na zagospodarowanie się po powrocie z długoterminowych wyjazdów do kraju i na

badania eksperymentalne w krajach Wschodniej i Centralnej Europy. Tabela 7 przedstawia ilu członków PTBioch skorzystało z tych stypendiów i ile osób z Europy starało się o takie stypendia oraz ile je dostało i ile w tym było osób z Polski.

#### KONKURSY I NAGRODY FEBS

Konkurs 40-lecia FEBS w 2004 roku. Nagrodą w tym konkursie było pokrycie 400,00 EUR wpisowego na kongres FEBS 2004 w Warszawie. (Winners of a free registration to the FEBS 2004 Congress in Warsaw). Wśród czterdziestu nagrodzonych osób znalazły się dwie z Polski: prof. Magdalena Fikus i Joanna Majchrzykiewicz.

Za najlepsze opracowanie swoich wyników w czasie stypendiów letnich (Summer Fellowships) nagrodę po 500 EUR otrzymali Andrea Ciesielska z Gdańska i Sergiej Havrylov z Warszawy.

#### PRACA POLSKICH NAUKOWCÓW WE WŁADZACH FEBS

Zarząd Główny PTBioch promuje swoich kandydatów do władz FEBS. W okresie dwóch ostatnich kadencji PTBioch w różnych strukturach FEBS pracowały następujące osoby:

Prof. Jolanta Barańska, w ścisłej egzekutywie FEBS. Vice-przewodnicząca FEBS (FEBS Vice-Chairman) na rok 2005 i przewodnicząca FEBS (FEBS Chairman) na rok 2006.

Prof. Maciej J. Nałęcz, przewodniczący Komitetu Stypendialnego FEBS (Chairman of the FEBS Fellowships Committee) i tym samym członek ścisłej egzekutywy FEBS na kadencję 2001–2004–2008.

Prof. Jan Barciszewski (Poznań), członek Komitetu Kursów dla Zaawansowanych (Advanced Courses Committee) w latach 1999–2003.

Prof. Jerzy Duszyński, członek Komitetu Publikacji (Publications Committee) na okres 2002–2006.

Prof. Jolanta Barańska, członek Roboczej Grupy Asystującej Krajom Centralnej i Wschodniej Europy (Working Group on Ways to Assist Central and Eastern Europe) w latach 2000–2005.

Prof. Andrzej Dżugaj (Wrocław), członek Roboczej Grupy Asystującej Krajom Centralnej i Wschodniej Europy (Working Group on Ways to Assist Central and Eastern Europe) na okres 2006–2010.

Prof. Adam Szewczyk, (Warszawa), doradca do Spraw Organizacji Kongresów FEBS (FEBS Counsellor), członek ścisłej Egzekutywy FEBS, na lata 2006–2008.

Ponadto, prof. Stanisław Bielecki (Łódź), został w roku 2001 wybrany członkiem Egzekutywy Europejskiej Konfederacji Biotechnologii (Executive Committee of the Federation of European Biotechnology).

#### KONFERENCJE IM. JAKUBA KAROLA PARNASA

Inną formą działalności międzynarodowej, a jednocześnie pomocy, jaką Polskie Towarzystwo Biochemiczne kieruje do naszych ukraińskich kolegów są Konferencje im. Jakuba Parnasa. Konferencje te organizują naprzemiennie i co dwa lata Polskie i Ukraińskie Towarzystwo Biochemiczne. Zjazd odbywa się zawsze w kraju organizatora Konferencji. I Konferencja odbyła się w 1996 r. we Lwowie, II w 1998 r. w Gdańsku, III w 2000 r. we Lwowie, IV w 2002 r. we Wrocławiu i V w 2005 r. w Kijowie. Dzięki sponsorom wspierającym Konferencje w Polsce, PTBioch mogło przyznać ukraińskim uczestnikom

Tabela 7.

Stypendia przyznane przez FEBS członkom Polskiego Towarzystwa Biochemicznego				
Nazwa stypendium	Liczba osób występujących o stypendia w okresie 2001-2004r.	Liczba przyznanych stypendiów w okresie 2001-2004r.	W tym Polakom	% Przyznanych
<b>Krótkoterminowe</b> (Short-term fellowship)	2002-36	2002-29	2002-4	14,3
	2003-52	2003-46	2003-3	6,5
	2004-82	2004-49	2004-5	10,2
<b>Długoterminowe</b> (long-term fellowship)	2002-50	2002-24	2002-4	16,7
	2003-101	2003-19	2003-1	5,3
	2004-218	2004-24	2004-3	12,5
<b>Nagroda dla młodego obiecującego badacza</b> (Distinguished Young Investigator Award)	2002 brak zgłoszeń	2002 brak zgłoszeń	2002 brak zgłoszeń	-
	2003-1	2003-0	2003-0	-
	2004-0	2004-0	2004-0	-
<b>Pomoc dla powracających z długoterminowych stypendiów</b> (Fellowship Follow-up Research Fund)	2002 brak zgłoszeń	2002 brak zgłoszeń	2002 brak zgłoszeń	-
	2003-3	2003-1	2003-1	100,0
	2004-2	2004-0	2004-0	-
<b>Letnie</b> (Summer Fellowships)	2002-21	2002-17	2002-4	23,5
	2003-33	2003-15	2003-1	6,7
	2004-21	2004-11	2004-3	27,3
<b>Na eksperymentalne badania. Osoby z Centralnej i Wschodniej Europy</b> (Collaborative Experimental Scholarships for Central and Eastern Europe)	2002-11	2002-10	2002-3	30,0
	2003-18	2003-14	2003-3	21,4
	2004-24	2004-18	2004-6	33,3

Konferencji w Polsce stypendia pokrywające ich wpisowe i koszty zakwaterowania. Ponadto, w czasie IV Konferencji odbywającej się w 2002 r. we Wrocławiu, uczestnicy z Ukrainy dostali stypendia pobytowe. W związku z organizowanym w 2004 r. Kongresem FEBS w Warszawie, Konferencją im. J.K. Parnasa przełożono na rok 2005. Tymczasem wiosną 2005 roku na Ukrainie wybuchła Pomarańczowa Rewolucja i pojawiły się obawy (problemy finansowe), że być może i w tym roku Konferencja im. J.K. Parnasa nie odbędzie się. PTBioch wystąpił do władz FEBS o pomoc dla Ukraińskiego Towarzystwa, która została przyznana w kwocie 10.000,00 EUR (szczegóły „Postępy Biochemii” 51, 224, 2005).

W okresie sprawozdawczym odbyły się dwie Konferencje im. Jakuba K. Parnasa (Tabela 8).

**2002 r.** IV Konferencja odbyła się w dniach 15–17.09 we Wrocławiu (Polska). Głównym organizatorem był prof. Andrzej Dżugaj. Sponsorami Konferencji byli: Rektor Uniwersytetu Wrocławskiego, Komitet Badań Naukowych (obecnie Ministerstwo Nauki i Informatyzacji), Polska Sieć UNESCO, Polska Akademia Nauk, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, Prezydent miasta Wrocławia i Marszałek Sejmiku Regionu Dolnośląskiego. Sprawozdanie z Konferencji opublikowano w „Postęпах Biochemii” 48, 325, 2002.

**2005 r.** V Konferencja odbyła się w dniach 26–29.04 w Kijowie (Ukraina). Głównym organizatorem ze strony Ukraińskiej był prof. Sergiej Komisarenko a ze strony polskiej prof. Jolanta Barańska. Głównym sponsorem finansującym Konferencję był FEBS. Sprawozdanie z Konferencji opublikowano w „Postęпах Biochemii” 51, 223, 2005. Z przyjemnością należy stwierdzić, że poziom naukowy i or-

ganizacyjny Konferencji J.K. Parnasa staje się coraz wyższy. V Konferencja stała na wysokim międzynarodowym poziomie.

**STYPENDIA PTBIOCH NA POKRYCIE KOSZTÓW PODRÓŻY DLA CZŁONKÓW PTBIOCH UCZESTNICZĄCYCH W KONFERENCJI IM. JAKUBA KAROLA PARNASA W 2005 R.**

W 2005 roku PTBioch postanowiło dofinansować 45% kosztów przelotu członków Towarzystwa, wykupując przelot samolotem rejsowym na trasie Warszawa-Kijów-Warszawa. Dofinansowaniem objęto 60 osób. Pozostałe koszty biletu pokryli uczestnicy. Pieniądze pochodziły z rozliczenia Kongresu FEBS 2004 w Warszawie.

**KONKURS I NAGRODY KONFERENCJI IM. JAKUBA KAROLA PARNASA**

W czasie Konferencji w 2002 r. ogłoszono konkurs dla jego młodych uczestników (do 30 roku życia) na najlepszą prezentację swoich wyników. Nagrodzono jedną osobę z Polski i jedną z Ukrainy. Nagrody pieniężne w wysokości 1000,00 PLN ufundował Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Nagrody otrzymali: Katerina Shostak (Kijów) i Rafał Czajkowski (Polska).

W konkursie w 2005 r. pierwsze miejsce i nagrodę pieniężną (ofiarowaną przez stronę ukraińską) otrzymał Serhij Havrylov (Polska), drugie miejsce i nagrodę pieniężną Ganna Panasyuk (Kijów) natomiast trzem następnym spośród 49 zgłoszonych do konkursu Dyrektorzy trzech warszawskich Instytutów: Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN i Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej ufundowali trzy stypendia pokrywające całkowity koszt ich uczestnictwa w XL Zjeździe PTBioch w Lublinie.

**STYPENDIA W RAMACH FUNDUSZU STYPENDIALNEGO EUROPY WSCHODNIEJ**

Od 2005 roku PTBioch będzie brało udział w przyznawaniu stypendiów na przyjazdy kolegów z krajów Europy Wschodniej, którzy nie są członkami Unii Europejskiej. Fundusze na ten cel Towarzystwo otrzymało w ramach rozliczeń pomiędzy Instytutem Biochemii i Biofizyki PAN a PTBioch związanych z kongresem FEBS 2004 w Warszawie.

**Podsumowując, za najważniejsze osiągnięcia Zarządu Głównego PTBioch w okresie 2001–2005 uważamy:**

Wzrost liczebności Towarzystwa, w tym liczby członków studentów.

Zmiany w wydawnictwach PTBioch, w tym zmiana szaty graficznej i sposobu redagowania „Postępów Biochemii” oraz wzrost impact factor „Acta Biochimica Polonica”.

Organizacja Kongresu FEBS w Warszawie w roku 2004. Polityka otwarcia na Kraje Europy Wschodniej.

Udział członków Towarzystwa we władzach FEBS.

Podniesienie rangi Konferencji im. Jakuba K. Parnasa.

**Ponadto pragniemy zasygnalizować przyszłym władzom Towarzystwa problemy do rozwiązania w przyszłości:**

Przygotowanie strategii działania PTBioch, obejmującej między innymi dopasowanie funkcjonowania Towarzystwa do zmieniających się warunków i struktur prawno-politycznych krajowych i unijnych.

Aktywizacja członków studentów. Utworzenie Forum Młodych PTBioch i reaktywacja Sekcji Tematycznych.

Udział w rozpowszechnianiu informacji o rynku pracy adresowanej do absolwentów wydziałów przyrodniczych i studiów doktoranckich.

Działanie na rzecz integracji Towarzystw reprezentujących nauki przyrodnicze w Polsce.

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego serdecznie dziękuje wszystkim członkom i kolegom, na których udział w naszej pracy mogliśmy zawsze liczyć i bez których pomocy nasze osiągnięcia byłyby niemożliwe.

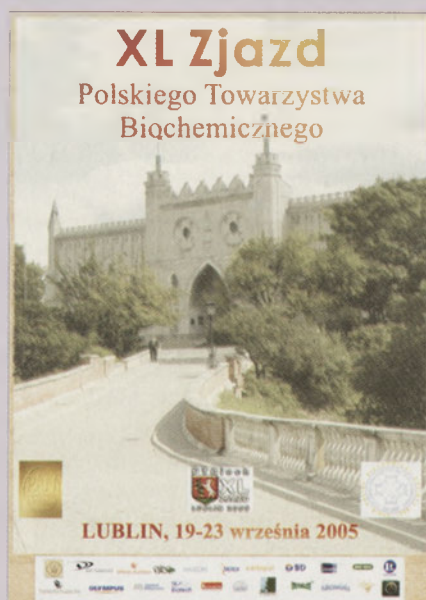
**Prof. Jolanta Barańska  
Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego  
Warszawa, 26 września 2005 r.**

Tabela 8.

Rok	Miejsce konferencji	Liczba uczestników ogółem	W tym uczestników z Polski
2002	WROCLAW	110	50
2005	KIJÓW	264	126

## Sprawozdanie z XL Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Lublin, 19–23 września 2005 r.

W dniach 19–23 września 2005 roku odbył się w Lublinie doroczny, XL Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Patronat honorowy nad Zjazdem objęli Prezydent miasta Lublin – Marek Pruszkowski, Prezes PAN – prof. dr hab. Andrzej Legocki, Prezes Lubelskiego Oddziału PAN – prof. dr hab. Jan Gliński, rektorzy wyższych uczelni Lublina, prof. dr hab. Marian Harasimiuk oraz prof. dr hab. Wiesław Kamiński z UMCS, prof. dr hab. Maciej Latański oraz prof. dr hab. Andrzej Książek z AM, prof. dr hab. Zdzisław Targoński z AR, ks. prof. dr hab. Stanisław Wilk z KUL oraz Redaktor Senior kwartalnika „Postępy Biochemii” prof. dr hab. Zofia Zielińska.



W Zjeździe uczestniczyło około 600 osób z różnych ośrodków z Polski a także goście z Austrii, Francji, Niemiec, Wielkiej Brytanii, Białorusi, Ukrainy, Kanady i USA. Uroczyste otwarcie Zjazdu odbyło się w auli Centrum Kongresowego Akademii Rolniczej w Lublinie. Wykład inauguracyjny pt. „Lonely and social domains – a structural constraint of probability of domain shuffling” wygłosił prof. dr hab. Włodzimierz Zagórski-Ostoja

z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. W części oficjalnej, po okolicznościowych wystąpieniach i powitaniach – Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego prof. dr hab. Jolanta Barańska przedstawiła osiągnięcia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w minionym roku, podkreślając wkład wielu członków Towarzystwa w organizację Kongresu FEBS w Warszawie w 2004 roku oraz piątej Konferencji im. J.K. Parnasa w Kijowie w 2005 roku. Podczas uroczystości wręczone zostały doroczne nagrody, przyznane w konkursach organizowanych pod patronatem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (patrz Sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego XVII Kadencji). Uroczystość otwarcia Zjazdu zakończył koncert zatytułowany „Zefir” na fletni Pana w wykonaniu Dimy Chabaka (Ukraina), a następnie spotkanie przy lampce wina.

Całość obrad zjazdowych odbywała się w obiektach Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, w większości na Wydziale Prawa i Administracji a także na Wydziale Chemii oraz Biologii i Nauk o Ziemi. Poszczególne dni obrad rozpoczynały wykłady plenarne adresowane do wszystkich uczestników Zjazdu. Wygłosili je profesorowie Piotr Stępień (Warszawa), Grzegorz Węgrzyn (Gdańsk) oraz Zbigniew Darżynkiewicz (USA). Po wykładach plenarnych odbywały się obrady w sesjach specjalistycznych, których organizację powierzono Koleżankom i Kolegom ze środowiska lubelskiego a także profesorom zaproszonym z różnych ośrodków biochemicznych w Polsce, z Warszawy, Poznania, Gdańska i Łodzi. Sesje poświęcone były następującym zagadnieniom:

1. Struktura i funkcja genów i genomów (prof. dr hab. Anna Skorupska, prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn);
2. Kwasy nukleinowe (prof. dr hab. Jan Barciszewski, prof. dr hab. Wanda Małek);

3. Struktura a funkcja białek (prof. dr hab. Mariusz Jaskólski);

4. Rola biologiczna fosforylacji białek (prof. dr hab. Nikodem Grankowski);

5. Receptory i mechanizmy transmisji sygnałów w komórkach (prof. dr hab. Jolanta Barańska);

6. Starzenie i różnicowanie się komórek (prof. dr hab. Ewa Sikora);

7. Biochemia kliniczna (prof. dr hab. Janusz Solski);

8. Diagnostyka molekularna i leczenie nowotworów (prof. dr hab. Jacek Wojcierowski);

9. Biochemia żywności i żywienia (prof. dr hab. Barbara Baraniak, prof. dr hab. Jerzy Rogalski, prof. dr hab. Zdzisław Targoński);

10. Dydaktyka biochemii, biologii molekularnej i biotechnologii (prof. dr hab. Marek Gniazdowski);

11. Doniesienia różne (prof. dr hab. Liliana Konarska).

Gółem wygłoszono 87 wykładów, przedstawiono 72 doniesienia ustne, odbyły się 344 prezentacje posterowe. Streszczenia wykładów i innych doniesień zjazdowych zostały opublikowane w języku angielskim w formie dodatkowego tomu kwartalnika *Acta Biochimica Polonica*. Było to możliwe dzięki funduszom przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji. Dodatkowo podczas Zjazdu, z inicjatywy prof. dr hab. Jana Barciszewskiego, odbyła się nie planowana wcześniej Sesja, poświęcona jubileuszowi 50-lecia odkrycia tRNA. Sesję rozpoczął prof. Barciszewski przypominając historię badań nad tRNA na świecie, a uczestnicy spotkania w spontanicznej dyskusji podzielili się wspomnieniami z badań prowadzonych w tym zakresie w różnych ośrodkach kraju. Na zakończenie wszyscy uczestnicy otrzymali znaczek okolicznościowy ufundowany przez firmę Meranco, przedstawiający model struktury tRNA.

W środę, 21 września, odbyło się Walne Zebranie Zarządu Głównego, na którym powołane zostały nowe władze Towarzystwa.

W czasie trwania Zjazdu przeprowadzono dwa doroczne konkursy, konkurs im. Janiny Opieńskiej-Blauth na najlepszą prezentację przedstawi-



na przez studenta, który w momencie przysyłania streszczenia nie posiadał jeszcze dyplomu ukończenia studiów oraz konkurs im. Włodzimierza Mozołowskiego za najlepszą pracę przedstawioną na Zjeździe przez młodego biochemika (do 30-tego roku życia). W pierwszym konkursie, któremu przewodniczyła prof. dr hab. Marta Stryjecka-Zimmer nagrodę otrzymał Rafał Wieczorek z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, Warszawa za pracę pt. „Reconstitution of skeletal muscle mitochondrial inner membrane into planar lipid bilayer”. Przyznano także jedno wyróżnienie dla Jarosława Kobieli z Akademii Medycznej z Gdańska za prezentację pracy pt. “Proteophilicity and lipophilicity of amino oxiles in relation to their cytoprotection in experimental cancer”. W konkursie im. W. Mozołowskiego uczestniczyło (rekordowo!) 26 osób. Komisja pod kierunkiem prof. dr hab. Michała Woźniaka przyznała nagrodę dla Anny Kloski z Uniwersytetu Gdańskiego za prezentację pracy pt. “Nonrandom inactivation of the X-chromosome in a girl with Hunter disease”.

Przyznane zostały też trzy wyróżnienia:

1. Anna Janaszak (Uniwersytet Gdański) za pracę pt. “*In vitro* transcription from *rpo H* and *ibpB*  $\sigma^{54}$  – controlled promoters”;

2. Jolanta Skalska (Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, Warszawa) za pracę pt. “The large conductance potassium channel activated by  $Ca^{2+}$  in skeletal muscle mitochondria – a novel myoprotective target”;

3. Yevhen Filyak (Instytut Biologii Komórki, Lwów) za pracę pt. DNA-damaging anticancer drugs doxorubicin inhibits TGF  $\beta$ -signaling, while TGF $\beta$ 1 enhances proapoptotic action of doxorubicin”.

W czasie trwania Zjazdu dużym zainteresowaniem cieszyły się wystawy firm prezentujących aparaturę, sprzęt i odczynniki niezbędne do badań. Mogliśmy także wysłuchać wykładów na temat najnowszych zastosowań oferowanego sprzętu. W przerwach obrad wiele osób znalazło czas na zwiedzanie Lublina. Ponadto wszyscy uczestnicy Zjazdu zostali za-

proszeni we wtorek 20 września do Muzeum Wsi Lubelskiej na wieczorny festyn biochemiczny.

Na zakończenie sprawozdania chciałabym serdecznie podziękować Zarządowi Głównemu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego oraz Redakcji *Acta Biochimica Polonica* za pomoc i współdziałanie. Dziękuję także Organizatorom Sesji naukowych, Członkom Komisji ds. nagród, Koleżankom i Kolegom z Lubelskiego Oddziału PT Bioch oraz studentom biochemii i biotechnologii UMCS za trud włożony w organizację Zjazdu oraz czuwanie nad jego sprawnym przebiegiem. Bez ich pomocy nie byłoby możliwe zorganizowanie naszego przedsięwzięcia.

Dziękując, składam wszystkim członkom i sympatykom Polskiego Towarzystwa Biochemicznego życzenia wszelkiej pomyślności i do zobaczenia na kolejnym Zjeździe Towarzystwa w Białymstoku.

**Prof. Teresa Jakubowicz**  
**Przewodnicząca Komitetu**  
**Organizacyjnego Zjazdu**

## WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

### DZIAŁ KRAJOWY

Szanowni Czytelnicy,

począwszy od niniejszego zeszytu, na zaproszenie redaktora naczelnego „Postępów Biochemii” inauguruje „dział krajowy” różnorodnością informacji. Aktualne wiadomości, nie tylko biochemicznej proveniencji, adresowane są do Czytelników „Postępów Biochemii”. „Listy do Biochemików” i kwartalnik ukazują się naprzemiennie, zatem z założenia wiadomości w obu wydawnictwach będą się uzupełniać, czasem powtarzać, ale z pewnością będą maksymalnie aktualne. Wierzę, że nie tylko strony internetowe, biuletyny i katalogi będą moim źródłem informacji. Spodziewam się współpracy ze strony Państwa w budowie obu wydawnictw informacyjnych Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

**Teresa Wesołowska**

**PREZES RADY MINISTRÓW** ogłosił nazwiska laureatów – naukowców wyróżnionych za rozprawy doktorskie i habilitacyjne oraz działalność naukową, naukowo-techniczną lub artystyczną w 2004 roku. Wśród nagrodzonych są członkowie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego: **prof. Dawid SHUGAR** – biochemia i biofizyka – Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie otrzymał nagrodę za wybitny dorobek naukowy; nagrody za rozprawy doktorskie otrzymali **dr Rafał CZAJKOWSKI** z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN; **dr Filip JELEŃ** z Instytutu Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego; **dr Anna WARZYŃSKA** (z d. BŁASZCZYK) z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

**NAGRODY MINISTRA NAUKI I INFORMATYZACJI DLA POLSKICH UCZONYCH** mogą być przyznawane co roku. Pozwala na to nowa ustawa o zasadach finansowania nauki. Nagrody mają honorować polskich naukowców za ich wybitne osiągnięcia, niezależnie od czasu w którym powstały. Preferowane będą te osiągnięcia, które wpłynęły lub oddziałują znacząco na rozwój nauki, społeczny lub gospodarczy. Nagrody będą przyznawane w trzech interdyscyplinarnych kategoriach, a nie jak zwykle się czynić, za osiągnięcia w poszczególnych dziedzinach wiedzy. Ustalono kategorie: podstawowe badania naukowe, badania na rzecz rozwoju społeczeństwa i badania na rzecz rozwoju gospodarki. Wydaje się, że kategorie te lepiej odzwierciedlają często interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań. Kandydatów do nagrody mogą zgłaszać rady naukowe lub rady wydziałów w jednostkach nauko-

wych, przez stowarzyszenia naukowe o zasięgu krajowym reprezentowane przez ich organy statutowe lub przez pozarządowe organizacje gospodarcze lub społeczne o zasięgu krajowym reprezentowane przez ich organy statutowe. Wysokość nagrody ustalono na poziomie dziesięciokrotnego zasadniczego wynagrodzenia miesięcznego profesora zwyczajnego w państwowej szkole wyższej. Wnioski powinny być sporządzone wg wzoru w załączniku 31 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji ([www.mnii.gov.pl](http://www.mnii.gov.pl)) i przekazane do Departamentu Informacji i Promocji MNiI, ul. Wspólna 1/3, 00-529 Warszawa, tel. 022 52 92 631, e-mail: [dip@mnii.gov.pl](mailto:dip@mnii.gov.pl).

**Prof. n. med. EDWARD BAŃKOWSKI**, profesor zwyczajny Akademii Medycznej w Białymstoku, od 25 lat kierownik Zakładu Biochemii Lekarskiej AM w Białymstoku, specjalizujący się m.in. w patobiochemii tkanki łącznej, za swoje dokonania naukowe w listopadzie 2005 roku został uhonorowany tytułem Doktora Honoris Causa Uniwersytetu w Reims Champagne-Ardenne we Francji — serdeczne gratulacje.

**FINANSOWANIE NAUKI** wyższymi nakładami zapowiedział minister Nauki i Informatyzacji, prof. Michał Kleiber. Według tej informacji uczelnie i placówki naukowe będą miały do dyspozycji w 2006 r. około 4 miliardów złotych. Z końcem września, mając na względzie wyrażoną obietnicę zwiększenia nakładów na naukę oraz zmianę rządu RP, prof. Andrzej Legocki, reprezentując Prezydium PAN i prof. Tadeusz Luty, przewodniczący Krajowej Konferencji Rektorów Akademickich Szkół Polskich wystosowali „Stanowisko – Apel” na ręce Ministra Nauki i Informatyzacji, prof. Michała Kleibera. W piśmie tym wyrażają wdzięczność i satysfakcję z zapowiedzianych w budżecie Państwa na 2006 r. wyższych nakładów na badania naukowe oraz nadzieję, że projekt ten znajdzie praktyczną realizację w działaniach nowego rządu naszego kraju. W uzasadnieniu konieczności zwiększenia nakładów profesorowie napisali „Polska nie może być krajem niższej kategorii, musi być społeczeństwem wykształconym i rozwiniętym na nowoczesnym poziomie. Bez badań

naukowych w nauczaniu, bez badań w procesach kształcenia na wszystkich poziomach wiedzy, bez utrzymania w nauce ścisłego kontaktu ze światem nie sprostamy międzynarodowej konkurencji. Nie dopuścimy do tego, porzucimy strategię stagnacyjną i dajmy szansę naszym młodym pokoleniom pracy naukowej dla Polski i w Polsce”.

Gdy środki na prowadzenie pracy eksperymentalnej i aplikacyjnej są nazbyt szczupłe, to wszelkie nagrody i sposoby gratyfikacji oraz wspomaganie młodych naukowców mają ich motywować do podejmowania trwałej pracy badawczej i realizowania swojej kariery naukowca w kraju. Jedną z form uzyskiwania środków na konsekwentną realizację badań jest akcja redakcji „Polityki” czyli: **STYPENDIA „ZOSTANCIE Z NAMI”** dla młodych pracowników nauki. Są one przyznawane od pięciu lat, co roku, jako wynik akcji tygodnika „Polityka” i pracy kapituły. W skład kapituły wchodzi wybitni naukowcy, sponsorzy i dziennikarze tygodnika „Polityka”. Stypendia w wysokości 25 tysięcy złotych mają zachęcić młodych badaczy do pozostania w Polsce i kontynuowania pracy badawczej w laboratoriach krajowych. W 2005 roku redakcja „Polityki” otrzymała ponad 500 zgłoszeń od osób, które tuż przed zgłoszeniem wniosku uzyskały stopień naukowy doktora, lub w najbliższym czasie miały bronić swojej dysertacji. Stypendia otrzymali naukowcy z zakresu nauk ścisłych: **dr n. med. Daniel Gackowski** (Fot. 1)



Fotografia 1.

— adiunkt w zespole prof. Ryszarda Olińskiego w Katedrze i Zakładzie Biochemii Klinicznej Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, pracujący nad udziałem szoku tlenowego w rozwoju różnych chorób, od nowotworów, przez miażdżycę, po chorobę Alzheimera;

jest członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego; **dr Krzysztof Ginalski** (Fot. 2) — adiunkt w Interdyscyplinarnym Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowe-



Fotografia 2.

go Uniwersytetu Warszawskiego zajmuje się bioinformatyką, a zwłaszcza badaniem struktury i funkcji białek; w latach 2003–2005 prowadził prace badawcze w Univesity of Texas Southwestern Medical Center w USA na stanowisku profesora; w 2004 roku został nagrodzony jako uczestnik światowego eksperymentu CASP-6 (Clinical Assessment of Protein Structure Prediction), zajmując najlepszą lokatę w dwóch kategoriach konkursowych, w rozpoznawaniu typu „foldów” i w modelowaniu porównawczym; **dr inż. Dariusz Hreniak** — adiunkt w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu; stypendysta prowadzi badania dotyczące nanokryształów o nieliniowych właściwościach optycznych i jest przekonany, że w ramach programów badawczych UE uda się zrealizować większość oryginalnych projektów związanych z wykorzystaniem nanoceramik zbudowanych z nanokryształów; był stypendystą Fundacji Nauki Polskiej (FNP) w latach 2003–2004, a za jeden z projektów badawczych otrzymał w 2004 r. dyplom Ministra Nauki; **dr Wojciech Kamysz** — adiunkt w Katedrze Chemii Nieorganicznej AM w Gdańsku, zajmuje się poszukiwaniem nowych substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym; przygotowana aktualnie praca habilitacyjna dotyczy wyników badań nowych antybiotyków peptydowych; był stypendystą FNP, a także otrzymał nagrodę Zakładów Farmaceutycznych Polpharma; **dr Marcin Andrzej Malik** — adiunkt w Katedrze Chemii na Wydziale Inżynierii Procesowej, Materiałowej i Fizyki Stosowanej Politechniki w Częstochowie; ma dwa

stopnie doktora, jeden z zakresu chemii, drugi z inżynierii materiałowej; będzie podejmował badania nad sterowaniem właściwościami fizykochemicznymi magnezów molekularnych. Mogą mieć one zastosowanie w diagnostyce medycznej; **dr Izabela Szafraniak** – adiunkt w Instytucie Inżynierii Materiałowej Politechniki w Poznaniu. Doktoryzowała się w Instytucie Maxa Plancka, a następnie podjęła badania określania wpływu bardzo małych rozmiarów na ostateczne właściwości materiałów; obecnie pracuje nad ferroelektrykami czyli materiałami, które można zastosować np. do trwałych układów pamięci czy czujników temperatury; **dr med. Wiesław Marcol** – asystent w Katedrze Fizjologii Śląskiej AM w Katowicach, aktualnie odbywający staż neurologiczny w Jastrzębiu Zdroju; praca badawcza stypendysty dotyczy zagadnień związanych z regeneracją układu nerwowego dorosłych ssaków, ze szczególnym uwzględnieniem naprawy uszkodzeń nerwów obwodowych; dr Marcol pracuje nad możliwościami naprawiania uszkodzeń rdzenia kręgowego poprzez stosowanie komórek macierzystych i prowadzi badania nad nowotworami mózgu; **dr med. Marcin Mycko** – asystent w Katedrze i Klinice Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, zajmujący się neuroimmunologią; był stypendystą FNP, a obecny projekt realizuje wspólnie z Ludwig Institute for Cancer Research w Lozannie (Szwajcaria). Przyznano także stypendia dla badaczy w dziedzinie prawa, ekonomii, nauk humanistycznych i politycznych. Większość stypendystów współpracuje z zagranicznymi ośrodkami badawczymi i publikuje w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (Polityka nr 41, str. 86–92, 2005).

**WYBRANE POLSKIE CZASOPISMA NAUKOWE** zgodnie z rozporządzeniem Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 4 sierpnia 2005 r. w sprawie kryteriów i trybu przyznawania i rozliczania środków finansowych na naukę znalazły się w wykazach wraz z liczbą punktów za umieszczoną w nich publikację naukową. Niektóre tytuły znajdują się na tzw. liście filadelfijskiej, wiele innych w wykazie kategorii B. Pismo Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Acta Biochemi-

ca Polonica, ulokowane jest na liście pierwszej z 10 punktami. Podobną punktację mają też Acta Biol. Cracov. Bot., Acta Protozool., Bul. Pol. Acad. Sci-Chem., Cell. Mol. Biol. Let. oraz Pol. J. Pharmacol. Kwartalnik „Postępy Biochemii” znajduje się na liście czasopism kategorii B z 5 punktami. Punktację (24, 20, 15 lub 10 punktów) za publikacje w czasopismach z listy Filadelfijskiego Instytutu Informacji Naukowej przypisuje się zgodnie z wielkością współczynnika przebiccia (Impact Factor) danego czasopisma opublikowanego w Journal Citation Reports z 2004 r. Rozporządzenie wskazuje także punktowanie publikacji wieloautorskich przy ocenie realizacji działalności statutowej jednostek badawczych.

**EUROPEJSKA RADA BADAŃ** będzie zajmowała się rozdzielaniem funduszy na badania podstawowe z budżetu UE, przeznaczonych na naukę. Zadaniem Rady będzie selekcja i wybór najlepszych projektów i najzdolniejszych uczonych, których badania powinny być finansowane z budżetu Wspólnoty Europejskiej. Część funduszy w VII Programie Ramowym będzie skierowana na badania „graniczne” poszerzające granice wiedzy ludzi o świecie. Są to badania podejmowane we wszystkich dziedzinach nauki. Do zespołu Europejskiej Rady Badań został zaproszony polski minister nauki **prof. Michał Kleiber** oraz dwóch naukowców z Węgier i Czech. W zespole Rady pracuje 21 uczonych z różnych krajów. Rada oficjalnie rozpocznie pracę z dniem 1 stycznia 2007 r. W międzyczasie Rada odbywać będzie posiedzenia organizacyjne (pierwsze w październiku 2005 roku).

**PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM**, ustawa podpisana przez Prezydenta RP 23 sierpnia 2005 r. zawiera także zapis o plagiacie. W przypadkach podejrzenia o plagiat w pracach dyplomowych rektor będzie wszczynał postępowanie wyjaśniające. Gdy podejrzenie okaże się prawdziwe, rektor wstrzyma nadanie stopnia czy tytułu naukowego. Postępowanie dyscyplinarne będzie stosowane z mocy prawa wobec pracowników naukowych, podejrzewanych o plagiat, korupcję, płatną protekcję

czy inne oszustwo naukowe (wg witryny Esculap.pl).

**NOWE KIERUNKI NAUCZANIA W SZKOŁACH WYŻSZYCH I NOWE MOŻLIWOŚCI SPECJALIZACJI** zostały zaplanowane lub uruchomione w bieżącym roku akademickim. Uniwersytet Medyczny w Łodzi (jako pierwsza uczelnia w kraju) uzyskał akredytację do prowadzenia kierunku o profilu humanistycznym (nauczanie filozofii w zakresie etyki i bioetyki). Na mocy umowy podpisanej pomiędzy Uniwersytetem Medycznym a Uniwersytetem im. kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie powołano w Łodzi Międzyuczelnianą Katedrę Nauk Humanistycznych. Absolwenci po trzech latach studiów humanistycznych, zakończonych licencjatem, będą mogli kontynuować kształcenie w Warszawie, u sygnatariusza umowy. Władze UE mają rok na organizację nowego kierunku i nabór kandydatów. Etycy i bioetycy mają już i będą mieli w przyszłości wiele poważnego zajęcia we współpracy z lekarzami i pacjentami w związku z nowymi specjalizacjami i procedurami medycznymi, wywołującymi nieraz kontrowersje moralne (PAP, 12.10.2005). Po raz pierwszy od 1999 r. „rusza” specjalizacja diagnostów laboratoryjnych. Program jest dostosowany do wymogów UE i realizowany jest według nowych zasad, regulowanych znowelizowaną ustawą o diagnostyce laboratoryjnej z 2003 r. i rozporządzeniem ministra zdrowia. Do specjalizacji mogą przystępować absolwenci medycyny i analityki medycznej, którzy uzyskali w ostatnich latach prawo wykonywania zawodu diagnosty medycznego i przeszli przez rekrutację. Specjalizacja jest częściowo finansowana przez osoby podejmujące kształcenie. Prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego (zawód korporacyjny) przyznaje Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych. O specjalizację z diagnostyki laboratoryjnej w Polsce mogą ubiegać się lekarze i absolwenci oddziału lub wydziału analityki medycznej, którzy wcześniej uzyskali zawód biologa, farmaceuty czy chemika (PAP, 11.10.2005).

**VII KONFERENCJA CHROMATOGRAFICZNA** „Chromatografia i techniki pokrewne a zdrowie czło-

wieka", odbędzie się w Białymstoku w dniach 10–13 września 2006 r. W programie Konferencji zaplanowano wykłady i sesje plakatowe z zakresu technik separacyjnych, a zwłaszcza z chromatografii gazowej i cieczowej, technik elektromigracyjnych i metod łączonych. Przewidziane są prezentacje z zakresu zastosowania technik chromatograficznych w analizie farmaceutycznej, klinicznej, toksykologicznej, środowiskowej, żywności i pasz oraz omówione zostaną sposoby przygotowania próbek i zagadnienia metrologii i walidacji. Przewidziany jest czas na problematykę z zakresu proteomiki, genomiki i metabolomiki. Komitetem Organizacyjnym kieruje p. prof. Elżbieta Skrzydlewska. Zamiar uczestnictwa można zgłaszać pocztą elektroniczną: [www.chromatografia.amb.edu.pl](http://www.chromatografia.amb.edu.pl) lub tradycyjną: Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, AM, ul. Mickiewicza 21, 15-230 Białystok. Tel. (085) 748 57 08. Informacje o Konferencji znajdują się na stronie [www.chromatografia.amb.edu.pl](http://www.chromatografia.amb.edu.pl).

**SEKCJA BIOENERGETYCZNA** PTBioch, powołana do życia przez prof. Lecha Wojtczaka w latach 70., będzie reaktywowana. Takie zamierzenie podjął prof. Adam Szewczyk z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie. Pomysłodawca prosi osoby zainteresowane działalnością w tej Sekcji o zgłoszenia. Adres kontaktowy: [adam@nencki.gov.pl](mailto:adam@nencki.gov.pl)

**NOWOŚCI I SUKCESY Z POLSKICH PRACOWNI** to zawsze pasjonująca lektura. Można być w pracowniach rozwiązujących problemy z innych dziedzin czy kategorii, nam czytającym, dalekich. Naukowcy z UAM w Poznaniu, z grupy **prof. Jerzego J. Langer**a skonstruowali nanodetektor i zademonstrowali go na Krecie podczas konferencji poświęconej nanotechnologii. Nanodetektor zbudowany z sieci polianilinowej, polimeru przewodzącego prąd, wykrywa żywe komórki w liczbie mniejszej niż 100 w mm<sup>2</sup> powierzchni badanej, w czasie 5–15 sek. Urządzenie może także różnicować komórki (zdrowe i chore) i być wykorzystywane jako zabezpieczenie antybioterrorystyczne i do monitoringu czystości środowiska naturalnego. Urządzenie, obiekt zainteresowania podczas konferencji

Nanomaterials and Nanotechnology 2005, jest w fazie testowania ([www.naukawpolsce.pap.pl](http://www.naukawpolsce.pap.pl)).

Celulozowe opatrunki do leczenia oparzeń chronią uszkodzone tkanki przed zakażeniem i przyspieszają gojenie ran. Celulozowy materiał o grubości ~0,5 cm wytwarzany jest z cukrów prostych przez bakterie przyjazne człowiekowi. Technologię ich produkcji opracowali naukowcy z Politechniki Łódzkiej. **Prof. Stanisław Bielecki**, dyrektor Instytutu Biochemii Technicznej PŁ, informował latem tego roku o funkcji, oryginalności zastosowania i technologii produkcji galaretowatych opatrunków celulozowych. Oryginalny produkt łódzkich uczonych jest obecnie testowany w Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich ([www.mnii.gov.pl](http://www.mnii.gov.pl)).

W konkursie algorytmicznym Top Coder Open 2005 Competition (Santa Clara w Kaliforni, 12–14 X 2005 r.) zwyciężył **Eryk Kopczyński**, doktorant drugiego roku studiów informatyki na Wydziale Matematyki, Informatyki i Mechaniki Uniwersytetu Warszawskiego. Laureat pokonał 48 finalistów, wylonionych z kilku tysięcy zgłoszonych uczestników eliminacji. W finałach uczestniczyli studenci UW – Marek Cygan, Tomasz Malesiński, Marcin Michalski, oraz Uniwersytetu Wrocławskiego – Paweł Gawrychowski i UJ – Andrzej Pezarski. Konkurs składał się z trzech konkursów: Component Design Competition, Component Development Competition i Algorithm Competition. W finale Component Development Competition uczestniczył inny student UW – Marcin Stefaniak. Od lutego b.r. Uniwersytet Warszawski zajmuje pierwsze miejsce w konkursie Top Coder.

**PRZEWODNICZĄCY KOMITETU BIOTECHNOLOGII** przy Prezydium PAN, prof. Stanisław Bielecki, był w lipcu inicjatorem spotkania w MNil z działaczami stowarzyszenia EuropaBio oraz przedstawicielami Departamentów Integracji Europejskiej oraz Strategii i Rozwoju Nauki. Prof. Stanisław Bielecki wiosną b.r. uczestniczył w Brukseli wraz z przedstawicielami EuropaBio w negocjacjach dotyczących zakresu pla-

nowanego 7 PR UE. Stowarzyszenie EuropaBio zrzesza 24 narodowych organizacji biotechnologicznych reprezentujących 1200 małych i średnich przedsiębiorstw zaangażowanych w badania i prace rozwojowe, testowanie, produkcję i dystrybucję produktów biotechnologicznych. Jest organizacją, której naczelnym celem jest promocja bioprzemysłu oraz lobbowanie na rzecz pozytywnego klimatu wokół biotechnologii w Europie. Reprezentuje zrzeszone w EuropaBio przemysły i wytwarzane w nich produkty. Stowarzyszenie jest organem opiniodawczym dla Parlamentu Europy, Komisji i Rady Ministrów w sprawach biotechnologii. Goście z EuropaBio przedstawili umowny podział biotechnologii na trzy obszary: biała – przemysłowa biotechnologia wykorzystująca systemy biologiczne w produkcji przemysłowej i ochronie środowiska; czerwona – biotechnologia wykorzystywana w ochronie zdrowia; zielona – biotechnologia związana z rolnictwem obejmująca metody inżynierii genetycznej. Według ich argumentów taka kategoryzacja obszarów biotechnologii ułatwia ukierunkowanie i tempo rozwoju tej dziedziny nauki w Europie; powinna być zastosowana w Polsce, gdzie biotechnologia intensywnie rozwija się, dla optymalizacji wykorzystania spodziewanych efektów. Zorganizowane wraz z Komisją Europejską Forum Biotechnologiczne w październiku b.r. miało wypracować model wspierania rozwoju biotechnologii w nowych krajach członkowskich, w tym w Polsce.

**KONFERENCJA „Successful aging”**. Choć starzenie się jest coraz bardziej istotnym problemem społecznym i znajduje się na liście priorytetów badawczych tak Unii Europejskiej, jak i krajowego programu ramowego badań naukowych, trudno powiedzieć, by biochemiczne badania procesu starzenia prowadzone były u nas szerokim frontem. A szkoda – chociażby biorąc pod uwagę te priorytety. Z uznaniem należy więc odnotować dwie inicjatywy, które mogą przyczynić się do zmiany tego stanu rzeczy. Obie są zasługą **Prof. dr hab. Ewy Sikory**, kierownika Zakładu Biochemii Komórki i Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia w Instytucie Biologii Doświadczal-

nej PAN im. M. Nenckiego. Jedną z nich była sesja poświęcona starzeniu się zorganizowana w ramach XL Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Lublinie, drugą zaś konferencja „Successful Aging”, która odbyła się w Warszawie w dniach 3-4 października 2005 r. Spotkanie 139 uczestników było ogromnie ciekawe i stymulujące. Organizatorom udało się zaprosić wspaniałych wykładowców, wśród: Toma Kirkwoda (University of Newcastle; jeden z najwybitniejszych autorytetów współczesnej gerontologii, autor teorii „ciała jednorazowego użytku” tłumaczącej ewolucyjne aspekty starzenia się organizmów, Fot. 3), Leonarda



Fotografia 3.

Hayflicka (University of California, San Francisco; ten, który obalił mit o nieśmiertelności komórek ssaków w hodowli *in vitro* – dzięki jego odkryciu mówimy o limicie Hayflicka), Grahama Pawelca (Universität Tübingen; światowy autorytet w zakresie immunogerontologii), Claudio Franceschiego (University of Modena; kontakt; pionier badań stulatków, który na konferencji omówił genetyczne aspekty długowieczności) i Suresha Rattana (Danish Centre for Molecular Gerontology, Aarhus; autor wielu prac o znaczeniu hormony dla długości życia). Polscy wykładowcy mówili w większości o chorobach ujawniających się u osób starszych: chorobie Alzheimera (Maria Barcikowska, Cezary Żekanowski) i chorobie Parkinsona (Andrzej Friedman). Katarzyna Broczek podsumowała wyniki badań polskich stulatków koordynowane przez Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej PAN w Warszawie, a Jacek Witkowski przedstawił wyniki badań dotyczących starzenia się limfocytów T. Podczas konferencji Tom Kirkwood

podpisywał swoją książkę *Czas naszego życia*, której polski przekład ukazał się niedawno (egzemplarze, niestety bez autografu autora, są jeszcze do kupienia w Instytucie Nenckiego; kontakt: a.sadlik@nencki.gov.pl).

Konferencja była dobrą i przyjemną okazją do zastanowienia się, czy nie warto włączyć się w badania procesu starzenia się. Prof. Sikora zadbała też o to by ewentualne pozytywne wyniki takich rozmyślań nie poszły tylko do mózgowej szuflady, tworząc listę dyskusyjną, która mogłaby skupić osoby także integracji osoby zainteresowane badaniami nad starzeniem się i długowiecznością (adres: <http://lists.nencki.gov.pl/mailman/listinfo/seneca>). Może warto dać się skusić tym zachętom? Brawo, Ewo, kuś dalej! (wg prof. Grzegorza Bartosza).

**VII OGÓLNOPOLSKIE SEMINARIUM KÓŁ NAUKOWYCH BIOTECHNOLOGII** organizuje Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów „Przybysz” przy Instytucie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, we Wrocławiu, w dniach 18-20 listopada b.r. W programie wykłady zaproszonych gości, wykłady, seminaria i prezentacje Kół Naukowych oraz sesja plakatowa, konkurs na najciekawsze wystąpienie ustne i najciekawszą prezentację plakatową i dużo dyskusji oraz wieczór integracyjny. Dokładny plan konferencji na początku listopada na stronie internetowej Uniwersytetu Wrocławskiego. Opłata uczestnictwa 50 zł powinna być wniesiona do 14 listopada na konto: Uniwersytet Wrocławski, pl. Uniwersytecki 1, 50-137 Wrocław, Bank Zachodni WBK IV O/Wrocław, nr 71 10902503 0000 0006 3000 0004 ([www.uni.wroc.pl](http://www.uni.wroc.pl)).

**TRZY UNIWERSYTETY POLSKIE** zostały umieszczone w tym roku na tzw. liście szanghajskiej, wśród 500 najlepszych uniwersytetów na świecie, sporządzonej przez uniwersytet Jiao Tong w Szanghaju. Jest to jeden z najpoważniejszych światowych rankingów szkół wyższych. W ocenie uczelni brane są pod uwagę następujące kryteria: liczba laureatów Nagrody Nobla i Medalu Fieldsa (odpowiednik Nagrody Nobla dla matematyków) wśród absolwentów i kadry, liczba cytowań publikacji naukowych

oraz liczba publikacji w pismach *Nature* i *Science*. Na liście znalazły się: Uniwersytet Jagielloński, Warszawski oraz Wrocławski. Pierwsze miejsce w tym rankingu zajmuje Uniwersytet w Harvardzie, drugi jest Uniwersytet w Cambridge. W pierwszej czterdziestce uczelni świata uplasowały się amerykańskie placówki, po dwie z Japonii i Kanady, a z europejskich cztery brytyjskie i jedna szwajcarska.

**ŻYCIE NAUKOWCA W PROZIE** można poznać czytając książkę napisaną przez prof. Mieczysława Chorążego p.t. „Z Janówki w świat – wspomnienia 1925-1995”. Wybitny naukowiec opowiada w niej Czytelnikom swoje przeżycia od okresu dzieciństwa i szkoły, przez czas wojny i okupacji, powstania warszawskiego, obozu jenieckiego, studiów medycznych, pracy w Instytucie Onkologii w Gliwicach, staży zagranicznych do okresu przełomu. Książkę wydali: Wydawnictwo PAU i Polskie Towarzystwo Onkologiczne. Informacje i zamówienia książki w Wydawnictwie PAU, ul. Sławkowska 17, 30-016 Kraków, tel.: (12) 424 02 12, fax: (12) 422 54 22; e-mail: [wydawnictwo@pau.krakow.pl](mailto:wydawnictwo@pau.krakow.pl).

**WARTO PRZECZYTAĆ** Znako- mitą recenzję ma drugie wydanie książki-opowieści „Bezmiar matematycznej wyobraźni” (wyd. Prószyński i S-ka, Warszawa, 2005), autorstwa matematyków z „Jagiellonki” Krzysztofa Ciesielskiego i Zdzisława Pogody. Recenzent napisał „to nie Ciesielski i Pogoda piszą o matematyce, lecz matematyka sama opowiada o swoim królestwie, korzystając jedynie z pośrednictwa dwóch zręcznych pomocników”. I to zachęca do sięgnięcia po tę popularyzatorską pozycję, bo nic przyjemniejszego jak przyjazna lektura o zagadnieniach trudnych, dalekich od naszego zawodu. Wydawnictwo Naukowe PWN wydało pierwszy podręcznik „Bioinformatyki” w tłumaczeniu polskim (Małgorzata Cebra, Jacek Leluk, Paweł Mackiewicz). Książka w oryginale była wydana pod redakcją A.D. Baxevanisa, B.F.F. Ouellette’a. Autorzy podręcznika przedstawiają podstawy posługiwania się narzędziami internetowymi, sposoby korzystania z biologicznych i literaturo- wych baz danych oraz szczegółowy przegląd zaawansowanych narzę-

dzi bioinformatycznych dostępnych w sieci. Uzpełnieniem książki są wykazy adresów internetowych umieszczone na końcu każdego rozdziału.

## 80-lecie urodzin Profesora Mieczysława Chorażyego



Mieczysław Rajmund Choraży urodził się 31 sierpnia 1925 roku w Janówce koło Białej Podlaskiej. Ukończył szkołę średnią w czasie wojny na tajnych kompletach. Brał udział w pracy konspiracyjnej w AK i w Powstaniu Warszawskim. Jako jeńiec wojenny znalazł się w Niemczech w Altengrabow. Z czasów Powstania pozostał mu trwały niedowład prawej dłoni, co w przyszłości utrudniało mu pracę laboratoryjną. W latach 1945-1951 studiował na Akademii Medycznej w Warszawie. Za działalność w AK, udział w Powstaniu i „nieprawomyślność” został w 1951 roku przeniesiony z Warszawy do Gliwic, gdzie rozpoczął pracę pod kierownictwem prof. Kazimierza Duxa w utworzonym wtedy Państwowym Instytucie Przeciwrakowym (obecnie Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, oddział w Gliwicach). W 1958 roku otrzymał stopień doktora medycyny ze specjalizacją z biochemii. Kolejne tytuły doktora habilitowanego, profesora nadzwyczajnego i profesora zwyczajnego otrzymał w latach 1961, 1970

i 1984. Od 1961 do 1995 roku, czyli do odejścia na emeryturę, pełnił obowiązki kierownika Zakładu Biologii Nowotworów.

W ciągu swojego życia naukowe Mieczysław Choraży zajmował się różnymi aspektami biologii nowotworów. Pierwszą jego pracą było badanie bilansu azotowego u szczurów chorych na nowotwory. Następnie Jego zainteresowania skupiły się na materiale genetycznym: transformacji komórek obcym DNA, organizacji sekwencji DNA u różnych organizmów (sekwencje powtarzające się), aktywności biologicznej związków oddziałujących z materiałem genetycznym oraz procesach towarzyszących regeneracji wątroby i etiologii nowotworów człowieka. Ostatnio zainteresowania Profesora koncentrowały się na mutagenезie i kancerogenezie środowiskowej. W dotychczasowym dorobku naukowym Profesora (od 1955 do 2005 roku) znajduje się 105 prac oryginalnych, 14 prac przeglądowych, 3 monografie, 5 tłumaczeń książek i wielka liczba artykułów popularnych i interwencyjnych w czasopiśmie naukowych i społecznych.

Ze swoich własnych prac Profesor najbardziej ceni badania nad wnikiem DNA do modelowych komórek eukariotycznych [1], których wyniki pokazały, że komórki mogą pobierać duże fragmenty DNA, oraz pracę nad metodami wyodrębniania chromosomów metafazowych [2]. Profesor opublikował także szereg pionierskich monografii przedstawiających podstawy biologii nowotworów i związku niestabilności genetycznej z kancerogenezą [3-5]. W końcu lat 80-ych i w latach 90-ych problematyka ta stała się głównym nurtem badawczym grupy Profesora. W ostatnich latach jego badania objęły również związki pomiędzy polimorfizmem genów kodujących enzymy uczestniczące w procesie detoksykacji komórek a procesem nowotworzenia [6-8].

Profesor Mieczysław Choraży już w trudnych latach powojennych nie tylko włączył się w pracę naukową, ale wykazywał hart ducha w działaniach związanych z organizacją nauki. Walczył twardo z urzędami centralnymi zdobywając podstawowe i nowoczesne wyposażenie dla Za-

kładu Biologii Nowotworów oraz odczynniki konieczne do badań. Zakład w tych czasach dysponował najlepszą biblioteką z dziedziny biologii molekularnej na Górnym Śląsku, a może nawet w całej Południowej Polsce. Jako pierwszy w Polsce, na początku lat 70-tych stworzył szkołę badania struktury i funkcji DNA.

Wielką wagę dla uczniów i następców Profesora stanowiła nie tylko Jego klasa naukowa, ale i postawa moralna, kultura osobista i niewątpliwa odwaga cywilna. Jego Zakład był przez dziesiątki lat wyspą wolności w morzu komunizmu, w czasach pełnych tchórzostwa i hipokryzji. Nie zrozumie tego nikt, kto tych lat nie przeżył. My, wychowankowie Profesora, jesteśmy Mu za tę atmosferę niezmiernie wdzięczni. W takiej atmosferze wychował liczne grono pracowników naukowych. Jego nieustanne walki z SB i Podstawową Organizacją Partyjną w Instytucie o wyjazdy zagraniczne dla pracowników owocowały podniesieniem ich kwalifikacji. Pod kierunkiem Profesora powstało 18 prac doktorskich, kilku Jego współpracowników habilitowało się, a pięćdziesięciu z nich otrzymało tytuł profesora. Do pracy w Jego zakładzie garnęli się ludzie dlatego, że dobrze się w nim czuli i dobrze się im pracowało. Przez ZBN przewinęło się wiele osób, do tej pory cenionych w kraju i na świecie, jak: Jan Filipowski, Ewa Grzybowska, Małgorzata Hanausek-Wałaszek, Jerzy Jurka, Paweł Kisielow, Stefania Krzyżowska-Gruca, Józef Mendek, Ewa Minc-Ninio, Czesław Radzikowski, Lidia Sadzińska-Matter, Zenon Stęplewski, Andrzej Vorbrodt, Zbigniew Wałaszek oraz obecni kierownicy już trzech potomnych Zakładów: Zdzisław Krawczyk, Joanna Rzeszowska i Stanisław Szala.

Mieczysław Choraży jest profesorem zwyczajnym nauk medycznych. Jest też członkiem rzeczywistym Polskiej Akademii Nauk, członkiem czynnym Polskiej Akademii Umiejętności, członkiem honorowym Polskiego Towarzystwa Onkologicznego (a w latach 1974-78 przewodniczącym), honorowym członkiem Węgierskiego Towarzystwa Onkologicznego, członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Europejskiego Stowarzyszenia Badań nad Rakiem

(EACR) i jego wiceprezydentem (w latach 1985–89), Europejskiej Organizacji Biologii Komórki (ECBO), Amerykańskiego Stowarzyszenia Badań nad Rakiem (AACR) i wielu innych polskich i zagranicznych towarzystw naukowych. Za wojskową i cywilną służbę został wyróżniony odznaczeniami państwowymi i wieloma nagrodami, w tym Złotym Krzyżem Zasługi i Oficerskim Krzyżem „Polonia Restituta”. Bliską z Nim znajomość i przyjaźń cenią sobie wybitne postaci świata nauki, a także polityki, sztuki i kultury.

Ostatnio Profesor Mieczysław Chorąży napisał i wydał staraniem Polskiej Akademii Umiejętności swoją autobiografię obejmującą okres 70 lat życia, pt.: „Z Janówki w świat”. Żywe opisy dzieciństwa i młodości, pracy i życia naukowego, wspomnienia z podróży zagranicznych, zmagania o prawdę i godność w ojczystym kraju skłaniają do refleksji nad losem i życiem ludzkim, a także do głębokiego zastanowienia się nad kondycją nauki polskiej w czasach wolności i integracji z Europą Zachodnią.

#### PIŚMIENICTWO

1. Chorąży M (1962) Badania nad wnikaniem kwasu dezoksyrybonukleinowego w komórkach raka włośni Ehrlicha. (Studies on the penetration of DNA into Ehrlich ascites carcinoma cells). *Post Hig Med Dośw* 16: 37-83
2. Chorąży M, Bendich A, Borenfreund E, Hutchinson DJ (1963) Studies on the isolation of metaphase chromosomes. *J Cell Biol* 19: 59-60
3. Szala S, Chorąży M (1972) Powtarzające się sekwencje DNA w genomie wyższych organizmów, *Monografie Biochemiczne*, PWN, Warszawa, str. 50
4. Dux K, Chorąży M (1973) Wstęp do biologii nowotworów. PWN, Warszawa, str. 408
5. Chorąży M (1985) Sequence rearrangements and genome instability. A possible step in carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 109: 159-172
6. Hemminki K, Grzybowska E, Chorąży M, Twardowska-Saucha K, Sroczynski JW, Putman KL, Randerath K, Phillips DH, Hewer A, Santella RM, Perera FP (1990) DNA adducts in humans related to occupational and environmental exposure to aromatic compounds. W: Vainio H, Sorsa M, McMichael AJ (red) *Complex mixtures and cancer risk*, t 104, IARC Scientific Publications, Lyon, str. 181-192
7. Perera FP, Hemminki K, Grzybowska E, Motykiewicz G, Michalska J, Santella RM, Young T-L, Dickey C, Brandt-Rauf P, deVivo I, Blaner W, Tsai W-Y, Chorąży M (1992)

Molecular and genetic damage in humans from environmental pollution in Poland. *Nature* 360: 256-258

8. Butkiewicz D, Grzybowska E, Hemminki K, Øvrebo S, Haugen A, Motykiewicz G, Chorąży M (1998) Modulation of DNA adduct levels in human mononuclear white blood cells and granulocytes by CYP1A1, CYP2D6 and GSTM1 genetic polymorphism. *Mutat Res* 415: 97-108

## Sprawozdanie z Letniego Kursu Hodowli Komórek Zwierzęcych dla zaawansowanych

**Grzegorz B. Gmyrek**

Laboratorium Immunologii Rozrodu, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław tel.: (71) 337 11 72, faks: (71) 337 13 82, e-mail: gregoire@hotmail.pl

Obserwowany w ostatnim czasie gwałtowny rozwój inżynierii tkankowej w naukach biomedycznych, nie pozostaje bez wpływu na rosnące zapotrzebowanie ze strony pozyskiwania wysoko wykwalifikowanych specjalistów. W tym świetle szczególnie uznanie może zyskać inicjatywa prof. Jerzego Moraczewskiego z Zakładu Cytologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, któremu przy pomocy współpracowników, udało się w tym roku z powodzeniem zorganizować szkolenie pt. „Letni Kurs Hodowli Komórek Zwierzęcych”.

Szkolenie, zorganizowane w dniach 13-18.06.2005 r., zgromadziło w sumie 46 osób, z których większość stanowili studenci, doktoranci oraz młodzi pracownicy nauki. Zakwalifikowani uczestnicy, w zależności od deklarowanych umiejętności oraz doświadczenia, zostali podzieleni na cztery grupy. Pierwsza została utworzona z myślą o początkujących badaczach, trzy pozostałe były zarezerwowane dla osób posiadających już pewne doświadczenie w prowadzeniu hodowli komórkowych. Różnica pomiędzy grupą zaawansowaną i początkującą dotyczyła zmodyfikowanego bloku teoretycznego oraz odmiennych zajęć laboratoryjnych. Ze względu

na ograniczoną liczbę pracowników oraz sal ćwiczeniowych, szkolenie zostało przeprowadzone w dwóch turach (3-dniowy blok zajęć), z których każda liczyła po dwie grupy. Kurs został podzielony na część teoretyczną oraz praktyczną. Niniejsza publikacja jest sprawozdaniem koncentrującym się na opisie zajęć odbytych przez uczestników z grupy zaawansowanej. W części teoretycznej, obejmującej łącznie około 15 godzin, zaprezentowano w sumie trzynaście prezentacji.

Wykład inauguracyjny wygłosił prof. Jerzy Moraczewski (Zakład Cytologii, Instytut Zoologii UW), w którym przedstawił ogólne zasady związane z prowadzeniem hodowli tkankowych. Główne punkty wystąpienia dotyczyły w szczególności: typów kultur komórkowych, sprzętu laboratoryjnego oraz odczynników potrzebnych do hodowli komórek, sposobów i warunków prowadzenia hodowli, scharakteryzowania stanu funkcjonalnego komórek, technik wizualizacji oraz separacji komórek. Poszczególne wątki wystąpienia były później szczegółowo rozwijane przez kolejnych prelegentów oraz szerzej omawiane w aspekcie praktycznym podczas ćwiczeń.



Zbiorowe zdjęcie uczestników kursu (grupa IV). Na pierwszym planie, odpowiednio, po lewej i prawej stronie, dr Edyta Wróbel (jedna z osób prowadzących zajęcia) oraz prof. Jerzy Moraczewski (organizator kursu).

W kolejnym wystąpieniu dr Maria Anna Ciemerych oraz mgr Aneta Suwińska (Zakład Embriologii Instytutu Zoologii UW) przedstawiły wykład pt. „Macierzyste komórki zarodkowe”. Według podstawowej definicji zarodkowe komórki macierzyste to komórki, z których mogą powstać wszystkie tkanki rozwijającego się zarodka. Zarodkowe komórki macierzyste (ang. *ES cells*) można wyodręb-

nić z zarodka, który osiągnął stadium blastocysty. Blastocysta ssaków jest strukturą zbudowaną z dwóch części: trofoblastu i wężła zarodkowego. Trofoblast jest utworzony z pojedynczej warstwy komórek, których potencjał rozwojowy jest ściśle określony, w przeciwieństwie do komórek wężła zarodkowego, mających charakter niezdeterminowany. Linie mysich zarodkowych komórek macierzystych otrzymuje się z 3,5 dniowych blastocyst. Te ostatnie można uzyskać w wyniku naturalnego pokrycia lub poddając wcześniej samice superowulacji. Hodowlę mysich ES przeprowadza się na warstwie fibroblastów inaktywowanych mitomycyną C w pożywce wzbogaconej w czynnik przeciwbiałaczkowy, który hamuje różnicowanie ES. W ujęciu praktycznym hodowle ES mają zastosowanie do badań procesów różnicowania, funkcji genów, toksyczności leków a w niedalekiej przyszłości także w klonowaniu terapeutycznym.

Dr Rafał Derlacz (Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii UW) przedstawił zasady hodowli komórek kanalików nerkowych. Pozyskiwanie komórek kanalików nerkowych z kory nerki jest metodą wydajną i stosunkowo nieskomplikowaną. Istnieją trzy podstawowe metody izolacji kanalików nerkowych: enzymatyczna, mechaniczna i immunologiczna, z których dwie pierwsze dają najlepsze rezultaty. W celu jak najdłuższego utrzymania glikogenowego charakteru wyizolowanych kanalików nerkowych, hodowlę przeprowadza się w medium pozbawionym glukozy oraz surowicy. Uzyskuje się hodowlę pierwotną, która po 5-6 dniach jest w pełni wykształcona. Kanaliki nerkowe w hodowli tworzą pojedynczą warstwę (ang. *monolayer*), w której mogą z czasem tworzyć się tzw. kopułki na skutek ukierunkowanego transportu jonów. Jakość hodowli określa się przez ocenę morfologii (właściwy kształt itp.) oraz aktywności enzymatycznej komórek. Hodowla kanalików nerkowych *in vitro* pozwala określać m.in.: metabolizm glukozy, szlaki sygnałowe oraz transport i jego regulację.

Dr Małgorzata Zimowska (Zakład Cytologii, Instytut Zoologii UW) przedstawiła wykład pt. „Hodowla

komórek izolowanych z mięśni szkieletowych”. U osobników dorosłych mięśnie charakteryzują się bardzo ograniczonym stopniem proliferacji i regeneracji. W procesach regeneracji mięśni szkieletowych uczestniczą, występujące w stanie nieodróżnionym, jednojądrowe prekursorowe komórki mięśniowe (komórki satelitowe). Pomimo, że u dorosłych osobników występują one w stanie uśpionym (faza G0), zachowują zdolność do podziałów, migracji i fuzji. Wyizolowane komórki satelitowe mogą być utrzymane w hodowli *in vitro* jako nieodróżnionowane, proliferujące mioblasty. Poprzez prostą zmianę medium mogą przejść w stan zróżnicowania z występującym później zjawiskiem fuzji. Jednym z istotnych składników medium w tym wypadku jest rodzaj użytej surowicy oraz obecność czynników progresji (insulina, IGF-I czy EGF). Medium proliferujące zawiera płodową surowicę bydlęcą z kolei medium różnicujące zawiera dodatek surowicy końskiej. Do ilościowego określania zjawiska fuzji służy tzw. indeks fuzji (iloraz liczby jąder w miotubach do całkowitej liczby jąder w mioblastach i miotubach pomnożony przez 100%).

Dr Edyta Wróbel (Zakład Biofizyki i Fizjologii Akademii Medycznej w Warszawie) wygłosiła wykład pt. „Hodowla komórek układu szkieletowego”. W hodowlach *in vitro*, bada się m.in. osteoblasty, osteocyty czy osteoklasty z których największe zainteresowanie przykuwają te pierwsze. Aktualne kierunki inżynierii tkankowej w ortopedii i chirurgii szczękowej obejmują m.in.: autologiczne hodowle komórek podścieliska szpikowego w terapii ubytków, przeszczepianie genetycznie modyfikowanych lub uprzednio stymulowanych w hodowli *in vitro* komórek dławcy czy miejscowe podawanie cytokin, czynników wzrostu oraz substancji biologicznie czynnych. Ponieważ w/w metody nie są jeszcze w powszechnym zastosowaniu, w praktyce stosuje się m.in. materiały biokompatybilne (implanty tytanowe lub ceramiczne), sztuczne substytuty kostne (hydroksyapatyty) czy bioszklę. Innym sposobem jest zastosowanie biomateriałów posiadających mineralną strukturę zbliżoną do tkanki człowieka. Takie cechy wykazuje biomateriał Bio-Oss (odpo-

wiednio zmodyfikowane kości wołowe), który jest zdolny do całkowitej integracji z tkanką kostną człowieka. W celu zwiększenia skuteczności tego procesu, Bio-Oss jest pokrywany membraną kolagenową tzw. Bio-Guide, mającą za zadanie wspomaganie procesu gojenia tkanki kostnej.

Dwa kolejne wykłady zaprezentowała dr Edyta Brzóska (Zakład Cytologii, Instytut Zoologii UW). Pierwszy z nich dotyczył aktualnych tendencji w zastosowaniu przeciwciał. Ogólnie przeciwciała można podzielić na poliklonalne i monoklonalne. Te pierwsze są tanie w uzyskaniu, posiadają jednak dość liczne wady. Związane są one m. in. z możliwościami wystąpienia reakcji krzyżowych, brakiem standaryzacji oraz co za tym idzie trudnościami w uzyskiwaniu wiarygodnych wyników. Tych wad pozbawione są przeciwciała monoklonalne, które znalazły zastosowanie w szeregu technik badawczych takich jak: cytometria przepływowa, ELISA, ELISPOT, RIA czy hybrydyzacja Western blot. Przeciwciała monoklonalne znajdują także zastosowanie w terapii wybranych schorzeń człowieka. W drugim wystąpieniu prelegentka przedstawiła sposoby uzyskiwania oraz rodzaje linii komórkowych. Linie komórkową definiuje się jako populację komórek uzyskaną z hodowli pierwotnej po wielokrotnych pasażach. Linia taka wykazuje cechy ustabilizowania, co oznacza że jej komórki mają określone cechy (posiadają podobny fenotyp) i właściwości (określone tempo podziałów). Istnieje kilka rodzajów linii komórkowych: klonalne linie komórkowe, linie komórkowe ciągłe oraz linie komórkowe uzyskane z diploidalnych komórek i tkanek. Te ostatnie charakteryzują się określonym czasem hodowli, ograniczoną liczbą podziałów oraz szybkim starzeniem się komórek. Z kolei linie komórkowe ciągłe (pozyskiwane z komórek nowotworowych izolowanych z guzów), cechuje nieograniczony czas życia, nieskończona liczba pasażów oraz wysoka aktywność telomerazy. Utworzenie linii komórkowej ciągłej jest możliwe także z linii komórkowej o określonym czasie przeżycia w wyniku transformacji spontanicznej lub indukowanej.



Ostatni wykład w części teoretycznej wygłosiła mgr Iwona Grabowska (Zakład Cytologii, Instytut Zoologii UW), którego istotą było omówienie hodowli przestrzennych (hodowle 3-D). Najprostszym wariantem tego typu jest hodowla narządowa. Jej istota sprowadza się do hodowli małych narządów w całości lub fragmentów większych tkanek. Innym przykładem są hodowle agregatów i sferoidów. Te pierwsze zbudowane są z jednego lub wielu typów komórek, a ich powstawanie jest możliwe w hodowli dynamicznej (zawieszina komórek umieszczona jest w próbówce lub w butelce i poddana ruchowi kołowemu) lub statycznej (komórki są wysiane na substrat uniemożliwiający adhezję). Z kolei sferoidy powstają z agregatów, które przekroczyły krytyczną dla siebie średnicę. W takim przypadku w centralnej części agregatu powstaje martwica, która otoczona jest warstwą żywych komórek. Rozwinięciem hodowli 3-D jest system kokultur organotypowych. W tego rodzaju modelu dąży się do jak najbardziej wiernego odzwierciedlenia warunków panujących *in vivo*. Umożliwia to optymalny skład pożywki, kontakt komórek z macierzą zewnątrzkomórkową (ECM) oraz przestrzenne ułożenie komórek. Komercyjnym rozwiązaniem tego typu modelu stanowią naczynia z tzw. insertami. Naczynie takie wypełnione jest pożywką, natomiast na spód insertu nanosi się warstwę ECM. Do znanych przykładów kokultur organotypowych zalicza się m. in. hodowlę endometrium.

W części teoretycznej słuchacze mieli również okazję zaznajomić się z rozwiązaniami jakie proponują w dziedzinie hodowli komórkowej znane firmy działające na naszym rynku. Firma Becton Dickinson Biosciences przedstawiła szeroką gamę produktów do hodowli komórkowej oraz do badania właściwości funkcjonalnych komórek. Przedstawiciele z firmy Alab zaprezentowali najnowszą ofertę pożywek i surowic, z kolei firma Precoptic przedstawiła podstawowe zasady technik mikroskopowych. W kolejnej prezentacji przedstawiciel firmy Zeiss wyjaśnił zasady działania skaningowego mikroskopu konfokalnego. Na koniec swoją ofertę przedstawiła firma LGC Promochem,

która jest wyłącznym przedstawicielem Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ATCC).

W części praktycznej, liczącej łącznie około 20 godzin, miały miejsce zajęcia laboratoryjne obejmujące następujące zagadnienia: uzyskiwanie blastocyst z samic myszy po superowulacji, umieszczanie wyizolowanych blastocyst w hodowli na warstwie inaktywowanych fibroblastów, izolacja kanalików nerkowych z kory nerki królika oraz ich późniejsza hodowla, rozmrażanie linii HL-60, C2C12 oraz zakładanie na ich bazie hodowli komórkowej, uzyskiwanie linii ES w wyniku dezagregacji węzła zarodkowego blastocyst, zakładanie hodowli komórek linii MG-63

i C2C12 w kolagenie (hodowla 3-D), pasażowanie komórek linii HL-60 i C2C12 oraz mrożenie (bankowanie) komórek linii HL-60 oraz C2C12.

Podsumowując „Letni Kurs Hodowli Komórek Zwierzęcych dla zaawansowanych” można śmiało stwierdzić, że było to udane przedsięwzięcie zarówno pod względem organizacyjnym jak i merytorycznym. Chciałbym bardzo podziękować organizatorom za możliwość uczestnictwa oraz wszystkim sponsorom za pomoc i wsparcie jakie było niezbędne przy organizacji kursu. Z kolei wszystkim tegorocznym kursantom życzę udanych doświadczeń oraz następnego spotkania na podobnym tego typu szkoleniu.

## LIST DO REDAKCJI

### MOBILNOŚĆ A KARIERA NAUKOWA PO DOKTORACIE

Szanowny Panie Redaktorze,

Obecnie na studiach doktoranckich przebywa ponad 30 tys. osób, z czego rocznie tytuł uzyskuje średnio prawie 3600 osób (średnia wartość z lat 1995–2002) [1]. Wprawdzie nauki przyrodnicze, wg danych z 2000 roku, stanowią niewielki odsetek z tej liczby [2], niemniej jednak dla wielu osób z uzyskanym tytułem drogi dalszej kariery wydają się być dość kręte. Przyczyn takiego stanu rzeczy jest kilka. Nie wdając się w szczegóły związane jest to przede wszystkim z zawirowaniami wokół finansowania polskiej nauki oraz z mentalnością części środowiska naukowego. Problem ten był szeroko dyskutowany zarówno w piśmiennictwie polskim jak i zagranicznym [3,4]. Wszystko to razem sprawia, że studia doktoranckie to jeden z trudniejszych etapów kariery naukowej, niemniej jednak jeszcze większym wyzwaniem staje się umiejętne zaplanowanie dalszej kariery po uzyskaniu tytułu.

DALSZE PLANOWANIE DROGI  
NAUKOWEJ. Nierzadko pozytywne ukończenie doktoratu nie jest gwarantem zatrudnienia w macierzystej jednostce naukowej. W tym świetle jednym z rozwiązań jest wykształcenie zdolności do szybkiego przemieszczania tam gdzie warunki rozwoju są optymalne. Mobilność można zatem

rozpatrywać w dwóch płaszczyznach: wewnętrznej i zewnętrznej. Dalszy podział może dotyczyć wariantu obranej ścieżki rozwoju: akademicka czy w kierunku przemysłu.

MOBILNOŚĆ WEWNĘTRZNA – OGRANICZONE MOŻLIWOŚCI. Aktualnie przemieszczanie się pomiędzy ośrodkami naukowymi w obrębie kraju wydaje się być ograniczone z powodu zbyt małej liczby tego typu placówek jak również dysproporcji w liczbie absolwentów studiów doktoranckich do ilości tworzonych etatów. Wg planów Narodowego Planu Rozwoju wydatki na naukę mają być zwiększone do 1,5% PKB (obecnie 0,7%), co powinno teoretycznie przełożyć się na jej lepsze perspektywy rozwoju [1]. Innym optymistycznym trendem jest tworzenie dużych jednostek naukowych np. Wielkopolskiego Centrum Biotechnologii Medycznej [5] czy pomysł wprowadzenia tzw. stypendiów podoktorskich (habilitacyjnych) [6]. Nie zmienia to faktu, że na wyniki tych zmian przyjdzie jeszcze zapewne trochę poczekać.

Z kolei migracja w kierunku przemysłu w przypadku doktorów nauk przyrodniczych (szczególnie jeśli chodzi o biologię molekularną, biochemię, biotechnologię czy kierunki pokrewne) jest trudna a czasami wręcz niemożliwa. Przyczyna tego stanu rzeczy sprowadza się do tego, że współpraca pomiędzy zespołami

badawczymi placówek naukowych a potencjalnie zainteresowanymi firmami jest trudna a często niemożliwa. Inną kwestią jest, że liczba firm z nowoczesnymi zespołami badawczo-rozwojowymi w zakresie biotechnologii czy farmacji jest w naszym kraju wciąż słabo rozwinięta [7].

Reasumując, obecny stan rzeczy, określający mobilność wewnętrzną zarówno w płaszczyźnie akademickiej jak i przemysłowej, nie jest zbyt atrakcyjny dla młodych naukowców. Oznacza to, że w celu zwiększenia szans w kierunku pełnego wykorzy-

stania swojego potencjału intelektualnego powinni oni szukać swojej szansy w mobilności zewnętrznej.

**MOBILNOŚĆ ZEWNĘTRZNA – OPTYMISTYCZNE PERSPEKTYWY.** Plany Uni Europejskiej zawierające się w dostosowaniu wydatków na badania i rozwój na poziomie 3% PKB, wymuszają w niedalekiej przyszłości duże zapotrzebowanie na dobrze wyszkolonych specjalistów. W celu swobodniejszego przepływu naukowców, w styczniu 2000 roku, powołano do życia Europejską Przestrzeń Badawczą (ang. *European*

*Research Area – ERA*). W kolejnych etapach, w celu zwiększenia tempa mobilności, ustanowiono w Internecie tzw. Europejskie Portale Mobilności (ang. *European Research Mobility Portal*) a w poszczególnych krajach UE tzw. punkty kontaktowe, których zadaniem jest dostarczanie informacji na temat warunków mobilności oraz ofert wyjazdowych [8]. Tych ostatnich najwięcej jest w ramach tzw. programów ramowych UE (stypendia Marie-Curie). Nie brakuje również innych organizacji, u których można ubiegać się o stypendium naukowe na po-

**Tabela 1.** Wykaz fundacji w których można ubiegać o różnego rodzaju stypendia (badawcze, nagrody itp.); źródło: strony internetowe: <http://www.eracareers-poland.gov.pl/> (Europejski Portal Mobilności) oraz wyszukiwarka internetowa Google.pl (<http://www.google.pl>).

Pochodzenie fundacji	Nazwa fundacji	Adres internetowy
polskie	Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej	<a href="http://www.fnpp.org.pl/">http://www.fnpp.org.pl/</a>
	Loreal dla Kobiet Nauki	<a href="http://www.lorealdlakobietnauki.pl/">http://www.lorealdlakobietnauki.pl/</a>
	Biuro Uznawalności Wykształcenia i Wymiany Międzynarodowej	<a href="http://www.buwim.edu.pl/wym/intro.htm">http://www.buwim.edu.pl/wym/intro.htm</a>
	Fundacja Crescendum Est Polonia	<a href="http://www.crescendumest.pl/">http://www.crescendumest.pl/</a>
	Fundacja Tomasza Jakuba Michalskiego	<a href="http://www.fundacjatjm.pl/">http://www.fundacjatjm.pl/</a>
	Fundacja im. Macieja Nowickiego	<a href="http://www.fundnowickiego.pl">http://www.fundnowickiego.pl</a>
	Fundacja Tygodnika Polityka (konkurs: „Zostańcie z nami”)	<a href="http://polityka.onet.pl/162,1205147,1,0,artykul.html">http://polityka.onet.pl/162,1205147,1,0,artykul.html</a>
	Aleksander von Humboldt Foundation	<a href="http://www.avh.de/en/programme/stip_aus/index.htm">http://www.avh.de/en/programme/stip_aus/index.htm</a>
	British Council (The Polish – British Research Partnership Programme)	<a href="http://www.britishcouncil.org/poland-research-partnership-programme.htm">http://www.britishcouncil.org/poland-research-partnership-programme.htm</a>
	Europejska Organizacja Biologii Molekularnej (EMBO)	<a href="http://www.embo.org/organisation/index.html">http://www.embo.org/organisation/index.html</a>
zagraniczne	The Ernst Schering Research Foundation	<a href="http://www.schering-fg.de/html/index.html">http://www.schering-fg.de/html/index.html</a>
	Fundacja Gotteba Daimlera i Karla Benza	<a href="http://www.daimler-benz-stiftung.de/home/en/start.html">http://www.daimler-benz-stiftung.de/home/en/start.html</a>
	Fundacja Kościuszkowska	<a href="http://www.kosciuszkofoundation.org/">http://www.kosciuszkofoundation.org/</a>
	Fundacja Taibunkyo	<a href="http://www.taibunkyo.com/activity/kikin_e.htm">http://www.taibunkyo.com/activity/kikin_e.htm</a>
	Fundacja Volkswagena	<a href="http://www.volkswagen-stiftung.de/english.html">http://www.volkswagen-stiftung.de/english.html</a>
	IARC – Fellowship for Cancer Research	<a href="http://www.iarc.fr/ENG/Fellowships/index.html">http://www.iarc.fr/ENG/Fellowships/index.html</a>
	Max Planck Society	<a href="http://www.mpg.de/english/portal/index.html">http://www.mpg.de/english/portal/index.html</a>
	Niemiecka Centrala Wymiany Akademickiej (DAAD)	<a href="http://www.daad.pl/index.php?lang=pl&amp;d=stypendia_pol">http://www.daad.pl/index.php?lang=pl&amp;d=stypendia_pol</a>
	Niemiecka Wspólnota Badawcza (DFG)	<a href="http://www.dfg.de/en/international/young_researchers/index.html">http://www.dfg.de/en/international/young_researchers/index.html</a>
	Stypendia Naukowego Instytutu Szwedzkiego	<a href="http://www.sweden.se/templates/cs/Article___5001.aspx">http://www.sweden.se/templates/cs/Article___5001.aspx</a>
	Stypendia Marie – Curie	<a href="http://mc-opportunities.cordis.lu/">http://mc-opportunities.cordis.lu/</a>
	The Royal Society	<a href="http://www.royalsoc.ac.uk/landing.asp?id=11">http://www.royalsoc.ac.uk/landing.asp?id=11</a>
	UNESCO	<a href="http://portal.unesco.org/en/ev.php-URL_ID=7972&amp;URL_DO=DO_TOPIC&amp;URL_SECTION=201.html">http://portal.unesco.org/en/ev.php-URL_ID=7972&amp;URL_DO=DO_TOPIC&amp;URL_SECTION=201.html</a>
	Serono Research Foundation	<a href="http://www.serono-foundation.org/fellowships.htm">http://www.serono-foundation.org/fellowships.htm</a>
	The Lalor Foundation	<a href="http://www.lalorfound.org">http://www.lalorfound.org</a>
	Polsko-Amerykańska Fundacja Fulbrighta	<a href="http://www.fulbright.edu.pl/">http://www.fulbright.edu.pl/</a>
	Czesław M. Rodkiewicz Scholarship Foundation	<a href="http://republika.pl/cmrsf">http://republika.pl/cmrsf</a>

**Tabela 2.** Przykładowe strony internetowe na których można wyszukać informacje na temat możliwości zatrudnienia w sektorze akademickim lub przemysłowym (źródło informacji: wyszukiwarka internetowa Google.pl <http://www.google.pl>); objaśnienia symboli użytych w tabeli: ☺☺ – można zobaczyć, ☺☺☺ – konieczne trzeba odwiedzić

L.p.	Adres internetowy	Opis (uwagi)
1	<a href="http://www.biodoktorat.pl">http://www.biodoktorat.pl</a>	☺☺☺
2	<a href="http://www.biotechnologia.com.pl">http://www.biotechnologia.com.pl</a>	☺☺☺
3	<a href="http://www.immuno.pl">http://www.immuno.pl</a>	☺☺
4	<a href="http://www.eracareers-poland.gov.pl/">http://www.eracareers-poland.gov.pl/</a>	☺☺☺
5	<a href="http://www.sciencejobs.com">http://www.sciencejobs.com</a>	☺☺☺
6	<a href="http://nextwave.sciencemag.org/pdn/">http://nextwave.sciencemag.org/pdn/</a>	☺☺☺
7	<a href="http://www.grantsnet.org/">http://www.grantsnet.org/</a>	☺☺☺
8	<a href="http://info.ki.se/research/juniorfaculty/postdoc/">http://info.ki.se/research/juniorfaculty/postdoc/</a>	☺☺☺
9	<a href="http://www.findapostdoc.com/firstmain.asp">http://www.findapostdoc.com/firstmain.asp</a>	☺☺☺
10	<a href="http://www.naturejobs.com">http://www.naturejobs.com</a>	☺☺☺
11	<a href="http://www.newscientistjobs.com">http://www.newscientistjobs.com</a>	☺☺☺
12	<a href="http://www.biochemist.org/jobs">http://www.biochemist.org/jobs</a>	☺☺☺
13	<a href="http://www.microbes.org/jobs.asp">http://www.microbes.org/jobs.asp</a>	☺☺
14	<a href="http://jobs.phds.org/jobs">http://jobs.phds.org/jobs</a>	☺☺☺
15	<a href="http://www.bio.com">http://www.bio.com</a>	☺☺
16	<a href="http://bioview.com">http://bioview.com</a>	☺☺
17	<a href="http://www.biospacejobs.com/bspj/servlet/BSPJHome">http://www.biospacejobs.com/bspj/servlet/BSPJHome</a>	☺☺
18	<a href="http://www.sciencekomm.at/careers.html">http://www.sciencekomm.at/careers.html</a>	☺☺☺
19	<a href="http://www.biorole.com">http://www.biorole.com</a>	☺☺
20	<a href="http://www.wetfeet.com">http://www.wetfeet.com</a>	☺☺☺
21	<a href="http://science-biotech.careerbuilder.com">http://science-biotech.careerbuilder.com</a>	☺☺☺
22	<a href="http://www.academic360.com">http://www.academic360.com</a>	☺☺☺
23	<a href="http://www.phdjobs.com">http://www.phdjobs.com</a>	☺☺
24	<a href="http://www.biocareer.com">http://www.biocareer.com</a>	☺☺
25	<a href="http://www.biotechnologyireland.com">http://www.biotechnologyireland.com</a>	☺☺
26	<a href="http://biotech.jobs.net">http://biotech.jobs.net</a>	☺☺
27	<a href="http://www.science-jobs.org">http://www.science-jobs.org</a>	☺☺
28	<a href="http://www.biolinkdirect.com">http://www.biolinkdirect.com</a>	☺☺☺
29	<a href="http://www.postdocjobs.com/">http://www.postdocjobs.com/</a>	☺☺
30	<a href="http://www.cyberpostdoc.org/mambo/">http://www.cyberpostdoc.org/mambo/</a>	☺☺
31	<a href="http://www.kowi.de/en/youngscientists/postdocs/default.htm">http://www.kowi.de/en/youngscientists/postdocs/default.htm</a>	☺☺☺
32	<a href="http://europa.eu.int/eracareers/index_en.cfm">http://europa.eu.int/eracareers/index_en.cfm</a>	☺☺☺

trzeby wyjazdu w obszarze Europy, USA czy Japonii (Tabela 1). Oprócz tego przydatnym źródłem informacji w poszukiwaniu możliwości wyjazdu na staż podoktorski (ang. *post-doc*) są strony internetowe, np.: sciencejobs.com czy naturejobs.com. Popularność nauk przyrodniczych przedkłada się zresztą na coraz ich liczniejszą liczbę w Internecie, co ułatwia optymalne zaplanowanie kariery po ukończeniu doktoratu (Tabela 2).

Powodzenie wyjazdu zagranicznego zależy przede wszystkim od umiejętności swobodnej komunikacji oraz skali posiadanego dorobku naukowego. Niemniejszą przeszkodą są kwestie rodzinne, choć w tym względzie można czasami liczyć na wsparcie ze strony ośrodka zaprasza-

jącego. Dużym także problemem są powroty z wyjazdów zagranicznych, szczególnie w momencie gdy przed wyjazdem nie miało się etatu. Pomocą w tym kierunku służą niektóre fundacje. Stypendyści Marie-Curie mogą liczyć na otrzymanie tzw. grantów reintegracyjnych w wysokości około 40 tys. euro, pomoc oferuje także swoim stypendystom Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej [9].

Podsumowując wyjazdy zagraniczne są dobrą alternatywą w stosunku do aktualnie panujących warunków w Polsce. Wprawdzie zmiany w naszym kraju są dostrzegalne, nie zmienia to jednak faktu, że na ich wyniki będzie trzeba jeszcze poczekać. Wyjazd po doktoracie jest zatem ważnym elementem rozwoju przyszłego

naukowca a rezultaty z tak powziętej decyzji na pewno zaprocentują w przyszłości, co z pewnością będzie korzystne także dla rozwoju polskiej nauki. W tym świetle nie jest zatem istotne ile osób wyjeżdża, ale ile z nich zdecyduje się na powrót [10].

## PIŚMIENICTWO

- Okon-Horodyńska E (2003) Nauka, B+R – źródła innowacyjności gospodarki. MNIiI, [http://www.uj.edu.pl/citru/prezent/Okon-Horodynska\\_29\\_03.ppt](http://www.uj.edu.pl/citru/prezent/Okon-Horodynska_29_03.ppt)
- Bartosik M. Udział szkół wyższych w badaniach naukowych i rozwoju kadr, [www.kbn.gov.pl/pub/kbninfo/artkuul\\_mb.doc](http://www.kbn.gov.pl/pub/kbninfo/artkuul_mb.doc)
- Zagrodzka D (2004). Czy w Polsce można zrobić karierę w nauce? Serwis internetowy [gazeta.pl](http://gazeta.pl) (dostęp płatny)
- Schiermeier Q (2003) Poles apart, or together with Europe? *Nature* 421: 471-472
- Serwis biotechnologiczny [biotechnologia.com.pl](http://www.biotechnologia.com.pl) (2005), <http://www.biotechnologia.com.pl/index.php?sectionID=79&show=105>
- PAP (2004) Prof. Legocki: promujemy młodych naukowców. <http://www.iitd.pan.wroc.pl/events/Legocki040603.html>
- Pietrucha T (2003) Biotechnologia jako szansa przyspieszenia rozwoju gospodarczego Polski, W: Kotarba W (red) Patentowanie wynalazków biotechnologicznych. Warszawa-Wrocław, str. 31-38
- Commission of the European Communities (2003) A mobility strategy for the European Research Area. Brussels 4.2.2003, SEC (2003) 146, [http://europa.eu.int/eracareers/docs/SEC\\_2003\\_146-EN.pdf](http://europa.eu.int/eracareers/docs/SEC_2003_146-EN.pdf)
- Holdys A. (2004) Naukowiec wraca, Bruksela wypłaca do 40 tys. euro. Serwis internetowy [gazeta.pl](http://gazeta.pl), <http://serwis.gazeta.pl/nauka/1,34148,2381790.html>
- Rozner K (2002) Ci odlatują, ci zostają. *Sprawy Nauki* 6 (79), [http://www.sprawnauki.waw.pl/?section=article&ref=issue&art\\_id=484](http://www.sprawnauki.waw.pl/?section=article&ref=issue&art_id=484)

## Grzegorz B. Gmyrek

Laboratorium Immunologii Rozrodu, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław tel.: (71) 337 11 72, faks: (71) 337 13 82 e-mail: [gregoire@hotmail.pl](mailto:gregoire@hotmail.pl)

# Kalretikulina, białko opiekuńcze regulujące stężenie $\text{Ca}^{2+}$ w siateczce śródplazmatycznej

Małgorzata Szperl<sup>1,2</sup>

Michał Opas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Samodzielna Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Kardiologii, Warszawa, Polska  
<sup>2</sup>Zakład Anatomii i Biologii Komórki, Uniwersytet w Toronto, Ontario, Kanada

<sup>3</sup>Samodzielna Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Kardiologii, ul. Alpejska 42, 04-628 Warszawa, Polska; e-mail: mszperl@yahoo.com, tel. (22) 343 44 27

Artykuł otrzymano 25 kwietnia 2005 r.  
Artykuł zaakceptowano 5 maja 2005 r.

**Słowa kluczowe:** białka opiekuńcze, siateczka śródplazmatyczna, homeostaza wapnia, rozwój mięśnia sercowego

**Wykaz skrótów:** CRT – kalretikulina; CNX – kalneksyna; eNOS – izoforma syntazy tlenku azotu ulegająca ekspresji w komórkach nabłonkowych; ER(SR) – siateczka śród(sarko)plazmatyczna;  $\text{RIP}_3$  – receptor inozytolotrójfosforanu (kanał wapniowy uwalniający  $\text{Ca}^{2+}$  z ER/SR); RyR – receptor rianodyny (kanał uwalniający jony wapnia z ER/SR); SR – siateczka sarkoplazmatyczna; SERCA – izoformy ATPazy transportującej jony wapnia zlokalizowane w siateczce śród(sarko)plazmatycznej

## STRESZCZENIE

Siateczka śród(sarko)plazmatyczna (ER/SR), rozbudowany system błon wewnątrzkomórkowych, odgrywa ważną rolę w procesie syntezy białek. System ten jest także wewnątrzkomórkowym magazynem przechowywania i uwalniania  $\text{Ca}^{2+}$ . Kalretikulina, zlokalizowana wewnątrz ER(SR), jedno z podstawowych białek tych błon, spełnia dwie główne funkcje – białka wiążącego i magazynującego  $\text{Ca}^{2+}$ , a także białka opiekuńczego na szlaku kontroli jakości nowosyntetyzowanych cząsteczek białek w ER. Ekspresja kalretikuliny w mięśniu sercowym jest najwyższa w rozwoju embrionalnym. U myszy transgenicznym z wywołaną doświadczalnie nadekspresją tego białka w mięśniu sercowym, zaobserwowano zaburzenia rytmu pracy serca, prowadzące do zatrzymania akcji serca i śmierci zwierzęcia tuż po narodzinach, co może świadczyć o kluczowej roli kalretikuliny w rozwoju i funkcji serca.

## WPROWADZENIE

Wszystkie białka wydzielane na zewnątrz komórki oraz składniki błon biologicznych są syntetyzowane w ER. W tym samym czasie w ER zachodzi wiele niezależnych procesów syntezy białek. Procesy te przebiegają przy współdziałaniu szeregu białek opiekuńczych, które zapobiegają między innymi nieprawidłowym oddziaływaniom pomiędzy nowosyntetyzowanymi cząsteczkami białek i odgrywają rolę w systemie kontroli jakości. Udział białek opiekuńczych w rozwoju różnorodnych stanów chorobowych jest dobrze udokumentowany [1,2]. System błon ER stanowi podstawowy wewnątrzkomórkowy magazyn wapnia, który występuje tam w formie zjonizowanej, a przede wszystkim w formie związanej z białkami opiekuńczymi. Jony wapnia uczestniczą w wielu zależnych od zmian stężenia tego kationu procesach w ER, między innymi w rozwoju mięśnia sercowego [3]. Kalretikulina (CRT) jest głównym białkiem opiekuńczym występującym w ER, białkiem wiążącym  $\text{Ca}^{2+}$ . Białko to z dużą wydajnością buforuje wapń. Wyniki badań na zwierzętach transgenicznym wskazują, że kalretikulina odgrywa znaczącą rolę w fizjologii serca. Zatem w niniejszej pracy przeglądowej podjęto problematykę udziału kalretikuliny w homeostazie wapnia w komórce oraz w rozwoju serca w normie i w stanach patologicznych.

## KALRETIKULINA: GEN I BIAŁKO

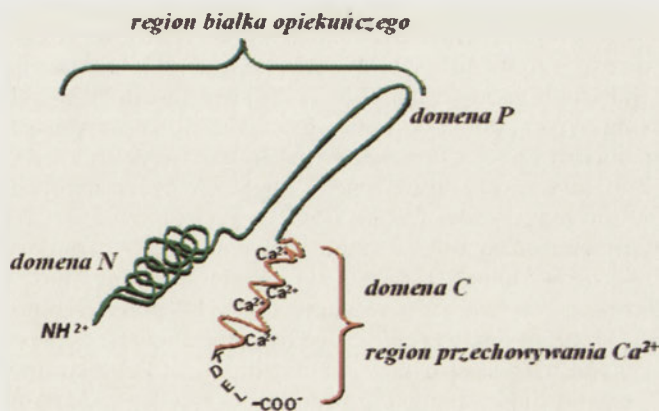
W 1974 roku wyizolowano białko o wysokim powinowactwie do  $\text{Ca}^{2+}$  z siateczki śródplazmatycznej (SR) mięśni królika i nazwano je HACBP (ang. *high-affinity calcium binding protein*) [4]. Po przeprowadzeniu wstępnej charakterystyki [5] białko HACBP nie budziło większego zainteresowania badaczy przez następne dziesięciolecie, aż do 1989 r., kiedy to wyizolowano cDNA kodujące HACBP [6]. Dalsza analiza wykazała, że białko HACBP jest jednym z podstawowych białek wiążących  $\text{Ca}^{2+}$  w ER(SR), dlatego też zmieniono jego nazwę z HACBP na kalretikulina. Badania nad genem kodującym białko CRT oraz jego strukturą pierwszorzędową dowiodły, że jego sekwencja jest zachowana w ewolucji [7-10], co stanowiło przesłankę do wysunięcia hipotezy, że kalretikulina odgrywa ważną rolę w komórce. Białko jest kodowane przez pojedynczy gen, dla którego nie stwierdzono zachodzenia zjawiska różnicowego cięcia i składania RNA. Gen kodujący kalretikulinę człowieka zlokalizowany jest na 19 chromosomie, składa się z 9 eksonów i jest wielkości 3,6 kpb [11]. Jego odpowiednik u myszy zlokalizowany jest na 8 chromosomie i jest wielkości 4,6 kpb. Nukleotydowe sekwencje genu człowieka i myszy wykazują wysoki (około 70%) stopień wzajemnego podobieństwa. Także organizacja tych genów jest prawie identyczna z wyjątkiem intronów 3 i 6 [12,13]. Promotor kalretikuliny zawiera miejsca wiążące czynniki transkrypcyjne (AP-1, AP-2, Sp1 i H4TF), sekwencję bogatą w zasady GC oraz cztery powtarzające się sekwencje CCAAT [11,12]. Miejsca wiążące czynniki transkrypcyjne AP-2 i H4TF zazwyczaj spotyka się w promotorach genów, które są aktywowane w czasie proliferacji komórek. Nie ma dowodów na istnienie miejsc wiążących czynniki transkrypcyjne NF-AT i NK- $\kappa$ B w promotorze genu

kalretikuliny. Opróżnienie magazynów ER(SR) z  $\text{Ca}^{2+}$  przez zahamowanie aktywności ATPazy SERCA w obecności specyficznego inhibitora enzymu, tapsigarginy, powoduje kilkukrotny wzrost aktywności promotora, a co za tym idzie wzrost poziomu mRNA i białka CRT [11,12]. Promotor kalretikuliny może być także aktywowany przez  $\text{Zn}^{2+}$ , białka szoku termicznego [13], lub w wyniku infekcji wirusowej [14].

Kalretikulina jest białkiem o masie cząsteczkowej 46 kDa. Analiza strukturalna CRT pozwoliła na identyfikację trzech odrębnych domen [15-17]. Rejon N-końcowy białka (domena N) zawiera sekwencję sygnałową [16] oraz potencjalne miejsca fosforylacji i glikozylacji, i charakteryzuje się zachowaną w ewolucji strukturą pierwszorzędową [15]. Domena N wiąże także jony cynku, DNA receptora glukokortykoidowego [18], RNA wirusa *Rubella* [16,17],  $\alpha$ -integrynę i białko Erp57 [19,20]. Domena ta uczestniczy między innymi w hamowaniu proliferacji komórek nabłonkowych i hamowaniu angiogenezy [21]. Domena P tworzy łącznik pomiędzy domenami N i C (rejon C-końcowy białka) [22]. W jej skład wchodzi rejon A bogaty w reszty proliny oraz rejon B o sekwencji podobnej do występującej w kalneksynie (CNX) [14]. Rejony A i B pełnią podstawową funkcję w podobnej do lektyn aktywności kalretikuliny jako białka opiekuńczego. Domena P wiąże jony wapnia z wysokim powinowactwem i małą wydajnością [23-25], charakteryzując się sekwencją aminokwasową przypominającą inne białka opiekuńcze wiążące  $\text{Ca}^{2+}$ , takie jak CNX [26] i kalmegina [27]. Domena ta stanowi także miejsce wiązania innych białek opiekuńczych [28]. Domena C, na której końcu zlokalizowana jest sekwencja KDEL, odpowiada za oddziaływanie CRT z ER(SR). Domena C odgrywa kluczową rolę w magazynowaniu  $\text{Ca}^{2+}$  w ER(SR), charakteryzując się wprawdzie niskim powinowactwem, ale wysoką wydajnością wiązania kationu ( $>25$  moli  $\text{Ca}^{2+}$ /mol białka) [29]. Ponadto wiąże prawdopodobnie czynniki krzepnięcia krwi i stymuluje ekspresję izoformy syntazy tlenku azotu (eNOS) [30], a także hamuje zjawisko restenozy spowodowane uszkodzeniem mechanicznym. W szczególności obecność domeny C powoduje zahamowanie rozwoju płytki miażdżycowej oraz redukcję rozrostu (hiperplazji) błony wewnętrznej naczyń uszkodzonych w wyniku angioplastyki z użyciem balonika [31]. Jakkolwiek kalretikulinę zidentyfikowano w ER(SR), to jednak istnieją doniesienia o innej niż ER(SR) lokalizacji tego białka. Prawdopodobnie wynika to z oddziaływania CRT z DNA receptora steroidowego (lokalizacja jądrowa) i eksponowanym do cytosolu „ogonkiem”  $\alpha$ -integryny (lokalizacja cytoplazmatyczna) [17,32]. Model cząsteczki kalretikuliny przedstawiono na rysunku 1 [33].

#### FUNKCJE KALRETIKULINY

Początkowe badania CRT skupiały się na zdolnościach tego białka do wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  i modulowania homeostazy wapnia w komórce [34]. Wkrótce okazało się, że kalretikulina uczestniczy w wielu procesach w komórce, począwszy od regulacji ekspresji genów, udziału w adhezji komórkowej, w apoptozie i w regulacji aktywności ATPazy SERCA2 [30,32,34-36]. Obecnie uważa się, że CRT zlokalizowana w ER(SR), odgrywa rolę białka opiekuńczego. Białka opiekuńcze zapobiegają niewłaściwym oddziaływaniom pomię-



**Rysunek 1.** Model cząsteczki kalretikuliny. Na schemacie pokazano trzy domeny kalretikuliny. Bogata w reszty proliny domena P tworzy charakterystyczną pętlę i łączy globularną domenę N z domeną C. Domeny P i N są prawdopodobnie odpowiedzialne za funkcjonowanie kalretikuliny jako białka opiekuńczego, natomiast domena C pełni funkcje magazynu  $\text{Ca}^{2+}$ . Istnienie domen P i N oparto na wynikach badań strukturalnych z zastosowaniem NMR [23] i metod krystalograficznych [30]. W chwili obecnej brak jest informacji na temat struktury domeny C.

dzy nowosyntetyzowanymi białkami i zwiększają liczbę prawidłowo złożonych kompleksów białkowych. W ostatnich latach ukazało się wiele publikacji dokumentujących fakt, że CRT, podobnie jak CNX, jest białkiem o właściwościach zbliżonych do lektyn, pełniącym funkcję białka opiekuńczego dla wielu białek, w tym także ligandów dla CNX. Zarówno CRT jak i CNX prawdopodobnie współdziałają jako system kontroli jakości podczas syntezy różnych białek, na przykład kanałów jonowych, receptorów powierzchniowych i integryn [37]. Dobrym przykładem współdziałania obu białek opiekuńczych jest synteza kompleksu MHC klasy I, jakkolwiek, należy to podkreślić, ekspresja i transport kompleksu MHC klasy I nie ulegają zaburzeniom w komórkach z niedoborem CNX, co sugeruje, że ekspresja CNX nie jest krytyczna dla funkcji CRT [38,39]. Kwestią do końca nie wyjaśnioną pozostaje, w jaki sposób CRT kontroluje proces syntezy białek, w jaki sposób oddziałuje z innymi białkami opiekuńczymi oraz jaką rolę w tych procesach odgrywają jony wapnia?

#### HOMEOSTAZA WAPNIA

Stężenie wapnia w magazynach ER(SR) jest o wiele wyższe niż w cytosolu. Jony wapnia są uwalniane z ER(SR) poprzez specyficzne kanały zlokalizowane w tych błonach, receptor izotolotrisfosforanu ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) i receptor rianodyny (RyR), zaś z powrotem dostają się do wnętrza magazynów ER/SR w wyniku działania pompy wapniowej, ATPazy SERCA. Istnieją trzy geny o zróżnicowanej ekspresji kodujące izoformy ATPazy SERCA. Izofорма SERCA1 występuje w mięśniach szkieletowych, izofорма SERCA3 w komórkach niemięśniowych, a izofорма SERCA2a w mięśniu sercowym (izofорма SERCA2b, z charakterystycznym wydłużonym rejonem C-końcowym, ulega ekspresji w komórkach mięśni gładkich i w komórkach niemięśniowych). Koekspresja kalretikuliny i izoformy ATPazy SERCA2b powoduje zwiększone uwalnianie  $\text{Ca}^{2+}$  z magazynów ER(SR) [36]. Sugeruje się, że dodatkowa (w stosunku do izoformy SERCA2a) sekwencja obecna w C-końcowym rejonie ATP-

azy SERCA2b ulega glikozylacji *in vivo* na reszcie N1036; z resztą tą oddziałuje również CRT. Związanie kalretikuliny z izoformą SERCA2b może hamować transport  $\text{Ca}^{2+}$  do magazynów ER(SR). W przypadku braku połączenia z kalretikulina izoforma SERCA 2b pozostawałaby w pełni aktywna i zdolna do transportu  $\text{Ca}^{2+}$  [36]. W warunkach niedoboru  $\text{Ca}^{2+}$  nie dochodziło by do oddziaływania CRT-SERCA2b, co w konsekwencji prowadziło by do napływu  $\text{Ca}^{2+}$  do magazynów ER(SR) (Rys. 2). Podsumowując, CRT odgrywa ważną rolę w homeostazie wapnia w komórce wykazując zdolność regulacji aktywności izoformy SERCA 2b oraz wpływając na uwalnianie  $\text{Ca}^{2+}$  z ER przez receptor  $\text{IP}_3$  [36, 40]. Właściwości te mogą być modulowane poprzez jony wapnia wiążące się z domenami C i P kalretikuliny. W szczególności domena P uczestniczy w wielu oddziaływaniach CRT z innymi białkami, dzięki swoim właściwościom lektynopodobnym [41]. Wszystko wskazuje na to, że zmiany patologiczne obserwowane u myszy z niedoborem CRT są bezpośrednio związane z brakiem tego białka jako modulatora homeostazy  $\text{Ca}^{2+}$  [40,42]. Jako inne wytłumaczenia proponuje się, że CRT jako białko opiekuńcze może mieć wpływ na modyfikacje potranslacyjne białek uczestniczących w homeostazie wapnia, ich składanie i wewnątrzkomórkowy transport. Wyizolowane z mysich embrionów komórki pnia pozbawione CRT mają zahamowaną zdolność adhezji za pośrednictwem integrzyn [35].

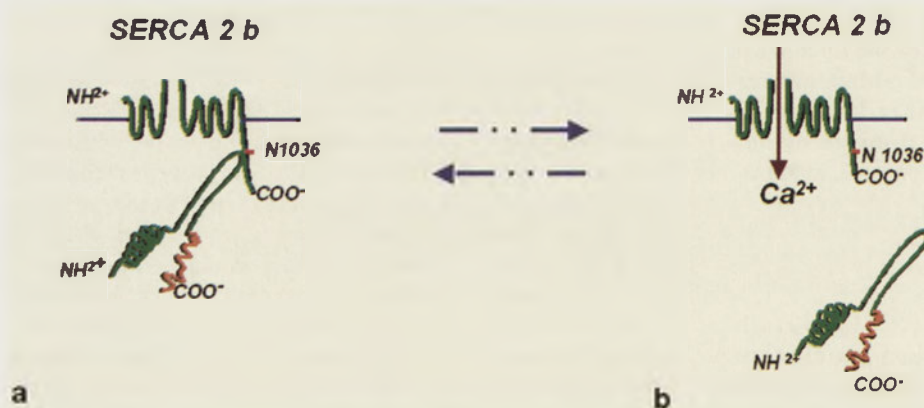
#### KALRETIKULINA W ROZWOJU MIĘŚNIA SERCOWEGO

Jakkolwiek kalretikulina stanowi niewielki procent białek mięśnia sercowego, to jednak odgrywa znaczącą rolę w jego rozwoju. Myszy pozbawione CRT charakteryzują się zahamowanym rozwojem mięśnia sercowego [42,43]. Ekspresja genu kalretikuliny jest szczególnie wysoka w rozwoju embrionalnym [44]. Homozygotyczne myszy z niefunkcyjnym genem kalretikuliny charakteryzują się zmniejszoną grubością ścian komór i znaczącą redukcją beleczek w ścianie komór [42]. Rozwój mięśnia sercowego w embrionach myszy z niedoborem kalretikuliny cechuje się zredukowaną liczbą miofibrili w komorach i przedsionkach, a także zmienionym ich kształtem [42,44]. Dodatkowo w tych zwierząt można zaobserwować zwiększoną aku-

mulację glikogenu. Ponadto wykazano, że w komórkach z wyłączoną ekspresją CRT zaburzeniom ulega translokacja czynnika transkrypcyjnego NF-AT. W komórkach prawidłowych stymulacja bradykininą powoduje wyrzut  $\text{Ca}^{2+}$  z ER(SR), oraz translokację NF-AT3 z sarkoplazmy do jądra. Komórki CRT<sup>-/-</sup> wykazują zahamowany wyrzut  $\text{Ca}^{2+}$  w odpowiedzi na stymulację bradykininą, oraz brak translokacji NF-AT3, co sugeruje że CRT odgrywa rolę jako jeden z komponentów szlaku transkrypcyjnego wiodącego przez  $\text{Ca}^{2+}$ -kalcyneurynę-NF-AT3-GATA4 [42].

#### UDZIAŁ KALRETIKULINY W STANACH PATOLOGICZNYCH SERCA

Wiadomo, że nadekspresja CRT powoduje zwiększenie ilości wapnia zmagazynowanego w komórce, podczas gdy brak CRT powoduje odwrotny skutek [45]. Transgeniczne myszy z nadekspresją CRT w mięśniu sercowym charakteryzują się zwolnioną częstością skurczu (bradykardia), co prowadzi do całkowitego zatrzymania pracy serca oraz pełnego bloku przedsionkowo-komorowego [44]. Obserwacja ta wskazuje, że kalretikulina odgrywa rolę w patologii i rozwoju systemu przewodzenia w mięśniu sercowym [46]. Co więcej, serca z nadekspresją kalretikuliny charakteryzują się niskim poziomem koneksyny 43, głównego składnika międzykomórkowych połączeń zwanych z ang. *gap-junctions* [46,47]. Ponadto wykazano, że nadekspresja CRT w kardiomioblastach promuje apoptozę poprzez hamowanie aktywności kinazy białkowej B i Akt [48]. Molekularne mechanizmy stanów patologicznych mięśnia sercowego wynikających ze zmian ekspresji kalretikuliny wymagają jednak dalszych badań. Bardzo ważne jest, że fenotyp myszy z nadekspresją kalretikuliny w mięśniu sercowym odpowiada symptomom opisanym dla dzieci z zaburzeniami pracy serca [49,50]. Mechanizmy leżące u podstaw tych stanów patologicznych są w chwili obecnej nieznane, jakkolwiek wydaje się, że kalretikulina przynajmniej w części jest odpowiedzialna za etiologię tej choroby. Białko to może mieć wpływ na homeostazę wapnia w trakcie różnicowania się kardiomiocytów oraz może odgrywać podstawową rolę w prawidłowej syntezie i składaniu szeregu białek mięśnia sercowego, takich jak kanały wapniowe i koneksyny.



**Rysunek 2.** Hipotetyczny mechanizm współdziałania pomiędzy kalretikulina a ATPazą SERCA2b. SERCA2b posiada dodatkową domenę transbłonową, której C-koniec zlokalizowany jest w świetle ER i zawiera potencjalne miejsce N-glikozylacji (reszta N1036). Metodą mutagenyzy punktowej wykazano, że obecność reszty N1036 jest krytyczna dla zależnej od kalretikuliny aktywacji SERCA2b. W oddziaływaniach tych uczestniczy domena P kalretikuliny [36]. Regulacja napływu  $\text{Ca}^{2+}$  do wnętrza komórki może odbywać się na zasadzie powstawania połączenia (a, brak napływu  $\text{Ca}^{2+}$ ) lub jego braku (b, napływ  $\text{Ca}^{2+}$ ) pomiędzy kalretikulina a izoformą ATPazy SERCA2b.

#### PODSUMOWANIE

Kalretikulina (CRT) jest specyficznym białkiem występującym w siateczce śród(sarko)plamacyjnej. Ulega ono wysokiej ekspresji w mięśniu sercowym w czasie rozwoju embrionalnego i posiada duży wpływ na prawidłowy rozwój serca; jako modulator homeostazy  $\text{Ca}^{2+}$  odgrywa zasadniczą rolę szczególnie we wczesnych etapach rozwoju serca. Z drugiej strony, wysoki poziom syntezy tego białka w okresie postnatalnym prowadzi do zaburzeń w systemie przewodzenia elektrycznego w mięśniu sercowym, aż do całkowitego zatrzymania akcji serca i śmierci.

## PIŚMIENICTWO

- Brooks DA (1999) Introduction: molecular chaperones of the ER: their role in protein folding and genetically disease. *Semin Cell Dev Biol* 10: 441-442
- Jacob CA, Chevet E, Thomas DY, Bergeron JJ (2001) Lectins of the ER quality control machinery. *Results Probl Cell Differ* 33: 1-17
- Jaconi M, Bony C, Richards SM, Terzic A, Arnaudeau S, Vassort G, Puecat M (2000) Inositol 1,4,5-triphosphate directs Ca<sup>2+</sup> flow between mitochondria and the endoplasmic/sarcoplasmic reticulum: A role in regulating cardiac autonomic Ca<sup>2+</sup> spiking. *Mol Biol Cell* 11: 1845-1858
- Ostwald TJ, MacLennan DH (1974) Isolation of a high affinity calcium binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 249: 974-979
- Michalak M, MacLennan DH. (1980) Assembly of sarcoplasmic reticulum. Biosynthesis of the high affinity calcium binding protein in rat skeletal muscle cultures. *J Biol Chem* 255: 1327-1334
- Smith MJ, Koch GL (1989) Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO J* 8: 3581-3586
- McCauliffe DP, Lux FA, Lieu TS, Sanz I, Hanke J, Newkirk MM, Bachinski LL, Itoh Y, Siciliano MJ, Reichlin M, Sontheimer RD, Capra JD (1990) Molecular cloning, expression, and chromosome 19 localization of a human Ro/SS-A autoantigen. *J Clin Invest* 85: 1379-1391
- Smith MJ (1992) *C. elegans* gene encodes a protein homologous to mammalian calreticulin. *DNA Seq* 2: 235-240
- Joshi M, Pogue GP, Duncan RC, Lee NS, Singh NK, Atreya CD, Dwyer DM, Nakhasi HL (1996) Isolation and characterization of *Leishmania donovani* calreticulin gene and its conservation of the RNA binding activity. *Mol Biochem Parasitol* 81: 53-64
- Denecke J, Carlsson LE, Vidal S, Hoglund AS, Ek B, van Zeijl MJ, Sinjorgo KM, Palva ET (1995) The tobacco homolog of mammalian calreticulin is present in protein complexes *in vivo*. *Plant Cell* 7: 391-406
- McCauliffe DP, Yang YS, Wilson J, Sontheimer RD, Capra JD (1992) The 5'-flanking region of the human calreticulin gene shares homology with the human GRP78, GRP94, and protein disulfide isomerase promoters. *J Biol Chem* 267: 2557-2562
- Waser M, Mesaeli N, Spencer C, Michalak M (1997) Regulation of calreticulin gene expression by calcium. *J Cell Biol* 138: 547-557
- Conway EM, Liu L, Nowakowski B, Steiner-Mosonyi M, Ribeiro SP, Michalak M (1995) Heat shock-sensitive expression of calreticulin. *In vitro* and *in vivo* up-regulation. *J Biol Chem* 270: 17011-17016
- Zhu J (1996) Ultraviolet B irradiation and cytomegalovirus infection synergize to induce the cell surface expression of 52-kD/Ro antigen. *Clin Exp Immunol* 103: 47-53
- Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M (1999) Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* 344: 281-292
- Fliegel L, Burns K, MacLennan DH, Reithmeier RA, Michalak M (1989) Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 264: 21522-21528
- Michalak M, Milner RE, Burns K, Opas M (1992) Calreticulin. *Biochem J* 285: 681-692
- Burns K, Duggan B, Atkinson EA, Famulski KS, Nemer M, Bleackley RC, Michalak M (1994) Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature* 367: 476-480
- Singh NK, Atreya CD, Nakhasi HL (1994) Identification of calreticulin as a rubella virus RNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12770-12774
- Atreya CD, Singh NK, Nakhasi HL (1995) The rubella virus RNA binding activity of human calreticulin is localized to the N-terminal domain. *J Virol* 69: 3848-3851
- Pike SE, Yao L, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, Nakhasi H, Teruya-Feldstein J, Wirth P, Gupta G, Tosato G (1998) Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med* 188: 2349-2356
- Corbett EF, Oikawa K, Francois P, Tessier DC, Kay C, Bergeron JJ, Thomas DY, Krause KH, Michalak M (1999) Ca<sup>2+</sup> regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *J Biol Chem* 274: 6203-11
- Ellgaard L, Riek R, Hermann T, Gunter P, Braun D, Helenius A, Wuthrich K (2001). NMR structure of the calreticulin P-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3133-3138
- Baksh S, Michalak M (1991) Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca<sup>2+</sup> binding domains. *J Biol Chem* 266: 21458-21465
- Tjoelker LW, Seyfried CE, Eddy RL Jr, Byers MG, Shows TB, Calderon J, Schreiber RB, Gray PW (1994) Human, mouse, and rat calnexin cDNA cloning: identification of potential calcium binding motifs and gene localization to human chromosome 5. *Biochemistry* 33: 3229-3236
- Bergeron JJ, Brenner MB, Thomas DY, Williams DB (1994) Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 19: 124-128
- Watanabe D, Yamada K, Nishina Y, Tajima Y, Koshimizu U, Nagata A, Nishimune Y (1994) Molecular cloning of a novel Ca<sup>2+</sup>-binding protein (calmegin) specifically expressed during male meiotic germ cell development. *J Biol Chem* 269: 7744-7749
- Frickel EM, Riek R, Jelesarov I, Helenius A, Wuthrich K, Ellgaard L (2002) TROSY-NMR reveals interaction between Erp57 and the tip of the calreticulin P-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1954-1959
- Nakamura K, Zuppin A, Arnaudeau S, Lynch J, Ahsan I, Krause R, Papp S, De Smedt H, Parys JB, Muller-Esterl W, Lew DP, Krause KH, Demaux N, Opas M, Michalak M (2001) Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol* 154: 961-972
- Kuwabara K, Pinsky DJ, Schmidt AM, Benedict C, Brett J, Ogawa S, Broekman MJ, Marcus AJ, Sciacca RR, Michalak M, Wang F, Pan YC, Grunfeld S, Patton S, Malinski T, Stern DM, Ryan J (1995) Calreticulin, an antithrombotic agent which binds to vitamin K-dependent coagulation factors, stimulates endothelial nitric oxide production, and limits thrombosis in canine coronary arteries. *J Biol Chem* 270: 8179-8187
- Dai E, Stewart M, Ritchie B, Mesaeli N, Raha S, Kolodziejczyk D, Hobman ML, Liu LY, Etches W, Nation N, Michalak M, Lucas A (1997) Calreticulin, a potential vascular regulatory protein, reduces intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2359-2368
- Dedhar S, Rennie PS, Shago M, Hagesteijn CY, Yang H, Filmus J, Hawley RG, Bruchovsky N, Cheng H, Matusik RJ, Giguère, V (1994) Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. *Nature* 367: 480-483
- Schrag JD, Bergeron JJM, Li Y, Borisova S, Hahn M, Thomas DY, Cygler M (2001) The structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol Cell* 8: 633-644
- Mery L, Mesaeli N, Michalak M, Opas M, Lew DP, Krause KH (1996) Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca<sup>2+</sup> storage and decreases store-operated Ca<sup>2+</sup> influx. *J Biol Chem* 271: 9332-9339
- Fadel MP, Dziak E, Lo CM, Ferrier J, Mesaeli N, Michalak M, Opas M (1999) Calreticulin affects focal contact-dependent but not close contact-dependent cell-substratum adhesion. *J Biol Chem* 274: 15085-15094
- John LM, Lechleiter JD, Camacho P (1998) Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J Cell Biol* 142: 963-973
- Rodan AR, Simons JF, Trombetta ES, Helenius A (1996) N-linked oligosaccharides are necessary and sufficient for association of glycosylated forms of bovine RNase with calnexin and calreticulin. *EMBO J* 15: 6921-6930
- Scott JE, Dawson JR (1995) MHC class I expression and transport in a calnexin-deficient cell line. *J Immunol* 155: 143-148
- Prasad SA, Yewdell JW, Porgador A, Sadasivan B, Cresswell P, Benink JR (1998) Calnexin expression does not enhance the generation of MHC class I-peptide complexes. *Eur J Immunol* 28: 907-913
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388: 882-887

41. Camachi P, Lechleiter JD (1995) Calreticulin inhibits repetitive intracellular  $Ca^{2+}$  waves. *Cell* 82: 765-771
42. Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause KH, Opas M, MacLennan DH, Michalak M (1999) Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol* 144: 857-868
43. Rauch F, Prud'homme J, Arabian A, Dedhar S, St-Arnaud R (2000) Heart, brain, and body wall defects in mice lacking calreticulin. *Exp Cell Res* 256: 105-111
44. Nakamura K, Robertson M, Liu G, Dickie P, Nakamura K, Guo JQ, Duff HJ, Opas M, Kavanagh K, Michalak M (2001) Complete heart block and sudden death in mice overexpressing calreticulin. *J Clin Invest* 107: 1245-1253
45. Li J, Puceat M, Perez-Terzic C, Mery A, Nakamura K, Michalak M, Krause KH, Jaconi ME (2002) Calreticulin reveals a critical  $Ca^{2+}$  checkpoint in cardiac myofibrillogenesis. *J Cell Biol* 158: 103-113
46. Gros DB, Jongsma HJ (1996) Connexin in mammalian heart function. *Bioessays* 18: 719-730
47. Kardami E, Doble BW (1998) Cardiomyocyte gap junctions: a target for growth factor signaling. *Trends Cardiovasc Med* 8: 180-187
48. Kageyama K, Ihara Y, Goto S, Urata Y, Toda G, Yano K, Kondo T (2002) Overexpression of calreticulin modulates protein kinase B/Akt signaling to promote apoptosis during cardiac differentiation of cardiomyoblast H9c2 cells. *J Biol Chem* 277: 19255-19264
49. Michaelsson M, Riesenfeld T, Jonzon A (1997) Natural history of congenital complete atrioventricular block. *Pacing Clin Electrophysiol* 20: 2098-2101
50. Moak JP, Barron KS, Hougen TJ, Wiles HB, Balaji S, Sreeram N, Cohen MH, Nordenberg A, Van Hare GF, Friedman RA, Perez M, Cecchin F, Schneider DS, Nehgme RA, Buyon JP (2001) Congenital heart block: development of late-onset cardiomyopathy, a previously underappreciated sequela. *J Am Coll Cardiol* 37: 238-242

## Calreticulin, $Ca^{2+}$ -binding chaperon of the endoplasmic reticulum

Małgorzata Szperl<sup>1,✉</sup>, Michał Opas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Biology, Institute of Kardiology, 42 Alpejska St., 04-628 Warszawa, Poland

<sup>2</sup>Department of Anatomy and Cell Biology University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada M5S 1A8

✉e-mail: mszperl@yahoo.com

**Key words:** endoplasmic reticulum, chaperon, calcium homeostasis, cardiac development

### ABSTRACT

The endoplasmic reticulum (ER) plays a vital role in many cellular processes, including  $Ca^{2+}$  storage and release. Calreticulin is a  $Ca^{2+}$ -binding chaperon residing in ER. The protein is a key component of the quality control pathways in ER. In the ER lumen, calreticulin performs two major functions, works as a chaperon and regulates  $Ca^{2+}$  homeostasis. In cardiac muscle, calreticulin plays an important role in cardiac development and pathology.



# Kompleksowa rola białek niedokrwistości Fanconiego w utrzymaniu stabilności genomu

## STRESZCZENIE

Niedokrwistość Fanconiego (ang. *Fanconi anemia*, FA) jest rzadką chorobą genetyczną charakteryzującą się licznymi nieprawidłowościami rozwojowymi, upośledzeniem funkcji szpiku kostnego oraz zwiększoną podatnością na nowotwory. Na poziomie komórkowym u chorych obserwuje się spontaniczną niestabilność chromosomalną i nadwrażliwość na środki sieciujące DNA, co wykorzystuje się w celach diagnostycznych. Choroba ta jest bardzo heterogenna pod względem genetycznym, gdyż do jej rozwoju prowadzi obecność mutacji w przynajmniej 11 różnych genach *FANCA*, *B*, *C*, *D1*, *D2*, *E*, *F*, *G*, *I*, *J* i *L*. Białka niedokrwistości Fanconiego współdziałają z innymi białkami uczestniczącymi w odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA i regulacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego, takimi jak: *RAD51*, *BRCA1*, *ATM* czy *NBS1*. Ponadto, jednym z białek niedokrwistości Fanconiego jest *BRCA2*, które pełni ważną rolę w procesie rekombinacji homologicznej. Wskazuje to, że białka niedokrwistości Fanconiego związane są z różnymi mechanizmami odpowiedzialnymi za stabilność genomową oraz ochronę komórki przed uszkodzeniami DNA, jednak ich molekularna funkcja jest jeszcze słabo poznana.

## WPROWADZENIE

Niedokrwistość Fanconiego, bardzo rzadka choroba o autosomalnym recesywnym typie dziedziczenia, została po raz pierwszy opisana w 1927 roku przez szwajcarskiego pediatrę Guido Fanconiego. Występuje średnio 1/100 000 urodzeń, ale szacuje się, że w Europie i USA nosicielem recesywnego genu warunkującego rozwój choroby może być aż 1 na 300 osób. Na całym świecie opisano do tej pory ponad 1300 przypadków niedokrwistości Fanconiego, przede wszystkim w rodzinach o dużym stopniu pokrewieństwa [1-5]. Dzieci dotknięte tą chorobą rodzą się zwykle z małogłowieciem i niedoborem wzrostu, częste jest również występowanie rozsianych przebarwień skóry, tzw. plam „café-au-lait” lub/i obszarów z niedoborem pigmentacji. U większości pacjentów obserwuje się liczne nieprawidłowości rozwojowe, przede wszystkim wady kończyn (głównie deformacje kości dłoni), nerek, serca i zewnętrznych narządów płciowych. Chorych cechuje jednak duże zróżnicowanie obrazu klinicznego, do tego stopnia, że nawet osoby będące nosicielami identycznych mutacji mogą wykazywać różny stopień anomalii rozwojowych. Mimo tak dużej rozbieżności fenotypowej, u wszystkich pacjentów (najczęściej już pomiędzy 5-10 rokiem życia) pojawia się niewydolność szpiku kostnego w postaci pancytopenii, tzn. obniżenia liczby wszystkich elementów komórkowych krwi: krwinek czerwonych, krwinek białych i płytek krwi. Dlatego też głównymi przyczynami zachorowań i dużej śmiertelności są nowotwory układu krwiotwórczego, głównie anemia aplastyczna, mielodysplazja i ostra białaczka szpikowa. Średnia długość życia chorych wynosi 12 lat.

U pacjentów z FA na poziomie komórkowym obserwuje się spontaniczną niestabilność chromosomalną i nadwrażliwość na środki sieciujące DNA, takie jak mitomycyna C, diepoksybutan czy cisplatyna, co wykorzystuje się powszechnie w celach diagnostycznych [6]. Po traktowaniu tymi czynnikami obserwuje się zwiększoną częstość pęknięć i wymian chromatyd w komórkach FA. Jak dotychczas jedyną metodą leczenia niedokrwistości Fanconiego jest transplantacja szpiku kostnego, jednak tak duża wrażliwość pacjentów na cytostatyki poważnie ogranicza jej stosowanie. Wiadomo obecnie, że istnieje przynajmniej 11 odrębnych genetycznie grup komplementacyjnych niedokrwistości Fanconiego (FA): FA-A, FA-B, FA-C, FA-D1, FA-D2, FA-E, FA-F, FA-G, FA-I, FA-J i FA-L, odpowiadające im geny przedstawiono w tabeli 1. Wśród pacjentów najliczniejsi są nosiciele mutacji w 3 genach niedokrwistości Fanconiego: *FANCA* (~66%), *FANCC* (~9,5%) i *FANCG* (~9%) (Rys. 1) [7]. Niedokrwistość Fanconiego, podobnie jak *Xeroderma pigmentosum*, *Ataxia teleangiectasia*, zespół Nijmegen (ang. *Nijmegen breakage syndrome*, NBS) czy zespół Blooma, jest zaliczana do grupy chorób, w których zaburzone jest funkcjonowanie genów nazywanych „strażnikami genomu” (ang. *caretaker-genes*), odpowiedzialnych m.in. za naprawę uszkodzeń

Katarzyna Kluzek<sup>1</sup>

Małgorzata Z. Zdzienicka<sup>1,2,✉</sup>

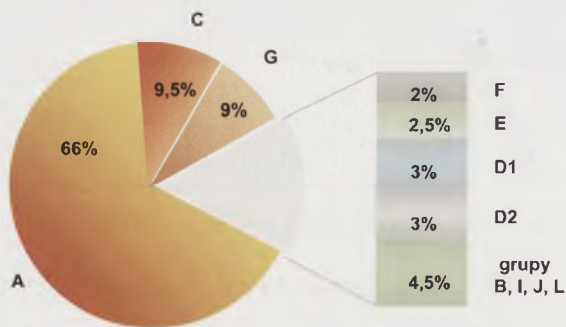
<sup>1</sup>Katedra i Zakład Genetyki Molekularnej Komórki, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Bydgoszcz  
<sup>2</sup>Department of Toxicogenetics – MGC, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

✉Department of Toxicogenetics – MGC, Leiden University Medical Center, Wassenaarsweg 72, 2333 AL Leiden, The Netherlands; e-mail: M.Z.Zdzienicka@lumc.nl; tel. 31 715 276 175

Artykuł otrzymano 14 marca 2005 r.  
Artykuł zaakceptowano 12 maja 2005 r.

**Słowa kluczowe:** niedokrwistość Fanconiego, niestabilność chromosomalna, wrażliwość na czynniki sieciujące DNA, naprawa dwuniciowych pęknięć DNA, *BRCA2*

**Wykaz skrótów:** *ATM* (ang. *Ataxia teleangiectasia mutated*) – gen uszkodzony w ataksji teleangiektazji; *ATR* (ang. *ATM and RAD3 – related kinase*) – kinaza zespołu Seckela; *BLM* – zespół Blooma; *BRCA1* i *BRCA2* (ang. *breast cancer susceptibility genes*) – geny podatności na nowotwory sutka; *DSBs* (ang. *double strand breaks*) – dwuniciowe pęknięcia DNA; *FA* (ang. *Fanconi anemia*) – niedokrwistość Fanconiego; *HR* (ang. *homologous recombination*) – rekombinacja homologiczna; *ICLs* (ang. *DNA interstrand crosslinks*) – międzyniciowe wiązania krzyżowe w DNA; *NBS1* (ang. *Nijmegen breakage syndrome*) – gen uszkodzony w zespole Nijmegen; *NHEJ* (ang. *non-homologous end joining*) – niehomologiczne łączenie końców DNA



Rysunek 1. Szacunkowa częstość występowania grup komplementacyjnych niedokrwistości Fanconiego. Opracowane na podstawie Levitus i wsp. [7].

DNA, kontrolę cyklu komórkowego i procesu apoptozy. Wszystkie te choroby cechuje zwiększona łamliwość chromosomów świadcząca o niezdolności komórek do utrzymania stabilności genomowej. Wynikająca z tego akumulacja zmian genetycznych prowadzi w efekcie do transformacji komórek i rozwoju nowotworów [3].

## PODSTAWY GENETYCZNE NIEDOKRWISTOŚCI FANCONIEGO

Heterogenność niedokrwistości Fanconiego, w połączeniu z jej rzadkim występowaniem, bardzo utrudniała zbadanie podłoża molekularnego tej choroby. Pierwszym krokiem w tym kierunku była genetyczna analiza komplementacyjna polegająca na fuzji limfocytów pochodzących od poszczególnych pacjentów z niedokrwistością Fanconiego, a następnie ocenie czy powstałe hybrydy odzyskały na drodze komplementacji oporność na mitomycynę C. W ten sposób ustalono istnienie 9 grup komplementacyjnych (FA-A, -B, -C, -D, -E, -F, -G, -I i -J) (Tab. 1) [7]. Początkowo wyodrębniono też grupę FA-H, jednak okazało się, że badana linia komórkowa, w rzeczywistości należała do grupy FA-A [8].

Obecnie znane są już sekwencje większości genów niedokrwistości Fanconiego odpowiadających poszczególnym grupom komplementacyjnym, z wyjątkiem *FANCI* i *FANCL*. Stosując klonowanie komplementacyjne (z wykorzystaniem biblioteki cDNA) zidentyfikowano geny: *FANCC*, *FANCA*, *FANCG*, *FANCF* i *FANCE* [3]. Sekwencję *FANCA* poznano też niezależnie za pomocą klonowania pozycyjnego (ang. *genetic linkage analysis*) [9]. Do identyfikacji *FANCD* wykorzystano natomiast metodę polegającą na mapowaniu genu przy zastosowaniu fuzji komórek pacjentów z tzw. mikrokomórkami zawierającymi pojedyncze chromosomy człowieka (ang. *microcell-mediated chromosome transfer*) [10]. Wykazano wtedy, że FA-D jest grupą heterogenną i podzielono ją na 2 podgrupy: D1 i D2, a pierwszy sklonowany gen nazwano *FANCD2*. Wiele emocji wzbudziło dokonane niedawno odkrycie, że u pacjentów z grupy FA-D1 genem odpowiedzialnym za rozwój niedokrwistości Fanconiego jest *BRCA2* [11,12]. Okazało się bowiem, że gdy obecność mutacji tylko w jednym z alleli *BRCA2* predysponuje do rozwoju raka piersi/jajnika, to uszkodzenie obu alleli tego genu jest przyczyną niedokrwistości Fanconiego. Kolejne 2 białka niedokrwistości Fanconiego poznano przy pomocy metod biochemicznych. Wykorzystując immunoprecypitację z udziałem przeciwciał anti-*FANCA* grupa

Tabela 1. Charakterystyka grup komplementacyjnych w niedokrwistości Fanconiego.

Grupa komplementacyjna	Uszkodzony gen	Lokalizacja w chromosomie	Masa cząsteczkowa białka (kDa)
FA-A	<i>FANCA</i>	16q24.3	163
FA-B	<i>FANCB</i>	Xp22.31	95
FA-C	<i>FANCC</i>	9q22.3	65
FA-D1	<i>FANCD1/BRCA2</i>	13q12-13	348
FA-D2	<i>FANCD2</i>	3p25.3	155
FA-E	<i>FANCE</i>	6p21-22	59
FA-F	<i>FANCF</i>	11p15	42
FA-G	<i>FANCG/XRCC9</i>	9p13	68
FA-I	?	?	?
FA-J	?	?	?
FA-L	<i>FANCL/PHF9</i>	2p16.1	43

Wang'a wyodrębniła i oczyściła kompleks, który oprócz 5 znanych już białek niedokrwistości Fanconiego (opisanych w następnym rozdziale) zawierał 4 nowe, nazwane FAAPs (ang. *Fanconi anemia-associated proteins*) [13]. W kolejnych doświadczeniach, z zastosowaniem techniki Western blot i spektrometrii masowej, zidentyfikowano jedno z nich (FAAP43) jako białko PHF9, a następnie wykazano, że jest ono uszkodzone u jednego z pacjentów z niedokrwistością Fanconiego [14]. Ze względu na posiadaną aktywność ligazy ubikwityny nazwano je *FANCL* (L – od słowa ligaza) i wyodrębniono kolejną grupę komplementacyjną – FA-L. Następnym poznany tą metodą białkiem kompleksu jądrowego jest tzw. FAAP95, zmutowane u pacjentów z grupy FA-B [15]. Bardzo interesujący jest fakt, że *FANCB* jest zlokalizowane w chromosomie X i ekspresja jednej z jego kopii podlega wyciszaniu. W tym więc wypadku mutacje tylko w pojedynczym allelu mogą prowadzić do zaburzeń stabilności genomu.

## W POSZUKIWANIU FUNKCJI BIAŁEK NIEDOKRWISTOŚCI FANCONIEGO

Prawie wszystkie zidentyfikowane do tej pory białka niedokrwistości Fanconiego należą do rodziny białek „orfanowych”, które nie wykazują homologii w stosunku do innych białek, ani nie posiadają znanych motywów strukturalnych, co bardzo utrudnia poznanie roli jaką pełnią w komórce. Co więcej, sekwencje białek niedokrwistości Fanconiego nie są zachowane w ewolucji poza grupą kręgowców. Wyjątkiem są *FANCD2*, *FANCD1* i *FANCL*, co może świadczyć o istotnej roli pełnionej przez nie w szlaku niedokrwistości Fanconiego [11,14,16]. Przeszukiwanie bazy danych NCBI przy użyciu czulej metody PSI-BLAST wykazało też, że przynajmniej jedno z białek niedokrwistości Fanconiego, *FANCG*, może posiadać funkcjonalne domeny strukturalne. Ich obecność sugeruje, że *FANCG* jest członkiem rodziny białek zawierających zdegenerowane 34-aminokwasowe powtórzenia TRP (ang. *tetratricopeptide repeats*). Kilka motywów TRP na C-końcu *FANCG* prawdo-

podobnie odpowiada za jego oddziaływanie z innymi białkami niedokrwiłości Fanconiego [17]. Pomimo trudności w określeniu dokładnej funkcji białek niedokrwiłości Fanconiego, wydaje się, że pełnią one ważną rolę w odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA, w którą włączone są geny *BRCA1* i *BRCA2* [11,18]

#### TWORZENIE KOMPLEKSU FA W JĄDRZE KOMÓRKOWYM

Podobny fenotyp komórek pacjentów z niedokrwiłością Fanconiego z poszczególnych grup komplementacyjnych sugerował, że produkty genów niedokrwiłości Fanconiego mogą ze sobą współpracować. Dzięki badaniom z użyciem immunoprecypitacji ustalono, że przynajmniej 5 białek niedokrwiłości Fanconiego (A, C, E, F i G) tworzy kompleks jądrowy [19]. Zastosowanie drożdżowego systemu dwu- i trójhybrydowego pozwoliło wykazać, że każde z tych białek oddziałuje z przynajmniej jednym z pozostałych [19,20]. Dalsze badania biochemiczne wykazały, że integralną częścią kompleksu są też *FANCL* i *FANCB* oraz najprawdopodobniej dodatkowe, niezidentyfikowane jeszcze białka. Nieobecność chociaż jednego z konstytutywnych elementów uniemożliwia powstanie kompleksu, tak więc w komórkach z grup FA-A, -B, -C, -E, -F, -G i -L nie dochodzi do jego utworzenia w jądrze komórkowym [13]. Dokładne dane na temat kinetyki tworzenia kompleksu są na razie nieznane, jednak wyniki badań wskazują na istnienie różnych form kompleksu niedokrwiłości Fanconiego, o zmiennej wielkości i lokalizacji w komórce, sugerując, że jego struktura jest bardzo dynamiczna i podlega regulacji w trakcie cyklu komórkowego [21,22]. Obserwacje te potwierdzają wyniki wcześniejszych doświadczeń z laboratorium Wang'a, wg których z głównym kompleksem jądrowym tworzonym przez białka niedokrwiłości Fanconiego immunoprecypitują również inne białka, w tym wiążące się z DNA i biorące udział w modelowaniu chromatyny: helikaza zespołu Blooma, RPA (ang. *replication protein A*) i topoizomeraza IIIa [13]. Aktualnie trwają prace nad identyfikacją dodatkowych białek obecnych w tych kompleksach.

Początkowo uważano, że jądrowy kompleks niedokrwiłości Fanconiego może brać bezpośredni udział w procesie naprawy DNA. Obecnie wydaje się, że raczej odgrywa on rolę czujnika uszkodzeń materiału genetycznego lub stabilizacji zatrzymanych widełek replikacyjnych, ale jego dokładna funkcja pozostaje niestety wciąż nieznana [23]. Wiadomo natomiast, że jest niezbędny do monoubikwitylacji białka *FANCD2*, które dopiero w tej formie jest aktywne i współdziała z innymi białkami. Fakt, że w grupach FA-D1, FA-D2, FA-I i FA-J tworzenie kompleksu zachodzi prawidłowo, wskazuje, iż białka te działają na dalszych etapach szlaku niedokrwiłości Fanconiego [7,10,24].

#### CENTRALNA ROLA BIAŁKA *FANCD2*

Mimo, że uszkodzenia *FANCD2* odpowiadają za niewielką liczbę przypadków niedokrwiłości Fanconiego (poniżej 1%), białko to odgrywa kluczową rolę w szlaku FA. Występuje ono w dwóch formach: krótkiej *FANCD2S* (S – ang. *short*) i długiej *FANCD2L* (L – ang. *long*), powstałej poprzez przyłączenie pojedynczej cząsteczki ubikwityny do reszty lizyny w pozycji 561. *FANCD2L* pojawia się w komórce

w trakcie replikacji oraz po uszkodzeniu DNA np. na skutek działania mitomycyny C, promieniowania jonizującego czy UV [18,24]. Obie formy *FANCD2* są stabilne i nie podlegają degradacji proteosomalnej, co wskazuje na istnienie enzymu usuwającego cząsteczkę ubikwityny po zakończeniu replikacji czy naprawy DNA. Niedawno doniesiono, że tę istotną funkcję kontroli aktywności *FANCD2* pełni prawdopodobnie białko *USP1* [25]. Początkowo przypuszczano, że za modyfikację *FANCD2* może odpowiadać *BRCA1*. Białka te oddziałują ze sobą, a *BRCA1* po związaniu z białkiem *BARD1* wykazuje aktywność ligazy ubikwitylowej. Niedawno okazało się jednak, że raczej nowo odkryte *FANCL* (*PHF9*) jest odpowiedzialne za ten proces [26]. Wykazano bowiem, że *FANCL* podlega autoubikwitylacji *in vitro*, a zablokowanie jego ekspresji przy pomocy siRNA całkowicie znosi monoubikwitylację *FANCD2 in vivo*. Ponieważ białko to jest konstytutywnym elementem kompleksu FA, wydaje się że właśnie ono jest ligazą modyfikującą *FANCD2* [13]. Prace innych badaczy wskazują jednak, że *BRCA1* również może mieć pewien udział w procesie monoubikwitylacji i migracji *FANCD2L* [27]. Warunkiem przeprowadzenia monoubikwitylacji jest uprzednie utworzenie kompleksu jądrowego, złożonego z większości białek niedokrwiłości Fanconiego, a dochodzi do niej jedynie w komórkach, w których żadne z tych białek nie jest uszkodzone [18]. Z tego względu analizę obecności dłuższej formy białka *FANCD2* można stosować jako prosty test diagnostyczny większości przypadków niedokrwiłości Fanconiego (Western blot). Należy jednak pamiętać, że mutacje w genach *FANCD1/BRCA2* i *FANCF* nie prowadzą do zahamowania monoubikwitylacji *FANCD2* [7,18].

Precyzyjna rola aktywnej formy *FANCD2* jest na razie niestety nieznana, ale wiele przesłanek wskazuje, że jej obecność jest bardzo istotna dla przeprowadzenia wydajnej naprawy DNA. *FANCD2L* migruje do kompleksów biorących udział w naprawie DNA, zawierających również *BRCA1*, *FANCD1/BRCA2* i *RAD51* oraz inne białka uczestniczące w procesie rekombinacji homologicznej (Rys. 2) [18,24]. Kompleksy takie w badaniach z zastosowaniem znakowanych immunofluorescencyjnie przeciwciał widoczne są jako tzw. foci, tworzące się w jądrze komórkowym pod wpływem czynników mutagenicznych [28].

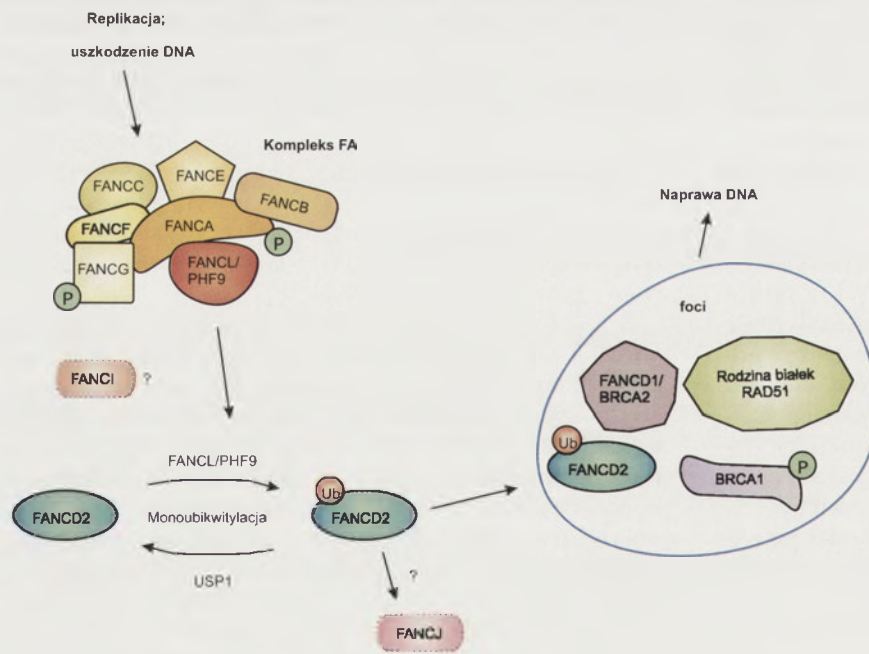
*FANCD2* odgrywa również rolę w regulacji przebiegu cyklu komórkowego. Jego aktywacja jest specyficzna dla fazy S cyklu komórkowego, a komórki ze zmutowaną resztą L561 *FANCD2*, czyli niezdolne do jego modyfikacji, po traktowaniu mitomycyną C nie są w stanie prawidłowo zakończyć fazy G2. Ponadto, w komórkach pacjentów z niedokrwiłością Fanconiego obserwuje się zaburzenia punktu kontrolnego fazy S oraz wydłużenie trwania fazy G2, a wiele badań dowodzi, że białka niedokrwiłości Fanconiego oddziałują z białkami efektorowymi punktów kontrolnych faz S i G2 [24,29-31]. Zaobserwowano też bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy *FANCD2* i kluczowymi regulatorami punktów kontrolnych cyklu komórkowego, kinazami fosfoinozitolowymi *ATM* (ang. *ataxia telangiectasia mutated*) i *ATR* (ang. *ATM and RAD3 – related kinase*) [32,33]. Po naświetleniu komórek promieniowaniem jonizującym *FANCD2* jest fosforylowane przez *ATM*, natomiast w odpowiedzi na mitomycynę C rolę aktywatora pełni *ATR*. W obu przypadkach fosforylacja zachodzi zupełnie niezależnie od mo-

noubikwylacji i tworzenia foci przez FANCD2L. Aktywacja FANCD2 przez kinazy przebiega najprawdopodobniej za pośrednictwem białka NBS1 uszkodzonego u pacjentów z zespołem Nijmegen [1,32]. W prawidłowych komórkach NBS1 po uszkodzeniu DNA tworzy kompleks z MRE11 i RAD50 (kompleks MRN), niezbędny w procesie naprawy dwuniciowych pęknięć DNA oraz do poprawnego funkcjonowania punktu kontrolnego fazy S [33]. Zauważono również, że istnieje duża zależność pomiędzy NBS1 i białkami niedokrwiłości Fanconiego. Niektóre linie NBS są w podobnym stopniu wrażliwe na mitomycynę C jak linie niedokrwiłości Fanconiego. Opisano też przypadek dwóch pacjentów, u których na podstawie danych klinicznych zdiagnozowano niedokrwiłość Fanconiego, jednak analiza genetyczna wykazała u nich obecność zmutowanego genu *NBS1* [29,34]. Ponadto istnieją przesłanki o roli NBS1 (oraz ATR) w monoubikwylacji FANCD2 [35]. Mimo że tak wiele danych wskazuje na funkcjonalne oddziaływanie białek niedokrwiłości Fanconiego z innymi białkami biorącymi udział w regulacji punktów kontrolnych, poznanie roli białek niedokrwiłości Fanconiego w tym procesie wymaga dalszych badań.

#### ROLA BIAŁEK NIEDOKRWIŁOŚCI FANCONIEGO W PROCESIE NAPRAWY DNA I STRESIE OKSYDACYJNYM

Przyczyny szczególnej nadwrażliwości komórek niedokrwiłości Fanconiego na środki sieciujące DNA, m.in. leki stosowane powszechnie w chemoterapii (mitomycyna C, cisplatyna, iperyt azotowy czy nitrozomocznik i ich pochodne), nie są do tej pory poznane. Związki sieciujące

tworzą z DNA liczne addukty, których niewielką część stanowią międzyciociowe wiązania krzyżowe (ang. *DNA inter-strand crosslinks*, ICLs), np. w przypadku mitomycyny C jest to jedynie 5–13% [36]. Pomimo to ICLs są uważane za główną przyczynę toksyczności środków sieciujących DNA, ze względu na ich zdolność do blokowania replikacji i transkrypcji. Uważa się, że obecność ICLs powoduje zatrzymanie widerek replikacyjnych, a do ponownego ich startu konieczne jest nacięcie dwóch łańcuchów DNA w pobliżu wiązania krzyżowego, prowadzące do powstania dwuniciowych pęknięć DNA (ang. *double-strand breaks*, DSBs) [1,36]. DSBs naprawiane są głównie przez dwa mechanizmy: niehomologiczne łączenie końców DNA (ang. *non-homologous end joining*, NHEJ) oraz rekombinację homologiczną. W komórkach ssaków w fazie G1 i wczesnej S cyklu komórkowego dominuje NHEJ, a w późnej S i G2, kiedy dostępne są jako matryca chromatydy siostrzane – rekombinacja homologiczna [37]. Częste występowanie pęknięć chromosomów w komórkach niedokrwiłości Fanconiego i aktywacja kompleksu niedokrwiłości Fanconiego przez czynniki uszkadzające DNA wskazują na rolę tych białek w naprawie DNA. Rothfuss i Grompe wykazali, że w komórkach niedokrwiłości Fanconiego rozpoznanie ICLs i nacięcie łańcuchów DNA zachodzi prawidłowo, sugerując tym działanie szlaku niedokrwiłości Fanconiego już po utworzeniu DSBs [38]. Z drugiej strony, oddziaływanie FANCA z kompleksem SWI/SNF odpowiedzialnym za proces modelowania chromatyny wskazuje na możliwość uczestnictwa białek niedokrwiłości Fanconiego również we wcześniejszych etapach naprawy uszkodzeń DNA [39].



**Rysunek 2.** Proponowany model działania białek niedokrwiłości Fanconiego. W trakcie replikacji oraz w odpowiedzi na uszkodzenie DNA np. przez środki sieciujące, tworzy się w jądrze komórkowym kompleks złożony z białek niedokrwiłości Fanconiego (A, B, C, E, F, G i L). Następnie przy udziale FANCL dochodzi do monoubikwylacji FANCD2. Aktywowane w ten sposób FANCD2 tworzy foci z BRCA1, BRCA2, RAD51 i innymi białkami uczestniczącymi w homologicznej rekombinacji, co wskazuje, że białka niedokrwiłości Fanconiego biorą udział w naprawie DNA. Po zakończeniu procesu replikacji czy naprawy DNA cząsteczka ubikwityny jest odłączana od FANCD2 przez enzym USP1. Rola niezidentyfikowanych do tej pory białek FANCI i FANCF jest na razie nieznana. Wiadomo jedynie, że w komórkach z grup FA-I i FA-J tworzenie kompleksu niedokrwiłości Fanconiego (FA) zachodzi prawidłowo, ale w liniach FA-I nie obserwuje się monoubikwylacji FANCD2.

**Rekombinacja homologiczna.** Na wysokiej wierności procesu rekombinacji homologicznej opiera się w dużym stopniu utrzymanie stabilności genomowej. Wiele obserwacji wskazuje na udział białek niedokrwiłości Fanconiego w tym procesie. Poza nadwrażliwością na czynniki sieciujące DNA, komórki niedokrwiłości Fanconiego, podobnie jak komórki z uszkodzonym *BRCA1* lub *BRCA2*, wykazują zwiększony poziom aberracji chromosomalnych [3,40,41]. Zbliżony fenotyp ma również szereg innych mutantów komórek ssaków z uszkodzoną rekombinacją homologiczną (np. *RAD51C*, *XRCC2* czy *XRCC3*) [42]. W odpowiedzi na uszkodzenie DNA FANCD2 jest aktywowane i tworzy wraz z BRCA1, FANCD1/BRCA2 i RAD51 jądrowe foci (Rys. 2). Proces ten ma miejsce w fazie S cyklu komórkowego, w czasie której zachodzi rekombinacja pomiędzy chromatydami siostrzanymi [24]. Wiadomo też, że FANCD2 i BRCA2 oddziałują bezpośrednio ze sobą, oraz że w komórkach *FANCD2*<sup>-/-</sup> po naświetleniu promieniowaniem jonizującym nie dochodzi do tworzenia foci przez BRCA2 i jego wiązania z chromatyną [43]. Sugerowało to, że FANCD2 bierze udział w rekombinacji homologicznej, jednak ostatnio pojawiły

się doniesienia, że białko to może uczestniczyć w naprawie DNA niezależnej od HR [44-46]. Jak na razie wiadomo, że bezpośrednią rolę w tym procesie odgrywa jedynie FANCD1/BRCA2, białko regulujące kluczowy etap HR, czyli wiązanie RAD51 z jednoniciowym DNA [47]. Ponadto, tylko w komórkach z grupy FA-D1 nie obserwuje się tworzenia kompleksów RAD51 w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, co jest jednym z markerów uszkodzonej rekombinacji [28]. Do tej pory nie ma wystarczających dowodów wskazujących, że inne białka FA są włączone w proces HR, chociaż wydaje się, że również FANCG i FANCC mogą brać w nim udział. Zaobserwowano bowiem, że inaktywacja FANCG w modelowej kurzej linii DT40, prowadzi do obniżenia poziomu naprawy DSBs poprzez rekombinację homologiczną [48]. Ponadto doświadczenia z użyciem systemu dwuhybrydowego wskazują, że FANCG może bezpośrednio oddziaływać z FANCD1/BRCA2 [49]. Stwierdzono również, że w komórkach DT40, FANCC współpracuje z innym białkiem rekombinacji homologicznej, XRCC2 (paralogiem RAD51), a inaktywacja FANCC prowadzi do zaburzeń w procesie HR [50].

**Niehomologiczne łączenie końców DNA.** Mimo wielu przesłanek sugerujących, że za niestabilność chromosomalną w komórkach pacjentów z niedokrwistością Fanconiego odpowiedzialne są defekty systemu HR, szereg doświadczeń wskazuje, że może być w nich także uszkodzony mechanizm NHEJ. Doświadczenia oparte na elektroporacji fibroblastów zlinearyzowanymi plazmidami wykazały, że efektywność łączenia końców plazmidów w komórkach z niedokrwistością Fanconiego jest dużo niższa (4%) niż w komórkach prawidłowych (28%). Podobnie badania wpływu podwójnych pęknięć chromosomowego DNA indukowanych enzymami restrykcyjnymi w fibroblastach człowieka w grupach FA-A, -C, -D2 i -G wykazały zwiększoną śmiertelność wśród tych komórek, a wprowadzenie do nich odpowiedniego cDNA przywracało prawidłowy fenotyp [51]. Wyniki te wskazują na zaburzenia w usuwaniu tego typu uszkodzeń, najprawdopodobniej przez niehomologiczne łączenie końców DNA. Poziom ekspresji białek NHEJ w komórkach pacjentów z niedokrwistością Fanconiego jest jednak prawidłowy, podobnie jak badana w ekstraktach jądrowych aktywność kluczowych dla NHEJ białek Ku. Sugeruje to, że w komórkach pacjentów z niedokrwistością Fanconiego uszkodzona może być alternatywna droga NHEJ, niezależna od białek Ku. Jak wskazują najnowsze badania, ich rolę prawdopodobnie spełnia kompleks białek MRE11, RAD50 i NBS1 [51].

**Stres oksydacyjny.** Pomimo, iż za główną przyczynę toksyczności środków sieciujących DNA uważa się wprowadzanie wiązań krzyżowych, istnieje również hipoteza uwzględniająca następstwa działania reaktywnych form tlenu. Większość czynników sieciujących wymaga aktywacji metabolicznej prowadzącej do powstawania reaktywnych form tlenu, jest więc bardzo prawdopodobne, że wrażliwość komórek pacjentów z niedokrwistością Fanconiego na te związki może być związana z nadprodukcją lub zaburzeniami w usuwaniu wolnych rodników [52]. Potwierdzają to badania, które wykazały że FANCC i FANCG oddziałują z enzymami uczestniczącymi w biotransformacji ksenobiotyków. FANCC wzmacnia też aktywność katalityczną GST-

P1 (ang. *glutathione S-transferase pi*), pełniącego ważną rolę antyoksydacyjną. Zaobserwowano również, że komórki pacjentów z niedokrwistością Fanconiego wykazują zwiększoną wrażliwość na tlen i przy jego niższych stężeniach rzadziej dochodzi w tych komórkach do powstawania aberracji chromosomowych. Dokładne omówienie teorii oksydacyjnej można znaleźć w pracach przeglądowych Pagano i wsp. [53,54].

#### UDZIAŁ BIAŁEK FA W PROCESIE APOPTOZY

Wiele danych wskazuje, że białka niedokrwistości Fanconiego mogą również odgrywać rolę w regulacji programowanej śmierci komórki. Zaobserwowano m.in., że zarówno pierwotne jak i unieśmiertelnione limfocyty pacjentów z niedokrwistością Fanconiego łatwiej ulegają spontanicznej apoptozie niż limfocyty osób zdrowych [55,56]. Zwiększona jest również podatność komórek pacjentów z niedokrwistością Fanconiego (szczególnie tych z uszkodzonym FANCC) na apoptozę indukowaną przez cytokiny (IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) oraz środki sieciujące DNA [55,57,58]. Ponadto kilka doniesień wskazuje na nieprawidłową strukturę i funkcjonowanie mitochondriów, organelli pełniących istotną rolę w indukcji procesu apoptozy [59,60]. Dane te sugerują, że białka niedokrwistości Fanconiego najprawdopodobniej pełnią rolę anty-apoptotyczną, chociaż z części badań wynika, że w komórkach pacjentów z niedokrwistością Fanconiego po traktowaniu mitomycyną C czy naświetlaniu promieniami jonizującymi nie obserwuje się niektórych charakterystycznych markerów apoptozy, takich jak: aktywacja kaspaz, degradacja PARP (ang. *poly (ADP) ribose polymerase*) oraz tworzenie drabinki oligosomalnej DNA [61,62]. Może to sugerować udział białek niedokrwistości Fanconiego raczej w jednej z form apoptozo-podobnej programowanej śmierci komórki niż w klasycznej apoptozie [63].

#### ZWIĄZEK FA Z PATOGENEZĄ NOWOTWORÓW

Pacjenci z niedokrwistością Fanconiego wykazują bardzo wysokie ryzyko rozwoju nowotworów układu hematologicznego, np. w przypadku ostrej białaczki szpikowej jest ono szacunkowo 15000x większe niż w populacji ogólnej. Wśród pacjentów z FA, którzy dożywają wieku dorosłego, istnieje również duże prawdopodobieństwo rozwoju guzów litych. Analiza danych 754 pacjentów IFAR (ang. *International Fanconi Anemia Registry*) wykazała znacznie zwiększoną (ok. 500 razy) zapadalność na raka płaskokomórkowego w stosunkowo młodym wieku. Zauważono, że są to głównie nowotwory głowy, szyi, odbytu i narządów płciowych, które są zarazem rejonami bardzo podatnymi na ataki wirusów onkogennych, takich jak HPV czy papilloma. Analiza komórek pochodzących z guzów rzeczywiście wykazała obecność DNA HPV16 w większości analizowanych prób, co wskazywać może na udział wirusów w patogenizie nowotworów u chorych z niedokrwistością Fanconiego [5].

Wiadomo, iż mutacje powodujące całkowitą inaktywację obu alleli *BRCA1* i *BRCA2* (ang. *null mutations*), zarówno u ludzi jak i myszy, prowadzą do śmierci na etapie embrionalnym, natomiast uszkodzenie jednego z alleli predysponuje do rozwoju raka sutka i jajnika [40]. *BRCA1* i *BRCA2* są

zmutowane jedynie u niewielkiej części pacjentów, trwają więc poszukiwania kolejnych genów odpowiedzialnych za rozwój tych nowotworów. Związek szlaku niedokrwiistości Fanconiego z BRCA1 oraz fakt, że BRCA2 jest jednym z genów niedokrwiistości Fanconiego sugerowały możliwość udziału heterozygotycznych wariantów genów niedokrwiistości Fanconiego w etiologii nowotworów sutka/jajnika. Jednak poszukiwania mutacji w *FANCA*, *FANCC*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF* i *FANCG* w 88 liniach pochodzących od pacjentów z rodzinną historią raka piersi (i prawidłowymi *BRCA1/2*) wykazały jedynie obecność polimorfizmów i 2 mutacji typu zmiany sensu [64]. Podobnie analiza sekwencji *FANCA* w materiale pochodzącym z 19 guzów sutka nie wykazała patogennych mutacji, pomimo że *FANCA* znajduje się na chromosomie 16q24.3, w rejonie, w którym często dochodzi do utraty dzikiego allelu (ang. *loss of heterozygosity*, LOH) w raku piersi. Wyniki te wskazują, że przebadane geny niedokrwiistości Fanconiego nie należą do grupy supresorów nowotworowych [65]. Stwierdzono natomiast, że inaktywacja szlaku niedokrwiistości Fanconiego (wyciszenie ekspresji *FANCF* poprzez metylację odcinka promotorowego) jest odpowiedzialna za niewielką część przypadków nowotworów jajnika, płuc oraz jamy ustnej [66,67]. Z kolei w sporadycznych nowotworach trzustki wykryto somatyczne i dziedziczne mutacje w genie *FANCC* (w jednym przypadku również *FANCG*) [68]. Także badania sekwencji *FANCA* wykazały, że mutacje w tym genie mogą predysponować do rozwoju raka trzustki [69]. Zarówno guzy trzustki jak i jajnika charakteryzuje oporność na czynniki chemoterapeutyczne takie jak cisplatyna, stąd ważna wydaje się identyfikacja pacjentów z uszkodzonym szlakiem niedokrwiistości Fanconiego, gdyż istnieje u nich duża szansa na pozytywne przeprowadzenie leczenia przy zastosowaniu środków sieciujących DNA.

#### UWAGI KOŃCOWE

W ciągu ostatnich kilku lat dokonano ogromnego postępu w badaniach nad podłożem molekularnym niedokrwiistości Fanconiego. Niezwykle istotne było odkrycie współdziałania szlaku niedokrwiistości Fanconiego z białkami BRCA1/2 oraz białkami uszkodzonymi w różnych zespołach niestabilności genomowej m.in. ATM, NBS1 i BLM. Białka te współdziałając z BRCA1 i innymi białkami uczestniczącymi w procesach naprawy DNA tworzą kompleks BASC (ang. *BRCA1-associated genome surveillance complex*), który prawdopodobnie pełni rolę czujnika uszkodzeń DNA oraz jest odpowiedzialny za „nadzorowanie” procesu replikacji i naprawy DNA [23,70]. Fakty te wskazują, że szlak niedokrwiistości Fanconiego odgrywa bardzo ważną rolę w utrzymaniu stabilności genomu, jednak precyzyjna rola białek niedokrwiistości Fanconiego nie jest do tej pory poznana. Wiemy obecnie, że jest ich przynajmniej kilkanaście, oraz że działają zarówno w jądrze komórkowym (procesy związane z naprawą DNA) jak i w cytoplazmie (apoptoza, ochrona komórki przed stresem oksydacyjnym). Ogólnie przyjęta jest hipoteza o istnieniu liniowego szlaku FA, obejmującego tworzenie kompleksu niedokrwiistości Fanconiego i aktywację *FANCD2*. Bardzo prawdopodobne jest jednak, że białka niedokrwiistości Fanconiego wspólnie z innymi białkami działają w różnych szlakach molekularnych, chroniąc komórkę przed uszkodzeniami DNA [31].

Pomimo intensywnych badań, niestety nadal nie wiadomo jakie są przyczyny szczególnej nadwrażliwości komórek z niedokrwiistością Fanconiego na środki sieciujące DNA. Pomoc w rozwiązaniu tego problemu może identyfikacja nieznanymi białkami niedokrwiistości Fanconiego, uszkodzonych w grupach komplementacyjnych FA-I i FA-J. Kandydatem na kolejny gen niedokrwiistości Fanconiego może być również *SNMB1*, występujący u człowieka homolog drożdżowego *PSO2* (ang. *psoralen-UV hypersensitive mutants*), na co wskazuje podobny fenotyp komórek niedokrwiistości Fanconiego i *SNMB1*<sup>-/-</sup> (nadwrażliwość na ICLs) [36]. Ze względu na związek szlaku niedokrwiistości Fanconiego z innymi białkami niezbędnymi dla utrzymania stabilności genomowej, wydaje się, że dokładne poznanie mechanizmu działania białek niedokrwiistości Fanconiego może mieć kluczowe znaczenie w badaniach nad procesami nowotworzenia oraz w opracowaniu nowych, skutecznych terapii przeciwnowotworowych. Już w tej chwili atrakcyjne wydaje się selektywne wyłączenie szlaku niedokrwiistości Fanconiego w komórkach nowotworowych, w celu zwiększenia ich wrażliwości na chemoterapeutyki.

#### PIŚMIENNICTWO

1. D'Andrea AD, Grompe M (2003) The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 3: 23-34
2. Tischkowitz MD, Hodgson SV (2003) Fanconi anaemia. *J Med Genet* 40: 1-10
3. Joenje H, Patel KJ (2001) The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet* 2: 446-457
4. Alter BP, Greene MH, Velazquez I, Rosenberg PS (2003) Cancer in Fanconi anemia. *Blood* 101: 2072
5. Tischkowitz M, Dokal I (2004) Fanconi anaemia and leukaemia – clinical and molecular aspects. *Br J Haematol* 126: 176-191
6. Auerbach AD (1993) Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. *Exp Hematol* 21: 731-733
7. Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, Cool NF, Oostra AB, Mathew CG, Hoatlin ME, Waisfisz Q, Arwert F, de Winter JP, Joenje H (2004) Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood* 103: 2498-2503
8. Joenje H, Levitus M, Waisfisz Q, D'Andrea A, Garcia-Higuera I, Pearson T, van Berkel CG, Rooimans MA, Morgan N, Mathew CG, Arwert F (2000) Complementation analysis in Fanconi anemia: assignment of the reference FA-H patient to group A. *Am J Hum Genet* 67: 759-762
9. Apostolou S, Whitmore SA, Crawford J, Lennon G, Sutherland GR, Callert DF, Ianzano L, Savino M, D'Apolito M, Notarangelo A *et al.* (1996) The Fanconi Anaemia/Breast Cancer Consortium. *Nat Genet* 14: 324-328
10. Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D'Andrea AD, Moses R, Grompe M (2001) Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, *FANCD2*. *Mol Cell* 7: 241-248
11. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, de Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, Ikada H, Fox EA, D'Andrea AD (2002) Allelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297: 606-609
12. Zdzienicka MZ, Arwert F (2002) Breast cancer and Fanconi anemia: what are the connections? *Trends Mol Med* 8: 458-460
13. Meetei AR, Sechi S, Wallisch M, Yang D, Young MK, Joenje H, Hoatlin ME, Wang W (2003) A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Mol Cell Biol* 23: 3417-3426
14. Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, Oostra AB, Yan Z, Ling C, Bishop CE, Hoatlin ME, Joenje H, Wang W (2003) A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* 35: 165-170

15. Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, Roimans MA, Bier P, Hoatlin M, Pals G, de Winter JP, Wang W, Joenje H (2004) X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet* 36: 1219-1224
16. Lo T, Pellegrini L, Venkitaraman AR, Blundell TL (2003) Sequence fingerprints in BRCA2 and RAD51: implications for DNA repair and cancer. *DNA Repair* 2: 1015-1028
17. Blom E, van de Vrugt HJ, de Vries Y, de Winter JP, Arwert F, Joenje H (2004) Multiple TPR motifs characterize the Fanconi anemia FANCG protein. *DNA Repair* 3: 77-84
18. Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7: 249-262
19. Medhurst AL, Huber PA, Waisfisz Q, de Winter JP, Mathew CG (2001) Direct interactions of the five known Fanconi anaemia proteins suggest a common functional pathway. *Hum Mol Genet* 10: 423-429
20. Gordon SM, Buchwald M (2003) Fanconi anemia protein complex: mapping protein interactions in the yeast 2- and 3-hybrid systems. *Blood* 102: 136-141
21. Qiao F, Moss A, Kupfer GM (2001) Fanconi anemia proteins localize to chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle-regulated manner. *J Biol Chem* 276: 23391-23396
22. Thomashevski A, High AA, Drozd M, Shabanowitz J, Hunt DF, Grant PA, Kupfer GM (2004) The Fanconi anemia core complex forms four complexes of different sizes in different subcellular compartments. *J Biol Chem* 279: 26201-26209
23. Thompson LH, Hinz JM, Yamada NA, Jones NJ (2005) How Fanconi anemia proteins promote the four Rs: replication, recombination, repair, and recovery. *Environ Mol Mutag* 45: 128-142
24. Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Andreassen PR, Gregory RC, Grompe M, D'Andrea AD (2002) S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* 100: 2414-2420
25. Nijman SM, Huang TT, Dirac AM, Brummelkamp TR, Kerkhoven RM, D'Andrea AD, Bernards R (2005) The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell* 17: 331-339
26. Meetei AR, Yan Z, Wang W (2004) FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination. *Cell Cycle* 3: 179-181
27. Bruun D, Foliás A, Akkari Y, Cox Y, Olson S, Moses R (2003) siRNA depletion of BRCA1, but not BRCA2, causes increased genome instability in Fanconi anemia cells. *DNA Repair* 2: 1007-1013
28. Godthelp BC, Artwert F, Joenje H, Zdzienicka MZ (2002) Impaired DNA damage-induced nuclear Rad51 foci formation uniquely characterizes Fanconi anemia group D1. *Oncogene* 21: 5002-5005
29. Nakanishi K, Taniguchi T, Ranganathan V, New HV, Moreau LA, Stotsky M, Mathew CG, Kastan MB, Weaver DT, D'Andrea AD (2002) Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat Cell Biol* 4: 913-920
30. Sala-Trepat M, Rouillard D, Escarceller M, Laquerbe A, Moustacchi E, Papadopoulou D (2000) Arrest of S-phase progression is impaired in Fanconi anemia cells. *Exp Cell Res* 260: 208-215
31. Venkitaraman AR (2004) Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. *Nat Rev Cancer* 4: 266-276
32. Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3: 155-168
33. Shiloh Y (2001) ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 11: 71-77
34. Gennery AR, Slatter MA, Bhattacharya A, Barge D, Haigh S, O'Driscoll M, Coleman R, Abinun M, Flood TJ, Cant AJ, Jeggo PA (2004) The clinical and biological overlap between Nijmegen Breakage Syndrome and Fanconi anemia. *Clin Immunol* 113: 214-219
35. Stiff T, Reis C, Alderton GK, Woodbine L, O'Driscoll M, Jeggo PA (2005) Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events. *EMBO J* 24: 199-208
36. Dronkert ML, Kanaar R (2001) Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res* 486: 217-247
37. Hendrickson EA (1997) Cell-cycle regulation of mammalian DNA double-strand-break repair. *Am J Hum Genet* 61: 795-800
38. Rothfuss A, Grompe M (2004) Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cell Biol* 24: 123-134
39. Otsuki T, Furukawa Y, Ikeda K, Endo H, Yamashita T, Shinohara A, Iwamatsu A, Ozawa K, Liu JM (2001) Fanconi anemia protein, FANCA, associates with BRG1, a component of the human SWI/SNF complex. *Hum Mol Genet* 10: 2651-2660
40. Venkitaraman AR (2001) Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci* 114: 3591-3598
41. Kraakman-van der Zwet M, Overkamp WJ, van Lange RE, Essers J, van Duijn-Goedhart A, Wiggers I, Swaminathan S, van Buul PP, Errami A, Tan RT, Jaspers NG, Sharan SK, Kanaar R, Zdzienicka MZ (2002) Brca2 (XRCC11) deficiency results in radioresistant DNA synthesis and a higher frequency of spontaneous deletions. *Mol Cell Biol* 22: 669-679
42. Thacker J, Zdzienicka MZ (2003) The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability. *DNA Repair* 2: 655-672
43. Wang X, Andreassen PR, D'Andrea AD (2004) Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol Cell Biol* 24: 5850-5862
44. Nakanishi K, Yang YG, Pierce AJ, Taniguchi T, Digweed M, D'Andrea AD, Wang ZQ, Jasin M (2005) Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1110-1115
45. Yamamoto K, Hirano S, Ishiai M, Morishima K, Kitao H, Namikoshi K, Kimura M, Matsushita N, Arakawa H, Buerstedde JM, Komatsu K, Thompson L, Takata M (2005) Fanconi anemia protein FANCD2 promotes immunoglobulin gene conversion and DNA repair through a mechanism related to homologous recombination. *Mol Cell Biol* 25: 34-43
46. Ohashi A, Zdzienicka MZ, Chen J, Couch FJ (2005) Fanconi anemia complementation group D2 (FANCD2) functions independently of BRCA2- and RAD51-associated homologous recombination in response to DNA damage. *J Biol Chem* 280: 14877-14883
47. Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, West SC (2001) Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* 7: 273-282
48. Yamamoto K, Ishiai M, Matsushita N, Arakawa H, Lamerdin JE, Buerstedde JM, Tanimoto M, Harada M, Thompson LH, Takata M (2003) Fanconi anemia FANCG protein in mitigating radiation- and enzyme-induced DNA double-strand breaks by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol* 23: 5421-5430
49. Hussain S, Witt E, Huber PA, Medhurst AL, Ashworth A, Mathew CG (2003) Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1. *Hum Mol Genet* 12: 2503-2510
50. Niedzwiedz W, Mosedale G, Johnson M, Ong CY, Pace P, Patel KJ (2004) The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair. *Mol Cell* 15: 607-620
51. Donahue SL, Campbell C (2004) A Rad50-dependent pathway of DNA repair is deficient in Fanconi anemia fibroblasts. *Nucleic Acids Res* 32: 3248-3257
52. Pagano G, Manini P, Bagchi D (2003) Oxidative stress-related mechanisms are associated with xenobiotics exerting excess toxicity to Fanconi anemia cells. *Environ Health Perspect* 111: 1699-1703
53. Pagano G, Youssoufian H (2003) Fanconi anaemia proteins: major roles in cell protection against oxidative damage. *Bioessays* 25: 589-595
54. Pagano G, Manini P, Bagchi D (2003) Oxidative stress-related mechanisms are associated with xenobiotics exerting excess toxicity to Fanconi anemia cells. *Environ Health Perspect* 111: 1699-1703
55. Rosselli F (1998) Fanconi anaemia syndrome and apoptosis: state of the art. *Apoptosis* 3: 229-236
56. Ridet A, Guillouf C, Duchaud E, Cundari E, Fiore M, Moustacchi E, Rosselli F (1997) Deregulated apoptosis is a hallmark of the Fanconi anemia syndrome. *Cancer Res* 57: 1722-1730

57. Marathi UK, Howell SR, Ashmun RA, Brent TP (1996) The Fanconi anemia complementation group C protein corrects DNA interstrand cross-link-specific apoptosis in HSC536N cells. *Blood* 88: 2298-2305
58. Pang Q, Christianson TA, Keeble W, Koretsky T, Bagby GC (2002) The anti-apoptotic function of Hsp70 in the interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase-mediated death signaling pathway requires the Fanconi anemia protein, FANCC. *J Biol Chem* 277: 49638-49643
59. Bogliolo M, Borghini S, Abbondandolo A, Degan P (2002) Alternative metabolic pathways for energy supply and resistance to apoptosis in Fanconi anaemia. *Mutagenesis* 17: 25-30
60. Paulin-Levasseur M, Chen G, Lariviere C (1998) The 2G2 antibody recognizes an acidic 110-kDa human mitochondrial protein. *Histochem J* 30: 617-625
61. Vit JP, Guillouf C, Rosselli F (2001) Futile caspase-8 activation during the apoptotic cell death induced by DNA damaging agents in human B-lymphoblasts. *Exp Cell Res* 269: 2-12
62. Ferrer M, Izeboud T, Ferreira CG, Span SW, Giaccone G, Kruyt FA (2003) Cisplatin triggers apoptotic or nonapoptotic cell death in Fanconi anemia lymphoblasts in a concentration-dependent manner. *Exp Cell Res* 286: 381-395
63. Leist M, Jaattela M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 589-598
64. Seal S, Barfoot R, Jayatilake H, Smith P, Renwick A, Bascombe L, McGuffog L, Evans DG, Eccles D, Easton DF, Stratton MR, Rahman N (2003) Breast Cancer Susceptibility Collaboration. Evaluation of Fanconi Anemia genes in familial breast cancer predisposition. *Cancer Res* 63: 8596-8599
65. Cleton-Jansen AM, Moerland EW, Pronk JC, van Berkel CG, Apostolou S, Crawford J, Savoia A, Auerbach AD, Mathew CG, Callen DF, Cornelisse CJ (1999) Mutation analysis of the Fanconi anaemia A gene in breast tumours with loss of heterozygosity at 16q24.3. *Br J Cancer* 79: 1049-1052
66. Taniguchi T, Tischkowitz M, Ameziane N, Hodgson SV, Mathew CG, Joenje H, Mok SC, D'Andrea AD (2003) Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nat Med* 9: 568-574
67. Marsit CJ, Liu M, Nelson HH, Posner M, Suzuki M, Kelsey KT (2004) Inactivation of the Fanconi anemia/BRCA pathway in lung and oral cancers: implications for treatment and survival. *Oncogene* 23: 1000-1004
68. Couch FJ, Johnson MR, Rabe K, Boardman L, McWilliams R, de Andrade M, Petersen G (2005) Germ line Fanconi anemia complementation group C mutations and pancreatic cancer. *Cancer Res* 65: 383-386
69. Rogers CD, Couch FJ, Brune K, Martin ST, Philips J, Murphy KM, Petersen G, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M (2004) Genetics of the FANCA gene in familial pancreatic cancer. *J Med Genet* 41: e126
70. Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14: 927-939

## Complex role of the FA proteins in providing genome stability

Katarzyna Kluzek<sup>1</sup>, Małgorzata Z. Zdzienicka<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Department of Molecular Cell Genetics, Nicolaus Copernicus Collegium Medicum in Bydgoszcz, 9 M. Skłodowskiej-Curie St., 85-094 Bydgoszcz, Poland

<sup>2</sup>Department of Toxicogenetics – MGC, Leiden University Medical Center, Wassenaarsweg 72, 2333 AL Leiden, The Netherlands

✉e-mail: M.Z.Zdzienicka@lumc.nl

**Key words:** Fanconi anemia, chromosomal instability, DNA interstrand crosslinks sensitivity, DNA double-strand breaks repair, BRCA2

### ABSTRACT

FA is a rare genetic disorder characterized by developmental abnormalities, bone marrow failure and cancer susceptibility. Cells that are derived from patients with FA display spontaneous chromosomal instability and hypersensitivity to DNA crosslinking agents that is used in FA clinical diagnostics. FA is genetically heterogeneous and caused by mutations in at least 11 distinct genes, *FANCA*, *FANCA*, *B*, *C*, *D1*, *D2*, *E*, *F*, *G*, *I*, *J* and *L*. FA proteins interact with various proteins involved in DNA damage response and cell cycle checkpoint regulation, such as: *RAD51*, *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* or *NBS1*. Moreover, *BRCA2* that plays a crucial role in homologous recombination is one of FA proteins. Collectively, all these data indicate, that the FA pathway is involved in different molecular processes that prevent DNA and control genomic stability, although its precise role still remains undefined.



# Mechanizm molekularny biotoksyczności homocysteiny – fakty i hipotezy

## STRESZCZENIE

W artykule przedstawiono w zarysie metabolizm homocysteiny i omówiono powstawanie tiolaktonu homocysteiny przy udziale syntetazy metionilo t-RNA. Praca opisuje zarówno wysoką reaktywność tiolaktonu względem grup  $\epsilon$  NH<sub>2</sub> lizyny białek, jak i zależny od Ca<sup>2+</sup> enzym hydrolizujący tiolakton. Oprócz stresu oksydacyjnego wywołwanego przez homocysteinę omówiono hipometylację, m.in. DNA, w wyniku hamowania metylotransferaz przez S-adenozylhomocysteinę. W pracy poruszono możliwe powiązania dróg metabolicznych homocysteiny, NO i argininy (z uwzględnieniem N<sub>G</sub>,N<sub>C</sub>-dimetyloargininy). Zwrócono też uwagę na powiązanie metabolizmu adenozyliny i innych nukleozydów z homocysteiną. Wydaje się, że główną przyczyną biotoksyczności homocysteiny w przebiegu miażdżycy i innych chorób jest drastyczna zmiana właściwości różnych białek w rezultacie ich N-homocysteilacji przez tiolakton homocysteiny.

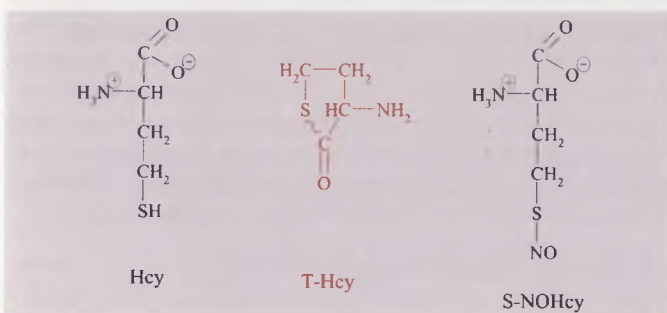
## WPROWADZENIE

Homocysteina cieszy się dużym zainteresowaniem biochemików i lekarzy, co znajduje odzwierciedlenie w liczbie publikacji na jej temat [1-3]. Dlaczego tak się dzieje? Kilkanaście lat temu stwierdzono, że homocysteina jest niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy [2]. Wykazano, że wysoki poziom homocysteiny w osoczu bardzo często towarzyszy różnego typu stanom patologicznym, nie tylko sercowo-naczyniowym, ale także związanym z funkcjonowaniem nerek [4], rozwojem płodu [5] oraz z zaburzeniami systemu nerwowego [6]. Jednak, niektórzy badacze uważają hyperhomocysteinemię nie za przyczynę, ale za skutek chorób sercowo – naczyniowych (za normę uważa się stężenie 5–15  $\mu$ moli homocysteiny na litr osocza krwi [1]).

## GŁÓWNE DROGI METABOLIZMU HOMOCYSTEINY

Homocysteina jest homologiem cysteiny (Rys. 1), a zarazem pochodną metioniny, od której różni się brakiem grupy metylowej przy atomie siarki. Zasadniczo homocysteina nie wchodzi w skład białek [3]; nie ma dla niej odpowiedniego kodonu. Stężenie homocysteiny w osoczu zależy od diety, zwłaszcza od dostępu metioniny i od mechanizmów jej transportu, a także od ewentualnego braku w organizmie niektórych enzymów metabolizmu metioniny i homocysteiny, jak również od witamin, które są głównymi elementami niezbędnych koenzymów [1,3]. Metabolizm homocysteiny obrazuje rysunek 2. W reakcji transmetylacji S-adenozylometioniny w obecności akceptora X-H powstaje X-CH<sub>3</sub> i S-adenozylhomocysteina. Ta ostatnia jest bezpośrednim substratem homocysteiny, w reakcji katalizowanej przez hydrolazę S-adenozylhomocysteiny, w której z cząsteczki S-adenozylhomocysteiny (+ H<sub>2</sub>O) powstaje homocysteina i adenozylna. S-adenozylometionina może także ulegać dekarboksylacji w reakcji katalizowanej przez odpowiednią dekarboksylazę z udziałem pochodnej witaminy B<sub>6</sub> – fosforanu pirydoksalu. Zdekarboksylowana S-adenozylometionina reaguje z putrescyną dając poliaminę – spermidynę (oraz S-metylotioadenozylnę). Putrescyna

powstaje przez dekarboksylację ornityny, a ta powstaje z argininy. Spermidyna reaguje ze zdekarboksylowaną S-adenozylometioniną, w czego wyniku powstaje poliamina – spermina. Spermidyna i spermina są niezwykle



Rysunek 1. Wzory chemiczne homocysteiny (Hcy), tiolaktonu homocysteiny (T-Hcy) i S-nitrozohomocysteiny (S-NOHcy).

Wojciech Antoni Turski<sup>1,✉</sup>

Edward Bald<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Pedagogiki Zdrowia i Wychowania Fizycznego, Filia w Piotrkowie Trybunalskim Akademii Świętokrzyskiej im. Jana Kochanowskiego w Kielcach, Piotrków Trybunalski

<sup>2</sup>Zakład Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź

<sup>✉</sup>Katedra Pedagogiki Zdrowia i Wychowania Fizycznego, Filia w Piotrkowie Trybunalskim Akademii Świętokrzyskiej im. Jana Kochanowskiego w Kielcach, ul. Słowackiego 114/118, 97-300 Piotrków Trybunalski; e-mail: ebal@uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 1 kwietnia 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 5 lipca 2005 r.

**Słowa kluczowe:** homocysteina; tiolakton homocysteiny; S-adenozylhomocysteina; S-nitrozohomocysteina; hydrolaza S-adenozylhomocysteiny; N<sub>G</sub>,N<sub>C</sub>-dimetyloarginina (ADMA); biotoksyczność, adenozylna

**Wykaz skrótów:** ADMA – N<sub>G</sub>,N<sub>C</sub>-dimetyloarginina (asymetryczna); BSC –  $\beta$ -syntaza cystationiny; Cys – cysteina; DDAH – N<sub>G</sub>,N<sub>C</sub>-dimetyloargininy dimetyloaminohydrolaza; DOPA – dihydroksyfenyloalanina; GLC –  $\gamma$ -liaza cystationiny; Hcy – homocysteina; Hcy AMP – homocysteilo-AMP; HDL – lipoproteiny (osocza) o dużej gęstości; LDL – lipoproteiny (osocza) o małej gęstości; Met – metionina; MT – metylotransferaza; MTRS – syntetaza metionilo-t-RNA; NAD<sup>+</sup> – nikotynamidoadeninodukleotyd (forma utleniona); NOS – syntaza tlenu azotu; PRMT<sub>1</sub> lub MT<sub>1</sub> – metylotransferaza argininy białek nr 1; SAH – S-adenozylhomocysteina; SAHH – hydrolaza S-adenozylhomocysteiny; SAM – S-adenozylometionina; SDMA – N<sub>1</sub>,N<sub>2</sub>-dimetyloarginina (symetryczna); SM – syntetaza metioniny (metylotransferaza metyloctetrahydrofolian – homocysteina); S-NO Hcy – S-nitrozohomocysteina; S-NO Hcy-t-RNA – S-nitrozohomocysteilo-t-RNA; TH – hydrolaza tiolaktonu homocysteiny (tiolaktonaza); T-Hcy – tiolakton homocysteiny; THF – tetrahydrofolian

ważne w każdej komórce, gdyż wywierają olbrzymi wpływ na regulację różnych przemian. Zarazem związki te łączą przemianę homocysteiny i argininy, a także inne drogi metaboliczne.

Powstająca w wyniku hydrolizy S-adenozylhomocysteiny homocysteina może ulegać przede wszystkim remetylacji do metioniny oraz reakcji transsulfuracji do cystationiny, która jest początkiem biosyntezy cysteiny [1]. Jeżeli dostępność metioniny jest ograniczona to drogą oszczędzania (ang. *salvage pathway*) może być reakcja remetylacji homocysteiny, katalizowana przez syntazę metioniny (SM), w której donorem grupy  $\text{CH}_3$  jest 5-metylotetrahydrofolian lub betaina. Wysokie stężenie homocysteiny może wynikać z upośledzenia remetylacji, co może być związane z defektem genetycznym. Inną przyczyną upośledzonej remetylacji może być brak kluczowych witamin, przede wszystkim kwasu foliowego. Okazało się, że w cyklu przemian pochodnych tetrahydrofolianu niezbędną jest też witamina  $\text{B}_{12}$  i witamina PP [7]. Reakcja transsulfuracji zachodzi między grupą hydroksylową seryny i homocysteina. Wydziela się woda, tworzy się nowe wiązanie S-C i powstaje cystationina, a reakcję katalizuje  $\beta$ -syntaza cystationiny (BSC). Do działania  $\beta$ -syntazy cystationiny niezbędny jest fosforan pirydoksalu.  $\beta$ -Syntaza cystationiny człowieka (w odróżnieniu od  $\beta$ -syntazy cystationiny np. drożdży) zawiera związany hem [8]. Jest on niezbędny do działania enzymu, ale mechanizm udziału hemu jest niejasny. Cystationina w środowisku wodnym ulega reakcji hydrolizy do cysteiny i homoseryny, katalizowanej przez  $\gamma$ -liazę cystationiny (GLC), której kofaktorem jest fosforan pirydoksalu. Cysteina i homocysteina mogą ulegać utlenieniu do związków zawierających mostek disiarczkowy – cystyny i homocystyny. Może też następować reakcja cysteiny i homocysteiny z innymi związkami zawierającymi grupy sulfhydrylowe z powstaniem mieszanych disiarczków [1]. Cysteina bierze udział w syntezie glutationu –  $\gamma$ -glutamylcysteinyloglicyny. Glutation uważany jest za jeden z najważniejszych związków biorących udział w utrzymywaniu równowagi redoks w komórce. Cysteina i homocysteina mogą ulegać utlenieniu do cysteino- lub homocysteinosulfianu, a następnie do cysteino- i homocysteinosulfonianu (homocysteinianu).

#### TIOLAKTON HOMOCYSTEINY

Co może dziać się z homocysteina poza remetylacją, utlenianiem i transsulfuracją? Homocysteina jest analogiem metioniny, a w związku z tym można się spodziewać, że pewne enzymy mogą być niejako „oszukane” i zamiast z metioniną mogą reagować z homocysteina (podobnie jest z selenocysteina). I tak się rzeczywiście dzieje. W obecności enzymu metionilo-t-RNA syntetazy (MTRS) i odpowiedniego t-RNA zachodzi reakcja aktywacji homocysteiny (Rys. 2). Od ATP odłącza się pirofosforan, a powstający AMP łączy się wiązaniem wysokoenergetycznym z grupą acylową homocysteiny, powstaje homocysteilo-AMP (Hcy-AMP) [9]. Gdyby homocysteilo-AMP mógł dalej brać udział, jak np metionilo-AMP, w mechanizmie translacyjnej aktywacji aminokwasów, to wówczas z odpowiednim t-RNA dawałby homocysteilo-t-RNA, z odłączeniem AMP. Jednakże, w tym wypadku enzym „nie daje się oszukać”. Dzie-

je się tak, ponieważ dochodzi do przesunięcia grupy -SH w stronę miejsca T w cząsteczce enzymu wiążącego grupę sulfhydrylową, a jednocześnie odsunięcia tej grupy [10] od miejsca S odpowiedzialnego za specyficzność enzymu w powstawaniu cząsteczek aminoacylo-t-RNA. Wówczas grupa SH zbliża się do reszty fosforanowej AMP. Dochodzi do pęknięcia wysokoenergetycznego wiązania acylofosforanowego, odłącza się AMP i powstaje pierścieniowy tioester homocysteiny – tiolakton homocysteiny (Rys. 1), w którym występuje wiązanie tioestrowe [9-11]. Wiązanie takie jest zawsze wiązaniem wysokoenergetycznym. Najbardziej znanym przedstawicielem związków z tego typu wiązaniem jest acetylokoenzym A. Potwierdzeniem wyżej naszkicowanego mechanizmu edycji (ang. *edition*) syntetazy metionilo-t-RNA jest jej zdolność do tworzenia metionilo-CoA i dipeptydu metionina-cysteina po inkubacji metioniny z enzymem w obecności odpowiednio CoA i cysteiny [3].

Tiolakton homocysteiny (T-Hcy) jest zasadą według Brönsteda (z grupą  $\text{NH}_2$ ), ale może występować w formie sprzężonego kwasu z grupą  $\text{NH}_3^+$  (Rys. 1). Stała  $\text{pK}$  grupy  $\text{NH}_3^+$  tiolaktonu wynosi 7,1 co oznacza, że w  $\text{pH}$  7,4 aż 66,7% cząsteczek związku ma wypadkowy ładunek elektryczny równy zero. Wiadomo, że cząstki elektrycznie obojętne stosunkowo łatwo mogą ulegać swobodnej dyfuzji przez błonę komórkową, zatem tiolakton homocysteiny stosunkowo łatwo wychodzi z komórek i przechodzi do osocza krwi lub do pożywki (hodowla komórkowa) [9,11]. Tiolakton homocysteiny, zarówno w komórkach bakterii, jak i organizmów eukariotycznych [12] może powstawać w reakcjach katalizowanych przez syntetazy leucylo-t-RNA i izoleucylo-t-RNA. Tiolakton nie jest syntetyzowany w erytrocytach i w osoczu, w których brak jest odpowiednich enzymów, choć jest w nich obecny w formie wolnej i związanej z  $\epsilon$ -N-lizyny w białkach [13].

Tiolakton homocysteiny jest bardzo reaktywny, bo zawiera wysokoenergetyczne wiązanie tioestrowe. Tiolakton reaguje z resztami lizyny znajdującymi się w łańcuchach bocznych białek [3,9,11]. Wydaje się, że szczególnie ważna jest struktura przestrzenna białka i dostępność reszt lizyny dla tiolaktonu. Reakcja z resztami lizyny białek jest nieenzymatyczna. W jej wyniku następuje acylacja reszt lizyny w białku i powstają pochodne zawierające N-acylową grupę homocysteiny. Proponujemy, aby tego typu reakcję nazwać homocysteilacją lub dokładniej N-homocysteilacją, choć w literaturze anglojęzycznej spotyka się określenie „*homocysteinylation*” [11]. Żadne inne reszty aminokwasów w białkach nie ulegają N-homocysteilacji [11]. Ilość w ten sposób zmodyfikowanego białka jest wprost proporcjonalna do stężenia tego białka w osoczu. N-homocysteilowane białka charakteryzują się obniżoną rozpuszczalnością w porównaniu z białkami, które nie zostały zmodyfikowane, a także mają zaburzoną strukturę przestrzenną, dzięki czemu nieprawidłowo przebiega składanie ich struktury przestrzennej (ang. *foldng*) i bardzo często ulegają agregacji [3,11].

#### S-NITROZOHOMOCYSTEINA

Syntetaza metionilo-t-RNA może też brać udział w aktywacji S-nitrozohomocysteiny, która powstaje w wyniku

nieenzymatycznej reakcji homocysteiny z tlenkiem azotu. Ten ostatni przyłącza się do atomu siarki homocysteiny i powstaje S-nitrozohomocysteina (S-NO Hcy) z grupą nitrozotiolową [10] (Rys. 1). Wszystkie nitrozotiole są nietrwałe, gdyż ulegają transnitrozylacji w obecności innych tioli, amin, hemu i hemoprotein. Połowiczny czas życia S-nitrozohomocysteiny w osoczu człowieka wynosi około 1 godziny, zatem S-nitrozohomocysteina jest jednym z najtrwalszych nitrozotiołów [14]. S-nitrozohomocysteina jest na tyle podobna do metioniny, że syntetaza metionilo-t-RNA „daje się oszukać” i katalizuje reakcję syntezy S-nitrozohomocysteilo-t-RNA. W obecności przenoszącego metioninę t-RNA tworzy się S-nitrozohomocysteilo-t-RNA [10], który zamiast metioniny może być dawcą grupy nitrozohomocysteilowej w biosyntezie białek. Jest to zatem trzeci sposób modyfikacji białek przez homocysteinę, tym razem towarzyszący translacji. S-nitrozohomocysteilo-t-RNA (S-NO Hcy-t-RNA) ulega stosunkowo szybko hydrolytycznej deacylacji do S-nitrozohomocysteiny (czas połowicznego rozpadu około 27 minut) [3]. Natomiast w obecności 1 mM homocysteiny lub glutationu może dochodzić do reakcji transnitrozylacji: S-nitrozohomocysteilo-t-RNA + tiol → nitrozotiol + homocysteilo-t-RNA. Powstający homocysteilo-t-RNA jest bardzo wrażliwy na deacylację i w ciągu minuty spontanicznie zmienia się w tiolakton homocysteiny i t-RNA. W związku z tym mało prawdopodobne są przypuszczenia [15], że w wątrobie królików znajduje się syntetaza homocysteilo-t-RNA katalizująca wbudowywanie homocysteiny do białek. W każdym bądź razie S-nitrozohomocysteilo-t-RNA bierze udział w translacji, a stąd w białkach mogą niezwykle rzadko występować reszty S-nitrozohomocysteiny. Niewiele wiadomo jest na temat trwałości S-nitrozohomocysteilowanych białek. Jeżeli związki nitrozotiolowe łatwo ulegają transnitrozylacji, to można zakładać, że w warunkach znacznego stężenia związków tiolowych w komórce lub poza nią, może dochodzić do transnitrozylacji i powstawania homocysteilowanych białek. Wiemy jednak, że grupy S-nitrozotiolowe, połączone z centrum aktywnym syntetazy metionilo-t-RNA są trwałe [10], co może wynikać z ochronnego wpływu struktury przestrzennej białek na te grupy. Nie wiemy jednak, jak zmieniają się właściwości białek pod wpływem takiej modyfikacji. Jakubowski [10] sugeruje, że taką modyfikacją można wytłumaczyć, dlaczego miażdżyca zaczyna się od miejsc rozgałęzienia naczyń, gdyż tam zachodzi największy nacisk hydrodynamiczny (ang. *shear forces*) prowadzący do zwiększonego powstawania NO przy udziale syntazy NO. W białkach występują raczej reszty homocysteiny a nie S-nitrozohomocysteiny. Podczas elongacji lub po translacji następuje transnitrozylacja białek prowadząca do wymiany reszt S-nitrozohomocysteiny na homocysteinę [3]. Również w tym wypadku, nieznanym jest wpływ takiej modyfikacji na właściwości białek. A nie jest to zjawisko marginalne. Aż 50 % homocysteiny w białkach komórek śródbłonna żyły pępkowej człowieka to homocysteina oporna na degradację Edmana [16], w której – w wyniku hydrolyzy – zostaje oderwany aminokwas, który w białku posiadał wolną grupę α-aminową. Wbudowywaniu homocysteiny do białek zapobiega nadmiar metioniny lub folianów ułatwiających remetylację homocysteiny do metioniny.

Istnieją lub istniały pewne kontrowersje w stosunku do nitrozylacji homocysteiny (lub raczej homocysteilacji NO). Z jednej strony S-nitrozohomocysteina ma działanie pozytywne; hamuje agregację płytek i proliferację miocytów gładkich mięśni naczyń, a ponadto stabilizuje NO, który działa rozkurczająco na ściany naczyń. Stanowi także ochronę przed tworzeniem tiolaktonu homocysteiny. Z drugiej jednak strony jest toksyczna i to nie tylko przez tworzenie nadtlenoazotynu, ale przez stymulację w budowywania homocysteiny do białek [3]. Warto odnotować, że S-nitrozohomocysteina nie została dotąd bezpośrednio wykryta w surowicy krwi człowieka; wykryto obecność 200 nM S-nitrozocysteiny i 200 nM S-NO-glutationu [3].

#### TIOLAKTONAZA HOMOCYSTEINY

Tiolakton homocysteiny może ulegać, jak już wspomniano, hydrolyzie nieenzymatycznej, ale najczęściej ulega on reakcji hydrolyzy do homocysteiny, katalizowanej przez obecną w osoczu hydrolazę tiolaktonu homocysteiny, inaczej tiolaktonazę homocysteiny [17,18]. Reakcja ta jest zależna od stężenia jonów wapnia. W stężeniach  $Ca^{2+}$  poniżej 10  $\mu M$  enzym nie działa; optymalne stężenie  $Ca^{2+}$  1-2 mM występuje jedynie w osoczu (ogólniej w przestrzeni pozakomórkowej). Ponieważ tiolakton może przyczyniać się do niekorzystnej modyfikacji białek [10,19], należy uznać działanie tiolaktonazy homocysteiny za podstawowy mechanizm obronny przed skutkami, które mogą m.in. nasilać się i akumulować w procesie powstawania patologii naczyniowo-sercowej [3]. Tiolaktonaza, którą oczyszczono do homogenności [17], jest białkiem o masie cząsteczkowej 45 kDa, wchodzi w skład kompleksu HDL, zawierającego tzw. „dobry” cholesterol [17,18]. Zatem obecność HDL w osoczu ma jeszcze ten korzystny aspekt, że kompleks zawiera enzym, który jest w stanie zniszczyć potencjalnie jatrogenny tiolakton. Tiolaktonaza jest enzymem o stosunkowo niskiej specyficzności substratowej; działa nie tylko na wiązanie tioestrowe tiolaktonu homocysteiny, ale także na inne estry, np. octan fenylu lub paranitrofenylu. Jej substratem jest również paraokson, który jest defoliantem, mogącym wywołać ogromne zniszczenia szaty roślinnej [20]. Tiolaktonaza kodowana przez gen *PONI*, może unieczynniać neurotoksyczne, śmiertelnie trujące gazy, sarin i soman [18] i prowadzić do hydrolytycznego usunięcia utlenionych cząsteczek fosfolipidów z kompleksów LDL (zawierających „zły” cholesterol) [18]. Tiolaktonaza współoczyzcza się z lipoproteiną A<sub>1</sub> obecną w HDL [3].

Podsumowując, tiolaktonaza jest obecna w cząstkach HDL magazynujących „dobry” cholesterol, i może jednocześnie modyfikować utlenione cząstki LDL, niosące „zły” cholesterol, w ten sposób doprowadzając do ich regeneracji. Kompleksy LDL pozbawione utlenionych lipidów słabiej ulegają adhezji do ściany komórek śródbłonna i miocytów, co zmniejsza przyleganie i chemotaksję makrofagów i monocytów. Nawiasem mówiąc uszkodzenie LDL może być wywołane nie tylko utlenianiem, ale też N-homocysteilacją grup ε-aminowych lizyny. Okazało się, że N-homocysteilacja 8 reszt lizyny (na 358 występujących w cząstce LDL zawierającej około 5000 reszt aminokwasów) nie zmienia pobierania i degradacji LDL *in vitro* przez limfocyty świnki

morskiej. Natomiast N-homocysteilacja 10-25% reszt lizyny sprawia, że cząstki LDL są szybciej pobierane i degradowane przez makrofagi człowieka w hodowli, a także ulegają agregacji [21]. Z drugiej strony, trzeba wspomnieć, że w wysokim stopniu N-homocysteilowane cząstki LDL są częściowo chronione przed utlenianiem z uwagi na zwiększoną zawartość grup -SH homocysteiny [22]. Wykazano istnienie różnic w zawartości HDL pomiędzy przedstawicielami rasy czarnej i białej na korzyść rasy czarnej, u której przedstawicieleli zaobserwowano średnio wyższe stężenie HDL i na ogół mniej zaburzeń sercowo-naczyniowych, a jednocześnie wyższą aktywność tiolaktonazy w stosunku do tiolaktonu homocysteiny [18]. Okazało się, że wysoka aktywność tiolaktonazy jest związana z częściej występującymi u osób rasy czarnej allelami R55 i R192 genu PON1, podczas kiedy niska aktywność tiolaktonazy najczęściej występuje u osób rasy białej (allele M55 i Q192). Okazało się też, że tiolaktonaza ulega uszkodzeniu przez tiolakton homocysteiny. Aktywniejsza forma enzymu występująca u osobników rasy czarnej traci pod wpływem 1 mM tiolaktonu homocysteiny tylko 25% aktywności, podczas gdy mniej aktywna forma występująca u osobników rasy białej aż 60% aktywności [23].

#### KLASYCZNE POGLĄDY NA TEMAT TOKSYCZNOŚCI HOMOCYSTEINY

Jakie mogą być mechanizmy toksyczności homocysteiny? Najpopularniejszy jest pogląd, że przy podwyższonym stężeniu homocysteiny w komórkach i w osoczu krwi może dochodzić do nadmiernego powstawania reaktywnych form tlenu [1,3]. Hipoteza ta jest mało prawdopodobna, bo aby wywołać szok hiperoksydacyjny z uszkodzeniem komórek przez wolne rodniki, szczególnie komórek śródbłonna, należy zastosować wysokie, niefizjologiczne stężenia homocysteiny. Ponadto okazało się, że podobną nadprodukcję reaktywnych form tlenu wywołuje inkubacja komórek nie tylko w obecności dużych stężeń homocysteiny, ale i z innych związków tiolowych, takich jak cysteina lub  $\beta$ -merkaptoetanol, jakkolwiek należy wziąć pod uwagę wyższą reaktywność grup tiolowych homocysteiny niż cysteiny [1,3]. Istnieją doniesienia o hamowaniu przez homocysteinę aktywności dysmutazy ponadtlenkowej [21]. Nie jest jednak wykluczone, że w tych warunkach przyczyną nie jest homocysteina a tiolakton homocysteiny (N-homocysteilacja). Przypuszcza się, że homocysteina może aktywować reduktazę  $\beta$ -hydroksy- $\beta$ -metyloglutarylokoenzymu A, która jest kluczowym enzymem regulatorowym w biosyntezie cholesterolu [24]. Tym można tłumaczyć, dlaczego hiperhomocysteinemia często towarzyszy hipercholesterolemii. Dodatkowo, pod wpływem homocysteiny zaobserwowano apoptozę neuronów i komórek śródbłonna [6]. Homocysteina może hamować aktywność peroksydazy glutationu, co prowadzi do stresu oksydacyjnego i do inaktywacji NO [25]. O ile sama inaktywacja NO przez  $O_2^{\cdot -}$  do nadtlenoazotynu (o silnym działaniu toksycznym, utleniającym i nitrującym) jest ogólnie znana, to mechanizm zwiększonej produkcji  $O_2^{\cdot -}$  z udziałem homocysteiny (via peroksydaza glutationu) pozostaje niejasny. Najprawdopodobniej towarzyszy temu zjawisku modyfikacja oksydazy NADPH i syntazy NO, tak że oba enzymy stają się producentami znacznej ilości anionorodnika  $O_2^{\cdot -}$  [1,2]. Jedną z ewentualnych przyczyn

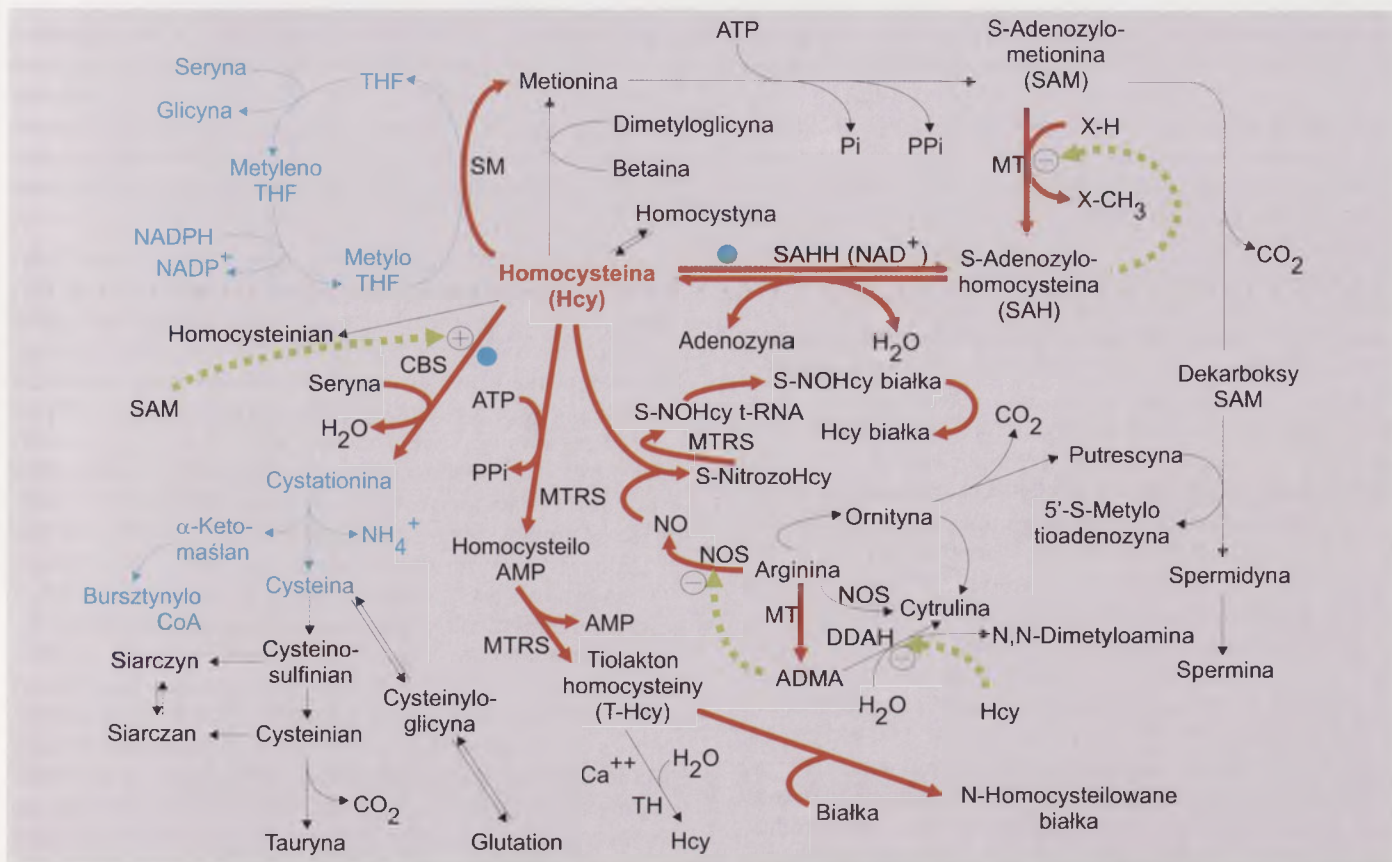
toksyczności homocysteiny mogłaby być jej reakcja z NO z utworzeniem nitrozotolu, powodująca obniżenie stężenia NO, a przez to osłabienie systemów obronnych przed reaktywnymi formami tlenu.

Rodzi się pytanie, czy obniżone stężenie homocysteiny w osoczu, czyli hipohomocysteinemia, nie może mieć skutków patologicznych? Okazało się, że tego typu zjawisko związane z nadekspresją  $\beta$ -syntazy cystationiny stwierdzono u ciężarnych kobiet [26]. Oczywiście jest to prawdopodobnie przypadek, a nie związek przyczynowo-skutkowy. Ponadto obniżone stężenie homocysteiny zaobserwowano u pacjentów z indukowaną streptozotocyną cukrzycą insulinozależną [27]. Okazuje się, że glukokortykoidy stymulują, a insulina hamuje biosyntezę m-RNA  $\beta$ -syntazy cystationiny. Stąd przy braku insuliny mamy intensywną transulfurację homocysteiny i w efekcie hipohomocysteinemię. Warto podkreślić, że glukagon u normalnych szczerów obniża poziom homocysteiny osocza, indukując ekspresję enzymów katalizujących transulfurację [27]. Należy dodać, że u pacjentów cierpiących na cukrzycę typu II, odwrotnie, mamy do czynienia z hiperhomocysteinemią [28]. Stwierdzono także, że w przypadku skrajnej hipohomocysteinemii (niemal ahomocysteinemii) dochodzi do poważnego niedoboru oksydazy siarczynowej [29]. Przyczyna tego zjawiska jest nieznaną – czyżby siarczyn był allosterycznym aktywatorem jakiegoś enzymu zużywającego homocysteinę? Regulatorem przemian homocysteiny i metioniny jest także S-adenozylometionina. Hamuje ona aktywność reduktazy metylenotetrahydrofolianowej, natomiast jest silnym aktywatorem allosterycznym  $\beta$ -syntazy cystationiny [30] (Rys. 2). W wypadku podwyższonego stężenia S-adenozylometioniny zachodzi zahamowanie remetylacji homocysteiny, a jednocześnie stymulacja transulfuracji, a więc przemiany cystationiny do cysteiny i glutationu.

#### NAJNOWSZE PRÓBY WYJAŚNIENIA BIOTOKSYCZNOŚCI HOMOCYSTEINY

##### HIPO- I HIPERMETYLACJA W TOKSYCZNOŚCI HOMOCYSTEINY

Niektórzy badacze sugerują, że źródłem toksyczności jest nie sama homocysteina a S-adenozylhomocysteina, która jest inhibitorem bardzo wielu metylotransferaz. W obecności wysokich stężeń homocysteiny ulega zahamowaniu m.in. O-metylotransferaza katecholowa, metylacja DNA i licznych białek [31,32]. Można przypuszczać, że w warunkach podwyższonego stężenia homocysteiny, jest też więcej S-adenozylhomocysteiny i to właśnie ten związek hamuje różnego typu reakcje metylacji. Stężenie homocysteiny zależy od aktywności hydrolazy S-adenozylhomocysteiny. Zahamowanie aktywności metylotransferaz przez S-adenozylhomocysteinę prowadzi do hipometylacji, co ma poważne, narastające konsekwencje. Początkowo sądzono, że hipometylacja występuje w warunkach obniżonego stężenia S-adenozylometioniny. Okazuje się jednak, że to nie wystarcza – spadkowi musi towarzyszyć podwyższone stężenie S-adenozylhomocysteiny, a zatem wzrost stosunku S-adenozylhomocysteiny do S-adenozylometioniny [33]. Obniżenie stężenia S-adenozylometioniny może wynikać z niedoboru ATP, z zahamowania aktywności adenozylotransferazy metioniny i nadprodukcji poliamin. Zdaniem



**Rysunek 2.** Metabolizm homocysteiny. Strzałki pełne (cienkie i grube), bez względu na kolor oznaczają reakcje. Przerwane strzałki w kolorze zielonym oznaczają hamowanie lub aktywację reakcji enzymatycznej. Minus na końcu strzałki w kolorze zielonym oznacza, że związek X jest allosterycznym lub kompetycyjnym inhibitorem enzymu katalizującego reakcję  $A \rightarrow B$ , zaś plus oznacza, że związek X jest aktywatorem (allosterycznym) danego enzymu. Kolor niebieski (strzałek, kół, nazw substratów i ich skrótów) oznacza, że w reakcjach uczestniczą koenzymy zawierające witaminy. Strzałki w kolorze czerwonym oznaczają reakcje, które zdaniem autorów artykułu są najważniejsze dla wyjaśnienia toksyczności homocysteiny.

niektórych badaczy [33] chroniczne podwyższenie stężenia S-adenozylhomocysteiny może wynikać z podwyższonego stężenia homocysteiny, w wyniku wzrostu aktywności hydrolazy S-adenozylhomocysteiny katalizującej reakcję:  $\uparrow$ homocysteina + adenozyina  $\leftrightarrow$  S-adenozylhomocysteina  $\uparrow$  + woda. Ale przyczyny mogą być inne, zdaniem innych badaczy to nie homocysteina, a S-adenozylhomocysteina jest toksyczna dla drożdży, które w wyniku mutacji nie mają  $\beta$ -syntazy cystationiny [32]. Jest bardzo prawdopodobne, że główną przyczyną toksyczności homocysteiny jest obecność nieprawidłowo zmetylowanych cząsteczek DNA, RNA i białek [31,32] lub obniżone stężenie produktów metylacji – kreatyny, cholicy i adrenaliny. W wypadku obniżenia stosunku S-adenozylometionina:S-adenozylhomocysteina obserwowano obniżoną metylację fosfatydyloetanolaminy do fosfatydylocholicy w osoczu dzieci ze zwyrodnieniem torbielowatym [34]. Zdaniem niektórych badaczy [35] N-metylotransferaza fosfatydyloetanolaminy, uczestnicząca w syntezie fosfatydylocholicy i S-adenozylhomocysteiny, może stać się w przyszłości celem terapii hiperhomocysteinemii.

Należy rozważyć dwa aspekty procesu transmetylacji. Po pierwsze z hipometylacją możemy mieć do czynienia w wypadku, kiedy jest dużo S-adenozylhomocysteiny, a mało S-adenozylometioniny i trudniej dochodzi do metylacji, bądź metylotransferazy są hamowane przez S-adenozylhomocysteinę.

Po drugie, skoro jest dużo S-adenozylhomocysteiny, można przypuścić, że ten stan poprzedziła wzmożona metylacja, w której S-adenozylometionina przekształciła się S-adenozylhomocysteinę i musiały powstać bardzo duże ilości innych produktów metylacji. Okazało się, że w komórkach inkubowanych z guanidynoocetanem dochodzi do wzmożonej produkcji homocysteiny i kreatyny. Prawie 75% homocysteiny człowieka powstaje w czasie syntezy kreatyny (50 mmoli/dobę), głównie w wątrobie. Okazało się, że guanidynoocetan, pochodzący przede wszystkim z nerek, prowadzi do wzrostu stężenia homocysteiny, a kreatyna hamuje jej powstawanie [36]. Można wysunąć przypuszczenie, że toksyczność homocysteiny nie wynika z jej nagromadzenia, ale z akumulacji w organizmie zmetylowanych substancji, na przykład kreatyny. Kreatyna jest często stosowana przez kulturystów i sportowców: w tej formie może hamować syntezę kreatyny w organizmie, a wtedy dodatkowo spada stopień zużycia S-adenozylometioniny i nie powstaje S-adenozylhomocysteina i homocysteina.

**POWIĄZANIA PRZEMIAN HOMOCYSTEINY, NO I ARGININY**

Pomijając już nitrozylację homocysteiny, tlenek azotu biorąc udział w „stresie oksydacyjnym” ma wpływ na wzmożoną produkcję reaktywnych form tlenu. Te z kolei unieczynnijają NO, więc w reakcji z anionorodnikiem po-

nadtlenkowym, w wyniku której powstaje nadtlenoazotyn. Może się zdarzyć, że syntaza NO ulegnie takiej modyfikacji, że będzie wytwarzała reaktywne formy tlenu zamiast NO z argininy. Z tej ostatniej powstaje też ornityna, a z niej przez dekarboksylację putrescyna. Ta reaguje ze zdekarboksylowaną S-adenozylometioniną, prowadząc do wytworzenia sperminy i spermidyny. A zatem nadprodukcja poliamin może w rezultacie powodować hipometylację, niedobór S-adenozylometioniny, argininy i NO. Dodatkowo stwierdzono, że poliaminy hamują aktywność izoformy NO w neuronach. Jest jeszcze jedno powiązanie wspomnianych dróg metabolicznych, uważane przez wielu badaczy za bardzo ważne [9,37]. Jest nim  $N_G, N_G$ -dimetyloarginina (ADMA). Tu należy przypomnieć, że NO powstaje z argininy (Rys. 3) w reakcji katalizowanej przez syntazę NO, zachodzącej według schematu:  $\text{arginina} + 2\text{NADPH} + 2\text{H}^+ + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{cytrulina} + \text{NO} + 2\text{NADP}^+$ . Okazało się, że w osoczu osób z hipercholesterolemią i miażdżycą dochodzi do akumulacji asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy (gdzie  $N_G$  oznacza atom azotu grupy guanidynowej), która z kolei hamuje kompetycyjnie aktywność syntazy NO śródbłonna, a więc hamuje aktywność rozkurczową [37,38]. Wzrost stężenia asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy towarzyszy podwyższonemu poziomowi cholesterolu (szczególnie LDL) i trójglicerydów [39]. Okazało się także, że aktywność syntazy NO jest blokowana zarówno przez asymetryczną  $N_G, N_G$ -dimetyloargininę, jak i przez LDL, na zasadzie rozprzęgnięcia (ang. *uncoupling*); działa wtedy domena redukcyjna enzymu, zaś jego domena oksygenazowa przekazuje elektrony na  $\text{O}_2$ , a nie na argininę. W rezultacie, syntaza NO zaczyna wytwarzać reaktywne formy tlenu. Zjawisko to miało miejsce nawet przy nieznacznej hipercholesterolemii. Wzrost stężenia asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy wydaje się nasilać rozwój miażdżycy, podczas gdy arginina może łagodzić dysfunkcję śródbłonna naczyń [37].

Jeśli chodzi o proces powstawania asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy, należy podkreślić, że to nie wolna arginina ulega metylacji, ale reszty argininy określonych białek. Komórki śródbłonna zdolne są do syntezy asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy i w mniejszych ilościach symetrycznej  $N_1, N_2$ -dimetyloargininy (SDMA) [40]. Oba związki powstają w wyniku proteolitycznej degradacji metylowanych białek. W organizmach ssaków zidentyfikowano dwie N-metylotransferazy argininy białkowej. N-metylotransferaza typu I ( $\text{MT}_1$ ) katalizuje reakcję mono- i dimetylacji asymetrycznej przy atomie azotu  $N_G$  argininy w białkach histonowych  $H_1$  [41]. N-metylotransferaza typu II ( $\text{MT}_2$ ) katalizuje reakcję monometylacji i asymetrycznej dimetylacji reszt argininy przy atomach  $N_G$  i  $N_G'$  zasadowego białka mieliny z mózgowia [42]. Inhibitorami syntazy NO są tylko asymetryczna  $N_G, N_G$ -dimetyloarginina i  $N_G$ -monometyloarginina pochodzące z metylacji histonu. Nie są nimi ani symetryczna  $N_1, N_2$ -dimetyloarginina, ani monometyloarginina. W każdym z przypadków dawcą grupy metylowej jest S-adenozylometionina (Rys. 3). Zidentyfikowano cztery izoformy metylotransferazy argininy białek typu I (PRMT1) różniące się stopniem oligomeryzacji, specyficznością substratową i mechanizmami regulacji aktywności [38]. Tylko uwalnianie asymetrycznej, ale nie symetrycznej  $N_1, N_2$ -dimetyloargininy jest hamowane przez inhibitory metylotransferaz [38], w tym S-adenozylhomocysteinę i cyklo-

leucynę. Cząsteczki LDL wpływają na wzrost uwalniania asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy przez komórki śródbłonna naczyń człowieka, najprawdopodobniej przez stymulację ekspresji genu *PRMT1* [38]. Mechanizm wpływu asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy, a pośrednio homocysteiny, S-adenozylometioniny, S-adenozylhomocysteiny i argininy na wzrost syntezy cholesterolu pozostaje nieznanym.

A zatem produkcja toksycznych S-adenozylhomocysteiny i homocysteiny rośnie wraz z produkcją toksycznej asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy. Jednocześnie wzrost stężenia asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy hamuje kompetycyjnie powstawanie NO z argininy, co ogranicza dostępność NO. A zatem ograniczenie dostępności NO pod wpływem homocysteiny zachodzi w wyniku bezpośredniej nitrozylacji homocysteiny i jej dalszych konsekwencji (w tym translacyjnego wbudowywania do białek). Ponadto, jeśli homocysteina rzeczywiście bierze udział w stresie oksydacyjnym to może wywoływać przestawienie syntazy NO na produkcję  $\text{O}_2 \cdot$  zamiast NO oraz wiązanie  $\text{NO}$  z  $\text{O}_2 \cdot$  z wytworzeniem toksycznych nadtlenoazotynów. Może dochodzić również do bezpośredniego zmniejszenia szybkości powstawania NO na skutek zahamowania aktywności syntazy NO przez asymetryczną  $N_G, N_G$ -dimetyloargininę. Należy również rozważyć możliwość pośredniego zmniejszenia możliwości powstawania NO, przez ubytek substratu syntazy NO, tzn. argininy, w wyniku jej metylacji do asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy i wydłużenia czasu półtrwania asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy poprzez zahamowanie reakcji hydrolizy asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy bezpośrednio przez homocysteinę [43]. Wykazano, że tylko asymetryczna  $N_G, N_G$ -dimetyloarginina, a nie symetryczna  $N_1, N_2$ -dimetyloarginina może ulegać hydrolizie do cytruliny i N,N-dimetyloaminy, reakcji katalizowanej przez hydrolazę N,N-dimetyloargininy dimetyloaminohydrolazy (DDAH) (Rys. 3) [38,43]. Aktywność DDAH jest bezpośrednio hamowana przez homocysteinę. Wykazano, że inkubacja neuronów w obecności homocysteiny wywołuje zależną od dawki akumulację asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy, co obniża produkcję NO. Proces ten ulega zahamowaniu w obecności antyoksydantów. Wydaje się, że homocysteina hamuje aktywność DDAH przez tworzenie w obecności utleniaczy disiarczkwów homocysteina-cysteina, z resztą cysteiny w centrum aktywnym DDAH [43]. Zaobserwowano, że w hiperhomocysteinemii ulega zmniejszeniu stymulowany adenozyną przepływ krwi przez naczynia wieńcowe, prawdopodobnie w wyniku wzmoczonego wytwarzania asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy. Zwiększony poziom tego związku wykryto w osoczu starszych osób po zawale lub z nadciśnieniem [44], a także u małp z hiperhomocysteinemią lub hipercholesterolemią [45]. Wzrost stężenia asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy był blokowany przez S-adenozylhomocysteinę (inhibitor transmetylacji) i witaminy z grupy B; okazało się, że kluczowym czynnikiem jest metylacja argininy do asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy z równoległym powstawaniem S-adenozylhomocysteiny, a nie zmiany poziomu homocysteiny.

Fakt, że asymetryczna  $N_G, N_G$ -dimetyloarginina jest inhibitorem syntazy tlenu azotu kompetycyjnym w stosunku

do L-argininy [46], tłumaczy tzw. paradoks L-argininowy: dodanie L-argininy usprawnia zależne od NO funkcje naczyń, mimo że początkowe stężenie argininy przed jej dodaniem jest już 25 razy wyższe niż wartość stałej Michaelisa dla syntazy NO śródbłonna *in vitro*. Wzrost stężenia argininy znosi hamowanie aktywności syntazy NO przez asymetryczną  $N_G, N_G$ -dimetyloargininę. Zaskakująco, doustne podawanie argininy nie poprawia wydolności pacjentów z dusznicą i funkcji skurczowej ich śródbłonna [47]. Doustne podawanie metioniny prowadzące do hiperhomocysteinemii nie powoduje wzrostu stężenia asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy [48]. Pradopodobnie wówczas – zakładając, że warunki pozwalają na przejście od metioniny do homocysteiny (Rys. 2) – zwiększona metylacja argininy przez S-adenozylometioninę jest równoważona przez dwa zjawiska. Są nimi: a) hamowanie metylacji przez S-adenozylhomocysteinę, i b) hydroliza produktu metylacji (ADMA) przez DDAH. Ta ostatnia nie jest hamowana przez homocysteinę, gdyż jej poziom w komórkach zbytnio nie rośnie, w wyniku jej eksportu do osocza. Duża pula  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy w osoczu wiąże się z białkami osocza [49]. Tym tłumaczy się ograniczoną eliminację asymetrycznej  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy podczas hemodializy, w tym również u pacjentów z końcowym stadium choroby nerek [50]. Przypuszcza się, że wiązanie  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy przez białka uniemożliwia eliminację związku z moczem przez

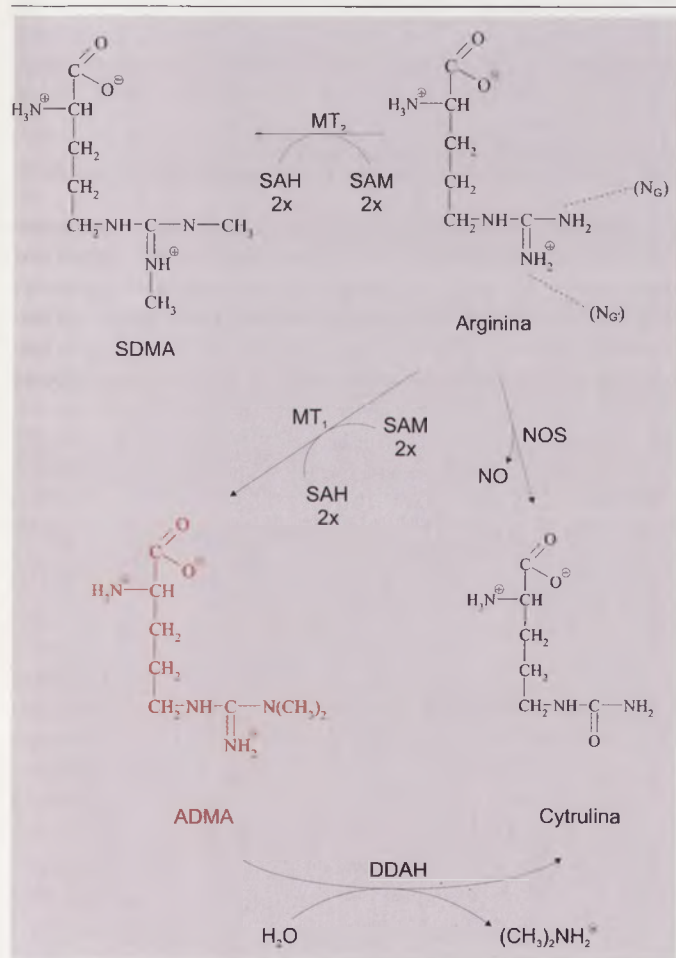
kłębuszki nerkowe. Możliwe jest też, że większość  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy osocza jest połączona z metylovanym białkiem i z tego kompleksu ulega ciąglemu uwalnianiu.

#### ADENOZYNA I INNE NUKLEOZYDY A TOKSYCZNOŚĆ HOMOCYSTEINY

Podstawowymi enzymami uczestniczącymi w wytwarzaniu homocysteiny są hydrolaza S-adenozylhomocysteiny (SAHH) i tiolaktonaza tiolaktonu homocysteiny (paraoksonaza – TH). Znaczenie mają również reakcje nieenzymatycznej transnitrozylacji S-nitrozohomocysteiny i redukcji mieszanych S-S-disiarczków homocysteiny, w tym disiarczków białek. Podstawowe enzymy i reakcje zużywające homocysteinę to hydrolaza S-adenozylhomocysteiny,  $\beta$ -syntaza cystationiny, metionilo t-RNA syntetaza (MTRS), metylotransferaza homocysteiny (syntaza metioniny – SM), a także nieenzymatyczna nitrozylacja homocysteiny z NO. W tym wypadku trudno rozstrzygnąć, który z wymienionych procesów dominuje. Wydaje się, że w fizjologicznych stężeniach witamin z grupy B jest to  $\beta$ -syntaza cystationiny lub syntaza metioniny. Wiele zależy od stężenia S-adenozylhomocysteiny, homocysteiny i adenozyiny, a także wartości  $K_m$  i  $V_{max}$  hydrolazy S-adenozylhomocysteiny działającej w obu kierunkach. Wydaje się, że w fizjologicznych stężeniach homocysteiny i adenozyiny w komórkach (i w osoczu) reakcja powstawania S-adenozylhomocysteiny w reakcji adenozyiny z homocysteiną z wydzieleniem cząsteczki wody (1) może dominować nad reakcją hydrolizy S-adenozylhomocysteiny (2). Zdaniem wielu badaczy S-adenozylhomocysteina jest znacznie bardziej toksyczna niż homocysteina, ponieważ jest silnym inhibitorem metylacji [31-33]. Wydaje się, że hydrolaza S-adenozylhomocysteiny jest zawsze enzymem „zwiększającym niebezpieczeństwo” (Rys. 2), bo działając w kierunku (1) zwiększa prawdopodobieństwo zajęcia tragicznej w skutkach hipometylacji, a działając w kierunku (2) potencjalnie prowadzi do wzrostu stężenia homocysteiny (a dalej tiolaktonu homocysteiny i S-nitrozohomocysteiny), a więc dalszej kaskady szkodliwych następstw.

Wiele wskazuje, że to S-adenozylhomocysteina, a nie homocysteina, jest znacznie lepszym znacznikiem procesów patologicznych towarzyszących miażdżycy [51]; co więcej to nie tiolakton homocysteiny a S-adenozylhomocysteina jest najgroźniejszym patogenem dla mysich embrionów *in vitro* [52].

Co się dzieje, gdy w komórkach człowieka jest poważny niedobór genetyczny hydrolazy S-adenozylhomocysteiny? Opisano przypadek 13-to miesięcznego chłopca, który miał około 3% aktywności hydrolazy S-adenozylhomocysteiny w wątrobie w porównaniu do dzieci zdrowych, oraz 5 i 10% tej aktywności odpowiednio w erytrocytach i fibroblastach [53]. Analiza genetyczna wykazała dwie mutacje w eksonie 4 oraz dziedziczony po matce kodon stop i dziedziczony po ojcu mutację „*mis-sense*”. Chłopiec był bardzo niesprawnym psychomotorycznie; miał nienormalne figury mielinowe i obniżoną mielinizację wypustek neuronów, zapalenie wątroby, podwyższoną aktywność aminotransferaz i kinazy kreatynowej osocza. Miał jedynie łagodną hiperhomocysteinemię (około 15  $\mu$ M), natomiast poziom S-adenozylometio-



**Rysunek 3.** Reakcje przemiany argininy w cytrulinę, w asymetryczną  $N_G, N_G$ -dimetyloargininę (ADMA) lub w symetryczną  $N_G, N_G$ -dimetyloargininę (SDMA) oraz hydrolizy  $N_G, N_G$ -dimetyloargininy do cytruliny.

niny był 30, a S-adenozylhomocysteiny 150 razy wyższy niż w normie. Stwierdzono ponadto wysoki poziom metylacji DNA, niski poziom lecytyny i choliny, a podwyższony poziom betainy, dimetyloglicyny i cystationiny [53].

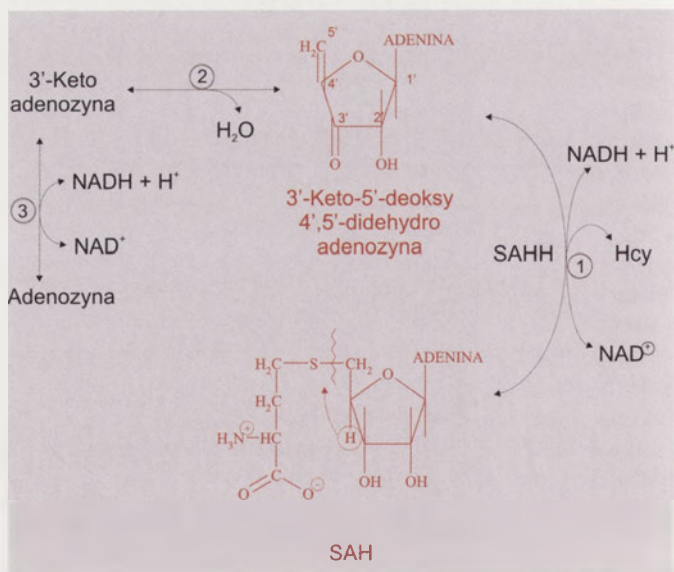
20 lat temu oczyszczono do homogenności hydrolazę S-adenozylhomocysteiny z *Dictyostelium discoideum* [54]. Enzym zbudowany jest z czterech podjednostek o masie 47 kDa każda. Podobny enzym został zidentyfikowany w erytrocytach królików i w wątrobie człowieka [55]. Jego aktywność jest niezależna od stężenia homocysteiny. Hydrolaza S-adenozylhomocysteiny jest prawdopodobnie ważnym enzymem, uczestniczącym w wytwarzaniu, jak i zużyciu adenozyiny. Można przypuszczać, że zły stan chorych cierpiących na miażdżycę, choroby nerek i zaburzenia układu nerwowego wynika nie tylko z wysokiego stężenia homocysteiny, ale z podwyższonego poziomu adenozyiny, albo podwyższona aktywność hydrolazy S-adenozylhomocysteiny prowadzi do spadku stężenia adenozyiny przez tworzenie S-adenozylhomocysteiny, czemu towarzyszą typowe objawy nadmiaru S-adenozylhomocysteiny. A przeciż adenozyina jest bardzo silnym endogennym regulatorem ciśnienia krwi i neuroprzeżyźnikiem w komórkach śródbłonna naczyń i w miocytach. W limfocytach zlokalizowano liczne receptory adenozyiny B<sub>1</sub> (należące do podtypów A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>), które mają olbrzymi wpływ na ciśnienie krwi, chemotaksję i przyleganie białych krwinek do komórek śródbłonna [56]. Stężenie adenozyiny osocza jest podobne do homocysteiny. A zatem, w wytwarzaniu adenozyiny główną rolę pełnią: hydrolaza S-adenozylhomocysteiny i 5'-nukleotydaza, a w jej usuwaniu przede wszystkim kinaza adenozyiny, hydrolaza S-adenozylhomocysteiny, i w mniejszym stopniu dezaminaza adenozyiny [57]. Wykazano, że w warunkach normoksji adenozyina pochodzi głównie z hydrolizy S-adenozylhomocysteiny przez SAHH, na drodze równoległej z metylacją różnych akceptorów, a dopiero w stanach hipoksji głównym źródłem adenozyiny staje się 5'-nukleotydaza (z 5'-AMP). Stwierdzono, że szereg nukleozydów (naturalnych i ich syntetycznych analogów) jest inhibitorami lub substratami hydrolazy S-adenozylhomocysteiny [55,58,59]. Na przykład 2'-deoksyadenozyna nie jest substratem fosforylasy nukleozydowej [55], ale ulega reakcji hydrolizy do adeniny i 2'-deoksyrybozy, katalizowanej przez hydrolazę S-adenozylhomocysteiny. Umożliwia to powstawanie – na nowej drodze – ATP z dAMP (adenina ulega przekształceniu do 5'-AMP i 5'-ATP). Nukleozydami wpływającymi na aktywność hydrolazy S-adenozylhomocysteiny są 3-deazaadenozyna, deoksyadenozyna i 2-chloroadenozyina. Największe zahamowanie aktywności hydrolazy S-adenozylhomocysteiny w wątrobie człowieka uzyskano z zastosowaniem 7-deazaadenozyny (tubercydyny), 2'-deoksyadenozyny i 9-α-D-arabinozofuranozyladeniny. Znaczną aktywność wykazywały pod tym względem także 2',3'-dideoksyadenozyna, 3'-deoksyadenozyna, 2-chloroadenozyina, adenozyloornityna (sinefungina), a także S-adenozylometionina.

Podkreślenia wymaga fakt, że jakkolwiek badania nad hamowaniem aktywności hydrolazy S-adenozylhomocysteiny przez analogi nukleozydów (często leki przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe) zyskały duże zainteresowanie w ostatnim czasie, to mechanizm działania hydrolazy

zy S-adenozylhomocysteiny, a więc i działania pewnych inhibitorów, został zbadany ponad 20 lat temu [60]. Wykazano, że apoenzym hydrolazy S-adenozylhomocysteiny wiąże NAD<sup>+</sup> (stechiometria wiązania wyniosła 1:1 mol/mol). W wyniku tego zachodzi reakcja S-adenozylhomocysteiny z NAD<sup>+</sup> z wytworzeniem homocysteiny, 3'-keto-5'-deoksy-4',5'-didehydroadenozyny i NADH (Rys. 4). Z kolei 3'-keto-5'-deoksy-4',5'-didehydroadenozyna ulega hydrolizie do 3'-ketoadenozyny, ta zaś reaguje z NADH wytwarzając adenozyinę i NAD<sup>+</sup>. Zatem hydrolaza S-adenozylhomocysteiny jest „ukrytą” oksydoreduktazą, a nie hydrolazą. Ponadto stwierdzono, że jedynie analogi adenozyiny z F, Cl i S-CH<sub>3</sub> w pozycji 5' (zamiast 5'OH) nie są substratami enzymu. Istnieją dwa główne mechanizmy hamowania jego aktywności: pierwszy, np. w obecności 2'-deoksyadenozyny [59] polegający na tym, że związek ten redukuje NAD<sup>+</sup> w kompleksie z enzymem do NADH. Drugi mechanizm polega na silnym wiązaniu NAD<sup>+</sup> przez inhibitor, co powoduje dysocjację holoenzymu na NAD<sup>+</sup> i apoenzym. Najlepszym przykładem takiego inhibitora jest cAMP [61]. Hydrolaza S-adenozylhomocysteiny silnie wiąże adenozyinę i cAMP w tym samym miejscu. Adenozyina (ale nie guanozyina i inozyina) może wywoływać apoptozę astrocytów i to przypuszczalnie nie tylko przez aktywację receptorów A<sub>3</sub>, ale przez modyfikację aktywności hydrolazy S-adenozylhomocysteiny [62]. Jak się wydaje należałoby poświęcić większą uwagę dalszym badaniom nad poziomem nie tylko homocysteiny, S-adenozylhomocysteiny, tiolaktonu homocysteiny i S-nitrozohomocysteiny, ale adenozyiny, a także innych nukleozydów i nukleotydydów, oraz badać współzależności ich dróg metabolicznych.

#### HOMOCYSTEILACJA BIAŁEK PRZEZ TIOLAKTON HOMOCYSTEINY

Najciekawszą teorią tłumaczącą toksyczność homocysteiny jest przypisanie odpowiedzialności tiolaktonowi homocysteiny [3]. Tworzenie tiolaktonu zachodzi w obecności fizjologicznych stężeń witamin i homocysteiny w zdrowych tkankach [9,11,19]. Okazało się, że różne typy komórek nowotworowych człowieka w hodowli produkują



Rysunek 4. Mechanizm odwracalnej reakcji katalizowanej przez hydrolazę S-adenozylhomocysteiny (SAHH).



więcej tiolaktonu homocysteiny niż komórki normalne [12]. Konsekwencją nadmiernego powstawania tiolaktonu przy udziale metionilo-t-RNA syntetazy i jego obniżonej hydrolizy przez tiolaktonazę, jest akumulacja w komórkach (i w osoczu) N-homocysteilowanych białek o zmienionej strukturze przestrzennej. Ulegają one agregacji i są źle rozpuszczalne, co może mieć cytotoksyczny wpływ na funkcjonowanie komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. Jednym z enzymów, którego aktywność ulega zahamowaniu w wyniku N-homocysteilacji jest oksydaza lizylowa [63], ważny enzym, który uczestniczy w „dojrzwaniu” kolagenu. W wyniku utlenienia łańcuchów bocznych lizyny powstają grupy aldehydowe, które ze sobą kondensują. W wyniku kondensacji aldolowej dochodzi do wytworzenia wiązań kowalencyjnych spinających ze sobą kilka łańcuchów polipeptydowych kolagenu. Zahamowanie aktywności oksydazy lizylowej wywołuje negatywne następstwa związane z utratą własności mechanicznych tkanki łącznej i tłumaczy powstawanie deformacji szkieletu kostnego u dzieci z hiperhomocystynurią [3].

Warto także wspomnieć o jeszcze innej przyczynie toksyczności homocysteiny. Tiolakton homocysteiny jest bardzo reaktywny względem aldehydów, co stwierdzono w doświadczeniach z zastosowaniem fosforanu pirydoksalu i streptomycyny. Reakcja tiolaktonu homocysteiny z wymienionym antybiotykiem była 400-krotnie szybsza niż z grupami  $\epsilon$  N lizyny białek i prowadziła do powstania adduktów z wolną grupą  $-SH$ , co początkowo było interpretowane jako aktywacja przez streptomycynę tiolaktonazy hydrolizującej tiolakton homocysteiny do homocysteiny [64]. Ale już reakcja tiolaktonu homocysteiny z aldehydem  $\alpha$ -ftalowym wymaga uprzedniej hydrolizy do homocysteiny [65]. Jeżeli więc tiolakton homocysteiny i homocysteina reagują z aldehydami (z grupami karbonyłowymi) to warto pójść tym tropem i zbadać reaktywność tych substancji w stosunku do enzymów szlaków kwasu glioksalowego, metyloglioksalu oraz aldehydów aromatycznych powstających w wyniku działania monoamino oksydazy na aminy biogenne. Ewentualne wiązanie aldehydów przez tiolakton homocysteiny (homocysteinę) mogłoby mieć wpływ na farmakokinetykę działania amin biogennych, w tym neuroprzebiegów, a także na detoksykację aldehydów, a pośrednio i etanolu w organizmie człowieka, a nawet na metabolizm substancji uzależniających.

Homocysteilacja przez tiolakton prowadzi także do inaktywacji syntetazy metionilo t-RNA i trypsyny [11,19]. Uszkodzenie metionilo t-RNA syntetazy jest rodzajem sprzężenia zwrotnego ujemnego. Przy zbyt wysokim stężeniu tiolaktonu, który nie może być wyeksportowany z komórki, dochodzi do modyfikacji białka enzymatycznego i nie może powstawać tiolakton. Nie wiadomo, czy inaktywacji ulega tylko jedna z syntetaz aminoacylo-t-RNA. Jeżeli inne syntetazy zostałyby nieodwracalnie uszkodzone, to tego typu uszkodzenie byłoby letalne dla komórki i uniemożliwiłoby biosyntezę białka. Homocysteilacji ulegają także enzymy trzustki: trypsyna, rybonukleaza i dezoksyrybonukleaza [19]. Modyfikację przez tiolakton homocysteiny opisano w przypadku albuminy, która jest głównym białkiem osocza niezbędnym m.in. do transportu wolnych kwasów tłuszczowych i bilirubiny.  $\gamma$ -Globuliny również ulegają j homocysteilacji, po-

dobnie jak fibrynogen i  $\alpha$ -2-makroglobulina [19], która jest naturalnym inhibitorem enzymów proteolitycznych i bierze udział w ochronie przed przerzutami nowotworów. Homocysteilacji ulegają też cząstki LDL. Przypuszcza się, że oprócz utleniania LDL również ich homocysteilacja może dodatkowo pogarszać ich właściwości transportowe, a ułatwiać ich przyleganie i tworzenie tym samym płytek miażdżycowych [21]. Homocysteilacji dość łatwo ulega też hemoglobina [19]. Występuje ona wprawdzie w krwinkach czerwonych, w których nie może powstawać tiolakton, ale związek ten z uwagi na swój ładunek równy zero, łatwo wchodzi do komórek. Wykazano, że w krwi zdrowych osobników występuje N-hemoglobina w stężeniu  $12,7 \mu M$  [13], która stanowi główny rezerwuuar homocysteiny we krwi ludzkiej. W osoczu występują N-homocysteilowane białka w zróżnicowanych stężeniach od  $0,1$  do  $13 \mu M$ , co stanowi do 25% homocysteiny osocza [19]. Inni badacze [66] stwierdzili, że u 20 zdrowych osobników stężenie N-homocysteilowanych białek w osoczu osiąga wartość  $0,5 \mu M$ , podczas gdy u 15 dializowanych pacjentów jest tylko niewiele wyższe  $0,74 \mu M$ . Doniesienia na temat 1000-krotnie wyższych stężeń N-homocysteilowanych białek u pacjentów z miażdżycą zostały zdementowane [67]. Wyniki najnowszych badań wskazują, że N-homocysteilowana hemoglobina łatwiej ulega utlenieniu w obecności  $H_2O_2$  i agregacji. Ponadto stwierdzono [68], że mieszany disiarczek cysteiny i albuminy (*via* reszta Cys34) jest szybciej modyfikowany przez tiolakton homocysteiny niż zwykła albumina.

Szczególnie groźne skutki dla organizmu może powodować immunogenność N-homocysteilowanych białek. Udało się wytworzyć poliklonalne przeciwciała przeciwko cząstkom LDL zawierającym 40% reszt lizyny zmodyfikowanych przez tiolakton [69]. Wykryto też obecność autoprzeciwciał przeciwko hemoglobinie i albuminie  $\epsilon$  N-homocysteilowanym przy lizynie [13]. Stopień N-homocysteilacji białek zależy od stężenia metioniny, witamin z grupy B, aktywności tiolaktonazy i stężenia HDL [3]. Należy pamiętać, że tiolakton homocysteiny powstaje tylko w obecności syntetazy metionilo-t-RNA. W sytuacji konkurencji pomiędzy homocysteiną a metioniną o to samo miejsce w centrum aktywnym enzymu, metionina będzie hamowała aminocacylację AMP przez homocysteinę, a tym samym tworzenie tiolaktonu. W przypadku obniżonego stężenia metioniny może dochodzić do tworzenia się zwiększonej ilości tiolaktonu homocysteiny i do akumulacji szkodliwych zmian wywołanych homocysteilacją białek przy atomie azotu lizyny. Homocysteilowane białka prawdopodobnie ulegają katabolizmowi w wątrobie. Homocysteilację różnych białek przez tiolakton wykryto nawet w obecności  $0,2$  nM tiolaktonu i  $60$  nM homocysteiny. Stwierdzono nasilenie się tych zmian ze wzrostem stężenia tiolaktonu homocysteiny. Jest to w dysproporcji do doniesień próbujących wyjaśnić toksyczność homocysteiny stresem oksydacyjnym, w których stężenie *in vitro* homocysteiny było 100-krotnie wyższe. Stężenie tiolaktonu homocysteiny w surowicy człowieka wynosi  $15-200$  nM [3,64; por. 70].

Niewiele wiadomo na temat udziału różnych rodzajów homocysteiny w jej toksyczności. Ponad 70% całkowitej homocysteiny wchodzi w skład białek, w postaci mieszanych disiarczków, w których reszty homocysteiny poprzez mostek S-S są połączone z białkiem. Jeżeli chodzi o homocysteinę

niebiałkową, to przeważa utleniona forma homocysteiny: symetryczne disiarczki albo mieszane disiarczki z cysteiną i innymi tiolami [1]. Jedyne niewielki procent homocysteiny stanowi homocysteina ze zredukowanymi grupami SH. Właśnie ta forma homocysteiny jest najbardziej groźna, gdyż może wywierać różnego typu działanie bezpośrednio: przechodzić w tiolakton homocysteiny, S-adenozylhomocysteinę lub S-nitrozohomocysteinę. Można domniemywać, że wiązanie się z białkami i tworzenie się mieszanych disiarczków jest pewną ochroną organizmu przed toksycznym wpływem zredukowanej homocysteiny w stanie wolnym, która poza tym jest potencjalnym konkurentem dla selenocysteiny, cysteiny i glutationu. Tworzenie mieszanych disiarczów i wiązanie się z białkami poprzez mostki disiarczkowe jest ochroną organizmu przed toksycznym wpływem S-adenozylhomocysteiny i tiolaktonu homocysteiny. Białka N-homocysteilowane przez tiolakton homocysteiny są niesprawne biologicznie, a ich powstawanie jest bardzo groźne dla organizmu. Tego typu zmian wcale nie musi być dużo. Mogą nagromadzać się z czasem, analogicznie do akumulacji produktów glikacji w cukrzycy i blaszek białkowych w chorobie Alzheimera [3]. Zgodnie z hipotezą Jakubowskiego [3] zmodyfikowane białka na powierzchni naczyń są bezpośrednio lub pośrednio rozpoznawane przez makrofagi. W tym ostatnim przypadku najpierw będą się wiązać z autoprzeciwciałami a te będą wiązać receptory makrofagów. Rozpocznie to kaskadę stanu

zapalnego śródbłonka naczyń prowadzącą do powstania blaszki miażdżycowej.

#### UWAGI KOŃCOWE

Niniejsza praca uwypukla nowe fakty mogące rzucić światło na mechanizm toksyczności homocysteiny i hiperhomocysteinemii (Tabela 1). Nie jest wykluczone, że pewne zmetylowane związki, takie jak kreatyna czy cholina mogą „poprawiać sytuację” w hiperhomocysteinemii, gdyż obecność tych substancji jak gdyby oszczędza grupy metylowe S-adenozylometioniny, która nie ulega dalszym przekształceniom w S-adenozylhomocysteinę i homocysteinę. Dokładniejszych badań wymaga wpływ nukleozydów na hiperhomocysteinemii. Należałoby sądzić, że nukleozydy, szczególnie adenozyne, będą redukować toksyczny wpływ homocysteiny, poprzez stymulację przekształcenia związku w S-adenozylhomocysteinę. Jeśli jednak będzie powstawać zbyt dużo S-adenozylhomocysteiny to spowoduje to zahamowanie procesów metylacji ustrojowej. Należałoby dążyć do uzyskania efektywnych i selektywnych inhibitorów hydrolazy S-adenozylhomocysteiny, np. nukleozydów i ich analogów, hamujących reakcję w kierunku powstawania homocysteiny bądź S-adenozylhomocysteiny. Te pasjonujące zagadnienia o wielkim znaczeniu w rozwoju miażdżycy i innych stanów patologicznych są wciąż dalekie od pełnego wyjaśnienia.

Tabela 1. Przyczyny biotoksyczności homocysteiny

Postulowany związek lub zjawisko toksyczne	Przyczyna (mechanizm) toksyczności
homocysteina	stres oksydacyjny wiązanie NO hamowanie DDAH → „przedłużanie życia” ADMA → ↓NOS → ↓NO wiązanie aldehydów
tiolakton homocysteiny	N-homocysteilacja białek → ich agregacja i denaturacja i powstawanie autoprzeciwciał wiązanie aldehydów?
SAH	hipometylacja DNA, RNA, białek, ale też guanidynoocetanu, kolaminy i kefalin ew. wpływ na metabolizm nukleozydów (rybo i dezoksy) <i>via</i> hydroliza SAH
S-nitrozohomocysteina	wiązanie NO translacyjne wbudowanie reszt S-NO Hcy → Hcy do białek → utrata własności ?
homocysteinian	efekt neurotoksyczny (nadmiernego pobudzania receptorów NMDA glutaminianowych)
ADMA	hamowanie syntazy NO (NOS)
adenozyne (?)	ewentualne przechodzenie Hcy w SAH ( <i>via</i> hydrolaza SAH) zmiany ciśnienia krwi (?) wpływ na metabolizm innych nukleozydów, w tym leków antywirusowych (?)
nukleozydy (?)	mechanizm działania nieznan, ale równolegle wpływ na hydrolazę SAH, co prowadzi do ↑SAH lub ↑Hcy
brak witamin z grupy B (B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , kw. foliowego, B <sub>12</sub> , B <sub>1</sub> , liponianu, PP, pantotenianu, H)	hiperhomocysteinemia jako objaw; przyczyną złego stanu są liczne defekty metaboliczne plus anemia
produkty hipermetylacji X-CH <sub>3</sub> (?)	mechanizm ich działania jest nieznan; wysokie stężenie SAH i Hcy jest jedynie skutkiem ubocznym powstawania X-CH <sub>3</sub>

## PIŚMIENNICTWO

1. Bald E (2003) Homocysteina niegdyś egzotyczny metabolit. W: Włodek L (red) *Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii*. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, str. 71-108
2. Clarke R, Collins MB, Lewington S, Donald A, Alftan G, Tuomilehto J (2002) Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 288: 2015-2022
3. Jakubowski H (2004) Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci* 61: 470-487
4. Austen SK, Coombes JS, Fassett RG (2003) Homocysteine-lowering therapy in renal disease. *Clin Nephron* 60: 375-385
5. Brauer PR, Tierney BJ (2004) Consequences of elevated homocysteine during embryonic development and possible modes of action. *Curr Pharm Des* 10: 2719-2732
6. Mattson MP, Shea TB (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 26: 137-146
7. Vrethem M, Mattson E, Hebelka H, Leerbeck K, Osterberg A, Landtblom AM, Balla B, Nilsson H, Brattstrom L, Kagedal B (2003) Increased plasma homocysteine levels without signs of vitamin B12 deficiency in patients with multiple sclerosis assessed by blood and cerebrospinal fluid homocysteine and methylmalonic acid. *Mult Scler* 9: 239-245
8. Janosik M, Oliveriusova J, Janosikova B, Sokolova J, Kraus E, Kraus JP, Kozich V (2001) Impaired heme binding causes aggregation of mutant cystathionine beta-synthase subunits in homocystinuria. *Am J Hum Genet* 68: 1506-1513
9. Jakubowski H (1997) Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. *J Biol Chem* 272: 1935-1940
10. Jakubowski H (2000) Translation incorporation of S-nitrosohomocysteine into protein. *J Biol Chem* 275: 21813-21820
11. Jakubowski H (1999) Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J* 13: 2277-2283
12. Jakubowski H, Goldman E (1993) Synthesis of homocysteine thiolactone by methionyl-tRNA synthetase in cultured mammalian cells. *FEBS Lett* 317: 593-598
13. Jakubowski H (2002) Homocysteine is a protein amino acid in humans. *J Biol Chem* 277: 30425-30428
14. Foster MW, McMahon T, Stamler JS (2003) S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med* 9: 160-168
15. Antonio CM, Nunes MC, Refsum H, Abraham AK (1997) A novel pathway for the conversion of homocysteine to methionine in eukaryotes. *Biochem J* 328: 165-170
16. Jakubowski H (2001) Translational accuracy of aminoacyl-tRNA synthetases: implications for arteriosclerosis. *J Nutr* 131(Suppl): 2983-2987
17. Jakubowski H (2000) Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. *J Biol Chem* 275: 3957-3962
18. Jakubowski H, Ambrosius WT, Pratt JH (2001) Genetic determinations of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for arteriosclerosis. *FEBS Lett* 491: 35-39
19. Jakubowski H (2000) Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr* 130: 377S-381S
20. Shih DM, Gu L, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW (1998) Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394: 284-287
21. Naruszewicz M, Mirkiewicz E, Olszewski A, McCully KS (1994) Thiolation of low density lipoprotein and homocysteine thiolactone causes increased aggregation and altered interaction with cultured macrophages. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 4: 70-77
22. Ferguson E, Hong N, Antholine WE, Joseph J, Singh RJ (1999) Characterization of the adduct formed from the reaction between homocysteine thiolactone and low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med* 26: 968-977
23. Ferretti G, Bacchetti T, Marotti E, Curatola G (2003) Effect of homocysteinylation on human high-density lipoproteins: a correlation with paraoxonase activity. *Metabolism* 52: 146-151
24. Li H, Lewis A, Brodsky S, Rieger R, Iden C, Goligorsky MS (2002) Homocysteine induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vascular endothelial cells. *Circulation* 105: 1037-1043
25. Forgione MA, Weiss N, Heydrick C, Cap A, Klings ES, Bierl C, Eberhardt RT, Farber HW, Loscalzo J (2002) Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1255-H1261
26. Brattstrom L (2003) Pregnancy-related decrease in total plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr* 77: 993-994
27. Ratnam S, Maclean KN, Jacobs RL, Brosnan ME, Kraus JP, Brosnan JT (2002) Hormonal regulation of cystathionine beta-synthase expression in liver. *J Biol Chem* 277: 42912-42918
28. Munshi MN, Stone A, Fink L, Fonseca V (1996) Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. *Metabolism* 45: 133-140
29. Sass JO, Nakanishi T, Sato T, Shimizu A (2004) New approaches towards laboratory diagnosis of isolated sulphite oxidase deficiency. *Ann Clin Biochem* 41: 157-159
30. Finkelstein JD, Martin JJ, Harris BJ (1988) Methionine metabolism in mammals. *J Biol Chem* 263: 11750-11754
31. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ (2000) Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 275: 29318-29323
32. James SJ, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Caudill MA (2002) Elevation in plasma S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *J Nutr* 132: 2361S-2366S
33. Christopher SA, Melnyk S, James SJ, Kruger WD (2002) S-adenosylhomocysteine, but not homocysteine, is toxic to yeast lacking cystathionine beta-synthase. *Mol Genet Metab* 75: 335-343
34. Innis SM, Davidson AG, Chen A, Dyer R, Melnyk S, James SJ (2003) Increased plasma homocysteine and decreased methionine is associated with altered phosphatidylcholine in cystic fibrosis. *J Pediatr* 143: 351-356
35. Noga AA, Stead LM, Zhao Y, Brosnan ME, Brosnan JT, Vance DE (2003) Plasma homocysteine is regulated by phospholipid methylation. *J Biol Chem* 278: 5952-5955
36. Stead LM, Au KP, Jacobs RL, Brosnan ME, Brosnan JT (2001) Methylation demand and homocysteine metabolism: effects of dietary provision of creatine and guanidinoacetate. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1095-E1100
37. Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, Bode-Boger SM, Tsikas D, Hornig B, Frolich JC, Boger RH (2003) ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocysteinemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res* 57: 244-252
38. Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T (2000) LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human cells: Involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 87: 99-106
39. Lundman P, Eriksson MJ, Stuhlinger M, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P (2001) Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 38: 111-116
40. Boger RH, Bode-Boger SM, Tsao PS, Chan JR, Cooke JP (1997) The endogenous NO synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine exerts proatherosclerotic effects in cultured human endothelial cells. *Circulation* 96: 1558
41. Rawal N, Paik WK, Kim S (1994) Purification and characterization of S-adenosylmethionine-protein-arginine N-methyltransferase from rat liver. *Biochem J* 300: 483-489

42. Grosh SK, Paik WK, Kim S (1988) Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain: myelin basic protein- and histone-specific enzyme. *J Biol Chem* 263: 19024-19033
43. Selley ML (2004) Homocysteine increases the production of asymmetric dimethylarginine in cultured neurons. *J Neurosci Res* 77: 90-93
44. Yoo JH, Lee SC (2001) Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Arteriosclerosis* 158: 425-430
45. Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, Lentz SR (2000) Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1557-1564
46. Boger RH (2004) Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* 134(10 Suppl): 2842S-2847S
47. Walker HA, McGing E, Fisher I, Boger RH, Bode-Boger SM, Chowaniec P (2001) Endothelium-dependent vasodilatation is independent of the plasma L-arginine/ADMA ratio in men with stable angina. *J Am Coll Cardiol* 38: 499-505
48. Wanby P, Brattstrom L, Brudin L, Hultberg B, Teerlink T (2003) Asymmetric dimethylarginine and total homocysteine in plasma after oral methionine loading. *Scand J Clin Lab* 63: 347-353
49. Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM, Lonnemann G, Frolich JC, Haller H, Fliser D (2004) Low dialysance of asymmetric dimethylarginine (ADMA) – *in vivo* and *in vitro* evidence of significant protein binding. *Clin Nephrol* 62: 295-300
50. Boger RH, Zoccali C (2003) ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Artgeroscler* 4 (Suppl): 23-28
51. Kerins DM, Koury MJ, Capdevila A, Rana S, Wagner C (2001) Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr* 74: 723-729
52. Hansen DK, Grafton TF, Melnyk S, James SJ (2001) Lack of embryotoxicity of homocysteine thiolactone in mouse embryos *in vitro*. *Reprod Toxicol* 15: 139-244
53. Baric I, Fumic K, Glenn B, Cuk M, Schulze A, Finkelstein JD, James SJ, Pazanin L, Pogribny IP, Rados M, Sarnavka V, Allen RH, Stabler S, Uzelac L, Vugrek O, Wagner C, Zeisel S, Mudd H (2004) S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4234-4239
54. Hohman RJ, Guitton MC, Veron M (1984) Purification of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Dictyostelium Discoideum*: reversible inactivation by cAMP and 2'-deoxyadenosine. *Arch Biochem Biophys* 233: 785-795
55. Fabianowska-Majewska K, Duley JA, Simmonds HA (1994) Effects of novel anti-viral adenosine analogues on the activity of S-adenosylhomocysteine hydrolase from human liver. *Biochem Pharmacol* 48: 897-903
56. Windscheif W (1996) Purinoceptors: from history to recent progress. *J Pharm Pharmacol* 48: 993-1029
57. Lloyd HG, Schrader J (1993) Adenosine metabolism in the guinea pig heart: the role of cytosolic S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, 5'-nucleotidase and adenosine kinase. *Eur Heart J* 14 (Suppl 1): 27-33
58. Smoleński R, Fabianowska-Majewska K, Montero C, Duley JA, Fairbanks LD, Marlewski J, Simmonds HA (1992) A novel route of ATP synthesis. *Biochem Pharmacol* 43: 2053-2057
59. Hill DM, Johnson LJ, Burns PJ, Neale AM, Harmening DM, Kenney AC (2002) Effects of temperature on stability of blood homocysteine in collection tubes containing 3-deazaadenosine. *Clin Chem* 48: 2017-2022
60. Palmer JL, Abeles RH (1979) The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *J Biol Chem* 254: 1217-1226
61. Kloor D, Danielyan L, Osswald H (2002) Characterization of the cAMP binding site of purified S-adenosylhomocysteine hydrolase from bovine kidney. *Biochem Pharmacol* 64: 1201-1206
62. Di Iorio P, Kleywegt S, Ciccarelli R, Traversa U, Andrew CM, Crocker CE, Werstik ES, Rathbone MP (2002) Mechanisms of apoptosis induced by purine nucleosides in astrocytes. *Glia* 38: 179-190
63. Liu G, Nellaippan K, Kagan HM (1997) Irreversible inhibition of lysyl oxidase by homocysteine thiolactone and its selenium and oxygen analogues. *J Biol Chem* 272: 32370-32377
64. Jakubowski H, Zhang L, Bardeguer A, Aviv A (2000) Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. *Circ Res* 87: 45-51
65. Chwatko G, Jakubowski H (2005) Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans. *Clin Chem* 51: 408-415
66. Uji Y, Motomiya Y, Hanyu N, Ukaji F, Okabe H (2002) Protein-bound homocystamide measured in human plasma by HPLC. *Clin Chem* 48: 941-944
67. Olszewski AJ (1991) Homocysteine content of plasma in ischemic heart disease, the reducing effect of pyridoxine, folate, cobalamine, choline, riboflavin and troxerutin. Correction of a calculation error. *Arteriosclerosis* 88: 97-98
68. Glowacki R, Jakubowski H (2004) Cross-talk between Cys<sup>34</sup> and lysine residues in human serum albumin revealed by N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 279: 10864-10871
69. Ferguson E, Parthasarathy S, Joseph J, Kalyanaraman B (1998) Generation and initial characterization of a novel polyclonal antibody directed against homocysteine thiolactone-modified low density lipoprotein. *J Lipid Res* 39: 925-933
70. McCully KS (1989) Homocysteinemia and arteriosclerosis: failure to isolate homocysteine thiolactone from plasma and lipoproteins. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 63: 301-304

## Molecular mechanisms of biotoxicity of homocysteine – facts and hypotheses

Wojciech Antoni Turski<sup>1,✉</sup>, Edward Bald<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Chair of Health and Physical Education, Holy Cross Academy, Branch at Piotrków Trybunalski, 114/118 Słowackiego St., 97-300 Piotrków Trybunalski, Poland

<sup>2</sup>Department of Environmental Chemistry, University of Łódź, 163 Pomorska St., 90-236 Łódź, Poland  
✉e-mail: ebald@uni.lodz.pl

**Key words:** homocysteine; homocysteine thiolactone; S-adenosylhomocysteine; S-nitrosohomocysteine; S-adenosylhomocysteine hydrolase; N<sub>G</sub>,N<sub>G</sub>-dimethylarginine (ADMA), biotoxicity, adenosine

### ABSTRACT

In the article, the main pathways of homocysteine metabolism are described, i.e. transsulfuration to cysteine and glutathione, as well as remethylation to methionine. Furthermore, formation of homocysteine thiolactone through editing mechanism with methionyl t-RNA synthetase and unusual reactivity of thiolactone against lysine εNH<sub>2</sub> groups of proteins as well as calcium dependent enzymatic hydrolysis of thiolactone are discussed. The effects of oxidative stress related to homocysteine are also reviewed. Finally, possible links of homocysteine to NO and arginine metabolism are discussed, including ADMA (N<sub>G</sub>,N<sub>G</sub>-dimethylarginine). The links between metabolism of homocysteine, adenosine and other nucleosides are emphasized. In conclusion, the N-homocysteinylation of proteins with thiolactone changing enormously their properties seems to be the main reason of biotoxicity of homocysteine during atherosclerosis and other diseases.

# Wpływ tlenu azotu na regulację ekspresji inhibitora aktywatorów plazminogenu typu 1 oraz tkankowego aktywatora plazminogenu

## STRESZCZENIE

Tlenek azotu produkowany w różnych tkankach organizmu przez syntazę tlenu azotu pełni znaczące funkcje w regulacji wielu procesów biologicznych. Mechanizm działania NO jest bardzo zróżnicowany. Fizjologicznie najważniejszym działaniem tego wolnego rodnika jest aktywacja cykazy guanylanowej i wzrost wytwarzania cyklicznego GMP. Tlenek azotu syntetyzowany w niewielkich ilościach odgrywa zasadniczą rolę w rozszerzaniu naczyń krwionośnych, a także posiada właściwości przeciwzakrzepowe, przeciwzapalne i antyproliferacyjne. Nadmierne wytwarzanie NO może zaburzać hemostazę naczyniową i przyczyniać się do rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego. Badania dowodzą, że tlenek azotu bierze również udział w regulacji fibrylizacji poprzez wpływ na ekspresję inhibitora aktywatorów plazminogenu typu 1 i tkankowego aktywatora plazminogenu, co ma ważne implikacje kliniczne. Celem tej pracy jest przedstawienie dotychczasowej wiedzy na temat roli tlenu azotu w regulacji tych dwóch elementów układu aktywacji plazminogenu.

## WROWADZENIE

Tlenek azotu (NO) jest rozpuszczalnym gazem. Zawiera w swej cząsteczce niesparowany elektron, odpowiadający za jego reaktywność. Fizjologiczne właściwości tlenu azotu po raz pierwszy zostały opisane przez Furchgott'a i Zawadzkiego w 1980 r. [1]. Wówczas znany był on jako śródbłonkopochodny czynnik rozkurczający (EDRF, ang. *endothelium-derived relaxing factor*), rozszerzający naczynia krwionośne. Syntetyzowany jest głównie przez śródbłonek naczyń krwionośnych, neurony, makrofagi i łatwo przenika przez błony komórkowe zgodnie z gradientem stężeń. NO jest cząsteczką bardzo labilną i może pełnić biologiczne funkcje zarówno w komórkach, w których jest syntetyzowany, jak również może współdziałać z komórkami i cząsteczkami sąsiadującymi. Tlenek azotu, syntetyzowany w warunkach fizjologicznych w niewielkich ilościach, bierze udział w regulacji ciśnienia krwi, przekaźnictwie nerwowym, reakcjach odpowiedzi immunologicznej i wielu innych ważnych funkcjach organizmu. Z drugiej jednak strony, zwiększona i niekontrolowana produkcja tlenu azotu przez indukowalne izoformy syntazy NO może przyczyniać się do rozwoju różnych schorzeń, jak na przykład wstrząsu septycznego, udaru mózgu, cukrzycy, chorób reumatycznych oraz innych przewlekłych stanów zapalnych [2]. Badania dowodzą również, że tlenek azotu może brać udział w regulacji fibrylizacji poprzez wpływ na ekspresję tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) i jego inhibitora – PAI-1. System aktywacji plazminogenu odgrywa znaczącą rolę w układzie fibrynolitycznym. Końcową cząsteczką efektorową tego systemu jest plazmina, rozpuszczająca powstały skrzep. Jej prekursorem jest nieaktywny zymogen – plazminogen, ulegający aktywacji w wyniku działania aktywatorów plazminogenu: tkankowego (t-PA) oraz urokinazowego (u-PA). Aktywatory te są z kolei regulowane przez inhibitory PAI-1 i PAI-2, przy czym fizjologicznie ważniejszą rolę w wewnątrznaczyniowej fibrylizacji odgrywa PAI-1 (Rys. 1).

Ponieważ zarówno t-PA, PAI-1, jak i tlenek azotu, pełnią istotną rolę w regulacji układu fibrynolitycznego, ważne wydaje się być zbadanie ich wzajemnych powiązań. Kilka prac wskazuje na istnienie takich związków. Nie są jednak w pełni poznane mechanizmy odpowiedzialne za oddziaływanie tlenu azotu z PAI-1 czy t-PA.

## SYNTAZA TLENU AZOTU

Tlenek azotu powstaje z aminokwasu L-argininy wskutek działania syntazy tlenu azotu (NOS, ang. *nitric oxide synthase*; EC 1.14.13.39) – enzymu zawierającego FAD i FMN. Arginina ulega utlenieniu przy udziale  $O_2$  i NADPH, a po odłączeniu od niej NO powstaje cytrulina. Kofaktorem tej reakcji jest tetrahydrobiopteryna [3]. W tkankach stwierdzono istnienie trzech izoform syntazy tlenu azotu. Zostały one nazwane w zależności od rodzaju tkanki, z której po raz

Katarzyna Oszajca<sup>✉</sup>

Janusz Szemraj

Jacek Bartkowiak

Zakład Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

<sup>✉</sup>Zakład Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; e-mail: kasia\_oszaj@o2.pl, tel. (42) 678 24 65

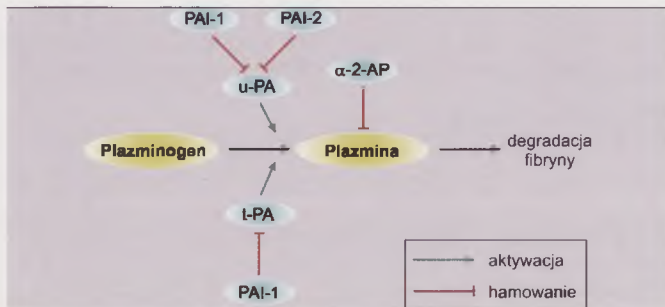
Artykuł otrzymano 7 lipca 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 18 lipca 2005 r.

**Słowa kluczowe:** tlenek azotu, syntazy tlenu azotu, inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 – PAI-1, tkankowy aktywator plazminogenu – t-PA

**Wykaz skrótów:** AP-1 (ang. *activator protein-1*) – białko aktywujące (czynnik transkrypcyjny); EDRF (ang. *endothelium-derived relaxing factor*) – śródbłonkopochodny czynnik rozkurczający; NF- $\kappa$ B (ang. *nuclear factor kappa B*) – jądrowy czynnik transkrypcyjny  $\kappa$ B; NOS (ang. *nitric oxide synthase*) – syntaza tlenu azotu; PAI-1 (ang. *plasminogen activator inhibitor type 1*) – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1; TGF- $\beta$  (ang. *transforming growth factor  $\beta$* ) – transformujący czynnik wzrostu; TNF- $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) – czynnik martwicy nowotworów; t-PA (ang. *tissue-type plasminogen activator*) – tkankowy aktywator plazminogenu

**Podziękowanie:** Praca wykonana jest z grantu Prezydenta miasta Łodzi



**Rysunek 1.** Schemat fibrylizacji z udziałem plazminy. W przekształcaniu plazminogenu w aktywną plazminę bierze udział tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) i urokinazowy aktywator plazminogenu (u-PA). Inhibitory aktywatorów plazminogenu PAI-1 i PAI-2 hamują działanie t-PA i u-PA. α-2-antyplazmina (α-2-AP) inaktywuje plazminę tworząc z nią nieczynny kompleks.

pierwszy je wyizolowano, a następnie sklonowano i scharakteryzowano. Tak więc wyróżniamy syntazę tlenu azotu śródbłonkową (eNOS), neuronalną (nNOS) oraz występującą w różnych tkankach – indukowaną (iNOS). Izoformy eNOS i nNOS są stale syntetyzowane, czyli konstytutywne (cNOS), natomiast indukowana syntaza tlenu azotu produkowana jest w odpowiedzi na stymulację przez cytokiny, lipopolisacharydy i inne czynniki immunologiczne [4-7]. Wiadomo jednak, że w pewnych warunkach syntazy śródbłonkowa i neuronalna mogą być indukowalne, i odwrotnie – indukowana syntaza tlenu azotu może pełnić funkcje enzymu konstytutywnego w określonych stanach fizjologicznych [4]. Ekspresja iNOS jest regulowana na poziomie transkrypcyjnym i posttranskrypcyjnym za pomocą mechanizmów przekazywania sygnałów, obejmujących między innymi jądrowy czynnik transkrypcyjny κB (NF-κB, ang. *nuclear factor kappa B*) oraz kinazy mitogenne (MAPKs, ang. *mitogen-activated protein kinases*) [7].

Geny kodujące izoformy NOS człowieka zostały sklasyfikowane według kolejności w jakiej je wyizolowano i scharakteryzowano. Zgodnie z tym, geny kodujące nNOS, iNOS oraz eNOS nazwano odpowiednio *NOS1*, *NOS2* i *NOS3* (Tab. 1) [4].

W przypadku wszystkich trzech izoform syntazy NO, reakcje katalizowane przez te enzymy są zależne od białka wiążącego wapń – kalmoduliny. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia jest niezbędny do związania się eNOS i nNOS z kalmoduliną i w konsekwencji do uzyskania przez te enzymy pełnej aktywności. W przeciwieństwie do tego, iNOS może wiązać kalmodulinę nawet przy niskim stężeniu jonów  $Ca^{2+}$  w komórce (Rys. 2). Zatem przejściowe zmiany w wewnątrzkomórkowym stężeniu wapnia mogą być czynnikiem regulującym aktywność śródbłonkowej i neuronalnej syntazy tlenu azotu, czego nie obserwuje się w przypadku izoformy indukowalnej [4].

Lokalizacja syntazy tlenu azotu na terenie komórki ma wpływ na biologiczną rolę i losy syntetyzowanych przez nią cząsteczek NO. Prawie wszystkie organelle komórkowe mogą być potencjalnymi miejscami syntezy tlenu azotu – od błony plazmatycznej poczynając, a na jądrze komórkowym kończąc. Na uwagę zasługuje tutaj usytuowanie śródbłonkowej syntazy tlenu azotu w błonie komórkowej, a dokładniej w kaweolach. Są to małe wglę-

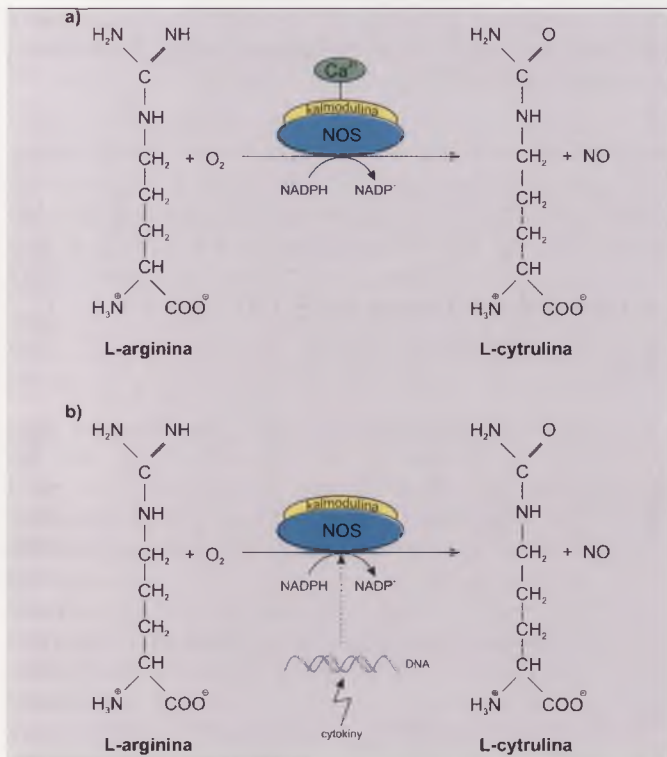
biaenia po wewnętrznej stronie błony, które charakteryzuje obecność transbłonowych białek – kaweolin. Skład lipidowy kaweoli jest bardzo charakterystyczny – są one bogate w cholesterol i glikosfingolipidy, natomiast nie zawierają fosfolipidów. Zmiany w składzie lipidowym mogą skutkować zaburzeniami w strukturze i funkcji kaweoli. W wielu tkankach mogą one służyć jako miejsca oddziaływania z cząsteczkami sygnałowymi, takimi jak: receptory, białka G, kinazy białkowe, a także eNOS [4]. Syntaza śródbłonkowa, w przeciwieństwie do pozostałych syntaz tlenu azotu, ulega posttranslacyjnym modyfikacjom: mirystylacji i palmitylacji, które pozwalają jej na związanie się z kaweoliną [8]. Oddziaływanie kaweoliny z eNOS hamuje aktywność tego enzymu, a efekt ten może zostać całkowicie zniesiony poprzez kompleks  $Ca^{2+}$ -kalmodulina. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia przyczynia się bowiem do związania eNOS z kalmoduliną i transformacji do aktywnej enzymatycznie syntazy NO. Opisany mechanizm regulacji aktywności enzymu stanowi przykład allosterycznego, kompetycyjnego oddziaływania białko-białko [9].

### TLENEK AZOTU JAKO CZĄSTECZKA SYGNAŁOWA

Tlenek azotu, będąc cząsteczką sygnałową, oddziałuje poprzez kowalencyjne związanie się z cząsteczką będącą odbiorcą informacji. Reaguje z białkami, zwłaszcza zawierającymi centra żelazowo-siarkowe, grupy hemowe oraz jony metali przejściowych, regulując aktywność wielu znaczących enzymów wewnątrzkomórkowych [10]. Fizjologicznie najważniejszym działaniem NO jest aktywacja cyklicznej guanylanowej. Uwolniony ze śródbłonka tlenek azotu łączy się kowalencyjnie z grupą hemową tego enzymu, zmieniając jego konformację i zwiększając aktywność. Prowadzi to do wzrostu stężenia cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP) (Rys. 3) [11]. W zależności od kierunku uwolnienia tego mediatora i miejsca, w którym następuje aktywacja cyklicznej guanylanowej, możemy obserwować różne efekty jego działania. Na przykład: wzrost stężenia cGMP w komórkach mięśni gładkich, leżących pod śródbłonkiem naczyń aktykuje GMP-zależne kinazy, prowadząc

**Tabela 1.** Porównanie właściwości izoform syntazy tlenu azotu

Cecha	Izoformy syntazy tlenu azotu		
	Typ I	Typ II	Typ III
inna nazwa	neuronalna (nNOS)	indukowalna (iNOS)	śródbłonkowa (eNOS)
nazwa genu kodującego białko	NOS1	NOS2	NOS3
ekspresja	konstytutywna	indukowalna	konstytutywna
lokalizacja wewnątrzkomórkowa	cytosol	cytosol	błona plazmatyczna
aktywacja poprzez jony $Ca^{2+}$	+	-	+
wydajność syntezy NO	niska	wysoka	niska



**Rysunek 2.** Schemat reakcji katalizowanych przez dwa typy syntaz tlenu azotu: a) syntazy konstytutywne (cNOS) zależne od wapnia i kalm moduliny, ich aktywność zwiększa się w wyniku wzrostu stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> w cytoplazmie; b) syntazy indukowalne (iNOS) niezależne od stężenia wapnia, ich biosynteza stymulowana jest przez cytokiny. Rysunek zmodyfikowany wg [4].

do zmniejszenia wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia i relaksacji naczyń. Natomiast wzrost stężenia cGMP w płytkach krwi w wyniku uwolnienia NO do światła naczynia krwionośnego, zmniejsza aktywację płytek i adhezję do powierzchni śródbłonna. Tlenek azotu reaguje również z żelazem grupy hemowej hemoglobiny, przekształcając ją w methemoglobinę, a sam ulega utlenieniu do azotanu [12,13]. Z kolei oddziaływanie NO z białkami wiążącymi żelazo w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym oraz z enzymami syntetyzującymi DNA w komórkach mikroorganizmów, hamuje ich aktywność i odgrywa w ten sposób istotną rolę w reakcji obronnej organizmu przed patogenami [13].

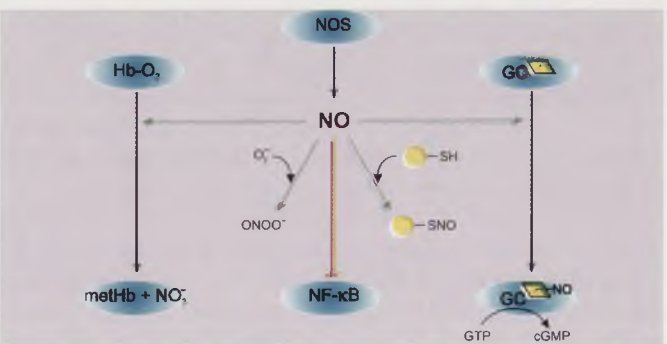
Inny mechanizm modyfikacji białek przez tlenek azotu polega na odwracalnym przyłączeniu NO do ich grup tiolowych, czyli S-nitrozylacji. Preferencyjna nitrozylacja niektórych białek zależy od sekwencji aminokwasowej w otoczeniu reszty cysteinowej. Sprzyja temu zwłaszcza sąsiedztwo reszt asparaginianowych i glutaminianowych. Nitrozylacja modyfikuje funkcje wielu białek, m.in. kanałów jonowych, receptorów, kinaz białkowych, fosfataz, białek G, kinaz tyrozynowych, a także czynników transkrypcyjnych, takich jak NF-κB, AP-1 (ang. *activator protein-1*) czy C/EBP (ang. *CAAT/enhancer binding protein*) [10,14,15]. Przyłączenie cząsteczek tlenu azotu do grup tiolowych białek osocza, jak np. albuminy, tworzy pułę krążących donorów NO [6].

Tlenek azotu posiada również zdolność zarówno do hamowania, jak i do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Efekt działania NO jest tutaj prawdopodobnie zależny od rodzaju komórki, w której jest syntetyzowany oraz od

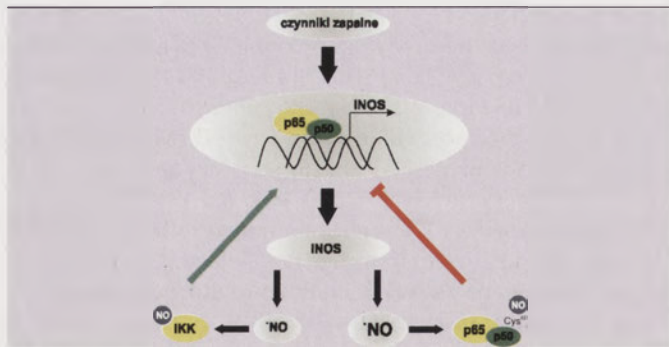
jego stężenia (Rys. 4) [16,17]. Czynniki NF-κB jest aktywowany przez rodniki tlenowe oraz prozapalne cytokiny i bierze udział w procesach zapalnych poprzez indukcję ekspresji cytokin przeciwzapalnych, cząstek adhezyjnych, chemokin i antygenów zgodności tkankowej klasy II (MHC II) w komórkach śródbłonna [18]. Funkcjonalny czynnik NF-κB jest dimerem złożonym z białek p50, p52, RelA (p65), relB lub c-Rel (najczęściej jest kompleksem podjednostek p50 i p65). Gdy nie działa bodziec stymulujący, sekwencja lokalizacji jądrowej blokowana jest przez białko inhibitorowe IκB, utrzymując czynnik transkrypcyjny NF-κB w cytosolu komórki. Pod wpływem czynników aktywujących NF-κB dochodzi do fosforylacji inhibitora przez kinazę IκB (IKK) w miejscach reszt serynowych Ser<sup>32</sup> i Ser<sup>36</sup>, co powoduje ubiquitylację i w konsekwencji degradację białka IκB [19,20]. Oddysocjowanie inhibitora odsłania sygnał lokalizacji jądrowej czynnika transkrypcyjnego NF-κB, wskutek czego ulega on szybkiej translokacji do jądra komórkowego, gdzie z dużym powinowactwem wiąże się z elementami κB promotorów odpowiednich genów [19,21]. Ponieważ aktywacja kinazy inhibitora κB jest znacząca dla indukcji czynnika NF-κB, zatem enzym ten jest idealnym celem dla mechanizmów regulacyjnych. Przykładem takiej regulacji jest hamowanie IKK przez tlenek azotu w wyniku S-nitrozylacji. Badania wykazały również, że zahamowanie aktywności syntazy tlenu azotu zwiększa zdolność czynnika martwicy nowotworów α (TNF-α) do aktywacji IKK, odzwierciedlając znaczenie endogennego NO w regulacji NF-κB przez cytokiny [16].

Tlenek azotu produkowany przez iNOS może również na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego hamować przedłużoną aktywację NF-κB, a tym samym transkrypcję docelowych genów tego czynnika [17,22]. Ponieważ promotor genu *NOS2* zawiera miejsce wiążące NF-κB niezbędne do maksymalnej aktywacji genu, tak więc hamowanie czynnika transkrypcyjnego NF-κB zmniejsza tę aktywację, a zatem i syntezę NO [16]. Tlenek azotu może hamować NF-κB na kilka sposobów, między innymi poprzez: stabilizację I-κB, indukcję mRNA I-κB, zapobieganie translokacji jądrowej NF-κB oraz S-nitrozylację Cys<sup>62</sup> podjednostki p50, co hamuje zdolność NF-κB do wiązania się z DNA [16,17].

Innym czynnikiem transkrypcyjnym podlegającym regulacji przez tlenek azotu jest AP-1 [23]. Białko to jest zbudowane z produktów proto-onkogenów *c-jun* oraz *c-fos* i występuje w postaci kompleksu homodimerycznego (Jun/Jun) lub heterodimerycznego (Jun/Fos). Czynniki AP-1 wiąże się z elementem TRE (ang. *tetradecanoylphorbol-13-acetate response element*), obecnym w promotorach wielu różnych



**Rysunek 3.** Główne ścieżki działania tlenu azotu.

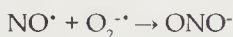


**Rysunek 4.** Kontrola aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB przez tlenek azotu. Niskie stężenia NO zwiększają aktywność NF-κB prawdopodobnie poprzez aktywację kinazy inhibitora κB (IKK). W przeciwieństwie do tego, duże stężenia tlenu azotu produkowane przez iNOS lub dostarczane w postaci donorów, hamują jądrowy czynnik transkrypcyjny poprzez nitrozylację Cys<sup>62</sup> jego podjednostki p50 i w ten sposób zmniejszają przedłużoną aktywację iNOS na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego.

genów biorących udział w proliferacji komórek i procesie nowotworzenia. Wiązanie się AP-1 do TRE wymaga interakcji podjednostek Jun i Fos za pomocą domeny zamka leucynowego [19,21,24]. Badania dowiodły, że tlenek azotu zwiększa ekspresję Fos i Jun, ale dokładny mechanizm tego działania nie został wyjaśniony. Natomiast przeprowadzone *in vitro* doświadczenia z użyciem donorów NO wykazały paradoksalnie, że egzogenny tlenek azotu bezpośrednio zmniejsza wiązanie czynnika AP-1 do fragmentów promotorów odpowiednich genów [25,26].

#### WPLYW REAKTYWNYCH FORM TLENU NA PRZEKAZYWANIE SYGNAŁÓW PRZEZ TLENEK AZOTU

Czynnikami modulującym przekazywanie sygnałów przez tlenek azotu są reaktywne formy tlenu (RFT), zwłaszcza anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ) i nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ). Enzymatycznym źródłem  $O_2^{\cdot-}$  w komórkach śródbłonna są oksydoreduktaza NADPH, cyklooksygenaza i cytochrom P-450. Tlenek azotu bardzo szybko reaguje z anionorodnikiem ponadtlenkowym, tworząc nadtlenuazotyn ( $ONO^{\cdot-}$ ), który nie jest już wolnym rodnikiem:



NO neutralizuje w ten sposób bardzo reaktywny  $O_2^{\cdot-}$ , chroniąc komórki przed jego szkodliwym działaniem. Z drugiej jednak strony, powstały w wyniku reakcji nadtlenuazotyn – będący silnym oksydantem – posiada zdolność utleniania i nitrowania wielu związków organicznych, w tym lipidów i białek. Kierunek działania tlenu azotu zależy tutaj nie tylko od jego stężenia, ale również od stężenia i szybkości syntezy innych reaktywnych form tlenu [13].

Modulujący wpływ nadtlenu wodoru na działanie tlenu azotu polega natomiast na podwyższaniu stężenia jonów wapnia w komórkach śródbłonna przez  $H_2O_2$ , co z kolei jest czynnikiem stymulującym syntazę tlenu azotu [27].

W pewnych warunkach syntazy tlenu azotu mogą stać się źródłem reaktywnych form tlenu. Gdy stężenie tetrahydrobiopteryny (kofaktora reakcji) znacznie spada, wówczas enzym aktywowany przez kompleks  $Ca^{2+}$ -kalmodulina nie działa na substrat (argininę), lecz następuje redukcja tlenu

cząsteczkowego i powstaje anionorodnik ponadtlenkowy  $O_2^{\cdot-}$ . Również małe stężenia argininy mogą powodować taki przebieg reakcji [10].

Wiele genów regulowanych przez tlenek azotu znajduje się jednocześnie pod wpływem reaktywnych form tlenu. Niektóre geny kontrolowane są w sposób skoordynowany przez NO i  $O_2^{\cdot-}$ , inne natomiast podlegają regulacji przeciwstawnej. Nawet niewielkie zaburzenie równowagi w proporcji  $NO/O_2^{\cdot-}$  może zatem powodować znaczące zmiany w ekspresji określonych enzymów [14].

#### PAI-1

Głównym regulatorem aktywacji plazminogenu oraz czynnikiem utrzymującym *in vivo* fizjologiczny stan hemostazy jest inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1, ang. *plasminogen activator inhibitor type 1*), syntetyzowany przez komórki śródbłonna, komórki mięśni gładkich naczyń, megakariocyty, hepatocyty i adypocyty. Znaczna część PAI-1 (ok. 90% jego całkowitej zawartości we krwi) jest magazynowana w ziarnistościach płytek krwi, skąd pod wpływem czynników aktywujących płytki jest on uwalniany. Natomiast uwalnianie PAI-1 z komórek śródbłonna i mięśni gładkich do krwioobrotu stymulowane jest przez prozapalne cytokiny, czynniki wzrostu i wiele innych bodźców. Duże stężenie tego inhibitora w osoczu stwarza ryzyko zakrzepowe. Jest ono większe u mężczyzn niż u kobiet, rośnie wraz z wiekiem oraz występuje w otyłości [28,29].

Gen *PAI-1*, o długości około 12,3 kbp, znajduje się w obszarze chromosomowym 7q21.3-q22 i składa się z 9 eksonów oraz 8 intronów. Częsteczka PAI-1 jest utworzonym z 379 aminokwasów pojedynczym łańcuchem glikoproteinowym o masie 50 kDa i należy do nadrodziny inhibitorów proteaz serynowych – serpin (ang. *serine proteinase inhibitors*) [30-32]. Białko to nie zawiera reszt cysteinowych, natomiast licznie występują w nim reszty metioninowe, co może tłumaczyć zdolność PAI-1 do nieodwracalnej inaktywacji przez czynniki utleniające. Centrum reaktywne inhibitora ( $Arg^{346}$ - $Met^{347}$ ) znajduje się w eksponowanym regionie „napiętej pętli” (ang. *„strained loop region”*) w końcu karboksylowym cząsteczki i służy jako pseudosubstrat dla proteazy serynowej.

Hamowanie aktywatorów plazminogenu przez PAI-1 przebiega w dwóch etapach. W pierwszym etapie z dużą szybkością tworzony jest odwracalny kompleks aktywator-inhibitor, a w drugim powolnemu rozcięciu ulega wiązanie peptydowe pomiędzy  $Arg^{346}$  i  $Met^{347}$  cząsteczki inhibitora (centrum aktywne). W efekcie uwolniony zostaje C-końcowy peptyd PAI-1, ale karboksylowa grupa  $Arg^{346}$  pozostaje kowalencyjnie związana z seryną w miejscu aktywnym białka aktywatora [29].

Białko PAI-1 może występować w kilku konformacjach – obok formy aktywnej lub nieaktywnej istnieje również forma latentna (utajona, nieczynna). Forma aktywna inhibitora spontanicznie przekształca się w formę utajoną z okresem półtrwania ok. 2h w 37°C [31]. Natomiast przekształcenie białka PAI-1 z konformacji latentnej w aktywną zachodzi w obecności czynników denaturujących, ujemnie



naładowanych fosfolipidów lub witronektyny, przy czym w ostatnim przypadku reakcja zachodzi bardzo wolno. W formie aktywnej centrum reaktywne białka PAI-1 ekspozowane jest na powierzchni cząsteczki, natomiast w konformacji utajonej zanurzone jest ono w głębi cząsteczki [29]. Inhibitor PAI-1 jest jedynym członkiem rodziny serpin, który ma zdolność do odwracalnego przekształcania się z formy aktywnej w natywną i odwrotnie. W osoczu i macierzy zewnątrzkomórkowej cząsteczka PAI-1 może tworzyć kompleks z witronektyną, stabilizującą jego aktywność i wydłużającą okres półtrwania [31,33]. W takiej postaci inhibitor zmienia swoją swoistość tak, że staje się dodatkowo inhibitorem trombiny [28].

#### t-PA

Kolejnym czynnikiem odgrywającym ważną rolę w układzie aktywacji plazminogenu, a podlegającym regulacji przez tlenek azotu, jest aktywator plazminogenu typu tkankowego (t-PA, ang. *tissue-type plasminogen activator*). Za główne źródło krążącego t-PA uważa się śródbłonek naczyń. Różne bodźce – takie jak trombina, aminy katecholowe, wazopresyna, bradykinina, endotelina, wysięk fizyczny, niektóre leki, zastój żylny – stymulują komórki do uwalniania tego aktywatora. Aktywność enzymatyczna cząsteczki t-PA znacznie zwiększa się w obecności fibryny (nawet 1000-krotnie), gdyż związanie plazminogenu i t-PA z włóknikiem powoduje ich zagęszczenie i wzrost powinowactwa. Również błona komórkowa i niektóre białka macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak trombospondyna czy kolagen IV, mogą zwiększać szybkość aktywacji plazminogenu przez t-PA, ale nie tak znacznie jak fibryna. Aktywność enzymatyczna ulega natomiast osłabieniu w przypadku tworzenia się nieodwracalnego kompleksu PAI-1-t-PA [28,29,34].

Gen *t-PA* znajduje się w obszarze chromosomowym 8p12-q11.2 [35]. Produktem tego genu jest białko t-PA syntetyzowane w postaci aktywnego pojedynczego łańcucha polipeptydowego. Aktywator ten jest jedyną proteazą układu krzepnięcia, która jest w sposób ciągły wydzielana przez komórki śródbłonna w formie aktywnej. Plazmina, kalikreina i czynnik Xa mogą przecinać wiązanie peptydowe pomiędzy Arg<sup>275</sup> i Ile<sup>276</sup>, prowadząc do utworzenia cząsteczki t-PA zbudowanej z dwóch łańcuchów – lekkiego i ciężkiego – połączonych mostkiem disiarczkowym. Łańcuch lekki białka zawiera centrum aktywne, składające się z His<sup>322</sup>, Asp<sup>371</sup> oraz Ser<sup>478</sup> i wykazuje znaczną homologię z innymi proteazami serynowymi. Łańcuch ciężki cząsteczki t-PA składa się natomiast z 4 domen: N-końcowej domeny *finger*, domeny podobnej strukturą do nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF) oraz dwóch domen *kringle* [29,36].

#### UDZIAŁ TLENKU AZOTU W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW *t-PA* I *PAI-1*

Aktywność inhibitora aktywatorów plazminogenu typu 1 jest ściśle regulowana na poziomie transkrypcji. Głównymi modulatorami jego ekspresji są prozapalne cytokiny i czynniki wzrostu, takie jak interleukina 1 (IL-1), czynnik martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ , ang. *tumor necrosis factor*  $\alpha$ ), transformujący czynnik wzrostu (TGF- $\beta$ , ang. *transfor-*

*ming growth factor*  $\beta$ ), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF, ang. *fibroblast growth factor*), angiotensyna II, jak również glukokortykoidy i aktywatory niespecyficznego kinazy białkowej C (PKC) [37-40]. Na końcu 5' genu *PAI-1* znajduje się kilka elementów regulatorowych *cis*, które wiążą czynniki transkrypcyjne (takie jak Sp1, AP-1, NF- $\kappa$ B, Smad3, Smad4, TFE3), będące mediatorami odpowiedzi na działanie wyżej wymienionych cytokin i czynników wzrostu [37].

Cytokiny TGF- $\beta$  i TNF- $\alpha$  wywołują wzrost ekspresji syntazy tlenu azotu, a w szczególności jej izoformy indukwalnej (iNOS). Wskazuje to na możliwy udział tlenu azotu w ekspresji inhibitora aktywatorów plazminogenu typu 1 zależnej od TGF- $\beta$  i TNF- $\alpha$  [41]. Dokładny mechanizm tego działania nie jest jednak poznany.

Transformujący czynnik wzrostu TGF- $\beta$  – wielofunkcyjna cytokina regulująca wzrost i różnicowanie komórek, jest jednym z najważniejszych induktorów ekspresji białka PAI-1 [38]. Znaczącą rolę w transdukcji sygnału przez TGF- $\beta$  odgrywają białka Smad, które działają poprzez bezpośrednie wiązanie się z odpowiednimi elementami promotora i/lub z innymi czynnikami transkrypcyjnymi. Badania wykazały, że promotor genu *PAI-1* posiada co najmniej trzy odrębne elementy odpowiedzi na TGF- $\beta$ . Jednym z nich jest miejsce wiążące czynnik transkrypcyjny Sp1 [42]. W zależności od TGF- $\beta$  indukcji promotora PAI-1 z udziałem miejsc Sp1, białka Smad uczestniczą jako koaktywatory transkrypcyjne. Promotor genu *PAI-1* jest indukowany przez TGF- $\beta$  w wyniku działania dwóch mechanizmów: 1) jest silnie aktywowany przez TGF- $\beta$ -zależne wiązanie w regionie dystalnym kompleksu jądrowego Smad3/Smad4; 2) część proksymalna promotora, zawierająca 2 miejsca Sp1, bierze udział w umiarkowanej indukcji przez TGF- $\beta$  poprzez interakcję Smad3 i Sp1 (niezależnie od interakcji Smad-DNA, ale niezależnie od współdziałania Sp1-DNA). Oba mechanizmy są wymagane do pełnej aktywacji promotora genu *PAI-1* [42].

Wpływ tlenu azotu na ekspresję PAI-1 za pośrednictwem transformującego czynnika wzrostu został zbadany przez Shihab i wsp. [43] W badaniach tych zaobserwowano, że zahamowanie produkcji NO za pomocą inhibitora syntazy tlenu azotu wiąże się ze wzrostem ekspresji TGF- $\beta$ , a to z kolei ma wpływ na wzrost ekspresji PAI-1. Natomiast podawanie substratu dla NOS – L-argininy (skutkujące zwiększeniem ilości NO) powoduje obniżenie ekspresji TGF- $\beta$  i PAI-1.

W wielu typach komórek transformujący czynnik wzrostu stymuluje produkcję reaktywnych form tlenu (RFT). Może hamować również ekspresję enzymów antyoksydacyjnych, np. dysmutazy ponadtlenkowej Mn i Cu, Zn oraz katalazy. Dokładne działanie RFT powstałych po stymulacji TGF- $\beta$  nie jest znane, ale oksydacyjny wpływ na różne komórki docelowe obejmuje zahamowanie wzrostu, apoptozę, autoindukcję TGF- $\beta$ , aktywację latentnej formy TGF- $\beta$ , syntezę kolagenu i różnicowanie miofibroblastów [44].

Kolejnym silnym induktorem ekspresji PAI-1 jest czynnik martwicy nowotworów. TNF- $\alpha$  aktywuje jądrowy czynnik transkrypcyjny  $\kappa$ B za pośrednictwem reaktywnych form tlenu, zatem tlenek azotu może hamować ten proces poprzez

inaktywację i usuwanie anionorodnika ponadtlenkowego  $O_2^-$ . Reakcja NO z  $O_2^-$  prowadząca do powstania nadtlenuazoty jest jedną z najszybszych reakcji w układach biologicznych i zachodzi prawie trzy razy szybciej niż pomiędzy  $O_2^-$  i dysmutazą ponadtlenkową [45].

Badania wykazały, że tlenek azotu może przeciwstawnie wpływać na ekspresję PAI-1 w komórkach śródbłonna w zależności od tego, czy jest on generowany endogennie, czy egzogennie [46,47]. Wynika to z lokalizacji pochodzącego z różnych źródeł NO na terenie komórki i w związku z tym, z odmiennego efektu działania na kinazy mitogenne MAPK – ERK1/2 i JNK1/2. Nitroprusydek sodowy (SNP, ang. *sodium nitroprusside*), będący donorem tlenu azotu, wykazuje wpływ tylko na szlak ERK1/2, podczas gdy NO syntetyzowany endogennie (na drodze zależnej od TNF- $\alpha$ ) aktywuje zarówno kinazę ERK1/2, jak i JNK1/2. Egzogeny NO aktywuje szlak zależny od cGMP, który ostatecznie prowadzi do zahamowania ekspresji PAI-1 w komórkach śródbłonna, z kolei stymulowana przez TNF- $\alpha$  aktywacja ekspresji PAI-1 zachodzi za pośrednictwem indukowalnej syntazy NO i w ten sposób generowany endogennie tlenek azotu zwiększa ekspresję PAI-1 [46]. Natomiast doświadczenia przeprowadzone przez Pérez-Ruiz i wsp. [48] z zastosowaniem linii komórkowych HUVEC (ang. *human umbilical vein endothelial cells*) w warunkach endotoksemii indukowanej lipopolisacharydami (LPS), nie wykazały istotnej roli tlenu azotu w regulacji ekspresji śródbłonkowego PAI-1. Jako donora tlenu azotu użyto w tych doświadczeniach S-nitrozo-N-acetylo-D,L-penicylaminy (SNAP).

Wyniki badań Eberhardta i wsp. [41] pokazały, że tlenek azotu i reaktywne formy tlenu mają kluczowe znaczenie w modulacji ekspresji t-PA i PAI-1 w komórkach mezangialnych szczura. Komórki mezangialne są głównym źródłem kłębuszkowego NO. W wyniku indukcji przez cytokiny zapalne, takie jak na przykład IL-1 $\beta$  czy TNF- $\alpha$ , produkują one duże ilości tlenu azotu, głównie poprzez aktywację indukowalnej izoformy NOS. Tlenek azotu może zmieniać ekspresję genów i ich produktów, które są potencjalnymi czynnikami w patogenezie kłębuszkowego zapalenia nerek, włączając w to geny kodujące białka macierzy zewnątrzkomórkowej i odpowiednie proteazy. Egzogenie dostarczany w tym doświadczeniu tlenek azotu powodował indukowaną przez cytokiny znaczącą redukcję poziomu mRNA t-PA i jego inhibitora PAI-1. Natomiast zwiększona ekspresja t-PA i PAI-1 w obecności inhibitora syntazy tlenu azotu – N-monometylo-L-argininy (L-NMMA), wskazywała na fakt, że endogeny NO również jest potencjalnym modulatorem systemu proteolitycznego. W ten sposób tlenek azotu może wywierać wzmocniony efekt inhibitorowy na ekspresję t-PA i PAI-1 w schorzeniach zapalnych nerek. Hamujący wpływ NO na indukowaną przez cytokiny ekspresję t-PA, chroni komórki mezangium przed nadmierną degradacją macierzy zewnątrzkomórkowej (pobudzaną przez IL-1 $\beta$ ). Okazało się, że tlenek azotu nie wpływa bezpośrednio na aktywność t-PA, a efekt inhibitorowy osiągnąć jest przez zmianę ekspresji genu kodującego tkankowy aktywator plazminogenu. Stwierdzono również, że podanie donorów NO powoduje początkowo zwiększenie poziomu t-PA indukowanego przez cytokiny na drodze zależnej od cGMP. Natomiast późniejszy efekt działania egzogenego tlenu

azotu odbywa się niezależnie od cGMP i skutkuje hamowaniem ekspresji tkankowego aktywatora plazminogenu indukowanego przez cytokiny [41]. Molekularny mechanizm oddziaływania tlenu azotu na ekspresję t-PA i PAI-1 nie jest jednak jeszcze dobrze poznany.

## UWAGI KOŃCOWE

Obniżona aktywność fibrynolityczna, która może być wywołana wysokim poziomem PAI-1, przyczynia się do rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego. Odkrycie, że egzogeny tlenek azotu powoduje zmniejszenie ekspresji PAI-1 w komórkach śródbłonna ma znaczące implikacje w regulacji fibrynolizy, a zatem i w leczeniu chorób naczyniowych. Wykazano bowiem, że podawanie donorów NO powoduje redukcję tworzenia skrzepu. Ten supresyjny wpływ tlenu azotu na aktywność inhibitora aktywatorów plazminogenu typu I może jednak być zaburzony w pewnych stanach patologicznych, jak otyłość, insulinooporność czy cukrzyca insulinozależna [47].

## PIŚMIENNICTWO

1. Furchgott RF, Zawadzki JW (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376
2. Pfeilschifter J (2002) Nitric oxide triggers the expression of proinflammatory and protective gene products in mesangial cells and the inflamed glomerulus. *Nephrol Dial Transplant* 17: 347-348
3. Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064
4. Michel T, Feron O (1997) Nitric oxide synthases: which?, where?, how?, and why? *J Clin Invest* 100: 2146-2152
5. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615
6. Channon KM, Qian H, George SE (2000) Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1873-1881
7. Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95
8. Walford G, Loscalzo J (2003) Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost* 1: 2112-2118
9. Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T (1997) Reciprocal regulation of endothelial nitric oxide synthase by  $Ca^{2+}$ -calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 272: 15583-15586
10. Bartosz G (2004) Druga twarz tlenu, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 328-333
11. Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, Misra M K (2004) Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. *J Biomed Biotechnol* 4: 227-237
12. Cannon III RO (1998) Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clinical Chemistry* 44: 1809-1819
13. Hart CM (1999) Nitric oxide in adult lung disease. *CHEST* 115: 1407-1417
14. Pfeilschifter J, Eberhardt W, Huwiler A (2003) Nitric oxide and mechanisms of redox signalling. *J Am Soc Nephrol* 14: S237-S240
15. Stamler JS, Meissner G (2001) Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* 81: 209-237
16. Reynaert NL, Ckless K, Korn SH, Vos N, Guala AS, Wouters EFM, van der Vliet A, Janssen-Heininger YMW (2004) Nitric oxide represses inhibitory  $\kappa$ B kinase through S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8945-8950
17. Janssen-Heininger YMW, Poynter ME, Baeuerle PA (2000) Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor  $\kappa$ B. *Free Rad Biol Med* 28: 1317-1327
18. Vos IHC, Briscoe DM (2002) Endothelial injury: cause and effect of alloimmune inflammation. *Transpl Infect Dis* 4: 152-159

19. Rahman I, MacNee W (2000) Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Rad Biol Med* 28: 1405-1420
20. Kunsch Ch, Bedford RM (1999) Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 85: 753-766
21. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 67-101
22. Umansky V, Hehner SP, Dumont A, Hofmann TG, Schirmacher V, Dröge W, Schmitz ML (1998) Costimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF- $\kappa$ B implies a physiological self-amplifying mechanism. *Eur J Immunol* 28: 2276-2282
23. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ (2001) Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 29: 345-350
24. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Rad Biol Med* 22: 269-285
25. Merrill JE, Murphy SP (1997) Regulation of gene expression in the nervous system by reactive oxygen and nitrogen species. *Metabolic Brain Disease* 12: 97-112
26. Tabuchi A, Sano K, Tsuchiya T, Tsuda M (1994) Modulation of AP-1 activity by nitric oxide *in vitro*. *FEBS Lett* 351: 123-127
27. Wolin MS, Davidson CA, Kaminski PM, Fayngersh RP, Mohazzab-H KM (1998) Oxidant – nitric oxide signalling mechanisms in vascular tissue. *Biochemistry* 33: 810-816
28. Łopaciuk S (2002) Zakrzepy i zatory. Wyd. II, Wydawnictwo PZWL, Warszawa, str. 38-43
29. Dobrovolsky AB, Titaeva EV (2002) The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. *Biochemistry* 67: 99-108
30. Błasiak J, Smolarz B, Piestrzeniewicz D (1999) Urokinazowy układ aktywacji plazminogenu i jego znaczenie w progresji nowotworów. *Postępy Biochem* 45: 42-49
31. Agirbasli M (2005) Pivotal role of plasminogen-activator inhibitor 1 in vascular disease. *Int J Clin Pract* 59: 102-106
32. Lijnen HR (2005) Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost* 3: 35-45
33. Binder BR, Christ G, Gruber F, Grubic N, Hufnagl P, Krebs M, Mihaly J, Prager GW (2002) Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol Sci* 17: 56-61
34. Bodary PF, Wickenheiser KJ, Eitzman TE (2002) Recent advances in understanding endogenous fibrinolysis: implications for molecular-based treatment of vascular disorders. Expert reviews in Molecular Medicine [www.expertreviews.org](http://www.expertreviews.org), (02)00436-2a.pdf Cambridge University Press
35. Yang-Feng TL, Opdenakker G, Volckaert G, Francke U (1986) Human tissue-type plasminogen activator gene located near chromosomal breakpoint in myeloproliferative disorder. *Am J Hum Genet* 39: 79-87
36. Ny T, Elgh F, Lund B (1984) The structure of the human tissue-type plasminogen activator gene: Correlation of intron and exon structures to functional and structural domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 5355-5359
37. Chorostowska-Wynimko J, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J (2004) Plasminogen activator inhibitor type 1 – its structure, biological activity and role in tumorigenesis. *Int J Mol Med* 13: 759-766
38. Eren M, Painter CA, Gleaves LA, Schoenhard JA, Atkinson JB, Brown NJ, Vaughan DE (2003) Tissue- and agonist-specific regulation of human and murine plasminogen activator inhibitor -1 promoters in transgenic mice. *J Thromb Haemost* 1: 2389-2396
39. Dellas C, Loskutoff DJ (2005) Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb Haemost* 93: 631-640
40. Hou B, Eren M, Painter CA, Covington JW, Dixon JD, Schoenhard JA, Vaughan DE (2004) Tumor necrosis factor  $\alpha$  activates the human plasminogen activator inhibitor-1 gene through a distal nuclear factor  $\kappa$ B site. *J Biol Chem* 279: 18127-18136
41. Eberhardt W, Beck KF, Pfeilschifter J (2002) Cytokine-induced expression of tPA is differentially modulated by NO and ROS in rat mesangial cells. *Kidney Int* 61: 20-30
42. Datta PK, Blake MC, Moses HL (2000) Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by transforming growth factor- $\beta$ -induced physical and functional interactions between Smads and Sp1. *J Biol Chem* 275: 40014-40019
43. Shihab FS, Yi H, Bennett WM, Andoh TF (2000) Effect of nitric oxide modulation on TGF- $\beta$ 1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 58: 1174-1185
44. Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1005-L1028
45. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Shin WS, Liao JK (1995) Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. *J Clin Invest* 96: 60-68
46. Świątkowska M, Cierniewska-Cieślak A, Pawłowska Z, Cierniewski CS (2000) Dual regulatory effects of nitric oxide on plasminogen activator inhibitor type 1 expression in endothelial cells. *Eur J Biochem* 267: 1001-1007
47. Bouchie JL, Hansen H, Feener EP (1998) Natriuretic factors and nitric oxide suppress plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1771-1779
48. Peréz-Ruiz A, Montes R, Velasco F, López-Pedraza C, Páramo JA, Orbe J, Hermida J, Rocha E (2002) Regulation by nitric oxide of endotoxin-induced tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in endothelial cells. *Thromb Haemost* 88: 1060-1065

## The influence of nitric oxide on the regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 and tissue-type plasminogen activator expression

Katarzyna Oszajca, Janusz Szemraj, Jacek Bartkowiak

Department of Medical Biochemistry, Medical University of Lodz, 6/8 Mazowiecka St., 92-215 Łódź, Poland  
 e-mail: kasia\_osz@o2.pl

**Key words:** nitric oxide, nitric oxide synthase, plasminogen activator inhibitor type 1, tissue-type plasminogen activator

### ABSTRACT

Nitric oxide produced in various human tissues by nitric oxide synthase is involved in the regulation of many physiological processes. Mechanism of its action is diverse. The most important physiological activity of nitric oxide is guanylate cyclase activation and an increase of cGMP synthesis. At low concentrations NO plays a pivotal role in vessel relaxation and possesses anti-thrombotic, antiproliferative and anti-inflammatory features as well. An excessive production of nitric oxide can disturb vascular hemostasis and contribute to development of cardiovascular diseases. Studies provide that NO also participate in fibrinolysis regulation by the influence on the PAI-1 and t-PA expression, what may have important clinical implications. The aim of this review is to present current knowledge about the role of nitric oxide in the regulation of these plasminogen activation system factors.

Grażyna Dąbrowska<sup>✉</sup>

Beata Głowacka

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

<sup>✉</sup>Zakład Genetyki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; e-mail: browsk@uni.torun.pl, tel. (56) 611 45 76, faks: (56) 611 47 72

Artykuł otrzymano 14 marca 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 1 kwietnia 2005 r.

**Słowa kluczowe:** tratwy lipidowe, błona komórkowa, cholesterol, przekazywanie sygnału

**Wykaz skrótów:** AFM (ang. *atomic force microscope*) – mikroskopia sił atomowych; ATP – adenozylo-5'-trifosforan; EGF (ang. *epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu; GPI – glikozylofosfatydyloinozytol; GTP – guanozylo-5'-trifosforan; MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*) – kinaza MAP; PDGF (ang. *platelet-derived growth factor*) – czynnik wzrostu płytek krwi; Src (ang. *non-receptor tyrosine kinases*) – kinaza tyrozynowa

### STRESZCZENIE

Tratwy lipidowe są domenami błon komórkowych, bogatymi w cholesterol i sfingolipidy, osiągającymi wielkość od 50 do 100 nm. Domeny te są nierozpuszczalne w detergentach niejonowych. Funkcjonują jako platformy, do których wiążą się białka transbłonowe, uczestniczą w przekazywaniu sygnału, endocytozie i kompartmentacji błony plazmatycznej. Znacznikami tratw lipidowych są flotylina, białka z kotwicą GPI, kinazy z rodziny sarcoma (Src), naskórkowy czynnik wzrostu i białka G. Pomimo intensywnych badań, znaczenie tratw, mechanizm ich organizacji w domeny błon komórkowych, oraz właściwości fizykochemiczne wciąż pozostają niejednoznaczne.

### WPROWADZENIE

W ogólnie przyjętym modelu mozaikowej budowy błony komórkowej [1] białka transbłonowe, niczym góry lodowe, są zanurzone w neutralnym środowisku płynnego morza lipidów, w którym swobodnie dryfują. Wydaje się jednak, że zarówno przestrzenne rozmieszczenie jak i ruchy tych białek transbłonowych nie są dowolne ani przypadkowe. Podobnie trzy główne klasy lipidów budujących błonę komórkową, jakimi są glicerofosfolipidy, sfingolipidy i sterole, nie stanowią jednorodnego środowiska lipidowego, lecz tworzą zróżnicowane przedziały. Obecnie uważa się, iż w błonach biologicznych można wyróżnić heterogeniczne mikrodomeny bogate w cholesterol i glikosfingolipidy. Domeny te nazwano błonowymi tratwami lipidowymi (ang. *lipid rafts*). W piśmiennictwie spotykana jest zróżnicowana nomenklatura określająca tratwy lipidowe: CEM (ang. *cholesterol-enriched membranes*), DIG (ang. *detergent-insoluble, glycosphingolipid-enriched membranes*), DRM (ang. *detergent resistant membrane*), GEM (ang. *glycosphingolipid-enriched membranes*), TIM (ang. *triton insoluble membrane*) TIFF (ang. *triton insoluble floating fraction*).

Tratwy lipidowe występują w rozmaitych typach komórek zwierzęcych. Zidentyfikowano je w błonie komórek nerwowych [2], nabłonka [3], limfocytów [4], a także neutrofilów [5]. Domeny te mają różną lokalizację wewnątrzkomórkową. Najczęściej występują w błonie komórkowej, jakkolwiek zidentyfikowano je w różnych strukturach błonowych, takich jak aparat Golgiego, czy fagosomy [6,7].

Tratwy są zaangażowane w dynamikę błony plazmatycznej, funkcjonują jako przedziały białek błonowych, stanowią platformy, do których asocjują białka błonowe. Biorą one udział w szeregu podstawowych procesach komórkowych zaczynając od sortowania białek i lipidów po obróbcę w aparatach Golgiego [8, 9], poprzez endocytozę niezależną od klatryny [10] do regulacji przekazywania sygnału [11,12], wnikania wirusów [13,14], dynamiki błony komórkowej [11,15], apoptozę [16] i polaryzację błony plazmatycznej [17].

Tratwy lipidowe, jak wiele innych struktur komórkowych, odkryto przypadkowo. Zidentyfikowano je podczas homogenizacji komórek nabłonka w zimnym, jednoprocetowym roztworze detergentu Triton X-100. Po zwirowaniu homogenatu komórkowego w gradiencie stężeń sacharozy, uzyskano unoszącą się na powierzchni roztworu warstwę pęcherzyków i fragmentów błony komórkowej, nierozpuszczalną w detergentach. Ze względu na dużą zawartość glikosfingolipidów oraz dryfowanie na powierzchni roztworu, warstwę nazwano tratwami lipidowymi [18]. Izolację tratw z użyciem detergentu Triton X-100 przeprowadzono na komórkach pochodzących z różnych typów tkanek; w każdym przypadku uzyskiwano podobne ilości cholesterolu oraz białek znacznikowych tratw lipidowych: flotyliny (ang. *flotillin*) i białek z kotwicą glikozylofosfatydyloinozytolową (ang. *GPI anchore*) [19,20].

## LIPIDY BUDUJĄCE TRATWY LIPIDOWE

Główną część tratwy tworzą glikosfingolipidy i cholesterol (Rys. 1). Glikosfingolipidy zmniejszają płynność, a cholesterol nadaje sztywność błonie komórkowej. Podział błony plazmatycznej opiera się przede wszystkim na różnicach w gęstości pomiędzy tratwami lipidowymi a ich środowiskiem. Tratwy lipidowe tworzą ściśle upakowane domeny błonowe, w przeciwieństwie do pozostałych rejonów błony komórkowej charakteryzujących się luźnym upakowaniem lipidów. Nieznaczna część tratw lipidowych stanowią fosfolipidy, przy czym fosfolipidy obecne w tratwach są zdecydowanie bardziej nasycone od fosfolipidów otaczających je, co wymusza ściślejsze upakowanie sfingolipidów i prowadzi do wyodrębnienia tratw jako oddzielnych domen. Ciasne upakowanie cząsteczek lipidów, wynikające z ich właściwości fizycznych najprawdopodobniej nadaje tratwom lipidowym odporność na niejonowe detergenty [21].

## BIAŁKA BUDUJĄCE TRATWY LIPIDOWE

Oddziaływania pomiędzy cząsteczkami lipidów są zbyt słabe, aby mogły utworzyć domeny skupiające czynniki białkowe uczestniczące w procesach komórkowych. Dopiero oddziaływania pomiędzy białkami a cholesterolem i sfingolipidami umożliwiają tworzenie funkcjonalnych domen błony komórkowej [22]. Tratwy lipidowe są bogate w różnorodne białka (Rys. 1). We frakcji tratw lipidowych między innymi zidentyfikowano kaweolinę, flotylinę, białka z kotwicą GPI, np. białko CD55 [23], kinazy z rodziny Src, białka G, a także receptory wzrostu (EGF, PDGF), receptor endoteliny, kinaza MAP (MAPK) oraz gangliozyd  $G_{M1}$  rozpoznawany przez toksynę cholery [14,18,19,24,25]. Białka wiążą się z tratwami w różnorodny sposób. Na przykład kaweolina, będąca integralnym białkiem błonowym, posiada domenę wiążącą cholesterol [26]. Natomiast białka peryferyjne, takie jak białka z kotwicą GPI, śród błonkowa syntaza tlenu azotu i kinazy z rodziny Src, dzięki acylacji na końcu N resztami nasyconych kwasów palmitynowego i mirystynowego, są zakotwiczone w tratwach lipidowych

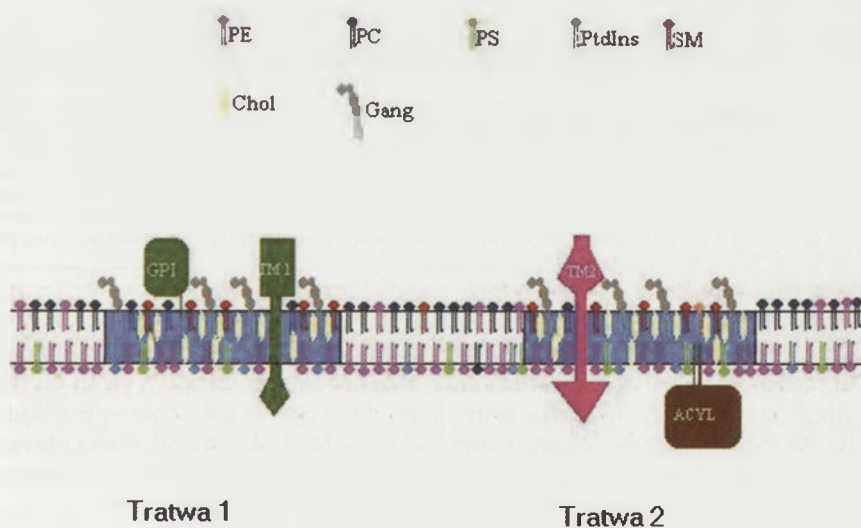
[27,28]. Łańcuch węglowodorowy, dołączony do białka wnika w dwuwarstwę lipidową, i trwale zakotwicza je w tratwie. Kolejną grupę białek tworzą receptory błonowe, które w wyniku ich aktywacji jedynie czasowo asocjują do tratw lipidowych [20,29].

Tratwy lipidowe są to zazwyczaj małe, wysoce ruchliwe domeny, o średnicy około 50 nm. Jednak istnieją również duże, stabilne domeny lipidowe, osiągające średnicę 200–300 nm, o silnie uporządkowanej strukturze lipidowej stabilizowanej przez zmiany w konformacji białek. Uważa się, że białka transbłonowe kowalencyjnie związane z lipidami tratw, zmieniają uporządkowanie lipidów w zależności od swego ułożenia. Boczne przechylenie transbłonowych elementów białek indukuje rozluźnienie struktury tratw lipidowych. Natomiast wyprostowanie elementów hydrofobowych białek wymusza uporządkowanie dwuwarstwy lipidowej. Udział białek w przechodzeniu tratw lipidowych w płynną mozaikę umożliwia utrzymanie równowagi pomiędzy błoną plazmatyczną a jej poddomenami [30].

## IZOLACJA TRATW LIPIDOWYCH

Wiedza o tratwach lipidowych oparta jest w głównej mierze na analizach biochemicznych tratw wyizolowanych z błon komórkowych i uzupełniana obserwacjami wykonanymi za pomocą różnych technik mikroskopowych. Istnieją bardzo rozmaite techniki izolacji tratw, a każda z nich odsłania odmienny charakter izolowanych domen. Większość metod izolacji tratw lipidowych opiera się na braku rozpuszczalności tych domen w detergentach niejonowych. Najczęściej używanym detergentem jest Triton X-100, jednakże wykorzystuje się również Lubrol WX, Lubrol PX, Brij 58, Brij 96, Brij 98, Nonidet, CHAPS, Tween 20 i glukozyd oktylowy. Warto zauważyć, że tratwy izolowane z użyciem odmiennych detergentów różnią się między sobą składem lipidowym.

Obok technik wykorzystujących niejonowe detergenty, stosowane są alternatywne procedury uzyskiwania frakcji tratw lipidowych. Metoda otrzymywania tratw opracowana przez Smarta i wsp. (1995) [31] różni się od technik wykorzystujących detergenty tym, że tratwy izoluje się z wcześniej oczyszczonych błon plazmatycznych a nie z całego homogenatu komórkowego. Dzięki temu otrzymywany preparat charakteryzuje się zdecydowanie wyższą czystością od produktów uzyskiwanych z wykorzystaniem detergentów. Po oczyszczeniu błona komórkowa jest fragmentowana w procesie sonikacji, a następnie podczas wirowania w gradiencie stężeń, rozdzielana na frakcje. Tratwy otrzymywane tą metodą posiadają stosunkowo więcej cholesterolu i sfingomieliny w porównaniu z całością błony komórkowej [32]. Jednakże w porównaniu z tratwami otrzymanymi poprzez izolację z zastosowaniem detergentu Triton



**Rysunek 1.** Budowa tratwy lipidowej. GPI – białka z kotwicą glikozylofosfatydyloinozytolową; TM – białka transbłonowe; Acyl – białka podwójnie acylowane; PC – fosfatydylocholina; PE – fosfatydyloctanoloamina; PS – fosfatydyloseryna; PtdIns – fosfatydyloinozytol; SM – sfingomielina; Chol – cholesterol; Gang – gangliozyd (zmodyfikowano wg [20]).

X-100, uzyskane domeny zawierają znacznie więcej glicerofosfolipidów. Otrzymywanie tratw lipidowych bez użycia detergentów jest metodą izolującą wybiórcze domeny lipidowe. Wydaje się, że frakcja izolowana powyższą techniką zawiera zdecydowanie więcej domen znajdujących się po wewnętrznej stronie błony komórkowej, w porównaniu z metodami stosującymi niejonowe detergenty.

Analizując rozbieżności w składzie lipidowym tratw izolowanych technikami zarówno z wykorzystaniem detergentów jak i bez ich używania, zaproponowano trzy różne modele strukturalne tych domen (Ryc. 2) [32].

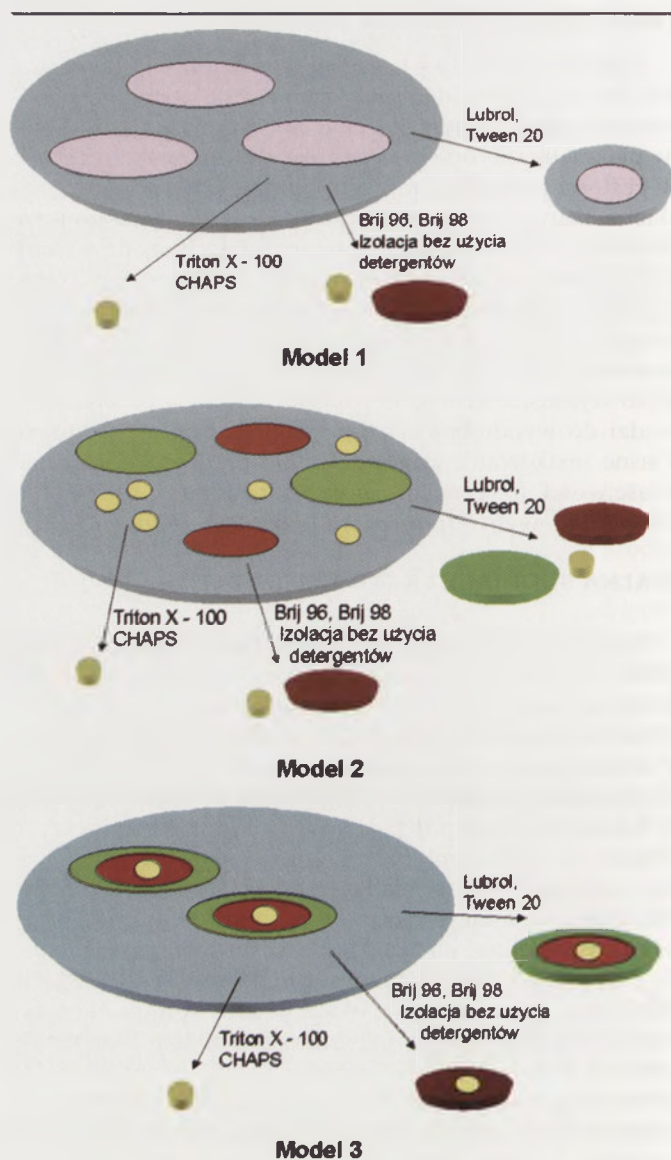
Według warstwowego modelu (Ryc. 2.1), tratwy lipidowe posiadają silnie uporządkowany rdzeń tworzony przede wszystkim przez cholesterol i sfingolipidy. Rdzeń ten jest otoczony przez koliste strefy lipidowe charakteryzujące się coraz mniejszą organizacją przestrzenną budujących je lipidów, aż wreszcie przechodzących w nieuporządkowaną warstwę lipidową. Izolacja z użyciem detergentów Triton X-100 i CHAPS pozwala na uzyskanie wyłącznie samego rdzenia tratw lipidowych. Technika izolacji bez użycia detergentów oraz za pomocą odczynników Brij 96 i Brij 98 umożliwia otrzymanie zarówno części rdzeniowej tratw bogatej w cholesterol i sfingolipidy, jak i warstwy zewnętrznej, zawierających znaczną ilość glicerofosfolipidów. Natomiast wykorzystanie detergentów takich jak Lubrol czy Tween daje w efekcie preparat zawierający wysoko nieuporządkowaną frakcję lipidową, jedynie w niewielkim stopniu różniącą się od głównego zrębu błony komórkowej.

Homogenny model tratw lipidowych (Rys. 2.2) zakłada, że wszystkie tratwy charakteryzują się niezmiennym składem lipidowym, a różne detergenty selektywnie izolują poszczególne komponenty lipidowe.

W heterogennym modelu budowy (Rys. 2.3), tratwy stanowią grupę domen odmiennych pod względem składu lipidowego, jak i pełnionych funkcji. Według heterogennego modelu w błonach komórkowych występują jednocześnie domeny budowane wyłącznie przez cholesterol i sfingolipidy, a także tratwy o mniejszej zawartości tych lipidów, ale bogate w glicerosfingolipidy. Wydaje się, że tratwy lipidowe nie są jednorodną grupą, lecz reprezentują rodzinę domen o zbliżonych, ale nie identycznych właściwościach fizyko-chemicznych.

### „NIEZIDENTYFIKOWANE OBIEKTY DRYFUJĄCE”

Ogromne znaczenie dla badania właściwości tratw ma wykorzystanie technik mikroskopowych, które w przeciwieństwie do analiz biochemicznych, umożliwiają obserwację natywnych form tratw lipidowych. Jedną z efektywnych technik wizualizacji poszczególnych domen błony komórkowej, jest metoda tak zwanych „odcisków dużych fragmentów błon”. Przy zastosowaniu tej metody, fragmenty błony plazmatycznej znakuje się specyficznymi przeciwciałami, sprzężonymi z ziarnami złota koloidalnego. Ten typ znakowania umożliwia wizualizację zarówno lipidów jak i białek, a w konsekwencji ich obserwację przy użyciu mikroskopii elektronowej [33].



**Rysunek 2.** Modele struktury błonowych tratw lipidowych. Błonowe tratwy lipidowe uzyskiwane różnorodnymi technikami izolacji. Kolorem żółtym zaznaczono rdzeń glikosfingolipidowo-cholesterolowy, kolorem czerwonym frakcję lipidową zawierającą zarówno cholesterol, glikosfingolipidy jak i glicerofosfolipidy. Kolorem zielonym oznaczono frakcję lipidową o wzrastającym nieuporządkowaniu struktury. 1 – model warstwowy; sfingolipidy i cholesterol tworzą silnie uporządkowany rdzeń, stopniowo przechodzący w nieuporządkowaną strukturę błony plazmatycznej. 2 – model homogenny; tratwy lipidowe tworzone przez jednorodną frakcję cholesterolu, glikosfingolipidów i glicerofosfolipidów (ciemnoniebieski owal) są otoczone nieuporządkowaną frakcją błony komórkowej. 3 – model heterogenny; tratwy o zróżnicowanym składzie białkowo-lipidowym występują równocześnie w błonach plazmatycznych (zmodyfikowano wg [49]).

Dogodną techniką umożliwiającą badanie błon biologicznych jest kriomikroskopia elektronowa. Używane w kriomikroskopii preparaty są zamrażane a następnie badane w niskich temperaturach. Technika ta umożliwia obserwację rzeczywistych składników, a nie materiału osadzonego na powierzchni błony [34].

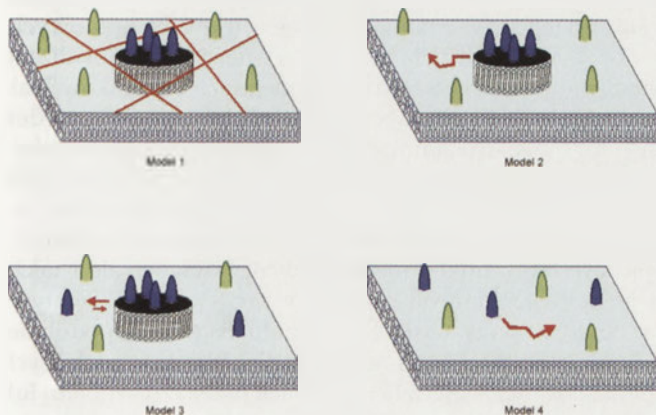
Kolejna z metod identyfikacji i badań tratw lipidowych jest oparta na obserwacji sztucznych błon lipidowych z wykorzystaniem mikroskopii AFM (ang. *atomic force mi-*

roscope). Metoda ta umożliwia wizualizację i obserwację obszarów błony plazmatycznej różniących się między sobą gęstością oraz pozwala na dokonanie precyzyjnych pomiarów wielkości i dynamiki mikrodomen [35]. Tratwy lipidowe sztucznych błon lipidowych osiągają średnicę 200 nm, są większe od tratw żywych błon białkowo-lipidowych, przez co możliwa jest ich obserwacja również w mikroskopie fluorescencyjnym [30]. Obecnie jedynym typem tratw lipidowych, których budowę morfologiczną udało się zaobserwować *in vivo*, są kaweole. Po raz pierwszy kaweole opisano pół wieku temu, jako wpuklenia w błonie komórki śródbłonna [36] i komórek nabłonka pęcherzyka żółciowego [37].

Kaweole tworzą gładkie wgłębienia błony plazmatycznej i zwykle przyjmują kształt cylindryczny czy litery  $\Omega$ . Głównym składnikiem kaweoli, oprócz lipidów typowych dla tratw lipidowych, jest rodzina białek peryferycznych, kaweolin, których funkcja jak dotąd nie została w pełni określona. Po raz pierwszy kaweole zidentyfikowano w kurzych fibroblastach transfekowanych wirusem mięsaka Rousa i opisano je jako kinazę tyrozynową [38]. Kolejne doniesienia charakteryzują kaweolinę jako integralne białko błonowe domen wywodzących się z pęcherzyków aparatu Golgiego [8]. Późniejsze badania dowiodły udziału niektórych typów kaweoli w regulacji przekazywania sygnału [39]. Kaweole komórek nabłonkowych posiadają zdolność oddzielania się od błony plazmatycznej i niezależnego od klatryny transportu zarówno niskocząsteczkowych rozтворów jak i makromolekuł [15]. Ostatnie eksperymenty wykazały zaangażowanie kaweoli w procesy wychwytywania, lub też asocjacji patogenów takich jak wirusy [13,15,40].

#### DYNAMIKA BŁONY PLAZMATYCZNEJ

Jedną z szerzej badanych funkcji tratw lipidowych jest ich zdolność do dyfuzji bocznej w płaszczyźnie błony komórkowej. Istnieją cztery modele dotyczące mobilności białek tratw lipidowych, proponujące różne rozwiązania w za-



**Rysunek 3.** Modele dynamiki tratw lipidowych oraz białek związanych i niezwiązanych z tratwami lipidowymi. Tratwy lipidowe oznaczono jako owale, białka jako walce. 1 – model stabilnej tratwy lipidowej; bariery dla dyfuzji oznaczono jako czarne linie; 2 – model ruchliwej tratwy lipidowej; 3 – model zmiennego składu białkowego tratw lipidowych; 4 – model przedstawiający białka niezwiązane z tratwami lipidowymi (zmodyfikowane wg [47]).

leżności od ich właściwości oraz środowiska otaczającego daną tratwę lipidową (Rys. 3). Pierwszy model (Rys. 3.1) zakłada, że tratwy nie posiadają zdolności poruszania się, są stabilnymi, nieruchliwymi strukturami, a białka są połączone z lipidami wiązaniami kowalencyjnymi [41,42]. W modelu drugim (Rys. 3.2) tratwy lipidowe dyfundują w błonie komórkowej jako stabilne jednostki [43], a szybkość ich ruchu na dużych odległościach jest niezależna od ich składu białkowego, jednakże wysoce uzależniona od wielkości samych tratw i możliwa jedynie w przypadku ich połączenia z podbłonowym szkieletem aktynowym [44]. Trzeci model (Rys. 3.3) przedstawia możliwość przemieszczania się białek z tratwy lipidowej do otaczającej ją błony plazmatycznej i w kierunku przeciwnym, co umożliwia tworzenie przejściowych domen błony komórkowej [4,45,46]. W modelu czwartym (Rys. 3.4) białka dyfundują niezależnie od siebie i od składu lipidowego błony plazmatycznej [47]. W rzeczywistości właściwości fizyko-chemiczne każdego z białek błonowych wymuszają specyficzną dla poszczególnych białek dynamikę dyfuzji [36].

#### WPLYW KOMÓRKOWEGO POZIOMU CHOLESTEROLU NA STABILNOŚĆ TRATW LIPIDOWYCH

Uważa się, że cząsteczki cholesterolu odgrywają znaczącą rolę w formowaniu i stabilizacji tratw lipidowych [48]. Badania wpływu cholesterolu na organizację tratw opierają się przede wszystkim na zmianie jego poziomu komórkowego. Wiele zespołów badawczych sprawdzało wpływ cholesterolu na ruchliwość tratw i ich skład białkowy poprzez traktowanie komórek metylo- $\beta$ -cyklodekstryną, która skutecznie obniża poziom komórkowego cholesterolu [12,49,50]. Metylo- $\beta$ -cyklodekstryna jest cyklicznym oligosacharydem, który wiążąc się z cholesterolem ekstrahuje go z błon komórkowych, nie wpływając na zmianę struktury błon biologicznych ani jej przepuszczalności [51]. Obniżenie komórkowego poziomu cholesterolu o około 70% sprawia, że tratwy lipidowe stają się zdecydowanie mniejsze [47]. Co więcej, Pike i Miller [49] donoszą iż komórki linii A431 pozbawione cholesterolu, w ilości nie przekraczającej 20% poziomu komórkowego, charakteryzuje utrata do 50% cząsteczek naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), będącego białkiem tratw lipidowych. Te same badania wskazują, że uzupełnienie niedoboru cholesterolu, znacząco wpływa na wzrost aktywności naskórkowego czynnika wzrostu. Analizując rolę cholesterolu w funkcjonowaniu tratw lipidowych warto zauważyć, że obniżenie jego poziomu wpływa na redukcję ilości zarówno białek domen sfingolipidowo-cholesterolowych, jak i białek transbłonowych, nie związanych z tratwami [47].

#### UDZIAŁ TRATW LIPIDOWYCH W PRZEKAZYWANIU SYGNAŁU

Specyficzne środowisko lipidowe mikrodomen stwarza warunki sprzyjające akumulacji wybranych białek. Należą do nich białka z jednostką GPD, skupione w zewnętrznej warstwie domen oraz zakotwiczone w warstwie cytoplazmatycznej domen, kinazy tyrozynowe z rodziny Src. Mikrodomeny sfingolipidowo-cholesterolowe są miejscem agregacji aktywowanych immunoreceptorów. Również kinazy

z rodziny Src są kompartmentalizowane w tratwach lipidowych błony komórkowej. W komórkach nie stymulowanych immunoreceptory znajdują się w otoczeniu glicerofosfolipidowym błony komórkowej poza obszarem domen dzięki ich mirystylacji i palmitylacji. Natomiast zaburzenia ich acylacji prowadzą do ograniczenia domen w kinazy Src, co wpływa na zahamowanie fosforylacji immunoreceptorów [52,53]. Kinazy Src poprzez fosforylację zachowanych w ewolucji reszt tyrozynowych sekwencji sygnałowej receptorów rozpoczynają pierwszy etap generacji sygnałów, uruchamiając kaskady sygnałowe charakterystyczne dla danego immunoreceptora w danej komórce. To właśnie wiązanie ligandów wymusza translokację receptorów do obszaru domen.

Wyniki badań biochemicznych i mikroskopowych potwierdzają tezę o asocjacji aktywowanych immunoreceptorów. Poprzez frakcjonowanie detergentowych homogenatów komórek układu odpornościowego w gradiencie gęstości stwierdzono, że domeny błony komórkowej są miejscem fosforylacji aktywowanych receptorów: Fcε1, FcγIIA, TCA, BCR. Jako składniki wymienionych kompleksów sygnałowych receptorów, poza BCR, zidentyfikowano kinazy Lyn, Lck i Fyn. Aktywne katalitycznie kinazy, prawdopodobnie odpowiadają za fosforylację receptorów [54-57]. W domenach przejściowych w czasie aktywacji immunoreceptorów obserwowane są inne białka kompleksu sygnałowego tych receptorów. Należą do nich fosfolipidaza Cγ, Grb2, kinaza 3-fosfatydyloinozitolu oraz Vav [56,58]. W obszarze mikrodomen limfocytów T zidentyfikowano białka Csk, PEP i PAG będące elementami mechanizmu kontrolującego aktywność kinaz. Mechanizm ten polega na dynamicznych i odwracalnych oddziaływaniach między ufosforylowanymi resztami tyrozynowymi kinaz a domenami SH2. Kinaza Csk fosforyluje C-końcową resztę tyrozynową kinaz Src, promując oddziaływanie tej reszty z domeną SH2 ufosforylowanej kinazy, odpowiada więc za dezaktywację kinaz z rodziny Src. Z cytoplazmy Csk przemieszcza się do domen, dzięki interakcji własnej domeny SH2 z ufosforylowanym transbłonowym białkiem PAG. Podczas aktywacji TCR białko PAG ulega defosforylacji przypuszczalnie katalizowanej przez zasocjowaną z nim fosfatazę tyrozynową PEP, co powoduje dysocjację kinazy Csk. Istnieje wówczas możliwość defosforylacji supresyjnej reszty tyrozynowej.

Uważa się, że aktywacja immunoreceptorów prowadzi do ich asocjacji z domenami a dodatkowo indukuje tworzenie się większych kompleksów ze zlewających się domen. Techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej umożliwiły obserwację, że wraz z aktywacją receptorów Fcε1, FcγIIA i TCR następuje redystrybucja białek z kotwicą GPI, kinaz z rodziny Src oraz gangliozydów i akumulacja tych składników domen w obrębie agregatów zidentyfikowanych w błonie komórkowej [58,59]. W obrębie aktywowanego receptora Fcε1, gdzie w bezpośrednim jego sąsiedztwie rezyduje kinaza Syk gromadziły się drobne agregaty bogate w kinazę Lyn, tworząc z Fcε1 i Syk większe skupiska. W obszarach Fcε1 zlokalizowano również białko LAT, będące substratem kinazy Syk. Uważa się, że w komórkach nie stymulowanych obecne są domeny o różnym składzie białkowym. Powyższą sugestię potwierdzają wyniki badań dotyczące segregacji mikrodomen w limfocytach T, neuronach i monocytach [20,60]. Sugeruje się udział szkieletu ak-

tynowego w utrzymaniu i uporządkowaniu przestrzennym powstałych kompleksów. W przypadku pełnej aktywacji limfocyta T wymagana jest również aktywacja immunoreceptora TCR i receptorów towarzyszących oraz białek powierzchniowych CD4, CD8, CD28, skupionych w domenach lub asocjujących z nimi po związaniu antygeny przez TCR [61].

W celu wyjaśnienia mechanizmów asocjacji domen z aktywowanymi receptorami Linda J. Pike [20] zaproponowała kilka hipotetycznych modeli wyjaśniających udział tratw w przekazywaniu sygnału. Najprostszy z nich zakłada, istnienie tratw funkcjonujących jako platformy skupiające białka, których wzajemne oddziaływania są niezbędne do przekazania sygnału. W takim modelu, w pojedynczej tratwie zlokalizowane są enzymy, ich substraty i receptory oraz czynniki z nimi sprzężone. Powyższy model jest najprawdopodobniej charakterystyczny dla receptorów aktywowanych poprzez wiązanie odpowiedniego hormonu, gdzie przekazywanie sygnału, następowało by szybko i wydajnie z powodu bliskiego sąsiedztwa współdziałających w przekazywaniu sygnałów elementów. Przestrzenne ograniczenie występowania receptorów do określonego typu tratw lipidowych zapobiega niespecyficznemu przekazywaniu sygnału na inne szlaki sygnałowe, a przez to zostaje wzmocniona swoistość sygnału.

W kolejnym modelu, przy braku pobudzenia, czynniki biorące udział w przekazywaniu określonego sygnału są pogrupowane w oddzielne tratwy lipidowe. Stymulacja komórki wywołana obecnością hormonu lub czynnika wzrostu prowadzi do przejściowego łączenia się tratw w jedną domenę. Natomiast inny wariant tego samego modelu zakłada istnienie niemal kompletnych tratw lipidowych, do których w wyniku indukcji zostaje przyłączony brakujący czynnik, co powoduje aktywację receptora.

Wydaje się, że kontrola przepływu sygnałów przez tratwy zależy również od środowiska lipidowego otaczającego dany receptor, sąsiedztwa białek regulatorowych i modulowania aktywności białek zlokalizowanych w ich wnętrzu. W takich wypadkach receptory pełnią swoją funkcję niezależnie od tego czy są zlokalizowane w tratwach lipidowych, czy poza nimi. Jednakże receptor w zależności od lokalizacji wykazuje powinowactwo do odmiennych czynników białkowych. Wydaje się wysoce prawdopodobnym fakt, iż jeden receptor może uruchamiać różne szlaki sygnałowe w zależności od przestrzennej lokalizacji w błonie plazmatycznej. Takie przypuszczenia potwierdzają badania dotyczące receptorów kinaz tyrozynowych [62]. Uważa się, że tratwy lipidowe biorą udział nie tylko w pozytywnej, ale i także w negatywnej kontroli przekazywania sygnału. Negatywna kontrola przekazywania sygnału najprawdopodobniej opiera się na przestrzennej segregacji białek sygnałowych i blokadzie niespecyficznej aktywacji przekazu sygnału, lub też kierunkowo hamuje aktywność danego białka sygnałowego obecnego w tratwie lipidowej [20].

## PODSUMOWANIE

Tratwy lipidowe są zorganizowanymi poddomenami błony komórkowej i błon wewnątrzkomórkowych. Charak-



teryzują się niewielkimi rozmiarami, ale stanowią znaczną część frakcji błony komórkowej. Od pozostałej części błony plazmatycznej trawny wyróżniają się specyficznym składem białkowo-lipidowym. Obserwacja tych domen nasuwa wnioski, iż trawny różnią się także między sobą rodzajami białek i lipidów wchodzących w ich skład, przestrzenną lokalizacją, specyficznymi funkcjami, szczególnie istotnymi w przekazywaniu sygnału. Teoria trawny lipidowych pozostaje wciąż kontrowersyjna. Biorąc pod uwagę bliskość procesów, w które zaangażowane są reakcje hydrolizy wysoce energetycznych wiązań, takich jak wiązania ATP czy GTP, relatywnie słabe oddziaływania pomiędzy lipidami błony plazmatycznej wydają się nie mieć istotnego wpływu na tworzenie domen w przedziale wielkości od 50 do 100 nm. Wydaje się, iż dostarczanie kolejnych niepodważalnych dowodów, pozwalających na określanie funkcji trawny lipidowych, zależeć będzie od rozwoju technik efektywnej wizualizacji błon białkowo-lipidowych oraz nowatorskich metod izolacji poszczególnych jednostek błony plazmatycznej.

## PIŚMIENICTWO

- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731
- Ledesma MD, Da Silva JS, Schevchenko A, Wilm M, Dotti CG (2003) Proteomic characterisation of neuronal sphingolipid-cholesterol microdomains: role in plasminogen activation. *Brain Res* 987: 107-116
- Fiedler K, Kobayashi T, Kurzchalia TV, Simons K (1993) Glycosphingolipid-enriched, detergent-insoluble complexes in protein sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 32: 6365-6373
- Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1994) Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J Biol Chem* 269: 30745-30748
- Shao D, Segal AW, Dekker LV (2003) Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Lett* 550: 101-106
- Hoylaerts MF (2003) Do lipid rafts contribute to platelet activation? *J Thromb Haemost* 6: 1140-1141
- Shogomori H, Brown DA (2003) Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly. *Biol Chem* 384: 1259-1263
- Ikonen E, Simons K (1998) Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Semin Cell Dev Biol* 9: 503-509
- Kwik J, Boyle S, Fooksman D, Margolis L, Sheetz MP, Edidin M (2003) Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13964-13969
- Nichols B (2003) Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci* 116: 4707-4714
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572
- Simons K, Toomre D (2001) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 216
- Damm EM, Pelkmans L, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Kurzchalia T, Helenius A (2005) Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol* 168: 477-488
- Li S, Song KS, Koh SS, Kikuchi A, Lisanti MP (1996) Baculovirus-based expression of mammalian caveolin in Sf21 insect cells. A model system for the biochemical and morphological study of caveolae biogenesis. *J Biol Chem* 271: 28647-28654
- Powers JP, Hancock RE (2003) The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24: 1681-1691
- Ishii H, Mori T, Shiratsuchi A, Nakai Y, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, Nakanishi Y (2005) Distinct localization of lipid rafts and externalized phosphatidylserine at the surface of apoptotic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 94-99
- Borg C, Jalil A, Laderach D, Maruyama K, Wakasugi H, Charrier S, Ryffel B, Cambi A, Figdor C, Vainchenker W, Galy A, Caignard A, Zitvogel L (2004) NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* 104: 3267-3275
- Brown DA, Rose JK (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68: 533-544
- Bickel PE, Scherer PE, Schnitzer JE, Oh P, Lisanti MP, Lodish HF (1997) Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem* 272: 13793-13802
- Pike LJ (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* 44: 655-667
- Brown DA, London E (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275: 17221-17224
- Harder T (2003) Formation of functional cell membrane domains: the interplay of lipid- and protein-mediated interactions. *Phil Trans R Soc Lond* 358: 863-868
- Peyron P, Bordier C, N'Diaye EN, Maridonneau-Parini I (2000) Non-opsionic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J Immunol* 165: 5186-5191
- Bodin S, Tronchere H, Payrastra B (2003) Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. *Biochim Biophys Acta* 1610: 247-257
- Graf GA, Matveev SV, Smart (1999) Class B scavenger receptors, caveolae and cholesterol homeostasis. *Trends Cardiovasc Med* 9: 221-225
- Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10339-10343
- Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG, Michel T (1996) Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 271: 6518-6522
- Shenoy-Scaria AM, Dietzen DJ, Kwong J, Link DC, Lublin DM (1994) Cysteine3 of Src family protein tyrosine kinase determines palmitoylation and localization in caveolae. *J Cell Biol* 126: 353-363
- Yamabhai M, Anderson RG (2002) Second cysteine-rich region of epidermal growth factor receptor contains targeting information for caveolae/rafts. *J Biol Chem* 277: 24843-24846
- Dietrich C, Volovyk ZN, Levi M, Thompson NL, Jacobson K (2001) Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10517-10518
- Smart EJ, Ying Y-S, Mineo C, Anderson RG (1995) A detergent free method of purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10104-10108
- Pike LJ (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* 378: 281-292
- Sanan DA, Anderson RG (1991) Simultaneous visualization of LDL receptor distribution and clathrin lattices on membranes torn from the upper surface of cultured cells. *J Histochem Cytochem* 39: 1017-1024
- Dołowy K, Szewczyk A, Piłkuła S (2003) Błony biologiczne, Wydawnictwo Naukowe Śląsk, Katowice, Warszawa
- Yang J (2004) AFM as a high-resolution imaging tool and a molecular bond force probe. *Cell Biochem Biophys* 41: 435-450
- Palade GE (1953) An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1: 188-211
- Yamada E (1955) The fine structure of the renal glomerulus of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1: 551-566
- Anderson DJ, Lee P, Levine KL, Sang JS, Shah SA, Yang OC, Shank PR, Linial ML (1992) Molecular cloning and characterization of the RNA packaging-defective retrovirus SE21Q1b. *J Virol* 66: 204-216

39. Laude AJ, Prior IA (2004) Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Mol Membr Biol* 21: 193-205
40. Pietiainen V, Marjomaki V, Upla P, Pelkmans L, Helenius A, Hyypia T (2004) Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Mol Biol Cell* 15: 4911-4925
41. Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 3: E 08-10
42. Roepstorff K, Thomsen P, Sandvig K, van Deurs B (2002) Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. *J Biol Chem* 277: 18954-18960
43. Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K, Horber JK (2000) Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* 148: 997-1008
44. Subczynski WK, Kusumi A (2003) Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1610: 231-243
45. Niv H, Gutman O, Kloog Y, Henis YI (2002) Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells. *J Cell Biol* 157: 865-872
46. Shvartsman DE, Kotler M, Tall RD, Roth MG, Henis YI (2003) Differently anchored influenza hemagglutinin mutants display distinct interaction dynamics with mutual rafts. *J Cell Biol* 163: 879-888
47. Kenworthy AK, Nichols BJ, Remmert CL, Hendrix GM, Kumar M, Zimmerberg J, Lippincott-Schwartz J (2004) Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J Cell Biol* 165: 735-746
48. Brown DA, London E (1998) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol* 164: 103-114
49. Pike L, Miller J (1998) Cholesterol Depletion Localizes Phosphatidylinositol Bisphosphate and Inhibits Hormone-stimulated Phosphatidylinositol Turnover. *J Biol Chem* 273: 22298-22304
50. Atger VM, de la Llera Moya M, Stoudt GW, Rodriguez VV, Phillips MC, Rothblat GH (1997) Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. *J Clin Invest* 99: 773-780
51. Kilsdonk EP, Yancey PG, Stoudt GW, Bangerter FW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH (1995) Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* 270: 17250-17256
52. Stulnig TM, Berger M, Sigmund T, Raederstorff D, Stockinger H, Waldhausl W (1998) Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains. *J Cell Biol* 143: 637-644
53. Kwiatkowska K, Sobota A (2004) Mikrodomeny błony komórkowej miejscem zapoczątkowanie szlaków sygnałowych przez immunoreceptory. *Kosmos* 53: 113-122
54. Field FJ, Born E, Mathur SN (1997) Effect of micellar beta-sitosterol on cholesterol metabolism in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 38: 348-360
55. Montixi C, Langlet C, Bernard AM, Thimonier J, Dubois C, Wurbel MA, Chauvin JP, Pierres M, He HT (1998) Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J* 17: 5334-5348
56. Xavier R, Brennan T, Li Q, McChormack C, Seed B (1998) Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8: 723-732
57. Kwiatkowska K, Sobota A (2001) The clustered Fc receptor II is recruited to Lyn-containing membrane domains and undergoes phosphorylation in cholesterol-dependent manner. *Eur J Immunol* 31: 989-998
58. Harder T, Kuhn M (2000) Selective accumulation of raft-associated membrane protein LAT in T cell receptor signaling assemblies. *J Cell Biol* 151: 199-207
59. Kwiatkowska K, Frey J, Sobota A (2003) Phosphorylation of FcγRIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: the role of membrane rafts. *J Cell Sci* 116: 537-550
60. Strzelecka-Kiliszek A, Korzeniowski M, Kwiatkowska K, Mrozinska K, Sobota A (2004) Activated FcγRII and signaling molecules revealed in rafts by ultrastructural observations of plasma membrane sheets. *Mol Membr Biol* 21: 101-108
61. Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y, Lanzavecchia A (1999) T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 283: 680-682
62. Suzuki S, Numakawa T, Shimazu K, Koshimizu H, Hara T, Hatanaka H, Mei L, Lu B, Kojami M (2004) BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts; roles in synaptic modulation. *J Cell Biol* 167: 1205-1215

## Plasmalemma – order or chaos?

Grażyna Dąbrowska<sup>✉</sup>, Beata Głowacka

Department of Genetics, Institute of General and Molecular Biology, Nicolaus Copernicus University, 9 Gagarina St., 87-100 Toruń, Poland  
<sup>✉</sup>e-mail: browsk@uni.torun.pl

**Key words:** lipid rafts, plasmalemma, cholesterol, signal transduction

### ABSTRACT

In the influential “fluid mosaic” model of plasmalemma, transmembrane proteins drift regardless of lipids. Recently researches widen this to a view in which membrane lipids are not randomly distributed but they form liquid-ordered regions with local heterogeneity, called lipid rafts. Lipid rafts are subdomains of the plasma membrane that contain high concentration of cholesterol and glycosphingolipids. They are 50-100 nm distinct liquid-ordered regions of the membrane that are resistant to extraction with nonionic detergents. They are proposed to function as dynamic lipid assemblies which serve as platforms for protein segregation and signaling, protein and lipid sorting during post-Golgi sorting, dynamic of plasmalemma and viral entry budding. Markers for the lipid rafts are flotillin, GPI – linked proteins, Src family kinases, EGF receptors and G proteins. The lifetime, biological relevance and properties of these domains *in vivo* are still unclear. However the answers will shape our views of signaling and membrane dynamics.

## STRESZCZENIE

Kinazy receptorów sprzężonych z białkami G (GRK) są kluczowymi modulatorami szlaków sygnalizacyjnych z udziałem siedmio-transbłonowych receptorów (GPCR). W skład rodziny serynowo-treoninowych kinaz GRK wchodzi siedem izoform tego enzymu, które fosforylują związane z agonistą receptory. Konsekwencją tego procesu jest szybkie przerwanie inicjowanego przez receptor procesu sygnalizacyjnego i desensytyzacja receptora. Aktywność kinaz z rodziny GRK i ich ukierunkowane działania są ściśle regulowane przez samą interakcję z odpowiednimi domenami receptora, podjednostkami białek G, lipidami, białkami kotwiczącymi oraz białkami wiążącymi wapń. Ponadto ważnym mechanizmem regulującym funkcjonowanie kinaz GRK jest ich fosforylacja i autofosforylacja. Poniższy artykuł jest podsumowaniem naszej obecnej wiedzy na temat mechanizmów regulujących kinazy GRK i ich fizjologicznej funkcji.

## WPROWADZENIE

Komórka odbiera napływające z otoczenia sygnały dzięki obecności w błonie komórkowej wielu typów receptorów. Największą grupę stanowi nadrodzina receptorów serpentynowych o siedmio-transbłonowej strukturze, sprzężonych z białkami G (ang. *G-protein-coupled receptor*, GPCR). W jej skład wchodzi ponad 1000 receptorów, które odbierają bardzo zróżnicowane bodźce chemiczne (np. hormony, neurotransmitery, chemokiny) i fizyczne (np. światło). Szlak sygnalizacyjny inicjowany aktywacją receptora GPCR, prowadzi do stymulacji sprzężonego z nim heterotrimerycznego białka G, które dysocjuje na podjednostkę  $G\alpha$  i dimer  $G\beta\gamma$ . Zarówno podjednostka  $G\alpha$  oraz dimer  $G\beta\gamma$  mogą niezależnie aktywować odmienne szlaki sygnalizacyjne, z udziałem różnych białek efektorowych i wtórnych przekaźników [1-3].

Wiele mechanizmów, które wykształciła komórka precyzyjnie kontroluje jej fizjologiczne reakcje na bodźce przekazywane za pośrednictwem GPCR, na przykład czas i siłę odpowiedzi. W wielu wypadkach mimo potencjalnej możliwości aktywacji receptora (obecność liganda), następuje stopniowy zanik reakcji komórki na bodziec. Zjawisko to, noszące nazwę desensytyzacji, odgrywa bardzo ważną rolę w funkcjonowaniu komórki i może zachodzić na wszystkich etapach szlaku sygnalizacyjnego (receptor, białko G, system efektorowy) [4].

Jednym z najlepiej poznanych mechanizmów desensytyzacji receptora jest jego, zależna od agonisty, fosforylacja. Mogą w niej brać udział kinazy zależne od wtórnych przekaźników, PKA lub PKC. Jednak kluczową rolę pełnią kinazy należące do rodziny kinaz receptorów sprzężonych z białkami G (ang. *G-protein-coupled receptor kinases*, GRK). Fosforylacja receptora GPCR przez kinazy regulowane wtórnymi przekaźnikami związana jest z ograniczeniem sprzężenia białko G-receptor, podczas gdy fosforylacja przez GRKs powoduje zarówno redukcję wiązania między białkiem G i receptorem, ale równocześnie sprzyja połączeniu receptora z dodatkowym białkiem z rodziny arestyn, które uczestniczy w desensytyzacji receptora, jego internalizacji i ponownym powrocie do błony w formie aktywnej [4-6]

Do tej pory zidentyfikowano tylko siedem izoform kinaz z rodziny GRK, które mogą fosforylować około 1000 typów receptorów serpentynowych. Nasuwa się, zatem pytanie, jaki czynnik decyduje o specyficznym rozpoznaniu receptor-kinaza. Preferencje kinaz GRK1, które występują w siatkówce oka i specyficznie fosforylują rodopsynę nie budzą wątpliwości. Jednak pozostałe kinazy występują w różnych typach komórek i w tym wypadku należy przypuszczać, że istnieje jakiś czynnik lub czynniki, które decydują o specyficzności interakcji receptor-kinaza. Subkomórkowa lokalizacja, regulacja aktywności i regulacja poziomu ekspresji kinaz są z pewnością czynnikami kontrolującymi specyfic-

Katarzyna Sobierajska

Hanna Fabczak

Stanisław Fabczak

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, Warszawa

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: s.fabczak@nencki.gov.pl, tel. (22) 822 23 43

Artykuł otrzymano 12 lipca 2005 r.  
Artykuł zaakceptowano 19 sierpnia 2005 r.

**Słowa kluczowe:** kinazy GRK, receptory GPCR, desensytyzacja szlaku sygnalizacyjnego

**Wykaz skrótów:** cSRS – niereceptorowe kinazy tyrozynowe; domena PH – domena homologiczna do plekstryny;  $G\beta\gamma$  –  $\beta$  i  $\gamma$  podjednostki białka G; GPCR – receptory sprzężone z białkami G; GRK – kinazy receptorów sprzężonych z białkami G;  $IP_3$  – trisfosfoinozytol; MAPK – mitogenne kinazy białkowe;  $PIP_2$  – fosfatydyloinozytolo(4,5)-bisfosforan; PKA – kinaza białkowa A; PKC – kinaza C białkowa; RGS – regulatory sygnału przenoszonego przez białka G

ność oddziaływań kinaza-receptor i na nie zwrócono szczególną uwagę w tym artykule.

## STRUKTURA KINAZ GRK

Kinazy GRK są białkami, których ciężar cząsteczkowy wynosi od 57 kDa do 80 kDa, należącymi do dużej nadrodziny kinaz serynowo-treoninowych. Siedem izoform kinaz, GRK1-GRK7, łączy wiele podobieństw strukturalnych i funkcjonalnych [7]. W środkowej części cząsteczki białka można wyróżnić region centralny (ang. *core central*) pełniący funkcję domeny katalitycznej i wykazujący homologie do innych kinaz serynowo-treoninowych. W domenie tej, w wysoko konserwowanym regionie, pomiędzy 263 a 266 resztą aminokwasową, występującym we wszystkich typach kinaz GRK, usytuowane jest miejsce wiązania ATP. Na N-końcu zbudowanym z 183 do 188 reszt aminokwasowych, wyróżniono region homologiczny do białek będących regulatorami sygnału przenoszonego przez białka G (ang. *regulators of G-protein signaling*, RGS). W niektórych izoformach zlokalizowane są tu domeny odpowiedzialne za przyłączenie kalmoduliny, rekoweryny i fosfatydyloinozytolo(4,5)-bisfosforanu (PIP<sub>2</sub>) (Rys. 1). Koniec karboksylowy cząsteczki o zmiennej długości ma charakter zróżnicowany i w zależności od typu kinazy, zlokalizowane są tutaj domeny odpowiedzialne za zakotwiczenie białka do błony komórkowej lub translokację do cytoplazmy (Rys. 1) [7-9]. W regionie tym występują motywy, do których w wyniku potranslacyjnej modyfikacji może być przyłączona reszta izoprenylova [10]. W kinazie GRK1 jest to reszta farnezylova, GRK7 – reszta geranylgeranylu, podczas gdy kinazy GRK4 oraz GRK6 podlegają palmitylacji. W przypadku kinazy GRK5 stwierdzono, że łączy się ona do fosfolipidów błony dzięki obecności domeny, w skład której wchodzi wiele dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych. Natomiast w kinazach GRK2 i GRK3 na C-końcu zlokalizowana jest domena plekstrynowa (Rys. 1) [9].

W oparciu o homologię sekwencji rodzina kinaz GRK została podzielona na trzy podrodziny. Do pierwszej z nich, kinaz rodopsynowych (ang. *rhodopsin kinases*, RK) lub też wzrokowych kinaz GRK (ang. *visual GRK*), zaliczono kinazę GRK1, nazywaną wcześniej kinazą rodopsynową oraz kinazę GRK7. W drugiej podrodzinie, kinaz receptorów  $\beta$ -adrenergicznych (ang.  *$\beta$ -adrenergic receptor kinases*,  $\beta$ ARK), umieszczono dwie kinazy GRK2 (dawniej  $\beta$ ARK1) i GRK3 (dawniej  $\beta$ ARK2). Ostatnią podrodzinę noszącą nazwę GRK4 tworzą białka GRK4, GRK5 i GRK6. Jedynie w przypadku tej podrodziny wykazano, że cztery możliwe warianty białka GRK4 powstają w wyniku alternatywnego składania genów [7].

Poziom ekspresji kinaz GRK w poszczególnych tkankach jest zróżnicowany. Kinazy GRK1 i GRK7 zlokalizowane są w siatkówce oka. Dodatkowo obecność kinazy GRK1 stwierdzono w szyszynce. Kinazy GRK4 występują w komórkach smakowych, natomiast kinazy GRK2, GRK3, GRK5 i GRK6 znajdowano w wielu typach tkanek [8,9,11,12].

Funkcjonalnie kinazy GRK wykazują wiele wspólnych cech, jak na przykład (i) preferencyjnie fosforylują aktyw-

nych (związanych z agonistą) receptorów GPCR, (ii) interakcja kinaz GRK z aktywowanym receptorem aktywuje te enzymy (efekt allosteryczny) oraz (iii) fosforylacja receptorów przez GRK wymaga udziału systemu regulacyjnego odpowiedzialnego za translokację tych enzymów do błony [9].

## DESENSYTYZACJA SYSTEMU SYGNALIZACYJNEGO KOMÓRKI

### RECEPTORY GPCR SUBSTRATAMI KINAZ GRK

Wiele kinaz białkowych fosforyluje peptydy/białka, które posiadają ściśle określone sekwencje aminokwasowe. Dla przykładu, kinaza A wykazuje preferencje do sekwencji RRXS(T), która prawdopodobnie jest wpisana w region rozpoznania znajdujący się w bliskim sąsiedztwie miejsca fosforylacji [13]. Kinazy GRK fosforylują GPCR po połączeniu receptora z agonistą. Istnieje zatem jakiś inny mechanizm specyficznego rozpoznania i fosforylacji aktywowanych receptorów. Połączenie agonisty z receptorem i jego aktywacja prowadzi do szeregu zmian konformacyjnych w cząsteczce receptora i tak zmieniona cząsteczka jest rozpoznawana przez kinazy GRK [9,13]. W konsekwencji następuje przyłączenie kinazy GRK do receptora, a następnie jego fosforylacja. Wiele dowodów wskazuje na to, że oba miejsca, czyli miejsce interakcji kinazy z receptorem i miejsce fosforylacji receptora nie sąsiadują ze sobą. Porównując kinetykę reakcji fosforylacji receptora związanego z agonistą z kinetyką fosforylacji syntetycznego peptydu stwierdzono 100 a nawet 100 000 krotnie niższe parametry tej reakcji dla peptydu. Fosforylacja aktywowanego receptora jest hamowana przez peptydy, które wywodzą się z cytoplazmatycznego regionu rodopsyny lub  $\beta_2$ AR, ale których położenie jest odległe od aktualnego miejsca fosforylacji. Ponadto peptydy te specyficznym hamują fosforylację receptora w przeciwieństwie do peptydów, które mogłyby być substratami kinazy. Uzyskane wyniki mogą zatem wskazywać, że peptydy te raczej specyficznym blokują interakcję GRK-GPCR, niż bezpośrednio hamują aktywność kinazy. Równocześnie obserwuje się podwyższony poziom fosforylacji peptydów będących substratami GRK w obecności aktywowanego receptora [9].

Przedstawione powyżej argumenty sugerują, że w receptorze istnieją odmienne domeny, odpowiedzialne za interakcję GPCR i GRK niż miejsca fosforylowane przez GRK. Następstwem interakcji GRK z aktywowanym receptorem jest allosteryczna aktywacja tego enzymu. Jest to cecha wspólna i specyficzna dla wszystkich kinaz GRK, nie obserwowana w przypadku innych kinaz, na przykład PKA, fosforylujących GPCR. Miejscem odpowiedzialnym za aktywowanie kinazy jest trzecia cytoplazmatyczna pętla pomiędzy 5 a 6 transbłonowym segmentem receptora, jej proteolityczne usunięcie uniemożliwia allosteryczną aktywację kinazy [9].

Reszty serynowe i treoninowe, które ulegają fosforylacji po związaniu receptora z kinazą mieszczą się w domenie zlokalizowanej po stronie cytoplazmy w pobliżu C-końca. Po fosforylacji i odłączeniu kinaz od receptora następuje przyłączenie białek z rodziny arrestyn. W komórkach ssaków białka te można podzielić na dwie podgrupy, jedną związaną z komórkami fotoreceptorowymi – arrestyny wzroko-

we, reprezentowane przez dwóch członków tej podgrupy, arestynę pręcików i arestynę z czopków siatkówki oka oraz drugą podgrupę,  $\beta$ -arestyny ( $\beta$  arestyna-1 i  $\beta$  arestyna-2), szeroko rozpowszechnione w innych tkankach. Przyłączenie arestyny do receptora inicjuje nową serię zjawisk związanych z internalizacją nieaktywnego receptora, a następnie jego powrót do błony już w formie aktywnej [5,6,14].

#### NIEZALEŻNA OD FOSFORYLACJI DESENSYTYZACJA SYSTEMU SYGNALIZACYJNEGO KOMÓRKI Z UDZIAŁEM KINAZ GRK

Do niedawna uważano, że rola kinaz GRK w desensytyzacji sygnału ogranicza się do fosforylacji reszt serynowo/treoninowych na 3 cytoplazmatycznej pętli lub na C-końcu cząsteczki receptora. Doniesienia z ostatnich lat wskazują, że przynajmniej dwie kinazy, GRK2 i GRK3 mogą być zdolne do desensytyzacji sygnału z pominięciem procesu fosforylacji receptora [12,15]. Pierwsze zaskakujące doniesienia na ten temat dotyczą szlaków sygnalizacyjnych inicjowanych przez aktywne receptory,  $\alpha_{18}$ -adrenergiczny i endotelialne,  $ET_A$  i  $ET_B$ . Obecnie jednak wiemy, że zjawisko to dotyczy wielu innych receptorów [12,15]. Nadekspresja GRK2, szerepu dziękowego lub pozbawionego własności katalitycznych mutanta tej kinazy, powoduje zahamowanie aktywności fosfolipazy C (PLC) stymulowanej przez  $G_{\alpha_{q/11}}$ . Wprawdzie początkowo, tą niezależną od fosforylacji desensytyzację szlaku sygnalizacyjnego przypisywano sekwestracji  $G\beta\gamma$  przez GRK2, ale obecnie bardziej prawdopodobne wydaje się, że GRK2 łączy się bezpośrednio z aktywną formą  $G_{\alpha_{q/11}}$  ( $G_{\alpha_{q/11}}$ -GTP), co w konsekwencji prowadzi do zablokowania aktywności PLC [12]. W kluczowej pracy Carman i współautorzy [16] wykazali, że leżąca na N-końcu kinaz GRK2 i GRK3 domena homologiczna do RGS może wiązać  $G_{\alpha_{q/11}}$ -GTP. Białka należące do rodziny RGS wiążą się do połączonej z GTP podjednostki  $G_{\alpha}$  i stymulują jej aktywność GTP-azową [17]. Nie stwierdzono, aby połączenie GRK2 z  $G_{\alpha_{q/11}}$ -GTP w widoczny sposób zwiększało jej aktywność GTP-azową. Jednak konsekwencją połączenia  $G_{\alpha_{q/11}}$ -GTP z GRK2 lub GRK3 jest efektywne zablokowanie możliwości wiązania  $G_{\alpha_{q/11}}$ -GTP z jej efektorami. Zjawiska tego nie zaobserwowano w przypadku innych kinaz z rodziny GRK mimo, że wszystkie one posiadają domenę RGS. Nie stwierdzono również, aby GRK2 wiązała się z  $G_{\alpha_s}$ ,  $G_{\alpha_i}$ ,  $G_{\alpha_o}$  i  $G_{\alpha_{12/13}}$  [12,15]. Nadekspresja domeny RGS kinazy GRK2 blokuje produkcję trisfosfoinozytolu ( $IP_3$ ), a ostatnie badania, które przeprowadzono wykorzystując zmutowane domeny homologiczne do RGS pozwoliły zlokalizować obecność sekwencji występującej wyłącznie w GRK2 i GRK3, tzw. 'C-site', która z dużym powinowactwem wiąże się do  $G_{\alpha_{q/11}}$ -GTP. W odróżnieniu od białek z rodziny RGS połączenie to ma miejsce na helisie  $\alpha$  5. domeny homologicznej do RGS kinazy GRK2 [18]. Jeśli ta specyficzna interakcja dotyczy jedynie kinaz GRK2 i GRK3 to nasuwają się pytania jakie implikacje fizjologiczne wynikają z tego faktu i czy obserwowany efekt nie jest negatywnym następstwem nadekspresji GRK2 lub mutantów tej kinazy. Postanowiono więc sprawdzić czy zredukowanie poziomu endogennej kinazy poprzez użycie antysensownych nukleotydów lub techniki RNAi może ułatwić rozwiązanie tych kwestii. Perroy i współautorzy [19] stosując metodę RNAi udowodnili, że GRK4 również może

regulować, z pominięciem procesu fosforylacji, aktywność receptora  $GABA_B$ . Dotychczas nieznanym jest mechanizm tego procesu, nie wiadomo czy odbywa się to poprzez wiązanie GRK4 do  $G_{\alpha_{i/o}}$ , czy też poprzez bezpośrednie oddziaływanie receptor – kinaza. Nie można wykluczyć możliwości, że podobnie jak to wykazano w przypadku megatropowych receptorów glutaminowych, mGluR1a i mGluR1b niezależna od fosforylacji desensytyzacja sygnału z udziałem kinaz GRK2 wymaga równoczesnej interakcji kinazy z receptorem i  $G_{\alpha_{q/11}}$ -GTP [20,21]. Miejsce wiązania obu białek, GRK2 i  $G_{\alpha_{q/11}}$ , zlokalizowano na 2 cytoplazmatycznej pętli cząsteczki receptora [22]. Bliskie sąsiedztwo domen odpowiedzialnych za wiązanie białek G i kinazy GRK w receptorze może ułatwić ten proces. Zatem, ten sam region receptora odpowiedzialny za inicjację sygnału w komórce (aktywacja białka G) prawdopodobnie zaangażowany jest w jego zakończenie. Badania krystalograficzne struktury GRK2 związanej z  $G\beta\gamma$  wskazują, że kinaza ta może łączyć się równocześnie z GPCR,  $G\beta\gamma$  oraz  $G_{\alpha_{q/11}}$ -GTP i przypuszczalnie w ten sposób spowodować zahamowanie transmisji sygnału. Natomiast fosforylacja receptora i przyłączenie do niego arestyny powodowałoby zakończenie procesu przekazywania sygnału [12] (Rys. 2).

#### REGULACJA AKTYWNOŚCI KINAZ GRK PRZEZ LIPIDY

##### FUNKCJA LIPIDOWEJ POTRANSLACYJNEJ MODYFIKACJI KINAZ GRK

Fosforylacja aktywowanych receptorów przez kinazy GRK jest możliwa dzięki ich zakotwiczeniu w błonie komórkowej. Trzy izoformy kinaz, GRK1, GRK4 i GRK7, mogą zakotwiczać się do błony komórkowej dzięki posiadaniu na C-końcu domeny, która ulega potranslacyjnej modyfikacji, prenylacji, polegającej na przyłączeniu izoprenoidu do cysteiny w zlokalizowanym na C-końcu cząsteczki motywie CAAX (C-cysteina, A-aminokwas alifatyczny, X-dowolny aminokwas) [10]. GRK1 ulega farnezytacji poprzez dołączenie 15-węglowej reszty lipidowej. Modyfikacja ta ma olbrzymie znaczenie funkcjonalne związane z zależną od światła lokalizacją enzymu w błonie. W zmutowanych komórkach, w których kinaza GRK1 nie ulega farnezytacji, stymulacja świetlna nie powoduje przemieszczenia enzymu do błony i receptory charakteryzują się mniejszym stopniem fosforylacji. Natomiast przeciwny efekt, stabilizację tego enzymu w błonie, bez wpływu na poziom fosforylacji receptora, obserwowano po przyłączeniu przez GRK1 dłuższej reszty lipidowej (20-węglowej) geranylgeranylu [9]. Modyfikacja GRK4 i GRK6 polegająca na dołączeniu 16-węglowego łańcucha kwasu palmitylowego do C-końca enzymu powoduje ich stałe umiejscowienie w błonie komórkowej [9].

##### ROLA LIPIDÓW I DOMENY HOMOLOGICZNEJ DO PLEKSTRYNY W REGULACJI AKTYWNOŚCI KINAZ GRK

Kinazy GRK2 i GRK3 nie ulegają potranslacyjnej lipidowej modyfikacji i w komórkach nie stymulowanych zlokalizowane są głównie w cytoplazmie. Po aktywacji receptora GPCR następuje translokacja enzymów do błony komórkowej. Kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za ten proces jest dimer  $G\beta\gamma$ , który oddysocjowuje od  $\alpha$  podjednostki białka G po stymulacji receptora i tworzy kompleks z kinazą [7]. Dzięki lipidowej modyfikacji podjednostki  $\gamma$  białka

G (izoprenylacja), wchodzącej w skład dimeru, następuje translokacja kompleksu, utworzonego z kinazy GRK2 lub GRK3 i dimeru  $G\beta\gamma$ , do błony komórkowej [2,10].

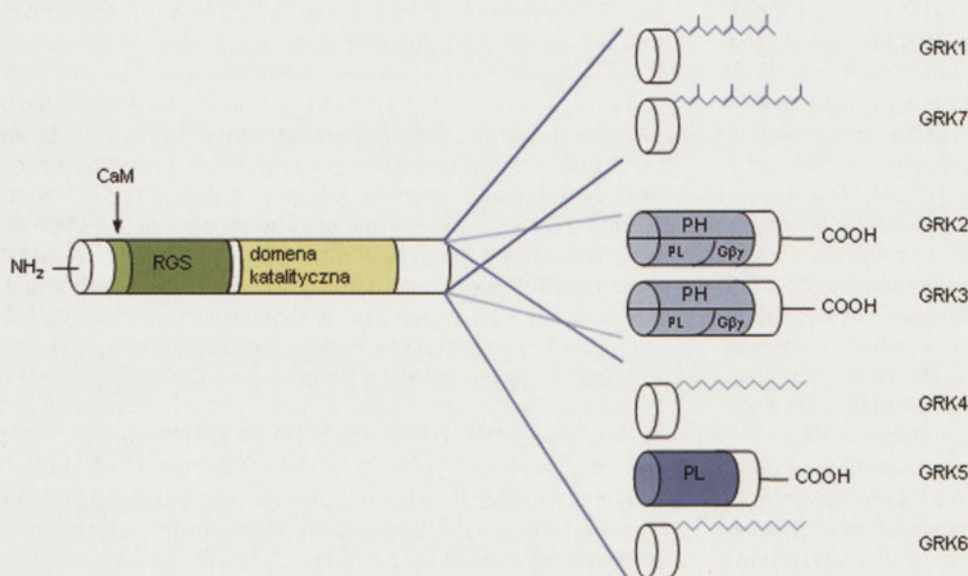
Zwiążanie kinazy z błoną powoduje drastyczny wzrost fosforylacji aktywowanego receptora przez kinazę GRK2 w systemach *in vitro* [9]. Miejsce przyłączenia dimeru  $G\beta\gamma$  do kinazy zlokalizowane jest na wydłużonym, w porównaniu z innymi kinazami GRK, jej końcu karboksylowym (Rys. 1). W tym rejonie pomiędzy 546 a 656 resztą aminokwasową znajduje się miejsce wiązania dimeru  $G\beta\gamma$ . W tym samym rejonie, pomiędzy 561 a 655 resztą aminokwasową, (częściowo pokrywająca się z miejscem wiązania dimeru), zlokalizowana jest domena homologiczna do plekstryny, tzw. domena PH, która pełni funkcję mediatora w oddziaływaniu białko-białko i białko-błona komórkowa [9].

Początkowo poszukiwania miejsca przyłączenia  $G\beta\gamma$  do GRK2 opierały się na badaniach fuzji pomiędzy S-transferazą glutationu i GRK2. Okazało się, że fragment 233 reszt aminokwasowych na C-końcu kinazy GRK2 (pomiędzy resztą Pro-467 i Leu-689), zawierający domenę PH, wiąże  $G\beta\gamma$  z takim samym powinowactwem jak cała cząsteczka [9]. Zastosowanie do badań syntetycznych peptydów pozwoliło ograniczyć ten obszar do 28-aminokwasowego odcinka (pomiędzy resztą Trp-643 a Ser-670) [9]. Doświadczenia z wykorzystaniem mutacji punktowej wykazały, że zamiana niektórych reszt aminokwasowych w tym regionie (Trp-643, Leu-647, Lys-663, Lys-665, Lys-667 i Arg-669) powoduje znaczne ograniczenie wiązania  $G\beta\gamma$  [9]. Późniejsze badania zawęziły region do minimum i wykazały, że dwie reszty aminokwasowe, Trp-643 i Leu-647, wchodzące w skład hydrofobowego rdzenia, są krytyczne w prawidłowym funkcjonowaniu enzymu. Ponadto dowiedziono, że dwie dodatnio naładowane reszty aminokwasowe, Lys 663 i Lys 665, odgrywają istotną rolę w interakcji kinazy i  $G\beta\gamma$ . Niespodziewanie okazało się, że również Arg 587 odgrywa kluczową rolę w funkcjonowa-

niu enzymu. Mutacja polegająca na wymianie Arg 587 na Gln, spowodowała utratę zdolności wiązania dimeru  $G\beta\gamma$ . Wprowadzie zdolność ta przy wyższym stężeniu  $G\beta\gamma$  w niewielkim stopniu (25%) została przywrócona, nadal jednak nie obserwowano fosforylacji receptora. Wydaje się więc, że Arg 587 może pełnić dwojaką rolę, po pierwsze, bierze bezpośrednio udział w wiązaniu  $G\beta\gamma$ , a po drugie, wpływa na katalityczne własności kinazy [23].

Zaproponowany przez Carman [23] model zakłada, że zmiany konformacyjne w cząsteczce kinazy powstałe w wyniku związania  $G\beta\gamma$  mogą być odbierane przez domenę katalityczną enzymu i powodują wzrost jej aktywności enzymatycznej. Taki model wymaga jednak obecności w cząsteczce kinazy reszty aminokwasowej, która pełniłaby rolę konformacyjnego przełącznika oraz zespołu interakcji, które pozwoliłyby konformacyjnym zmianom oddziaływać na domenę katalityczną. Funkcję tego przełącznika mogłaby pełnić Arg 587, która odgrywa zasadniczą rolę nie tylko w oddziaływaniu kinaza- $G\beta\gamma$ , ale również w przekazywaniu tej „informacji” na dalsze rejony cząsteczki [23].

Nowe światło na problem interakcji kinaza- $G\beta\gamma$  rzucają ostatnie doniesienia, które wskazują, że w cząsteczce GRK2 występuje dodatkowe miejsce wiązania  $G\beta\gamma$ . Eichmann i wsp. [24] usuwając domenę plekstrynową z cząsteczki GRK2 pokazali, że na N-końcu kinazy zlokalizowane jest drugie miejsce wiązania  $G\beta\gamma$ , które bierze udział w regulacji GRK2 przy niższych stężeniach  $G\beta\gamma$  [24]. Obecność tego miejsca wydaje się niezbędna w prawidłowym funkcjonowaniu enzymu, gdyż wyłączenie jego funkcji na skutek podania specyficznych przeciwciał, uniemożliwia fosforylację rodopsyny przez GRK2 *in vitro*. Oddziaływanie pomiędzy dimerem  $G\beta\gamma$  a GRK2 jest przykładem wzajemnej regulacji. Połączenie  $G\beta\gamma$  i GRK2 wymagane jest do aktywacji kinazy, ale z drugiej strony kinaza GRK2 może również regulować aktywność sygnalizacyjną dimeru  $G\beta\gamma$  [24].



**Rysunek 1.** Schemat budowy kinaz z rodziny GRK z uwzględnieniem domen charakterystycznych dla poszczególnych enzymów. Skróty: RGS – domena homologiczna do białek RGS; PH – domena plekstrynowa; PL – domena łącząca się z fosfolipidami;  $G\beta\gamma$  – domena wiążąca dimer  $\beta\gamma$  białka G; CaM – domena łącząca się z białkami wiążącymi wapń; (w przypadku GRK1 jest to rekoweryna pozostałe kinazy wiążą kalmoduleinę).

Domena plekstrynowa obecna na C-końcu wspomaga połączenie kinazy z błoną komórkową dzięki zdolności wiązania z  $PIP_2$ . Oprócz  $PIP_2$  również kwaśne lipidy błony, takie jak fosfatydyloseryna (PS), mogą wpływać na aktywność kinazy. Jednak zarówno sposób regulacji jak i miejsce wiązania tych fosfolipidów do enzymu są odmienne. PS w przeciwieństwie do  $PIP_2$  bezpośrednio aktywuje kinazę i prawdopodobnie promuje zmiany konformacyjne w cząsteczce enzymu. Pomimo, że miejsce wiązania PS znajduje się również na C-końcu kinazy jednak wykluczono, aby domena PH była bezpośrednio zaangażowana w ten proces [9].

Mutacje w obrębie domeny PH wpływają na stopień fosforylacji receptora poprzez zakłócenie oddziaływań kinaza- $G\beta\gamma$ , ale również

poprzez uniemożliwienie połączenia kinazy z fosfolipidami błony. Wymiana Lys 567 i Trp 578 na Glu w GRK2 hamuje fosforylację receptora i efekt ten prawdopodobnie wywołany jest ograniczeniem wiązań kinazy z kwaśnymi fosfolipidami błony. Jednak w obecności  $G\beta\gamma$  zmutowana kinaza ma zdolność fosforylacji receptora, co może sugerować, że mutacja ta nie ma wpływu na możliwość wiązania  $G\beta\gamma$  oraz aktywność katalityczną enzymu. Ponadto można przypuszczać, że wiązanie do fosfolipidów błony nie jest absolutnie niezbędnym czynnikiem do aktywacji kinazy przez  $G\beta\gamma$ , chociaż z pewnością może wspomagać ten efekt, jak to stwierdzono we wcześniejszych badaniach *in vitro* [9].

Mimo braku domeny homologicznej do plekstryny kinaza GRK5 jest także regulowana poprzez wiele ligandów lipidowych. Region bogaty w dodatnio naładowane reszty aminokwasowe mogące łączyć się z lipidami zlokalizowano na C-końcu (pomiędzy 547 a 560 resztą aminokwasową) tego enzymu i zidentyfikowano go również w izoformach GRK4 i GRK6 [9]. Wspomniane kinazy posiadają ponadto dodatkową domenę wiążącą  $PIP_2$  zlokalizowaną na N-końcu, pomiędzy 22-29 resztą aminokwasową [7]. W przeciwieństwie do N-końcowej domeny, domena zlokalizowana na C-końcu nie wykazuje specyficzności lipidowej, a przyłączenie lipidów stymuluje autofosforylację kinazy oraz wpływa na poziom fosforylacji receptora. Nadekspresja pozabawionego C-końca zmutowanego białka GRK5 powoduje lokalizację takiego enzymu w cytoplazmie, odmiennie niż w przypadku komórek kontrolnych [8]. Poczynione obserwacje sugerują, że właśnie ten region, a nie ten zlokalizowany na N-końcu, odpowiedzialny jest za zakotwiczenie kinazy GRK5 do błony komórkowej.

## BIAŁKA – REGULATORY KINAZ GRK

Wielodomenowa struktura kinaz GRK (Rys. 1) umożliwia im interakcję z różnymi białkami w komórce. Wykazano, że kinazy z rodziny GRK mogą oddziaływać oprócz receptorów GPCR, między innymi z  $\alpha$ -podjednostką białka G ( $G\alpha$ ) [8,12,16],  $\beta\gamma$ -dimerem białek G ( $G\beta\gamma$ ) [8,9,23], białkami oddziaływującymi z GRK (ang. *GRK-interacting protein*) [9], kaweoliną-1 [7,8], kinazą 3-fosfatydilinozytoli [7,25], białkami cytoszkieletu (aktyna i tubulina) [8, 9] oraz wieloma białkami wiążącymi wapń [7,8,26] (Rys. 2).

## ROLA BIAŁEK WIĄŻĄCYCH WAPŃ W FUNKCJONOWANIU KINAZ GRK

Wiązanie  $Ca^{2+}$  przez białka wiążące wapń jest jednym z mechanizmów, poprzez który ten wtórny przekaźnik kontroluje wiele biologicznych procesów. Wśród białek wiążących  $Ca^{2+}$  główną grupę stanowią białka posiadające charakterystyczną domenę, „EF-hand”. Mechanizm kontrolowania aktywności kinaz GRK poprzez  $Ca^{2+}$  i białka „EF-hand” jest wspólną cechą całej tej rodziny [26]. Po raz pierwszy hamujący efekt  $Ca^{2+}$  na aktywność kinazy GRK zaobserwowano w przypadku kinazy GRK1, a białkiem pośredniczącym w tym procesie była rekoweryna (ang. *recoverin*) [27]. Aktywność kinazy GRK1 może być zahamowana przez bezpośrednie przyłączenie rekoweryny, do regionu składającego się z 25 aminokwasów i zlokalizowanego na N-końcu enzymu. Zdolność hamowania przez rekowerynę jest zależna od stężenia  $Ca^{2+}$  i wzmacniana przez myristy-

lację tego białka [26]. W warunkach fizjologicznych, gdy komórki fotoreceptorowe poddane są stymulacji świetlnej, następuje aktywacja rodopsyny, czego efektem jest spadek stężenia  $Ca^{2+}$  w komórkach fotoreceptorowych. Konsekwencją tego procesu jest inaktywacja rekoweryny, uwolnienie kinazy GRK1, fosforylacja rodopsyny, a to stanowi pierwszy etap desensytyzacji receptora.

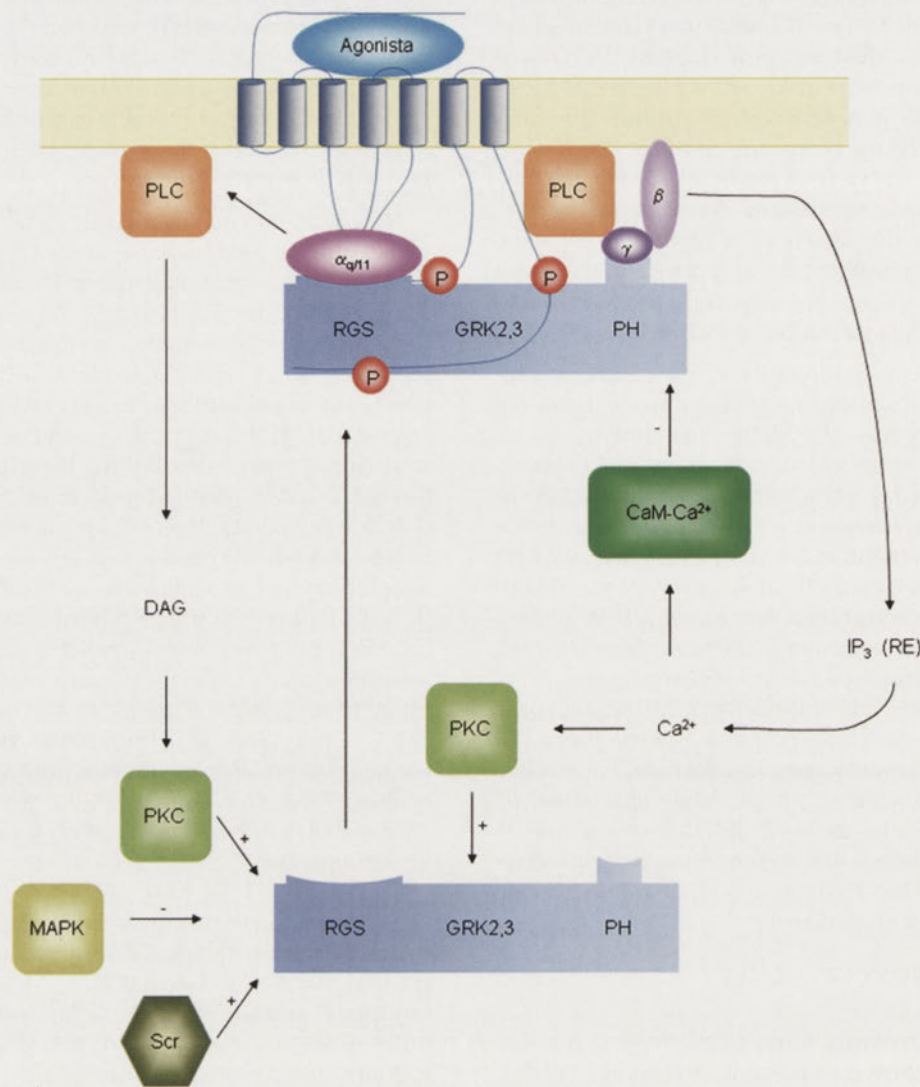
Pozostałe enzymy należące do rodziny kinaz GRK regulowane są przez inne białko wiążące  $Ca^{2+}$ , kalmodulinę. Efektywność hamowania aktywności kinazy przez kalmodulinę jest bardzo różna. Podczas gdy aktywność GRK5 ulega zahamowaniu przy niskich, nanomolarnych stężeniach kalmoduliny, to jej wpływ na kinazę GRK2 jest widoczny dopiero przy kilkakrotnie wyższym, mikromolarnym stężeniu tego białka [9]. Kinazy GRK posiadają dwa konserwowane miejsca wiązania kalmoduliny. Jedno z nich zlokalizowane jest na N-końcu, pomiędzy 20 a 39 resztą aminokwasową GRK5 i pomiędzy 18 a 37 resztą aminokwasową GRK2. Drugie miejsce wiązania znajduje się na C-końcu kinazy, a jego pozycja jest zmienna w zależności od typu enzymu [8, 26]. W przypadku GRK5 miejsce wiązania kalmoduliny (547-562) pokrywa się z domeną wiążącą fosfolipidy i połączenie z kalmoduliną wyklucza przyłączenie enzymu do błony i tym samym hamując fosforylację receptora. Wykazano, że przyłączenie kalmoduliny do obu miejsc wiązania jest niezbędne, aby zahamować aktywność kinazy [8, 26]. Mutacje tylko na N-końcu lub usunięcie C-końca GRK5 jedynie w niewielkim stopniu wpływają na poziom fosforylacji receptora.

Ponadto dowiedziono, że kalmodulina specyficznie stymuluje autofosforylację GRK5 jednak nie ma wpływu na poziom autofosforylacji GRK2 i GRK1. W obecności kalmoduliny autofosforylacji ulegają odmienne reszty aminokwasowe niż ma to miejsce przypadku fosfolipidów [8]. Indukowana obecnością kalmoduliny autofosforylacja kinazy hamuje bezpośrednio wiązanie GRK5 do błon pręciaków siatkówki oka i w związku z tym blokuje fosforylację rodopsyny [8].

Jedną z hipotez zakłada, że wysokie powinowactwo kalmoduliny do określonej grupy kinaz GRK może preferencyjnie zmniejszać aktywność tych kinaz. W ten sposób GRK5 mogłoby odgrywać mniejszą rolę w regulacji receptorów związanych z przekazywaniem sygnału z udziałem jonów wapnia. Ponadto wydaje się, że kinazy GRK2 charakteryzujące się stosunkowo niskim powinowactwem do kalmoduliny mogą występować wybiórczo w komórkach, w których poziom kalmoduliny jest wysoki (np. neuronach). Przypuszcza się też, że GRK2 może być regulowana, również przez inne białka wiążące  $Ca^{2+}$ . Jednym z takich białek jest NCS1 (ang. *neuronal calcium sensor-1*), który wiążąc się do GRK2 osłabia desensytyzację receptora dopaminowego D2 [28].

## REGULACJA AKTYWNOŚCI KINAZ GRK PRZEZ KAWEOLINĘ I BIAŁKA CYTOSZKIELETALNE

Aktywność i lokalizacja komórkowa kinaz z rodziny GRK jest regulowana przez wiele czynników włączając w to aktywację receptora,  $G\beta\gamma$ ,  $PIP_2$  i białka wiążące wapń. Niektóre z nich są niezbędne w interakcji kinaz z błoną komór-



**Rysunek 2.** Schemat przedstawiający przypuszczalny mechanizm regulacji kinaz GRK2 i GRK3 i ich udział w desensytyzacji szlaku sygnalizacyjnego. Po aktywacji receptora i aktywacji białka G, G $\alpha_{q/11}$ -GTP stymuluje fosfolipazę C (PLC), która hydrolizuje fosfatydyloinozytolo(4,5)-bisfosforan (PIP<sub>2</sub>) do trisfosfoinozytol (IP<sub>3</sub>) i diacyloglicerolu (DAG). DAG aktywuje kinazę C (PKC) zdolną do fosforylacji GRK2 i GRK3, IP<sub>3</sub> zaś uwalnia Ca<sup>2+</sup> z siateczki endoplazmatycznej (RE). Kinazy GRK2 i GRK3 po aktywacji receptora, dzięki domenie plekstrynowej (PH) i domenie wiążącej dimer  $\beta\gamma$  białka G zlokalizowanych na C-końcu cząsteczki zostają zakotwiczone do błony komórkowej. W tej formie kinazy mogą wiązać się z receptorem (GPCR) i fosforylować reszty serynowe/trionowe (P), zlokalizowane w trzeciej pętli cytoplazmatycznej i na końcu C cząsteczki receptora. Fosforylacja receptora jest niezbędna do przyłączenia arrestyny, a następnie jego internalizacji. Ponadto kinazy GRK2 i GRK3 po połączeniu z G $\alpha_{q/11}$ -GTP za pomocą domeny RGS zlokalizowanej na N-końcu blokują aktywację PLC. Dodatkowo aktywność GRK2 jest hamowana przez kalmodulinę i jony wapnia (CaM-Ca<sup>2+</sup>) oraz mitogenne kinazy białkowe (MAPK). Natomiast fosforylacja GRK2 przez nie receptorową kinazę tyrozynową, Src, podobnie jak PKC zwiększa aktywność katalityczną GRK2 i GRK3.

kową. Stwierdzono, że znaczące ilości GRK2 specyficznie wiążą się z błonami mikrosomalnymi, a odpowiedzialne za ten proces są zarówno domena, umiejscowiona pomiędzy 50 a 145 resztą aminokwasową na N-końcu kinazy oraz bliżej nieokreślone białko kotwiczące. Ponadto w badaniach *in vitro* wykazano, że związana z błonami mikrosomalnymi kinaza GRK2 nie wykazuje aktywności katalitycznej, a jej przywrócenie następowało w obecności aktywatorów białek G [7].

Późniejsze badania wykazały, że kinazy GRK wiążą się z kaweoliną, białkiem wchodzącym w skład kaweol, domen błonowych utworzonych przez cholesterol i glikosfingolipidy, struktur, do których wiąże się wiele białek zaangażowanych w sygnalizacji komórkowej. Dlatego uważa się, że kaweole mogą służyć jako mikrodomeny błony, które

skupiają i organizują szlaki sygnalizacyjne w komórce [29]. GRK2 oddziałuje z kaweoliną poprzez motywy konsensusowe (ang. *caveolin-binding motifs*), o wzorze  $\Phi X\Phi X X X X \Phi$ ,  $\Phi X X X X \Phi X X \Phi$ , lub  $\Phi X\Phi X X X X \Phi X X$ ; (gdzie  $\Phi$  reprezentuje aromatyczną resztę aminokwasową) [29], występujące w domenie homologicznej do plekstryny (pomiędzy 567 a 584 resztą aminokwasową) oraz przez wysoko konserwowany rejon znajdujący się w domenie na N-końcu, pomiędzy 63 a 71 resztą aminokwasową kinazy. Ten konserwowany fragment jest jedynym rejonem, dzięki któremu kinazy nie posiadające domeny PH (GRK1 i GRK5) mogą łączyć się z kaweoliną. Wykazano ponadto, że wiązanie kaweoliny do N-końca kinazy GRK1, GRK2 i GRK5 silnie hamuje jej aktywność katalityczną. Funkcjonalne znaczenie tych oddziaływań nie jest do końca wyjaśnione. Z jednej strony wiązanie kinazy przez kaweolinę może być mecha-



nizmem regulującym aktywność tego enzymu, jednak nie można również wykluczyć funkcjonowania kaweoli jako swoistego rodzaju selekcyjona regulującego substratową specyficzność kinazy [7].

Również oddziaływania kinaz GRK z białkami cytoskieletu takimi jak  $\alpha$ -aktylina mogą leżeć u podstaw regulacji specyficzności substratowej oraz lokalizacji kinaz GRK w komórce. W badaniach *in vitro* wykazano, że  $\alpha$ -aktylina hamuje aktywność katalityczną kinazy, a regulatorami jej działania może być kalmodulina i  $PIP_2$ . Na podstawie tych wyników autorzy zaproponowali model działania  $\alpha$ -aktyliny oraz  $PIP_2$  jako regulatorów GRK *in vivo* [30].

#### REGULACJA AKTYWNOŚCI KINAZ GRK PRZEZ FOSFORYLACJĘ

W ostatnich latach wykazano, że fosforylacja kinaz GRK z udziałem różnych kinaz białkowych jest istotnym mechanizmem regulacji aktywności tych enzymów. Ma ona również wpływ na oddziaływania kinaz GRK z innymi białkami. Ten zależny od fosforylacji sposób regulacji pozwala na kontrolę mechanizmu działania wielu szlaków przekazywania sygnału poprzez modulację procesu desensytyzacji receptorów.

#### ROLA KINAZ PKC I PKA W REGULACJI KINAZ GRK

Doświadczenia *in vitro* i *in situ* wykazały, że obie kinazy, kinaza GRK2, należąca do podrodziny GRK2 oraz kinaza GRK5, wchodząca w skład podrodziny GRK4, są substratami białkowej kinazy C [7]. Jednak funkcjonalne konsekwencje ufosforylowania tych enzymów są bardzo różne dla obu kinaz. W doświadczeniach *in vitro* stwierdzono, że indukowana przez PKC fosforylacja GRK2 powoduje dwukrotny wzrost poziomu ufosforylowania aktywowanej rodopsyny i jest to zjawisko charakterystyczne dla receptora jako substratu, nie zaobserwowano natomiast, zmian poziomu fosforylacji w przypadku substratów peptydowych. Można więc założyć, że fosforylacja kinazy GRK2 przez kinazę C promuje wiązanie kinazy GRK z błoną lub/i receptorem umożliwiając jego fosforylację, ale nie wpływa bezpośrednio na własności katalityczne kinazy GRK [9]. Początkowo sądzono, że miejsce fosforylacji GRK2 przez kinazę C znajduje się na C-końcu białka, jednak ostatnie doświadczenia wykazały, że ufosforylowaniu ulega 29 reszta seryny (Ser-29) [31] zlokalizowane w rejonie łączenia się kinazy GRK2 z kalmoduliną. Jak wspomniano poprzednio, przyłączenie kalmoduliny do kinazy uniemożliwia fosforylację receptora, jednak zjawisku temu zapobiega fosforylacja GRK2 przez PKC. Wyniki otrzymane w doświadczeniach *in vitro* mogą posłużyć jako odniesienie do mechanizmu działania kinazy C w komórce, gdzie dostępność aktywnej kinazy GRK2 może być zahamowana przez utworzenie kompleksu kinaza-kalmodulina. Natomiast ufosforylowanie kinazy GRK2 przez PKC może zapobiegać formowaniu kompleksu, a tym samym umożliwić przyłączenie się GRK2 do receptora i jego fosforylację [31].

W przeciwieństwie do kinazy GRK2, fosforylacja kinazy GRK5 przez kinazę C hamuje jej aktywność. Obniżenie poziomu fosforylacji stwierdzono zarówno w przypadku receptora jak i peptydów, może to więc sugerować, że

fosforylacja kinazy GRK5 przez kinazę C jest związana z zahamowaniem aktywności katalitycznej tego enzymu. Doświadczenia *in vitro* ujawniły dwa główne miejsca fosforylacji w obrębie regionu składającego się z 26 reszt aminokwasowych i zlokalizowanego na C-końcu enzymu. We fragmencie tym znajdują się również miejsca odpowiedzialne za hamowanie autofosforylacji, która jest stymulowana na obecności  $Ca^{2+}$  i kalmoduliny. Bliskie sąsiedztwo miejsc autofosforylacji i fosforylacji przez kinazę C może tłumaczyć dlaczego enzym ten oraz kompleks  $Ca^{2+}$ -kalmodulina posiadają takie same własności hamujące w stosunku do GRK5 [7].

Drugą kinazą aktywowaną przez wtórne przekaźniki, która może fosforylować kinazy z rodziny GRK jest kinaza A. Stwierdzono, że stymulowana kinaza A może bezpośrednio fosforylować kinazę GRK2, co prowadzi do wzrostu poziomu fosforylacji  $\beta$ -adrenergicznych receptorów [32]. Miejsce fosforylacji GRK2 przez kinazę A znajduje się na 685 reszcie serynowej, blisko miejsca łączenia się kinazy GRK2 z  $\beta\gamma$ -dimerem białka G. Wykazano, że fosforylacja GRK2 przez kinazę A nie ma bezpośredniego wpływu na aktywność katalityczną tego enzymu, lecz zwiększa prawdopodobieństwo wiązania GRK2 z podjednostką  $G\beta\gamma$ , a tym samym ułatwia translokację GRK2 do błony komórkowej i jej interakcję z aktywowanym receptorem. Oprócz kinazy A bierze udział w tym procesie także dodatkowe białko kotwiczące kinazę A do receptora (ang. *protein kinase A-anchoring protein*, AKAP79). Fosforylacja GRK2 przez kinazę A jest kolejnym przykładem wieloetapowej regulacji procesu desensytyzacji receptora. Po pierwsze, kinaza A sama fosforyluje receptor, co prowadzi do jego inaktywacji, a ponadto stymuluje działanie kinazy GRK2.

#### FOSFORYLACJA KINAZ GRK PRZEZ KINAZY cSRC I MAPK

Receptory sprzężone z białkami G oprócz klasycznych szlaków przekazywania sygnałów prowadzących do aktywacji kinazy A lub kinazy C mogą również uczestniczyć w aktywacji nie receptorowych kinaz tyrozynowych (cSrc) oraz mitogennych kinaz białkowych (MAPK) [1,2]. Utworzenie kompleksu receptor-kinaza Src jest wymagane nie tylko do inicjacji nowych szlaków enzymatycznych [2], ale istnieje wiele dowodów na to, że kinaza Src odgrywa bezpośrednią rolę w procesie desensytyzacji GPCR. Aktywacja kinazy Src wymaga jej połączenia z receptorem, uprzednio związanym z agonistą i fosforylowanym przez nie znaną do tej pory kinazę tyrozynową na 350 reszcie tyrozynowej. Kinaza Src po utworzeniu kompleksu z receptorem ulega aktywacji, przyłącza kinazę GRK2, która staje się jej substratem (Rys. 2). Fosforylacja kinazy GRK2 na reszcie tyrozynowej jest niezbędna do zwiększenia jej aktywności katalitycznej, a to w konsekwencji umożliwia fosforylację receptora i przyłączenie  $\beta$ -arestyny, będącej sygnałem do zapoczątkowania desensytyzacji receptora na drodze endocytozy [33].

Kompleks kinazy Src z receptorem  $\beta$ 2-adrenergicznym i z  $\beta$ -arestyną może również inicjować szlak sygnalizacyjny od cykazy adenylanowej poprzez białka RAS do mitogennych kinaz białkowych, ERK/MAPK [2]. Aktywne kinazy ERK/MAPK, jak stwierdzono *in situ*, mogą łączyć się z kinazą GRK2. Natomiast w badaniach *in vitro*, wyka-

zono, że kinazy ERK/MAPK fosforylują GRK2 na C-końcu (Ser 670). To miejsce fosforylacji leży w obrębie domeny wiążącej  $G\beta\gamma$  [34] i konsekwencją ufosforylowania kinazy GRK2 przez ERK/MAPK jest zaburzenie procesu interakcji GRK2 z  $G\beta\gamma$ . Następstwem tego zjawiska jest ograniczenie zarówno translokacji GRK2 do błony jak i jej katalitycznej aktywności [34]. Zatem mamy tu do czynienia z negatywnym sprzężeniem zwrotnym, w wyniku którego następuje zahamowanie aktywności GRK2 i uniemożliwienie fosforylacji receptora GPCR.

## REGULACJA POZIOMU EKSPRESJI KINAZ GRK W KOMÓRKACH

Kinazy GRK, a w szczególności kinaza GRK2, są białkami, u których precyzyjnie regulowana jest nie tylko aktywności oraz jej subkomórkowa lokalizacja, ale również poziom ekspresji tego enzymu w komórce. Poziom kinazy GRK2 w komórkach może być regulowany na kilka odmiennych sposobów. Po pierwsze, wykazano, że różnicowanie w przekazywaniu sygnału w różnych komórkach po aktywacji  $\beta$ 2AR, ma ścisły związek ze zmianami poziomu ekspresji GRK. Różnicowany poziom ekspresji kinazy GRK2, jak na przykład w komórkach płuc jest skorelowany z różnym wzorem desensytyzacji i internalizacji  $\beta$ 2AR [7]. Należy zaznaczyć, że zaburzenia w poziomie ekspresji kinaz z rodziny GRK mogą być związane ze zmianami chorobowymi. Wywołanie w modelach zwierzęcych zmian patologicznych, takich jak niedoczynność tarczycy, wiąże się z innym niż u zwierząt kontrolnych wzorem ekspresji kinazy GRK2 i GRK5 w komórkach [35]. Zmiany ekspresji kinaz z rodziny GRK towarzyszą między innymi chorobie niedokrwiennej serca (GRK2) [36], mukowiscydozie (GRK2) [37], nadciśnieniu tętniczemu (GRK2) [38] oraz reumatoidalnemu zapaleniu stawów (GRK2 i GRK6) [39]. Zmiany poziomu ekspresji kinaz GRK odnotowywano nie tylko jako następstwo zmian patologicznych organizmu, lecz również jest ono konsekwencją, procesów fizjologicznych. Wzrost poziomu ekspresji tych kinaz zaobserwowano po aktywacji limfocytów T oraz w cyklu okołoporodowym szczura i w rozwoju melanocytów [7].

Zmianom poziomu ekspresji kinaz GRK w warunkach fizjologicznych i patologicznych w wielu wypadkach towarzyszą zmiany w poziomie mRNA, tak więc można przypuszczać, że jednym z czynników regulujących to zjawisko są mechanizmy kontroli transkrypcji. Niestety badania w zakresie molekularnych mechanizmów kontroli poziomu mRNA kinaz z rodziny GRK są dopiero na wstępnym etapie [7].

Poziom kinaz GRK w komórce jest również regulowany na drodze degradacji tych enzymów. GRK2 to „krótko żyjące białko” (czas półtrwania wynosi ok. 1 godziny), które ulega szybkiemu rozpadowi w proteasomach [40]. Stymulacja tego procesu następuje po aktywacji receptora, co może sugerować fizjologiczną zależność pomiędzy aktywacją kinazy GRK2 i jej degradacją. Interesujący wydaje się aspekt współdziałania kinaz Src i GRK2, który prowadzi do rozpadu kinazy GRK2. Okazało się, że fosforylacja kinazy GRK2 przez kinazę tyrozynową Src i dodatkowo przyłącze-

nie  $\beta$ -arestyny jest krytyczne do inicjacji procesu degradacji kinazy GRK2 [40]. Należy zauważyć, że ufosforylowanie reszt tyrozynowych z udziałem Src na GRK2 nie jest jedynym sygnałem kierującym ten enzym na drogę degradacji. Dodatkowym czynnikiem regulującym jest fosforylacja przez MAP kinazy, a wcześniejsza fosforylacja przez Src wspomaga ten proces. Kontrola poziomu GRK2 w komórce poprzez fosforylację z udziałem Src i/lub MAPK może mieć funkcjonalne zastosowanie w procesach zarówno fizjologicznych jak i patologicznych, w których po pobudzeniu receptorów GPCR następuje aktywacja wspomnianych kaskad [2]. W ten sposób zostaje uruchomiony mechanizm dla szybkich i przejściowych zmian w poziomie GRK2.

## PODSUMOWANIE

Kinazy GRK są kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za desensytyzację aktywnych receptorów, sprzężonych z białkami G. Poznanie sposobu działania, wewnątrzkomórkowej lokalizacji, a także poziomu ekspresji kinaz z rodziny GRK jest warunkiem zrozumienia kompleksowej regulacji interakcji i modulacji receptorów GPCR przez omawiane białka. Zdefiniowanie różnorodnych funkcjonalnie domen w różnych kinazach GRK rozszerzyło możliwość badań nad potencjalną funkcją omawianych białek w komórce. Fosforylacja kinaz z rodziny GRK jest istotnym mechanizmem regulacji pełnionych przez nie funkcji i ich oddziaływań z innymi białkami, a nawet kierowania tych białek na drogę degradacji.

## PIŚMIENNICTWO

1. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 639-650
2. Barańska J (2003) Nowa niezależna od białek G, droga przekazywania sygnałów przez receptory o siedmiu domenach transbłonowych. Koroniak H, Barciszewski J (red) *Na pograniczu chemii i biologii*, t VIII. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, Poznań, str. 51-67
3. Fabczak H, Sobierajska K, Fabczak S (2004) Dimer  $\beta\gamma$  białka G – cząsteczka sygnałowa. *Kosmos* 53: 356-372
4. Bünemann M, Hosey MM (1999) G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol* 517: 5-23
5. Szmyczek M, Kurowska E, Górczyca W (2005) Rola arestyny w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. *Postępy Hig Med Dośw* 59: 324-333
6. Gurevich VV, Gurevich EV (2004) The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol Sci* 25: 105-111
7. Penela P, Ribas C, Mayor F Jr (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* 15: 973-981
8. Penn RB, Pronin AN, Benovic JL (2000) Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc Med* 10: 81-89
9. Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67: 653-692
10. Jamroz-Wiśniewska A, Beltowski J (2004) Izoprenylacja białek. *Postępy Biochem* 50: 316-329
11. Weiss ER, Ducceschi MH, Horner TJ, Li A, Craft CM, Osawa S (2001) Species-specific differences in expression of G-protein-coupled receptor kinase GRK7 and GRK1 in mammalian cone photoreceptor cells: implications for cone cell phototransduction. *J Neurosci* 21: 9175-9184
12. Willets JM, Challiss RA, Nahorski SR (2003) Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture? *Trends Pharmacol Sci* 24: 626-633
13. Palczewski K (1997) GTP-binding-protein-coupled receptor kinases-two mechanistic models. *Eur J Biochem* 248: 261-269.

14. Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* 27: 107-144
15. Pao CS, Benovic JL (2002) Phosphorylation-independent desensitization of G protein-coupled receptors? *Sci STKE* 153: 1-3
16. Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB, Gilman AG, Benovic JL, Kozasa T (1999) Selective regulation of G $\alpha$  (q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* 274: 34483-34492
17. Hollinger S, Hepler JR (2002) Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 54: 527-559
18. Sterne-Marr R, Tesmer JJ, Day PW, Stracquatano RP, Cilente JA, O'Connor KE, Pronin AN, Benovic JL, Wedegaertner PB (2003) G protein-coupled receptor kinase 2/G $\alpha$  q/11 interaction. A novel surface on a regulator of G protein signaling homology domain for binding G $\alpha$  subunits. *J Biol Chem* 278: 6050-6058
19. Perroy J, Adam L, Qanbar R, Chenier S, Bouvier M (2003) Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J* 22: 3816-3824
20. Dhami GK, Anborgh PH, Dale LB, Sterne-Marr R, Ferguson SS (2002) Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 277: 25266-25272
21. Dhami GK, Dale LB, Anborgh PH, O'Connor-Halligan KE, Sterne-Marr R, Ferguson SS (2004) G protein-coupled receptor kinase 2 regulator of G protein signaling homology domain binds to both metabotropic glutamate receptor 1a and Galphaq to attenuate signaling. *J Biol Chem* 279: 16614-16620
22. Dhami GK, Babwah AV, Sterne-Marr R, Ferguson SS (2005) Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor 1 signaling requires G protein-coupled receptor kinase 2 binding to the second intracellular loop. *J Biol Chem* 280: 24420-24427
23. Carman CV, Barak LS, Chen C, Liu-Chen LY, Onorato JJ, Kennedy SP, Caron MG, Benovic JL (2000) Mutational analysis of G $\beta\gamma$  and phospholipid interaction with G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 275: 10443-10452
24. Eichmann T, Lorenz K, Hoffmann M, Brockmann J, Krasel C, Lohse MJ, Quitterer U (2003) The amino-terminal domain of G-protein-coupled receptor kinase 2 is a regulatory G $\beta\gamma$  binding site. *J Biol Chem* 278: 8052-8057
25. Naga Prasad SV, Barak LS, Rapacciuolo A, Caron MG, Rockman HA (2001) Agonist-dependent recruitment of phosphoinositide 3-kinase to the membrane by beta-adrenergic receptor kinase 1. A role in receptor sequestration. *J Biol Chem* 276: 18953-18959
26. Sallèse M, Iacovelli L, Cumashi A, Capobianco L, Cuomo L, De Biasi A (2000) Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. *Biochim Biophys Acta* 1498: 112-121
27. Kawamura S (1993) Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP phosphodiesterase regulation by S-modulin. *Nature* 362: 855-857
28. Kabbani N, Negyessy L, Lin R, Goldman-Rakic P, Levenson R (2002) Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J Neurosci* 22: 8476-8486
29. Zuwała-Jagiello J (2004) Rola kaweoli srodblonka w endocytozie późnych produktów glikacji. *Postępy Biochem* 50: 272-281
30. Freeman JL, Pitcher JA, Li X, Bennett V, Lefkowitz RJ (2000)  $\alpha$ -Actinin is a potent regulator of G protein-coupled receptor kinase activity and substrate specificity *in vitro*. *FEBS Lett* 473: 280-284
31. Krasel C, Dammeier S, Winstel R, Brockmann J, Mischak H, Lohse MJ (2001) Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J Biol Chem* 276: 1911-1915
32. Cong M, Perry SJ, Lin FT, Fraser ID, Hu LA, Chen W, Pitcher JA, Scott JD, Lefkowitz RJ (2001) Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. *J Biol Chem* 276: 15192-1519
33. Fan G, Shumay E, Malbon CC, Wang H (2001) c-Src tyrosine kinase binds the beta 2-adrenergic receptor via phospho-Tyr-350, phosphorylates G-protein-linked receptor kinase 2, and mediates agonist-induced receptor desensitization. *J Biol Chem* 276: 13240-13247
34. Elorza A, Sarnago S, Mayor F Jr (2000) Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol* 57: 778-783
35. Penela P, Barradas M, Alvarez-Dolado M, Munoz A, Mayor F Jr (2001) Effect of hypothyroidism on G protein-coupled receptor kinase 2 expression levels in rat liver, lung, and heart. *Endocrinology* 142: 987-991
36. Yu X, Zhang M, Kyker K, Patterson E, Benovic JL, Kem DC (2000) Ischemic inactivation of G protein-coupled receptor kinase and altered desensitization of canine cardiac beta-adrenergic receptors. *Circulation* 102: 2535-2540
37. Mak JC, Chuang TT, Harris CA, Barnes PJ (2002) Increased expression of G protein-coupled receptor kinases in cystic fibrosis lung. *Eur J Pharmacol* 436: 165-172
38. Gros R, Benovic JL, Tan CM, Feldman RD (1997) G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *J Clin Invest* 99: 2087-2093
39. Lombardi MS, Kavelaars A, Penela P, Scholtens EJ, Roccio M, Schmidt RE, Schedlowski M, Mayor F Jr, Heijnen CJ (2002) Oxidative stress decreases G protein-coupled receptor kinase 2 in lymphocytes via a calcium-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 62: 379-388
40. Penela P, Elorza A, Sarnago S, Mayor F Jr (2001)  $\beta$ -arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *EMBO J* 20: 5129-5138.

## Mechanisms of regulation and function of G-protein coupled receptor kinases

Katarzyna Sobierajska, Hanna Fabczak, Stanisław Fabczak<sup>✉</sup>

Department of Cell Biology, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur St., 02-093 Warszawa, Poland

✉ e-mail: s.fabczak@nencki.gov.pl

**Key words:** G-protein coupled receptor kinases, G-protein, desensitization.

### ABSTRACT

G protein-coupled receptor kinases (GRKs) are key modulators of G protein-coupled receptor (GPCR) signaling. They constitute a family of seven mammalian serine-threonine protein kinases that phosphorylate agonist-bound receptor. GRKs-mediated receptor phosphorylation rapidly initiates profound impairment of receptor signaling and desensitization. Activity of GRKs and subcellular targeting is tightly regulated by interaction with receptor domains, G protein subunits, lipids, anchoring proteins and calcium sensitive proteins. Moreover, GRKs phosphorylation by several other kinases and autophosphorylation have recently been shown to modulate its functionality. This review summarizes our current knowledge of GRKs regulatory mechanisms and GRKs physiological function.

# Aromataza – kluczowy enzym biosyntezy estrogenów

Ryszard Milczarek<sup>✉</sup>

Jerzy Klimek

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej,  
Akademia Medyczna, Gdańsk

<sup>✉</sup> Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej,  
Akademia Medyczna w Gdańsku, ul. Dębinki  
1, 80-211 Gdańsk; e-mail: rysmil@amg.gda.pl,  
tel./faks: (58) 349 14 65

Artykuł otrzymano 3 lutego 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 23 marca 2005 r.

**Słowa kluczowe:** aromataza, CYP19, estrogeny, P450<sub>arom</sub>, różnicowe cięcie i składanie

**Wykaz skrótów:** cAMP – cykliczny AMP; CLS (ang. CRE – like sequence) – element odpowiedzi na cAMP podobny do CRE; CRE (ang. cAMP response element) – element odpowiedzi na cAMP; CREB (ang. cAMP response element binding protein) – białko wiążące element odpowiedzi na cAMP; CYP19 – gen kodujący cytochrom P450 aromatazy człowieka; GRE (ang. glucocorticoid response element) – element odpowiedzi na glikokortykoidy; P450<sub>arom</sub> – cytochrom P450 aromatazy; PGE<sub>2</sub> – prostaglandyna E<sub>2</sub>; PKA (ang. protein kinase A) – kinaza białkowa A; PKC (ang. protein kinase C) – kinaza białkowa C; SF-1/Ad4BP (ang. steroidogenic factor – 1/adrenal 4-binding protein) – sierocy receptor jądrowy – czynnik steroidogeniczny 1; TGFβ (ang. transforming growth factor β) – transformujący czynnik wzrostu; TNFα (ang. tumor necrosis factor α) – czynnik martwicy nowotworu

**Podziękowanie:** Praca powstała w ramach projektów W-48 i ST-40 Akademii Medycznej w Gdańsku realizowanych w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej

## STRESZCZENIE

Estrogeny regulują wiele funkcji życiowych, w tym: rozwój i działanie układu rozrodczego, budowę kośćca oraz zachowania seksualne. Aromataza jest kluczowym enzymem biosyntezy estrogenów a jej aktywność determinuje ilość wytwarzanych w narządzie lub tkance estrogenów. W przedstawionym artykule omówiono właściwości, strukturę i mechanizm działania aromatazy oraz opisano szczegółowo budowę genu cytochromu P450 aromatazy człowieka (CYP19). Wskazano na unikatowy charakter ekspresji genu CYP19 człowieka wynikający z obecności wielu tkankowo-specyficznych promotorów oraz różnicowego cięcia i składania eksonów. Szczegółowo omówiono molekularne mechanizmy regulacji ekspresji genu cytochromu P450 aromatazy w gonadach żeńskich i męskich człowieka, szczura, bydła i konia oraz w tkance tłuszczowej i łożysku człowieka. Ze względu na wyjątkowo istotną rolę estrogenów w rozwoju raka piersi opisano molekularne podłoże zaburzeń ekspresji genu CYP19 w guzie raka piersi i otaczającej go tkance tłuszczowej oraz potencjalne możliwości jej farmakologicznego wygaszania.

## WPROWADZENIE

Estrogeny stanowią grupę hormonów o budowie steroidowej. Działając poprzez swoje receptory jądrowe i błonowe regulują wiele funkcji życiowych, w tym: rozwój i działanie układu rozrodczego, budowę kośćca oraz zachowania seksualne. Syntezę estrogenów z androgenów katalizuje kompleks enzymatyczny nazywany aromatazą.

Biosyntezę estrogenów wykazano u wszystkich gromad kręgowców włączając ssaki, ptaki, gady, płazy, ryby i bezczaszkowce [1]. U większości zbadanych gatunków kręgowców aktywność aromatazy wykazano w gonadach żeńskich, gonadach męskich oraz w mózgu. Do chwili obecnej nie wykazano obecności aromatazy u bezkręgowców. U licznych naczelnych, w tym i u człowieka, estrogeny są syntetyzowane również w tkance tłuszczowej, kościach, wątrobie płodowej oraz w łożysku. Ten ostatni narząd jest również miejscem syntezy estrogenów u licznych gatunków ssaków kopytnych, takich jak: bydło, owce, świnię oraz konie [1].

## WŁAŚCIWOŚCI I STRUKTURA AROMATAZY CZŁOWIEKA

Do tej pory najlepiej poznanym enzymem posiadającym aktywność aromatazy jest enzym człowieka. Składnikiem decydującym o specyficzności substratowej i katalitycznej aromatazy jest wchodzący w jej skład cytochrom P450 (P450<sub>arom</sub>) [2]. W obecnej nomenklaturze białko to oznacza się jako CYP19A1, a kodujący je gen jako CYP19. Występuje ono przede wszystkim we frakcji mikrosomalnej [2]. Izolowany z tkanek człowieka P450<sub>arom</sub> ma masę 55 kDa [3].

P450<sub>arom</sub>, tak jak inne cytochromy P450 klasy II, wymaga do swojego działania reduktazy NADPH:cytochrom P450 (EC 1.6.2.4). Enzym ten zawierający FAD i FMN występuje powszechnie w retikulum endoplazmatycznym wielu tkanek steroidogenicznych jak i niesteroidogenicznych, a jego podstawową funkcją jest transport elektronów z NADPH na żelazo hemowe różnych form cytochromu P450 [4].

P450<sub>arom</sub> posiada wiele elementów budowy wspólnych z innymi przedstawicielami rodziny cytochromów P450. W jego odcinku C-końcowym zlokalizowana jest silnie konserwowana domena wiążąca hem. Znajdująca się w niej reszta cysteiny funkcjonuje jako piąty ligand koordynujący żelazo hemowe. Obecność w tym miejscu grupy tiolowej decyduje o wyjątkowych właściwościach spektrofotometrycznych i katalitycznych całej rodziny cytochromów P450. Dalej w stronę N-końca od domeny wiążącej hem znajduje się inny wysoce konserwatywny region, mianowicie część helisy I, która prawdopodobnie tworzy kieszonkę

wiążącą substrat, leżącą bardzo blisko prostetycznej grupy hemowej [5].

Liczne izoformy cytochromu P450 w obrębie N-końca posiadają odcinek hydrofobowy umożliwiający związanie enzymu z błoną. W P450<sub>arom</sub> takie właściwości posiada odcinek pomiędzy 20 a 40 aminokwasem. Funkcjonuje on przypuszczalnie jako domena transbłonowa, podczas gdy odcinek zawierający aminokwasy od 1 do 20 pozostaje w świetle retikulum endoplazmatycznego. P450<sub>arom</sub> ulega N-glikozytacji w obrębie pierwszych 20 aminokwasów, jednak usunięcie glikozylowanej sekwencji lub mutacja w tym regionie nie miały dużego wpływu na aktywność enzymu [5,6]. Warte odnotowania jest to, że jeżeli usunięcie pierwszych 10 aminokwasów miało niewielki wpływ na aktywność enzymu, to usunięcie pierwszych 20 spowodowało jej 95% spadek, wskazując na duże znaczenie regionu pomiędzy 10 a 20 aminokwasem dla zachowania prawidłowej konformacji białka [5].

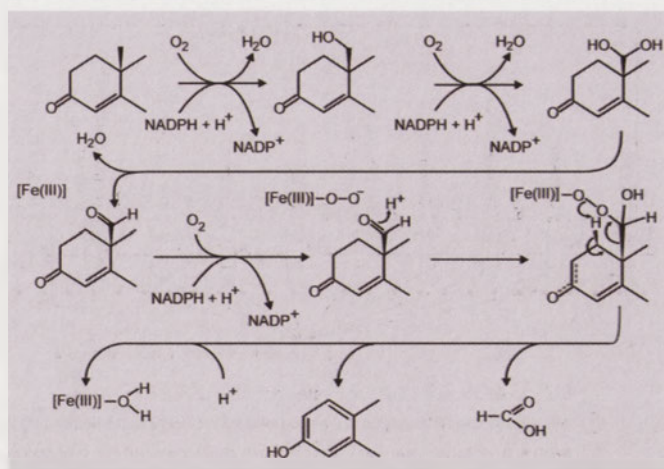
## STECHEIOMETRIA I MECHANIZM REAKCJI

Reakcja katalizowana przez aromatazę zużywa 3 mole NADPH i 3 mole O<sub>2</sub> na każdy mol metabolizowanych androgenów [5]. Fizjologicznymi substratami aromatazy są: androstendion, testosteron i 16 $\alpha$ -hydroksyandrostendion. W wyniku reakcji katalizowanej przez aromatazę pierścienia A androgenu staje się pierścieniem aromatycznym, a kątowa grupa metylowa C-19 zostaje utleniona do kwasu mrówkowego i usunięta (Rys. 1). Pierwsze dwie cząsteczki tlenu są zużywane do utlenienia grupy metylowej C-19 poprzez dwie kolejne stereospecyficzne hydroksylacje [5]. W wyniku tych hydroksylacji powstają kolejno 19-hydroksyandrostendion i 19-gem-diol, który następnie ulega dehydratacji do 19-oksoandrostendionu. Kolejny etap reakcji katalizowanej przez aromatazę prowadzi do utlenienia i usunięcia grupy aldehydowej C-19 oraz aromatyzacji pierścienia A. Wytwarzany w trakcie tego etapu intermedial nadtlenkowy cytochromu P450 [Fe(III)-OO<sup>-</sup>], przeprowadza atak nukleofilowy na węgiel grupy karbonylowej C-19 [7]. Następnie wiąże się z grupą karbonylową C-19 wytwarzając pośredni związek hemiacetalowy, który rozpada się do kwasu mrówkowego i estrogeneru. Jednocześnie z pozycji 1 zostaje usunięty proton, co prowadzi do enolizacji pierścienia, uwolnienia estrogeneru i wytworzenia „soczynkowej” formy cytochromu P450<sub>arom</sub> [7].

## GENY I EKSPRESJA CYTOCHROMU P450 AROMATAZY

### GEN CYTOCHROMU P450 AROMATAZY CZŁOWIEKA - CYP19

Gen CYP19 człowieka zlokalizowano na chromosomie 15q21.2. Projekt poznania genomu człowieka pozwolił na określenie jego rozmiarów, położenia eksonów i sekwencji promotorowych. Gen CYP19 obejmuje obszar 123 kpz., przy czym na obszar regulatorowy przypada 93 kpz., a na kodujący 30 kpz. [8]. (Rys. 2). Region kodujący łańcuch polipeptydowy P450<sub>arom</sub> obejmuje eksony od II do X. Region regulatorowy zawiera tkankowo-specyficzne promotory i położone za nimi eksony, które w trakcie transkrypcji i przemian potranskrypcyjnych są włączane alternatywnie do dojrzałego mRNA w charakterystyczny dla danej tkanki



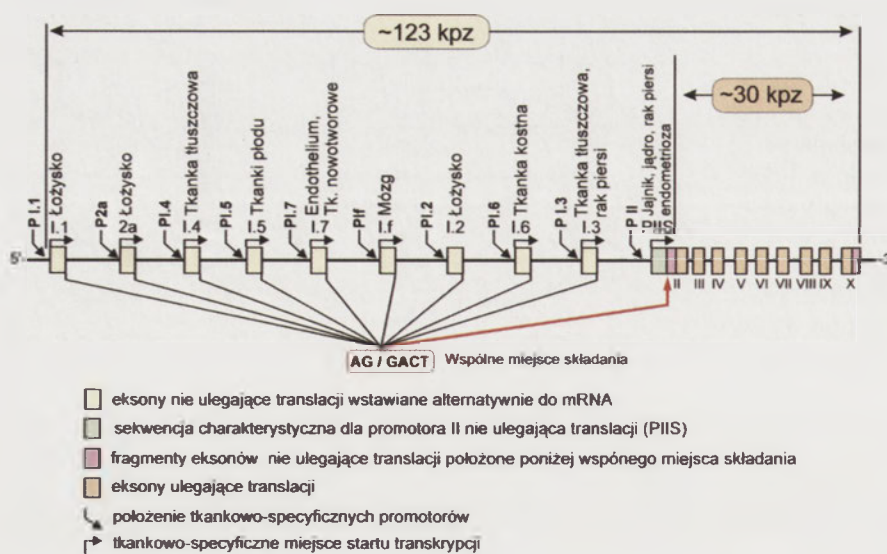
Rysunek 1. Uproszczony mechanizm reakcji katalizowanej przez aromatazę. Na rysunku dla przejrzystości przedstawiono tylko pierścien A steroidu. [Fe(III)] – żelazo układu hemowego P450<sub>arom</sub>.

sposób. Eksony znajdujące się w obszarze regulatorowym genu oznaczono wspólną rzymską cyfrą I oraz kolejnymi cyframi arabskimi od 1 do 7. Niektórzy autorzy stosują numerację alternatywną i zamiast cyfry arabskiej dodają małą literę alfabetu łacińskiego. Miejsce alternatywnego włączania eksonów do dojrzałego transkryptu znajduje się 38 z. przed tripletem nukleotydów kodującym miejsce startu translacji [8].

Najdalej położonym w kierunku 5' fragmentem genu CYP19 jest ekson I.1. oraz znajdujący się przed nim region promotorowy. Jest on umiejscowiony 93 kpz. w górę od eksonu II [8]. Ekson I.1 jest włączany do dominującego transkryptu łożyskowego. Najbliższym względem regionu kodującego jest promotor regulujący transkrypcję w gonadach, która rozpoczyna się w miejscu położonym 116 pz. przed tripletem kodującym miejsce startu translacji [9]. W tym wypadku, odcinek 78 z. znajdujący się pomiędzy 5'-końcem pierwotnego transkryptu a wspólnym miejscem składania nie jest wycinany. Stąd w dojrzałym mRNA izolowanym z jajnika ekson II jest dłuższy o ten dodatkowy odcinek w stosunku do eksonu II w transkryptach pochodzących z innych tkanek. Ten dodatkowy fragment eksonu II (na Rys. 2, 3 i 5 oznaczony jako PIIS) nazwano sekwencją charakterystyczną dla promotora II (ang. *promoter II – specific sequence*), a w nomenklaturze alternatywnej eksonem Id. Pozostałe alternatywnie wstawiane eksony wraz z poprzedzającymi je promotorami są zlokalizowane pomiędzy promotorem łożyskowym I.1 a promotorem specyficznym dla gonad PII. Zostały one wyszczególnione w tabeli 1.

Ponieważ różnicowe cięcie i składanie eksonów (alternatywny splicing) dotyczy obszaru niekodującego mRNA, białko kodowane przez te tkankowo-specyficzne transkrypty jest zawsze takie samo. Stąd też we wszystkich tkankach człowieka, w których gen CYP19 ulega ekspresji, istnieje tylko jedna identyczna forma białka P450<sub>arom</sub>.

W ciągu ostatnich kilku lat pojawiło się wiele prac dotyczących polimorfizmu genu CYP19. Najczęściej opisywany i badany rodzaj polimorfizmu wynika z różnej ilości powtórzeń sekwencji TTTA, zawartych w intronie pomiędzy eks-



Rysunek 2. Gen kodujący P450<sub>arom</sub> (CYP19) człowieka.

onem 4 i 5. W różnych allelach CYP19 stwierdza się od 7 do 13 powtórzeń tej sekwencji. Wykazano zależność pomiędzy liczbą powtórzeń sekwencji TTTA a zachorowalnością na osteoporozę [10], raka prostaty [11] i raka piersi [12]. Innym częstym rodzajem polimorfizmu genu CYP19 jest insercja/delecja sekwencji trzech nukleotydów w intronie 4. Sugerowano, że tego rodzaju polimorfizm związany jest z endometriozą [13].

#### GENY CYTOCHROMU P450 AROMATAZY INNYCH GATUNKÓW

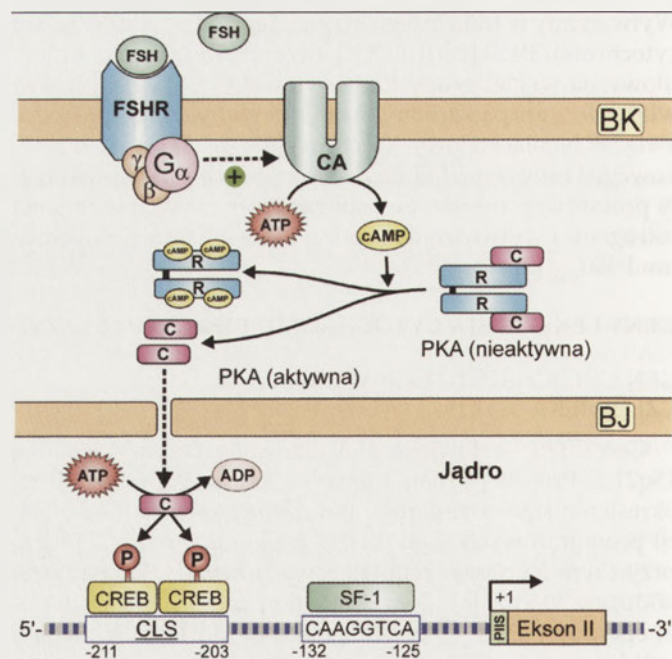
Większość zbadanych do tej pory gatunków kręgowców posiada tylko jeden gen kodujący cytochrom P450 aromatazy. U wielu gatunków z tej grupy stwierdzono również występowanie alternatywnego składania eksonów. W przypadku niektórych gatunków ryb wykazano istnienie dwóch genów [1], a w przypadku świni domowej trzech genów kodujących P450<sub>arom</sub>. Ze względu na miejsce ekspresji poszczególnych genów u świni sklasyfikowano je jako typ I – jajnikowy, typ II – łożyskowy oraz typ III – embrionalny [14]. W przypadku bydła, poza podlegającym pełnej ekspresji genem P450<sub>arom</sub>, stwierdzono istnienie podlegającego transkrypcji pseudogenu, który oznaczono jako *bcyp19P1* lub *bcyp19φ* [15]. Podobnie stwierdzono istnienie pseudogenu u owiec [15].

#### EKSPRESJA GENÓW CYTOCHROMU P450 AROMATAZY

**Jajnik.** U wielu przebadanych gatunków ssaków w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego i komórkach lutealnych ciała żółtego wykrywa się metodą Northern blot obecność kilku rodzajów transkryptów P450<sub>arom</sub> o różnej długości. U człowieka są to mRNA o długości 3,0, 2,4 i 1,6 kz. [16], u pawiana 3,6, 3,0, i 1,7 kz. [17], u szczura 3,3, 2,6, i 1,9 kz. [18], ale np. u bydła stwierdza się tylko jeden rodzaj transkryptu o długości 8 kz. [19]. Wewnątrzgatunkowe różnice w wielkości transkryptów wynikają z występowania w genie P450<sub>arom</sub> kilku potencjalnych miejsc przyłączenia odcinka poli-(A) [20].

Transkrypcja genu P450<sub>arom</sub> w jajniku jest inicjowana przez promotor II [1]. Regulacja tego procesu w komórkach ziarnistych jest bardzo podobna u większości gatunków kręgowców i odbywa się pod kontrolą hormonu folikulotropowego (FSH), w którego działaniu pośredniczy cAMP [1] (Rys. 3). Zidentyfikowano dwie sekwencje odpowiedzialne za stymulację transkrypcji genu P450<sub>arom</sub> przez cAMP. Do pierwszej (CAAGGTCA) położonej w genie CYP19 człowieka -132 pz. od miejsca startu transkrypcji wiąże się białko SF-1/Ad4BP [21]. Identyczną sekwencję znaleziono również w obszarze regulatorowym promotora II szczurzego genu P450<sub>arom</sub>. Zlokalizowano ją w odcinku pomiędzy -90 a -66 pz. od miejsca startu transkrypcji [22]. Białko SF-1 zalicza się do rodziny sierocych receptorów jądrowych. Jego nieprawidłowa ekspresja prowadzi do zaburzeń w rozwoju nadnerczy i gonad oraz dysfunkcji komórek produkujących hormony tropowe dla tych narządów. W odróżnieniu od innych receptorów jądrowych, SF-1 nie tworzy homo- ani heterodimerów w trakcie wiązania DNA. Sekwencja rozpoznawana przez SF-1 występuje również w obszarach regulatorowych innych genów kodujących enzymy steroidogeniczne. Obecność drugiej sekwencji istotnej dla ekspresji genu P450<sub>arom</sub> stwierdzono w miejscu leżącym w kierunku 5' od sekwencji wiążącej SF-1. W genie człowieka znajduje się ona w odległości -203 pz. od miejsca startu transkrypcji [1]. Sekwencja ta (TG<sub>C</sub>CACGTCA) jest zbliżona do sekwencji elementu odpowiedzi na cAMP (CRE) i dlatego nazwano ją CLS (ang. CRE-like sequence). Od sekwencji zgodnej CRE różni się ona

wa ekspresja prowadzi do zaburzeń w rozwoju nadnerczy i gonad oraz dysfunkcji komórek produkujących hormony tropowe dla tych narządów. W odróżnieniu od innych receptorów jądrowych, SF-1 nie tworzy homo- ani heterodimerów w trakcie wiązania DNA. Sekwencja rozpoznawana przez SF-1 występuje również w obszarach regulatorowych innych genów kodujących enzymy steroidogeniczne. Obecność drugiej sekwencji istotnej dla ekspresji genu P450<sub>arom</sub> stwierdzono w miejscu leżącym w kierunku 5' od sekwencji wiążącej SF-1. W genie człowieka znajduje się ona w odległości -203 pz. od miejsca startu transkrypcji [1]. Sekwencja ta (TG<sub>C</sub>CACGTCA) jest zbliżona do sekwencji elementu odpowiedzi na cAMP (CRE) i dlatego nazwano ją CLS (ang. CRE-like sequence). Od sekwencji zgodnej CRE różni się ona



Rysunek 3. Mechanizm regulacji transkrypcji genu CYP19 w komórkach ziarnistych pęcherzyka. Opis w tekście. BK – błona komórkowa, BJ – błona jądrowa, CA – cyklaza adenylanowa, FSHR – receptor FSH.

Tabela 1. Czynniki regulujące tkankowo-specyficzną ekspresję genu *CYP19* człowieka.

Ekson alternatywnie włączany do mRNA	Odległość od miejsca splicingu (kbp)	Czynniki regulujące ekspresję genu <i>CYP 19</i>				
		Miejsce ekspresji	Czynniki zewnętrzne-komórkowe	Elementy wewnętrzne-komórkowego szlaku sygnalizacyjnego	Sekwencje czynników cis od 5' do -3'	Czynniki trans
PIIS (Id)	0	komórki ziarniste	FSH	cAMP PKA PKB/Akt	CAAGGTCA TGCACGTCA (CLS)	SF1/ Ad4BP (+) CREB (+) GATA-4 (+)
		komórki lutealne			CAAGGTCA TGCACGTCA (CLS)	SF1/ Ad4BP (+) CREB (+)
		komórki Leydiga	LH T, 5 $\alpha$ -DHT	cAMP PKA	CAAGGTCA TGCACGTCA (CLS)	SF1/ Ad4BP (+) CREB (+)
		komórki Sertoliego	FSH	cAMP PKA	CAAGGTCA TGCACGTCA (CLS)	SF1/ Ad4BP (+) CREB (+)
		męskie komórki germintywne	T, 5 $\alpha$ -DHT	AR		
I.3 (Ic)	0,2	tkanka tłuszczowa (fibroblasty) (TM*), tkanki nowotworowe	PGE2	PKC (EP1) cAMP PKA (EP2)	CAAGGTCA TGCACGTCA (CLS) TGAAGTCA (CRE1)	LRH-1(+) CREB (+) CREB (+)
		tkanka tłuszczowa (fibroblasty) (TM*), tkanki nowotworowe	PGE2	cAMP, PKA	TGAAGTCA (CREaro) AAGGTCAGAAAT	CREB (+) Snail, Slug (-) ERR $\alpha$ -1 (+) COUP-TF (-) EAR-2 (-) RAR $\gamma$ (-)
I.6	1	osteoblasty			do chwili obecnej nie znane	
I.2 (Ie)	12	łożysko (TM*)			do chwili obecnej nieznane	
If	33	mózg			do chwili obecnej nieznane	
I.7	36	endothelium, zrakowaciałe komórki nabłonkowe				GATA-2 (+)
I.5	43	tkanki płodowe			do chwili obecnej nie znane	
I.4 (Ib)	73	tkanka tłuszczowa (preadipocyty, fibroblasty, tkanki płodowe, osteoblasty)	glukokortykosteroidy	GR	AGAAGATTCTGTCT (GRE) GGCGGGC (GC-box) TTCCACTGAA (GAS) TGATTAA (AP-1)	GR (+) Sp1 (+) STAT3 (+)
		łożysko (TM*)	interleukiny TNF $\alpha$	Gp130, Jak1		JUN, FOS (+)
2a	78	łożysko (TM*)			do chwili obecnej nieznane	
I.1 (Ia)	93	łożysko (TD*)	retinoidy	RXR $\alpha$	GGCCTCAGG (TSE) ACCCTCAT (TSE2) AGGTCATGCCCC GGCGGG (GC-box) CACATG (E-box) CACGTG (E-box)	TSEBP (+) GCM1 (+) RXR $\alpha$ , VDR (+) Sp1 (+)
			O <sub>2</sub>	Mash-2		USF1, USE2 (-) USF1, USE2 (-)

\*TD – transkrypt dominujący; TM – transkrypt mniejszościowy; PIIS – sekwencja charakterystyczna dla promotora II; AR – receptor androgenowy.

obecnością dodatkowego nukleotydu cytydynowego (podkreślenie). Obydwie sekwencje wiążą się z białkiem CREB, jednak jego powinowactwo do sekwencji CLS jest znacznie mniejsze niż do sekwencji zgodnej CRE [1].

Warunkiem koniecznym do stymulacji transkrypcji przez cAMP i białko CREB jest jego fosforylacja na reszcie seryny-133. FSH w komórkach ziarnistych szczura indukuje w ciągu 1 godziny przejście podjednostki katalitycznej PKA do jądra

i fosforylację białka CREB [23]. Ponadto wykazano, że szlak sygnalizacyjny prowadzący do wzrostu ekspresji aromatazy w komórkach ziarnistych w obecności FSH oprócz cAMP, PKA i białka CREB, wymaga również aktywności kinazy PKB/ Akt (ang. *protein kinase B/kinase Akt*), choć na obecnym etapie badań sposób jej aktywacji oraz dokładna rola nie są znane [24].

Niedawno wykazano, że w regulacji ekspresji genu P450<sub>arom</sub> w jajniku myszy uczestniczy czynnik transkrypcyj-

ny GATA-4. W obszarze regulatorowym promotora II mysiego genu P450<sub>arom</sub> znaleziono sekwencję wiążącą ten czynnik. Jej zmutowanie prowadziło do wielokrotnego spadku ekspresji genu reporterowego [25]. Sekwencja wiążąca GATA-4 jest obecna również w genach P450<sub>arom</sub> szczura i człowieka [25].

Ciałko żółte wielu przebadanych do tej pory gatunków ssaków posiada zdolność do syntezy estrogenów podczas cyklu płciowego [17,26] oraz w czasie ciąży [17,27]. W budowie ciała żółtego można na ogół wyróżnić dwie grupy komórek lutealnych, tzw. komórki duże oraz komórki małe [26]. Aktywność aromatazy zlokalizowana jest przede wszystkim w dużych komórkach lutealnych pochodzących ze zróżnicowanych komórek ziarnistych [26,28]. Luteinizacja komórek ziarnistych zapoczątkowana wyrzutem hormonu luteinizującego (LH) prowadzi do przejściowego spadku ekspresji genu P450<sub>arom</sub> i syntezy estrogenów w jajniku [19,29]. Podczas luteinizacji komórek ziarnistych człowieka ekspresja genu P450<sub>arom</sub> staje się niezależna od FSH [26]. Interesujące jest to, że u człowieka pomimo spadku syntezy estrogenów w fazie lutealnej, w dojrzałym ciałku żółtym obserwuje się wyższą niż w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego ekspresję genu *CYP19* [29,30]. Sugeruje się, że czynnikiem ograniczającym syntezę estrogenów w ciałku żółtym jest aktywność 17 $\alpha$ -hydroksylazy/17,20-liazy odpowiedzialnej za syntezę androgenów.

W odróżnieniu od człowieka i szczura jajnik bydła produkuje w fazie pęcherzykowej znacznie mniejsze ilości estrogenów, a w fazie lutealnej traci tą zdolność prawie całkowicie [19]. Za odmienny sposób ekspresji genu P450<sub>arom</sub> w jajniku bydła przynajmniej częściowo odpowiada brak w sekwencji CLS nukleotydu C (TGCAGTCA). Tak zmieniona sekwencja bardzo słabo wiąże białko CREB, co czyni tę sekwencję niefunkcjonalną [1]. Brak tego samego nukleotydu stwierdza się również u innych kopytnych, w tym świni i konia [31].

W jajniku klaczy w trakcie luteinizacji komórek ziarnistych wywołanej podaniem hCG (ang. *human chorionic gonadotropin*) zaobserwowano zjawisko dwukrotnej zmiany miejsca startu transkrypcji genu P450<sub>arom</sub>. Przed podaniem hCG transkrypcja jest inicjowana przez promotor II, tak jak odbywa się to u większości zbadanych gatunków. Po upływie 1 doby po podaniu hCG kontrolę nad transkrypcją genu P450<sub>arom</sub> przejmuje promotor homologiczny do promotora I człowieka, ale w wykształconym ciałku żółtym obserwuje się ponownie transkrypty powstające pod kontrolą promotora II [31].

**Jądra i męskie komórki germinatywne.** Przez wiele lat rola estrogenów u samców była niedoceniana, co znajdowało swoje odbicie w zaliczeniu estrogenów do tzw. „żeńskich hormonów płciowych”. Otrzymanie zwierząt transgenicznych pozbawionych funkcjonalnych receptorów estrogenowych lub aromatazy pokazało, że hormony te są niezbędne również dla prawidłowego przebiegu spermatogenezy [1].

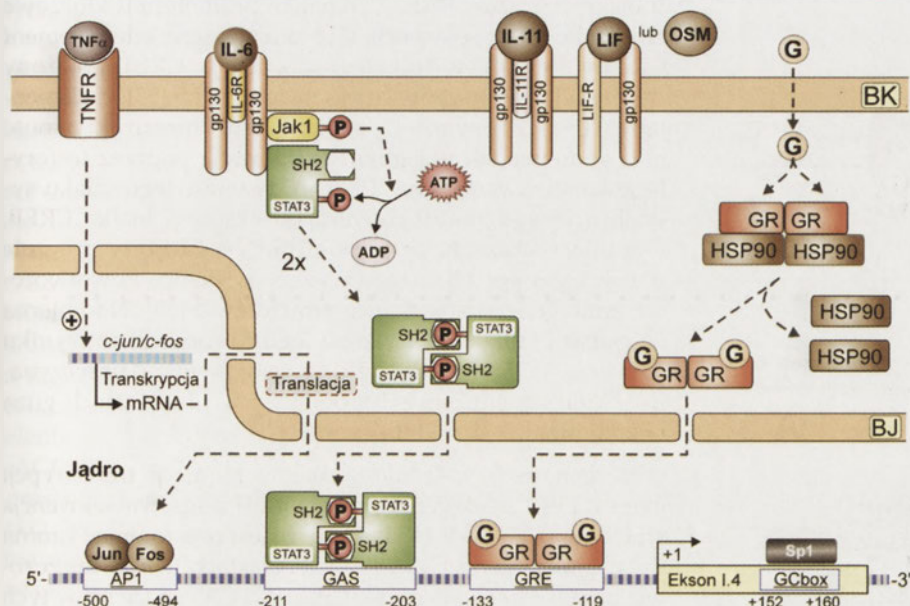
U większości gatunków aktywność aromatazy wykazują komórki Leydiga, komórki Sertoliego oraz komórki germinatywne [32].

U wielu gatunków metodami immunohistochemicznymi obecność P450<sub>arom</sub> wykazano w komórkach Leydiga oraz komórkach germinatywnych. U konia w podobny sposób wykazano ją również w komórkach Sertoliego [33]. Obecność mRNA P450<sub>arom</sub> stwierdzono w komórkach Leydiga i komórkach Sertoliego szczura, komórkach Leydiga człowieka [32], konia [34] oraz w różnych stadiach rozwojowych plemników człowieka [35], szczura i myszy [32]. Ilość mRNA P450<sub>arom</sub> w komórkach Sertoliego dorosłego szczura jest od 10 do 15 razy niższa niż w komórkach Leydiga [32,36]. O ile w komórkach Leydiga w czasie życia szczura nie zachodzą znaczące zmiany w ilości P450<sub>arom</sub>, to w komórkach Sertoliego obserwuje się 20-krotny spadek ilości tego enzymu pomiędzy 20 i 70 dniem życia [32]. W komórkach germinatywnych szczura obserwuje się ciekawą zależność. Poziom mRNA P450<sub>arom</sub> w spermatocytach, spermatydach i plemnikach wynosi kolejno:  $38.7 \pm 8.1 \times 10^{-3}$ ,  $20.4 \pm 3.8 \times 10^{-3}$  i  $1.3 \times 10^{-3}$  amol/10<sup>6</sup> komórek, podczas gdy aktywność aromatazy jest od 2.5 do 4 razy wyższa w plemnikach niż w innych komórkach germinatywnych [36].

Ekspresja genu kodującego P450<sub>arom</sub> w jądrach niezależnie od typu komórki zachodzi pod kontrolą promotora II [37]. Jest ona regulowana przez identyczne czynniki transkrypcyjne jak w jajniku, czyli SF-1 oraz CREB i jest zależna od cAMP. W przypadku komórek Leydiga aktywność aromatazy stymuluje LH [37]. Ponadto synteza estrogenów oraz ilość mRNA P450<sub>arom</sub> w komórkach Leydiga i męskich komórkach germinatywnych jest stymulowana przez testosteron oraz 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron [37]. W komórkach germinatywnych zaobserwowano, że na ekspresję genu P450<sub>arom</sub> mają wpływ również: TGF $\beta$  (ang. *transforming growth factor*  $\beta$ ), oraz TNF $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor*  $\alpha$ ).

**Tkanka tłuszczowa.** Ekspresję genu P450<sub>arom</sub> w tkance tłuszczowej do chwili obecnej wykazano tylko u człowieka i naczelnych. Estrogeny syntetyzowane w tkance tłuszczowej działają na poziomie auto-, para- i endokrynnym. Ich rola staje się szczególnie widoczna u kobiet w wieku pomonopauzalnym, gdy ustaje aktywność endokryna jajników. Estrogeny produkowane w tkance tłuszczowej mają pozytywny wpływ na stan masy kostnej oraz układ krążenia. Gen *CYP19* ulega ekspresji w fibroblastach tkanki tłuszczowej (określanych również jako preadipocyty lub komórki stromy) z których mogą różnicować się adipocyty [1]. Wraz z wiekiem obserwuje się wzrost aktywności aromatazy oraz wzrost ilości mRNA P450<sub>arom</sub> w tkance tłuszczowej [5]. Transkrypty izolowane z tkanki tłuszczowej na swoim 5'-końcu zawierają przede wszystkim nie podlegający translacji ekson I.4 [9,38], ale w niewielkiej ilości obecne są również transkrypty zawierające ekson I.3 oraz transkrypty powstające pod kontrolą promotora II [39]. Ekspresja genu *CYP19* w fibroblastach prawidłowej tkanki tłuszczowej jest stymulowana przez glukokortykoidy, niektóre cytokiny oraz TNF $\alpha$  (Rys. 4) [1,38]. Za stymulację ekspresji genu *CYP19* przez glukokortykoidy odpowiada sekwencja GRE zlokalizowana w obszarze powyżej eksonu I.4 [38]. Wpływ glukokortykoidów na transkrypcję genu *CYP19* jest zwielokrotniany przez cytokiny typu interleukiny-6 takie jak: IL-6, IL-11, LIF (ang. *leukaemia inhibitory factor*) oraz OSM (ang. *oncostatin M*). Wszystkie cytokiny należące do tej grupy działają poprzez receptory błonowe posiadające przynajm-





**Rysunek 4.** Mechanizm regulacji transkrypcji genu *CYP19* w fibroblastach tkanki tłuszczowej przez promotor I.4. Opis w tekście. BK – błona komórkowa, BJ – błona jądrowa, G – glukokortykoidy, GR – receptor glukokortykoidowy, HSP90 – białka szoku termicznego.

niej jedną identyczną podjednostkę – białko gp130. Związanie się wyżej wymienionych cytokin do ich receptorów w fibroblastach tkanki tłuszczowej prowadzi do fosforylacji i aktywacji kinazy Jak1 (ang. *Janus protein kinase*), która następnie fosforyluje czynniki transkrypcyjne STAT3 (ang. *signal transducer and activator of transcription*). Te po ufosforylowaniu dimeryzują i wiążą się z sekwencją GAS (ang.  $\gamma$ -*interferon activating sequence*) stymulując transkrypcję genu *CYP 19* inicjowaną przez promotor I.4. TNF $\alpha$  podobnie jak cytokiny typu IL-6 stymuluje transkrypcję genu *CYP19* tylko w obecności glukokortykoidów. TNF $\alpha$ , działając najprawdopodobniej poprzez ceramid, indukuje ekspresję genów *c-jun* i *c-fos*. Ich produkty – odpowiednie białka JUN i FOS wiążą się z sekwencją AP-1, położoną powyżej eksonu I.4, co prowadzi do wzrostu ekspresji genu *CYP19*. Warunkiem koniecznym działania wszystkich wyżej wymienionych czynników jest związanie czynnika transkrypcyjnego Sp1 (ang. *specificity protein 1*) z sekwencją typu GC-box znajdującą się w obrębie eksonu I.4 [1].

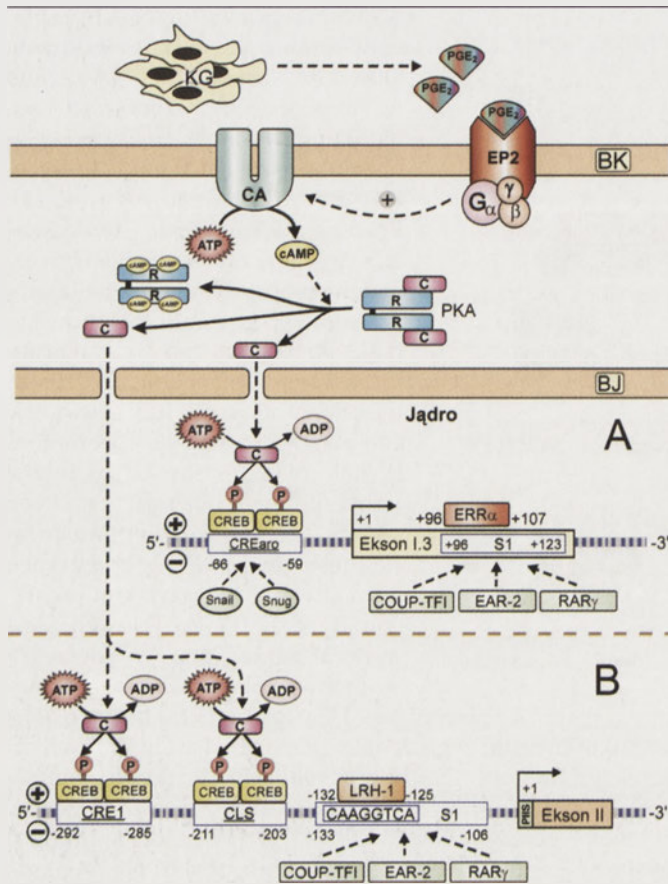
Cytokiny oraz TNF $\alpha$ , które stymulują ekspresję genu *CYP19* hamują jednocześnie różnicowanie adipocytów. Interesujące jest to, że czynniki stymulujące różnicowanie adipocytów takie jak PPAR $\gamma$  (ang. *peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$* ) i ligandy dla tego receptora hamują ekspresję genu *CYP19* w tkance tłuszczowej. Działanie to zaobserwowano dla transkryptów pochodzących z promotora I.4 [1] oraz promotora II [40].

**Rak piersi.** Kiedy w gruczole piersiowym dochodzi do rozwoju raka, w guzie rośnie stężenie aktywnych estrogenów: estradiolu i estronu [41]. Wzrost poziomu estrogenów w guzie wynika w dużej mierze ze zwiększenia ich lokalnej syntezy z krążących we krwi androgenów. Estrogeny stymulują wzrost i podziały komórek nowotworowych [42-44]. Guz raka piersi zbudowany jest przede wszystkim ze zrakowaciałych komórek nabłonkowych, zmodyfiko-

wanych i prawidłowych fibroblastów oraz naczyń krwionośnych. Obecność aromatazy wykazano w fibroblastach i komórkach nabłonkowych tkanki nowotworowej oraz fibroblastach tkanki tłuszczowej gruczołu piersiowego [45,46]. Poziom mRNA P450<sub>arom</sub> w tkance guza jest znacząco wyższy niż w nie zmienionej nowotworowo tkance tłuszczowej gruczołu piersiowego [47]. Powstające w tych warunkach transkrypty genu *CYP19* zawierają eksony I.3 lub sekwencję charakterystyczną dla promotora II, natomiast zmniejsza się udział transkryptów zawierających ekson I.4 [48]. Czynnikiem stymulującym ekspresję genu *CYP19* w komórkach guza jest przede wszystkim prostaglandyna E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) [1]. PGE<sub>2</sub> jest wytwarzana przez zrakowaciałe komórki nabłonkowe oraz znajdujące się w guzie fibroblasty i osiąga

wysokie stężenie w guzie raka piersi. Stwierdzono również, że ekspresja genu *CYP19* w wycinkach z gruczołu piersiowego wykazuje silną dodatnią korelację z ekspresją genów cyklooksygenazy COX-1 i COX-2 [49]. W proces stymulacji ekspresji genu *CYP19* w fibroblastach przez PGE<sub>2</sub> zaangażowane są receptory EP1 i EP2 [50]. Receptory EP1 i EP2 uczestniczą w aktywacji ścieżek sygnałowych przebiegających kolejno z udziałem PKC i PKA. Najlepiej poznany szlak sygnałowy prowadzącym do wzrostu ekspresji genu P450<sub>arom</sub> jest szlak zależny od receptora EP2 (Rys. 5). Elementem odpowiedzialnym za indukcję aktywności promotora I.3 przez cAMP i PKA (Rys. 5A) jest obecna w jego obszarze regulatorowym sekwencja CRE<sub>aro</sub> (TGAAGTCA) różniącą się nieznacznie od sekwencji zgodnej CRE [51]. Podobnie jak z innymi sekwencjami typu CRE wiąże się z nią białko CREB. W warunkach fizjologicznych stymulacja transkrypcji z udziałem promotora I.3 i sekwencji CRE<sub>aro</sub> jest hamowana przez wiązanie się z jej fragmentem dwóch białek zawierających motywy palców cynkowych – Snail i Slug [48]. Ich związanie z DNA blokuje wiązanie elementu CRE<sub>aro</sub> z białkiem CREB i tym samym hamuje transkrypcję stymulowaną przez cAMP. Jednakże, w komórkach nowotworowych ekspresja genów kodujących białka Snail i Slug jest znacznie niższa w porównaniu z komórkami prawidłowymi, co prowadzi do zwiększonej aktywności transkrypcyjnej promotora I.3 [48].

Wewnątrz eksonu I.3 znaleziono sekwencję odpowiedzialną za hamowanie aktywności promotorów I.3 i II (na Rys. 5A i 5B oznaczoną jako S1) [48]. W fibroblastach tkanki tłuszczowej gruczołu piersiowego, z elementem wyciszającym S1 (ang. *silencer element 1*) wiążą się czynniki transkrypcyjne należące do rodziny sierocych receptorów jądrowych: COUP-TFI, EAR-2 oraz RAR $\gamma$  (ang. *chicken ovalbumin upstream promoter – transcription factor, erb A related, retinoic acid receptor*), które hamują aktywność transkrypcyjną promotorów I.3 i II [52]. W komórkach raka piersi, gdzie obserwuje się znacznie niższe stężenie białek COUP-TFI, EAR-2,



**Rysunek 5.** Mechanizm regulacji transkrypcji genu *CYP19* w guzie raka piersi i otaczającej go tkance tłuszczowej przez promotor I.3 (A) i promotor II (B). Opis w tekście. BK – błona komórkowa, BJ – błona jądrowa, CA – cykloza adenylanowa, KG – komórki guza.

i RAR $\gamma$  do sekwencji S1 wiąże się, stymulujący transkrypcję genu *CYP19*, sierocy receptor jądrowy ERR $\alpha$  (ang. *estrogen related receptor*) [48,52]. Porównanie ekspresji genu kodującego ERR $\alpha$  w kilku nowotworowych i nienowotworowych liniach komórkowych wykazało, że poziom ekspresji białka ERR $\alpha$  jest znacząco wyższy w komórkach raka piersi [52].

Podsumowując, w komórkach raka piersi dochodzi do obniżenia ekspresji białek Snail, Slug, oraz COUP-TFI, EAR-2, i RAR $\gamma$  i jednoczesnego wzrostu ekspresji genu P450<sub>arom</sub> w wyniku wiązania CREB do elementu CRE<sub>aro</sub> i ERR $\alpha$  do elementu S1.

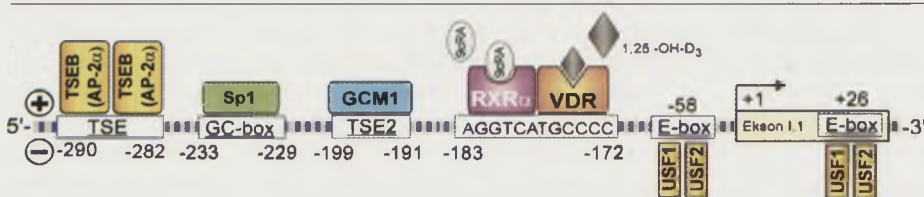
Regulacja transkrypcji genu *CYP19* przez promotor II w fibroblastach guza i otaczającej go tkance tłuszczowej została przedstawiona na Rys. 5B. Aktywność transkrypcyjna tego promotora jest stymulowana przez PGE<sub>2</sub>, podobnie jak to ma miejsce w przypadku promotora I.3 [1]. Dla stymulacji

transkrypcji przez PGE<sub>2</sub>, z udziałem promotora II kluczowe znaczenie mają: sekwencja CLS oraz jeszcze jeden element CRE (na Rys. 5B i w Tab. 1 oznaczony jako CRE1) położony w górę od wcześniej opisanej sekwencji CLS [53]. Z elementami CLS i CRE1 wiąże się białko CREB, którego aktywność jest, podobnie jak w jajniku, regulowana poprzez fosforylację katalizowaną przez PKA. Aktywność tego szlaku sygnalizacyjnego zależy również od ekspresji białka CREB. Ostatnio wykazano, że poziom mRNA CREB w gruczole piersiowym jest kilka razy wyższy w tkance nowotworowo zmienionej niż w tkance prawidłowej [53]. Nadmierna ekspresja białka REB i wzrost jego fosforylacji w wyniku działania PGE<sub>2</sub> (poprzez PKA) są głównymi przyczynami zwiększonej ekspresji aromatazy w fibroblastach guza i otokoguzowej tkanki tłuszczowej.

W gonadach zasadniczą rolę w regulacji transkrypcji genu *CYP19* z udziałem promotora II odgrywa sekwencja wiążąca białko SF-1. Wykazano, że jest ona również istotna dla ekspresji genu *CYP19* w fibroblastach tkanki tłuszczowej oraz, że z sekwencją tą (CAAGGTCA) wiąże się w tych komórkach białko LRH-1 (ang. *liver receptor homologue-1*) (Rys. 5.B) [54]. Białko LRH-1 należy do rodziny sierocych receptorów jądrowych i podobnie jak SF-1 nie tworzy dimerów w czasie wiązania DNA. Ekspresję LRH-1, ale nie SF-1, wykazano w fibroblastach tkanki tłuszczowej i komórkach raka piersi [54]. Związanie LRH-1 z docelową sekwencją umożliwia indukowaną przez PGE<sub>2</sub>, zależną od cAMP i CREB, aktywność transkrypcyjną promotora II.

W guzie i przylegającej do niego tkance tłuszczowej odkryto jeszcze jeden aktywny promotor, który oznaczono jako I.7 [55]. Inicjuje on transkrypcję przede wszystkim w śródbłonku naczyń krwionośnych guza i zrakowaciałych komórkach nabłonkowych, natomiast nie zaobserwowano jego aktywności w fibroblastach. Z czynników transkrypcyjnych regulujących jego aktywność zidentyfikowano białko GATA-2 [55].

**Łożysko.** Transkrypcja genu aromatazy człowieka w łożysku jest regulowana przez położony dystalnie promotor I.1 leżący przed nie podlegającym translacji eksonem I.1 [1]. Mimo znacznej odległości od wspólnego miejsca składania jest to najsilniej działający promotor genu *CYP19*, co powoduje, że aktywność aromatazy w łożysku człowieka jest znacznie wyższa niż w jakiegokolwiek innej tkance. W łożysku człowieka ekspresja genu *CYP19* rozpoczyna się wraz z wykształceniem się syncytiotrofoblastu i dotyczy tylko tej grupy komórek łożyska. Do tej pory zidentyfikowano kilka elementów regulujących transkrypcję genu *CYP19* w łożysku (Rys. 6). Yamada i wsp. [56] zlokalizowali dwa takie elementy: TSE oraz TSE2 (ang. *trophoblast specific element*) leżące wewnątrz fragmentu do -300 pz. powyżej eksonu I.1. Element identyczny z TSE w obszarze regulatorowym promotora I.1 genu *CYP19* odkryto wcześniej w obszarze regulatorowym genu kodującego podjednostkę  $\alpha$  gonadotropiny łożyskowej człowieka [57]. Białko wiążące się z elementem TSE, początkowo nazwane TSEB, zostało zidentyfikowane przez innych autorów jako iden-



**Rysunek 6.** Mechanizm regulacji transkrypcji genu *CYP19* w łożysku ludzkim. Opis w tekście.

tyczne z czynnikiem transkrypcyjnym AP-2 $\alpha$  (ang. *activator protein-2a*) [57]. Rodzina białek AP-2 składa się z trzech przedstawicieli: AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  i AP-2 $\gamma$  kodowanych przez różne geny, z których pierwsza i ostatnia izoforma ulegają ekspresji w łożysku człowieka. W trakcie różnicowania syncytiotrofoblastu poziom izoformy AP-2 $\gamma$  maleje, a izoformy AP-2 $\alpha$  wzrasta i właśnie izoforma AP-2 $\alpha$  uzyskuje pozycję dominującą w syncytiotrofoblastie, w którym zachodzi synteza estrogenów [58]. Element TSE2 wiąże się z białkiem GCM1 (ang. *mammalian homologue of the Drosophila glia cells missing protein*) [56]. Opisano dwie izoformy białka GCM: GCM1(GCMA) i GCM2(GCMB), przy czym tylko pierwsza z nich występuje w łożysku, a ekspresja jej genu dotyczy tylko syncytiotrofoblastu [59]. Kolejnym zidentyfikowanym elementem była niekompletnie palindromowa sekwencja 5'-AGGTCATGCCCC-3' odpowiedzialna za stymulację ekspresji genu *CYP19* przez retinoidy. Wiąże ona heterodimer składający się z RXR $\alpha$  (ang. *retinoid X receptor*) i VDR (ang. *vitamin D<sub>3</sub> receptor*) [60]. Inne doniesienia wskazują na to, że ekspresja receptorów RXR i RAR wzrasta podczas procesu różnicowania cytotrofoblastu w syncytiotrofoblast [61]. Sugeruje to, że retinoidy odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji genu *CYP19* w czasie tworzenia syncytiotrofoblastu.

Ekspresja aromatazy w łożysku człowieka jest regulowana również przez ilość dostępnego tlenu [62]. W pierwszym trymestrze ciąży w łożysku panują warunki niedotlenienia stymulujące angiogenezę. Dopiero wytworzenie krążenia łożyskowego prowadzi do wzrostu ciśnienia parcjalnego tlenu w łożysku. Wykazano, że niedotlenienie hamuje zarówno różnicowanie cytotrofoblastu w syncytiotrofoblast jak i ekspresję genu *CYP19*. Zasadniczym elementem tego szlaku sygnalizacyjnego jest białko Mash-2 (ang. *mammalian achaete/scute homologue 2*) należące do rodziny czynników transkrypcyjnych typu bHLH (ang. *basic helix-loop-helix*). Hamujący wpływ na ekspresję genu aromatazy wywiera ono przez co najmniej dwa inne czynniki transkrypcyjne zawierające motywy bHLH i LZ (ang. *leucine zipper*): białka USF1 i USF2 (ang. *upstream stimulatory factor*) [62]. Ich poziom zależy od ilości obecnego w komórce białka Mash-2 i znacząco wzrasta w komórkach łożyskowych w niedotlenieniu. Związanie tych czynników jako heterodimerów do sekwencji E-box znajdujących się w pozycjach -58 i +26 pz. w stosunku do miejsca startu transkrypcji prowadzi do utworzenia kompleksu hamującego transkrypcję (Rys. 6). Sugeruje się, że ekspresja czynników USF jest regulowana na poziomie translacji i/lub stabilizacji białka [62].

Uważa się, że istotną rolę w stymulacji ekspresji genu *CYP19* odgrywa również sekwencja wiążąca czynnik Sp1 położona między -229 a -233 pz. od miejsca startu transkrypcji [63]. Poza człowiekiem i naczelnymi ekspresja genu *P450<sub>arom</sub>* zachodzi również w łożysku ssaków kopytnych. Jednak porównanie sekwencji łożyskowych promotorów człowieka, bydła i innych kopytnych wykazało, że nie wykazują one homologii [1,64].

## PERSPEKTYWY

Intensywnie prowadzone w ostatnich latach badania dotyczą zarówno mechanizmu działania jak i regulacji eks-

Presji genu *P450<sub>arom</sub>*. Badania nad mechanizmem działania i strukturą aromatazy budzą szczególne zainteresowanie w kontekście prac nad nowymi inhibitorami aromatazy wykorzystywanymi w terapii nowotworów piersi. Pewną przeszkodą w tych badaniach jest fakt, że wciąż nie znamy faktycznej struktury trzyczłonowej enzymu. Dopiero niedawno udało się przeprowadzić ekspresję genu *CYP19* człowieka w *E. coli*, której produktem jest aktywny enzym [65,66]. Uzyskanie tą drogą dużych ilości rozpuszczalnego enzymu prawdopodobnie umożliwi wkrótce poznanie pełnej struktury tego niezwyklego przedstawiciela tej rodziny białek oraz pozwoli na projektowanie coraz lepszych selektywnych inhibitorów tego enzymu.

Regulacja ekspresji genu *P450<sub>arom</sub>* budzi bardzo duże zainteresowanie ze względu na unikatowy sposób wykorzystania wielu tkankowo specyficznych promotorów. Dzięki temu u człowieka i kilku innych gatunków ekspresja jednego genu *P450<sub>arom</sub>* może być regulowana w całkowicie odmienny sposób w różnych tkankach. Poznanie mechanizmów regulacji pozwoli być może w przyszłości na wyłączenie ekspresji genu *P450<sub>arom</sub>* tylko w konkretnych tkankach i narządach. Możliwość ukierunkowanego wygaszania ekspresji genu *P450<sub>arom</sub>* jest bardzo atrakcyjna przede wszystkim dlatego, że tego typu postępowanie terapeutyczne pozwoliłoby uniknąć szeregu działań niepożądanych związanych z niedoborem estrogenów w całym organizmie człowieka. Postępowanie terapeutyczne oparte na tkankowo-specyficznej regulacji ekspresji genu *CYP19* mogło by znaleźć zastosowanie w leczeniu raka piersi, endometriozy, guzów feminizujących lub przedwczesnego dojrzewania płciowego.

## PIŚMIENNICTWO

1. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M (2002) Aromatase – a brief overview. *Annu Rev Physiol* 64: 93-127
2. Thompson EA Jr, Siiteri PK (1974) The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization. *J Biol Chem* 249: 5373-5378
3. Kellis JT Jr, Vickery LE (1987) Purification and characterization of human placental aromatase cytochrome P-450. *J Biol Chem* 262: 4413-4420
4. Murataliev MB, Feyereisen R, Walker FA (2004) Electron transfer by diflavin reductases. *Biochim Biophys Acta* 1698: 1-26
5. Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR, Michael MD, Bulun SE, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Sun T, Fisher CR, Qin K, Mendelson CR (1997) Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 52: 185-213
6. Shimozawa O, Sakaguchi M, Ogawa H, Harada N, Mihara K, Omura T (1993) Core glycosylation of cytochrome P-450(arom). Evidence for localization of N terminus of microsomal cytochrome P-450 in the lumen. *J Biol Chem* 268: 21399-21402
7. Jin S, Bryson TA, Dawson JH (2004) Hydroperoxoferric heme intermediate as a second electrophilic oxidant in cytochrome P450-catalyzed reactions. *J Biol Inorg Chem* 9: 644-653
8. Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M (2003) The human *CYP19* (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86: 219-224
9. Mahendroo MS, Mendelson CR, Simpson ER (1993) Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. *J Biol Chem* 268: 19463-19470

10. Gennari L, Masi L, Merlotti D, Picariello L, Falchetti A, Tanini A, Mavilia C, Del Monte F, Gonnelli S, Lucani B, Gennari C, Brandi ML (2004) A polymorphic *CYP19* TTTA repeat influences aromatase activity and estrogen levels in elderly men: effects on bone metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2803-2810
11. Latil AG, Azzouzi R, Cancel GS, Guillaume EC, Cochran-Priollet B, Berthon PL, Cussenot O (2001) Prostate carcinoma risk and allelic variants of genes involved in androgen biosynthesis and metabolism pathways. *Cancer* 92: 1130-1137
12. Ahsan H, Whittemore AS, Chen Y, Senie RT, Hamilton SP, Wang Q, Gurvich I, Santella RM (2005) Variants in estrogen-biosynthesis genes *CYP17* and *CYP19* and breast cancer risk: a family-based genetic association study. *Breast Cancer Res* 7: R71-R81
13. Kado N, Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshiba H, Kusuki I, Tsukamoto K, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshikawa T, Honjo H (2002) Association of the *CYP17* gene and *CYP19* gene polymorphisms with risk of endometriosis in Japanese women. *Hum Reprod* 17: 897-902
14. Graddy LG, Kowalski AA, Simmen FA, Davis SL, Baumgartner WW, Simmen RC (2000) Multiple isoforms of porcine aromatase are encoded by three distinct genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 73: 49-57
15. Vanselow J, Zsolnai A, Fesus L, Furbass R, Schwerin M (1999) Placenta-specific transcripts of the aromatase encoding gene include different untranslated first exons in sheep and cattle. *Eur J Biochem* 265: 318-324
16. Steinkampf MP, Mendelson CR, Simpson ER (1987) Regulation by follicle-stimulating hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P-450 in human granulosa cells. *Mol Endocrinol* 1: 465-471
17. Hild PS, Fazleabas AT (1997) Expression of steroid receptors and steroidogenic enzymes in the baboon (*Papio anubis*) corpus luteum during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 955-962
18. Hickey GJ, Chen SA, Besman MJ, Shively JE, Hall PF, Gaddy-Kurten D, Richards JS (1988) Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinology* 122: 1426-1436
19. Voss AK, Fortune JE (1993) Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and P450 aromatase in pre-ovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 132: 2239-2245
20. Means GD, Mahendroo MS, Corbin CJ, Mathis JM, Powell FE, Mendelson CR, Simpson ER (1989) Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P-450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *J Biol Chem* 264: 19385-19391
21. Michael MD, Kilgore MW, Morohashi K, Simpson ER (1995) Ad4BP/SF-1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the proximal promoter (P1) of the human aromatase P450 (*CYP19*) gene in the ovary. *J Biol Chem* 270: 13561-13566
22. Carlone DL, Richards JS (1997) Functional interactions, phosphorylation, and levels of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulatory element binding protein and steroidogenic factor-1 mediate hormone-regulated and constitutive expression of aromatase in gonadal cells. *Mol Endocrinol* 11: 292-304
23. Gonzalez-Robayna JJ, Alliston TN, Buse P, Firestone GL, Richards JS (1999) Functional and subcellular changes in the A-kinase-signaling pathway: relation to aromatase and Sgk expression during the transition of granulosa cells to luteal cells. *Mol Endocrinol* 13: 1318-1337
24. Zeleznik AJ, Saxena D, Little-Ihrig L (2003) Protein kinase B is obligatory for follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 144: 3985-3994
25. Tremblay JJ, Viger RS (2001) GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology* 142: 977-986
26. Devoto L, Kohen P, Vega M, Castro O, Gonzalez RR, Retamales I, Carrvallo P, Christenson LK, Strauss JF (2002) Control of human luteal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 186: 137-141
27. Hickey GJ, Oonk RB, Hall PF, Richards JS (1989) Aromatase cytochrome P450 and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 in corpora lutea of pregnant rats: diverse regulation by peptide and steroid hormones. *Endocrinology* 125: 1673-1682
28. Sanders SL, Stouffer RL (1997) Localization of steroidogenic enzymes in macaque luteal tissue during the menstrual cycle and simulated early pregnancy: immunohistochemical evidence supporting the two-cell model for estrogen production in the primate corpus luteum. *Biol Reprod* 56: 1077-1087
29. Suzuki T, Sasano H, Sasaki H, Fukaya T, Nagura H (1994) Quantitation of P450 aromatase immunoreactivity in human ovary during the menstrual cycle: relationship between the enzyme activity and immunointensity. *J Histochem Cytochem* 42: 1565-1573
30. Doody KJ, Lorence MC, Mason JL, Simpson ER (1990) Expression of messenger ribonucleic acid species encoding steroidogenic enzymes in human follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 1041-1045
35. Boerboom D, Kerban A, Sirois J (1999) Dual regulation of promoter II- and promoter I $\beta$ -derived cytochrome P450 aromatase transcripts in equine granulosa cells during human chorionic gonadotropin-induced ovulation: a novel model for the study of aromatase promoter switching. *Endocrinology* 140: 4133-4141
31. Carreau S, Genissel C, Bilinska B, Levallet J (1999) Sources of estrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int J Androl* 22: 211-223
32. Sipahutar H, Sourdaire P, Moslemi S, Plainfosse B, Seralini GE (2003) Immunolocalization of aromatase in stallion Leydig cells and seminiferous tubules. *J Histochem Cytochem* 51: 311-318
33. Lemazurier E, Sourdaire P, Nativelle C, Plainfosse B, Seralini G (2001) Aromatase gene expression in the stallion. *Mol Cell Endocrinol* 178: 133-139
34. Aquila S, Sisci D, Gentile M, Middea E, Siciliano L, Ando S (2002) Human ejaculated spermatozoa contain active P450 aromatase. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3385-3390
35. Levallet J, Bilinska B, Mitre H, Genissel C, Fresnel J, Carreau S (1998) Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol Reprod* 58: 919-926
37. Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Silandre D, Delalande C (2004) The promoter(s) of the aromatase gene in male testicular cells. *Reprod Biol* 4: 23-34
38. Zhao Y, Mendelson CR, Simpson ER (1995) Characterization of the sequences of the human *CYP19* (aromatase) gene that mediate regulation by glucocorticoids in adipose stromal cells and fetal hepatocytes. *Mol Endocrinol* 9: 340-349
39. Pauley RJ, Santner SJ, Tait LR, Bright RK, Santen RJ (2000) Regulated *CYP19* aromatase transcription in breast stromal fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 837-846
40. Rubin GL, Duong JH, Clyne CD, Speed CJ, Murata Y, Gong C, Simpson ER (2002) Ligands for the peroxisomal proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor inhibit aromatase cytochrome P450 (*CYP19*) expression mediated by promoter II in human breast adipose. *Endocrinology* 143: 2863-2871
41. Chetrite GS, Cortes-Prieto J, Philippe JC, Wright F, Pasqualini JR (2000) Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 72: 23-27
42. Tekmal RR, Durgam VR (1995) The overexpression of int-5/Aromatase, a novel MMTV integration locus gene, is responsible for D2 mammary tumor cell proliferation. *Cancer Lett* 88: 147-155
43. Yue W, Wang JP, Hamilton CJ, Demers LM, Santen RJ (1998) In situ aromatization enhances breast tumor estradiol levels and cellular proliferation. *Cancer Res* 58: 927-932
44. Chen S, Zhou D, Okubo T, Kao YC, Yang C (1999) Breast tumor aromatase: functional role and transcriptional regulation. *Endocr Relat Cancer* 6: 149-156
45. Santen RJ, Martel J, Hoagland M, Naftolin F, Roa L, Harada N, Hafer L, Zaino R, Santner SJ (1994) Stromal spindle cells contain aromatase in human breast tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 627-632

46. Brodie A, Long B, Lu Q (1998) Aromatase expression in the human breast. *Breast Cancer Res Treat* 49: S85-S91
47. Harada N (1997) Aberrant expression of aromatase in breast cancer tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61: 175-184
48. Chen S, Itoh T, Wu K, Zhou D, Yang C (2003) Transcriptional regulation of aromatase expression in human breast tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83: 93-99
49. Brueggemeier RW, Richards JA, Petrel TA (2003) Aromatase and cytochrome P450: enzymes in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86: 501-507
50. Richards JA, Brueggemeier RW (2003) Prostaglandin E2 regulates aromatase activity and expression in human adipose stromal cells via two distinct receptor subtypes. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2810-2816
51. Zhou D, Chen S (1999) Identification and characterization of a cAMP-responsive element in the region upstream from promoter 1.3 of the human aromatase gene. *Arch Biochem Biophys* 371: 179-190
52. Yang C, Yu B, Zhou D, Chen S (2002) Regulation of aromatase promoter activity in human breast tissue by nuclear receptors. *Oncogene* 21: 2854-2863
53. Sofi M, Young MJ, Papamakarios T, Simpson ER, Clyne CD (2003) Role of CRE-binding protein (CREB) in aromatase expression in breast adipose. *Breast Cancer Res Treat* 79: 399-407
54. Clyne CD, Speed CJ, Zhou J, Simpson ER (2002) Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes. *J Biol Chem* 277: 20591-20597
55. Sebastian S, Takayama K, Shozu M, Bulun SE (2002) Cloning and characterization of a novel endothelial promoter of the human *CYP19* (aromatase P450) gene that is up-regulated in breast cancer tissue. *Mol Endocrinol* 16: 2243-2254
56. Yamada K, Ogawa H, Honda S, Harada N, Okazaki T (1999) AGCM motif protein is involved in placenta-specific expression of human aromatase gene. *J Biol Chem* 274: 32279-32286
57. Knofler M, Saleh L, Bauer S, Vasicek R, Griesinger G, Strohm H, Helmer H, Husslein P (2000) Promoter elements and transcription factors involved in differentiation-dependent human chorionic gonadotropin-alpha messenger ribonucleic acid expression of term villous trophoblasts. *Endocrinology* 141: 3737-3748
58. Richardson BD, Cheng YH, Langland RA, Handwerger S (2001) Differential expression of AP-2gamma and AP-2alpha during human trophoblast differentiation. *Life Sci* 69: 2157-2165
59. Cross JC, Anson-Cartwright L, Scott IC (2002) Transcription factors underlying the development and endocrine functions of the placenta. *Recent Prog Horm Res* 57: 221-234
60. Sun T, Zhao Y, Mangelsdorf DJ, Simpson ER (1998) Characterization of a region upstream of exon 1.1 of the human *CYP19* (aromatase) gene that mediates regulation by retinoids in human choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 139: 1684-1691
61. Stephanou A, Sarlis NJ, Richards R, Handwerger S (1994) Expression of retinoic acid receptor subtypes and cellular retinoic acid binding protein-II mRNAs during differentiation of human trophoblast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 772-780
62. Jiang B, Mendelson CR (2003) USF1 and USF2 mediate inhibition of human trophoblast differentiation and *CYP19* gene expression by Mash-2 and hypoxia. *Mol Cell Biol* 23: 6117-6128
63. Kamat A, Alcorn JL, Kunczt C, Mendelson CR (1998) Characterization of the regulatory regions of the human aromatase (P450<sub>arom</sub>) gene involved in placenta-specific expression. *Mol Endocrinol* 12: 1764-1777
64. Vanselow J, Furbass R, Rehbock F, Klautschek G, Schwerin M (2004) Cattle and sheep use different promoters to direct the expression of the aromatase cytochrome P450 encoding gene, *Cyp19*, during pregnancy. *Domest Anim Endocrinol* 27: 99-114
65. Zhang F, Zhou D, Kao YC, Ye J, Chen S (2002) Expression and purification of a recombinant form of human aromatase from *Escherichia coli*. *Biochem Pharmacol* 64: 1317-1324
66. Kagawa N, Hori H, Waterman MR, Yoshioka S (2004) Characterization of stable human aromatase expressed in *E. coli*. *Steroids* 69: 235-243

## Aromatase – key enzyme of estrogen biosynthesis

Ryszard Milczarek<sup>✉</sup>, Jerzy Klimek

Department of Pharmaceutical Biochemistry, Medical University of Gdańsk, 1 Dębinki St., 80-211 Gdańsk, Poland

✉ e-mail: rysmil@amg.gda.pl

**Key words:** alternative splicing, aromatase, *CYP19*, estrogens, P450<sub>arom</sub>

### ABSTRACT

Estrogens control a large range pivotal life functions as reproductive development and fertility, bone growth and sexual behavior. Aromatase is a key enzyme of estrogen biosynthesis. The property, structure and reaction mechanism of aromatase as well as detailed structure of human aromatase cytochrome P450 gene (*CYP19*) was discussed in this article. It was pointed that unique human *CYP19* gene expression results from presence of many tissue specific promoters and alternative splicing. The molecular mechanism of control aromatase cytochrome P450 gene expression in various species ovaries, testes and human adipose tissue and placenta was discussed in details. Because of a very important role of estrogen in breast cancer a molecular base of aberrant expression *CYP19* gene in breast tumor and adipose tissue proximal to breast tumor and potential possibility of pharmacological silencing of this gene expression was discussed in the article.

Katarzyna Dorota Raczyńska<sup>23</sup>

Halina Augustyniak

Zakład Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

<sup>23</sup>Zakład Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań; e-mail: doracz@amu.edu.pl, tel. (61) 829 27 30

Artykuł otrzymano 11 marca 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 1 kwietnia 2005 r.

**Słowa kluczowe:** motyw PPR, powtórzenia helikalne, białka wiążące RNA, organelle

**Wykaz skrótów:** APC (ang. *anaphase promoting complex*) – kompleks inicjatorowy anafazy; CMS (ang. *cytoplasmic male sterility*) – cytoplazmatyczna męska sterylność; EST (ang. *expressed sequence tag*) – znaczniki sekwencji ulegających ekspresji; LRP (ang. *leucin rich protein*) – białko bogate w reszty leucyny; LRV (ang. *leucin rich variant*) – motyw białkowy bogaty w reszty leucyny; PCMP (ang. *plant combinatorial and modular protein*) – roślinne białka zawierające charakterystyczne motywy sekwencji; PPR (ang. *pentatricopeptide repeat*) – trzydziestopięć-aminokwasowe powtórzenie; ORF (ang. *open reading frame*) – otwarta ramka odczytu; TPR (ang. *tetratricopeptide repeat*) – trzydziestocztero-aminokwasowe powtórzenie; UTR (ang. *untranslated region*) – region mRNA nie ulegający translacji

## STRESZCZENIE

Białka typu PPR należą do dużej rodziny białek wiążących kwasy nukleinowe, głównie zdegenerowanych, 35 aminokwasowych powtórzeń sekwencji, ułożonych tandemowo przynajmniej w jednej parze. Każdy motyw PPR budują dwie  $\alpha$  helisy A i B, a tandemowe powtórzenie kilku motywów prowadzi do powstania superhelisy, która zawiera bruzdę lub tunel będące miejscem wiązania docelowej sekwencji. Białka typu PPR kierowane są głównie do mitochondriów i plastydów, gdzie są przeważnie zaangażowane w procesy potranskrypcyjne i proces translacji. Wśród białek typu PPR znaleziono również tzw. białka „restorery”, przywracające płodność roślin z cechą CMS (ang. *cytoplasmic male sterility*). Białka typu PPR mogą też pełnić funkcję adaptorów dla różnych czynników białkowych oraz oddziaływać z innymi motywami PPR lub z innymi białkami. Geny białek typu PPR znaleziono we wszystkich analizowanych genomach eukariotycznych. Szczególnie rozpowszechnione są w roślinach, gdzie stanowią nawet 1–2% całego DNA.

## WPROWADZENIE

W ostatnich latach dzięki poznaniu sekwencji nowych genomów wykryto wiele genów białek o nieznanym działaniu. Opierając się na podobieństwie budowy, geny tych białek zgrupowano w rodziny, co pozwoliło łatwiej znaleźć ich homologów w genomach innych organizmów [1]. Jedną z takich nowo odkrytych rodzin genów białek jest rodzina PPR [2]. Chociaż pojedyncze geny PPR opisywano wcześniej badając mutanty drożdży i *Neurospora crassa*, to dopiero po pełnym poznaniu sekwencji genomów określono ich liczebność [3,4]. W genomie *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano dotychczas ponad 440 genów kodujących białka zawierające motywy PPR. Stanowią one 1–2% całego DNA tej rośliny [1,2,5].

Geny białek typu PPR rzadko zawierają introny w obrębie sekwencji kodującej. W większości genów, bo około 80%, występuje pojedynczy ekson, a tylko 7% zawiera więcej niż jeden intron. Introny znajdują się zwykle poza strefą powtórzeń, lub występują w genach białek, zawierających motywy odbiegające nieco strukturą od typowego motywu PPR [5,6].

Geny białek typu PPR znaleziono we wszystkich analizowanych genomach eukariotycznych, aczkolwiek w różnej ilości. Są one szczególnie rozpowszechnione wśród roślin wyższych. W genomie *A. thaliana* jest ich na przykład około 70 razy więcej niż w genomie człowieka, a jak wynika z danych uzyskanych dla ryżu, w innych roślinach może ich być znacznie więcej (Tab. 1). Genów tych białek nie wykryto dotychczas w organizmach prokariotycznych, z wyjątkiem pojedynczego białka znalezionej u *Ralstonia solanacearum*. Jego występowanie jest prawdopodobnie spowodowane transferem horyzontalnym genów [2,5,7].

Jak wynika z dotychczasowych danych literaturowych, białka typu PPR należą do grupy białek wiążących kwasy nukleinowe, zwłaszcza RNA; są zaangażowane głównie w procesy potranskrypcyjne, zachodzące w mitochondriach i plastydach. Oprócz białek wykazujących wysokie powinowactwo do RNA, zidentyfikowano też białka PPR wiążące DNA [8,9]. Wśród białek typu PPR znaleziono również tzw. białka ang. „restorery”, przywracające płodność u roślin wykazujących cechę CMS. Analizując mutanty roślinnych białek PPR wykryto, że część z nich wywiera wpływ letalny na rozwój zarodków roślinnych, co wskazuje, że białka te pełnią także istotną funkcję we wczesnym etapie rozwoju rośliny [5, 10]. Sądzi się również, że białka typu PPR uczestniczą w procesie re-dagowania, który wymaga zaangażowania dużej liczby specyficznych czynników, większość z których nie została jeszcze poznana [2,5,11-15].

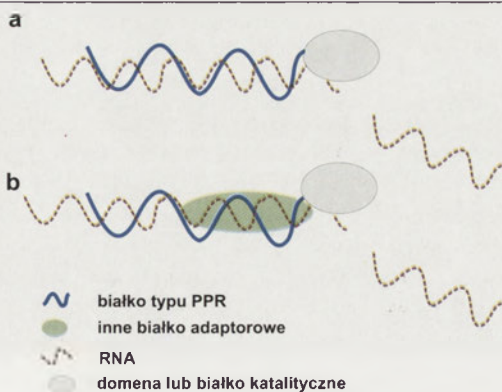
Tabela 1. Liczba białek typu PPR w wybranych organizmach

Organizm	Całkowita liczba genów	Liczba białek typu PPR
<i>Homo sapiens</i>	37,490	6
<i>Drosophila melanogaster</i>	17,087	2
<i>Caenorhabditis elegans</i>	20,673	2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	28,581	470
<i>Oryza sativa</i>	74,385	655
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	4,772	10
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5,010	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6,304	5
<i>Trypanosoma brucei</i>	16,757	19
<i>Ralstonia solanacearum</i>	5,129	1

## CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK TYPU PPR

Nazwa białek typu PPR pochodzi od występowania w nich zdegenerowanych, 35 aminokwasowych powtórzeń, ułożonych tandemowo przynajmniej w jednej parze. Liczba tych motywów sekwencji waha się od 2 do 26 [2]. Białka typu PPR zawierają średnio 642 aminokwasy [5]. W większości z nich na N-końcu występuje motyw sekwencji docelowej kierującej je albo do plastydów (19% białek) albo do mitochondriów (54% białek) [2,5]. Nie znaleziono białka typu PPR zawierającego sekwencję kierującą jednocześnie do obu organelli [5]. Dla części tych białek nie udało się ustalić ich lokalizacji komórkowej ani eksperymentalnie, ani za pomocą metod bioinformatycznych. Przypuszcza się jednak, że bardzo nieliczne białka typu PPR występują w komórkach roślinnych poza organellami [5].

Poziom ekspresji białek typu PPR jest raczej mały, można więc przypuszczać, że ulegają one ekspresji konstytutywnej oraz, że są zaangażowane w powstawanie określonych, specyficznych transkryptów. Większość z tych białek nie zawiera domen katalitycznych, co sugeruje, że mogą one pełnić również funkcję adaptorów dla innych, aktywnie działających czynników. Nie wyklucza się też, że motywy PPR mogą oddziaływać z innymi motywami PPR lub innymi białkami (Rys. 1) [5]. Motywy PPR znaleziono na przykład w N-końcowej domenie polimeraz RNA *Homo sapiens* i *Xenopus laevis*. Sugeruje się, że odpowiadają one za wiązanie się innych czynników białkowych, łącząc w ten sposób proces transkrypcji z procesem translacji [16].



Rysunek 1. Przykłady oddziaływań białek typu PPR a) schemat przedstawia oddziaływanie z cząsteczką RNA, b) oddziaływanie z cząsteczką RNA w obecności dodatkowego czynnika (zmodyfikowano wg [5]).

## CHARAKTERYSTYKA MOTYWU PPR

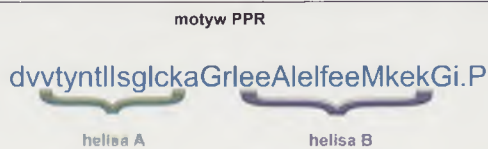
Motyw PPR w białkach budują dwie  $\alpha$  helisy: A i B. Sądzi się, że helisa B odgrywa raczej rolę strukturalną a helisa A uczestniczy w wiązaniu substratu. Tandemowe powtórzenie kilku motywów prowadzi do powstania superhelisy zawierającej bruzdę lub tunel. Reszty aminokwasowe, które „wyściełają” powierzchnię tej bruzdy mają prawie wyłącznie charakter hydrofilowy, natomiast dół bruzdy zawiera aminokwasy o ładunku dodatnim, co jak sądzi się, może być miejscem związania liganda o charakterze hydrofilowym i kwasowym [2]. Szerokość bruzdy utworzonej przez superhelisę wystarcza aby pomieścić pojedynczą cząsteczkę RNA, której rdzeń fosforanowy wiąże się z dodatnio naładowaną powierzchnią dołu bruzdy (Rys. 2) [2].

## CHARAKTERYSTYKA SEKWENCJI WYSTĘPUJĄCYCH POMIĘDZY MOTYWAMI PPR

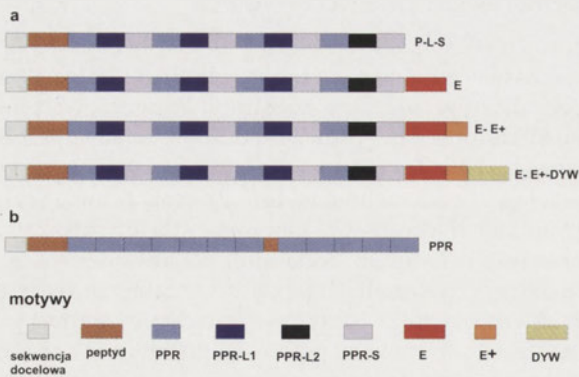
Białka typu PPR zawierają średnio 12 motywów PPR ułożonych często w nieprzerwane tandemowe powtórzenia, obejmujące około dwóch trzecich sekwencji całego białka. Motywy PPR albo przylegają do siebie bezpośrednio, albo też mogą być rozdzielone 60–75 aminokwasowymi sekwencjami. Wśród sekwencji rozdzielających motywy PPR wyodrębniono dwa nowe motywy obejmujące 31 oraz 35 lub 36 aminokwasów. Oba motywy wykazują podobieństwo do motywu PPR i przestrzennie układają się również w postaci dwóch helis  $\alpha$ . Motywy te znaleziono tylko w niektórych, uprzednio zidentyfikowanych białkach typu PPR i nazwano odpowiednio PPR-S (ang. *short*) i PPR-L (ang. *long*). W części białek typu PPR motywy te ułożone są wzdłuż całej sekwencji białkowej w charakterystycznej kolejności: P-L-S. Litera P oznacza w tym przypadku właściwy motyw PPR. Schemat takiego ułożenia motywów znaleziono we wcześniej scharakteryzowanej grupie białek o nazwie AtPCMP. Białka te zakwalifikowane zostały do jednej grupy na podstawie analiz bioinformatycznych ze względu na występowanie w rejonie ich końca karboksylowego wysoce konserwatywnego motywu D-Y-W [1].

## CHARAKTERYSTYKA MOTYWÓW OBECNYCH NA C-KOŃCU BIAŁEK TYPU PPR

Jak wspomniano, N-końcowa domena białek PPR zawiera zazwyczaj sekwencję docelową, kierującą białko albo do chloroplastów lub do mitochondriów. W części C-końcowej białek zidentyfikowano natomiast trzy charakterystyczne motywy sekwencji: motyw E obejmujący 91 aminokwasów, motyw E+ obejmujący 33 aminokwasy i motyw DYW obejmujący 106 aminokwasów. Znaleziono je odpowiednio w 191, 145 i 87 białkach *A. thaliana* [5]. Motywy te, podobnie jak PPR-P i PPR-L, spotykane są jedynie wśród białek typu PPR [1]. Na podkreślenie zasługuje fakt, że zostały one wykryte tylko wśród białek PPR zawierających powtórzenia P-L-S. Ułożone są one w charakterystyczny sposób: 1)



Rysunek 2. Motyw PPR z zaznaczeniem aminokwasów tworzących helisy A i B. Aminokwasy zachowawcze w ewolucji zaznaczono wielkimi literami (zmodyfikowano wg [2]).



**Rysunek 3.** Ułożenie motywów sekwencji w rodzinie białek typu PPR: a) schemat przedstawia kolejność ułożenia motywów towarzyszących głównemu motywowi PPR, b) schemat białka zawierającego tylko główny motyw PPR (zmodyfikowano wg [5]).

motywy w tym samym białku nie tworzą kopii wielokrotnych; 2) motywy obecne w poszczególnym białku zawsze układają się według schematu E-E+-DYW; 3) motyw DYW prawie zawsze poprzedza motyw E-E+, a motyw E+ zawsze poprzedza motyw E. Biorąc pod uwagę te cechy wyodrębniono cztery podrodziny białek typu PPR: 1) białka typu PPR nie zawierające żadnego z trzech C-terminalnych motywów; 2) białka zawierające tylko motyw E; 3) białka zawierające motyw E-E+; 4) białka zawierające motyw E-E+-DYW (Rys. 3) [5].

Motywy obecne na C-końcu białek nie przypominają żadnych dotychczas poznanych motywów sekwencji. Okazało się też, że motywy E i E+ są w znacznym stopniu zdegenerowane, natomiast motyw DYW charakteryzuje duża zachowawczość sekwencji, a występowanie w nim wielu reszt cysteiny i histydyny pozwala przypuszczać, że motyw ten może odgrywać rolę domeny katalitycznej [5]. Ponieważ genów PPR nie stwierdzono dotychczas u prokariotów, wyklucza się możliwość ich pochodzenia od endosymbiotycznego przodka. Prawdopodobnie niewielka grupa genów PPR występująca u wszystkich eukariotów uległa szczególnie dużej amplifikacji u roślin. Dotyczyło by to również genów białek zawierających motywy E, E+, DYW, PPR-L i PPR-S, które występują tylko w królestwie roślin [5,17]. Ciekawe, że białka PPR z motywami P-L-S pojawiły się u mszaków ale nie stwierdzono ich dotychczas u *Chlamydomonas*. O ile sugeruje się, że powtórzenia typu P-L-S mogą być wynikiem mutacji podstawowego motywu PPR, to w przypadku motywów obecnych na C-końcu białek typu PPR nie zaproponowano dotychczas żadnej hipotezy ich pochodzenia.

#### PODOBIENSTWO BIAŁEK TYPU PPR DO BIAŁEK TYPU TPR

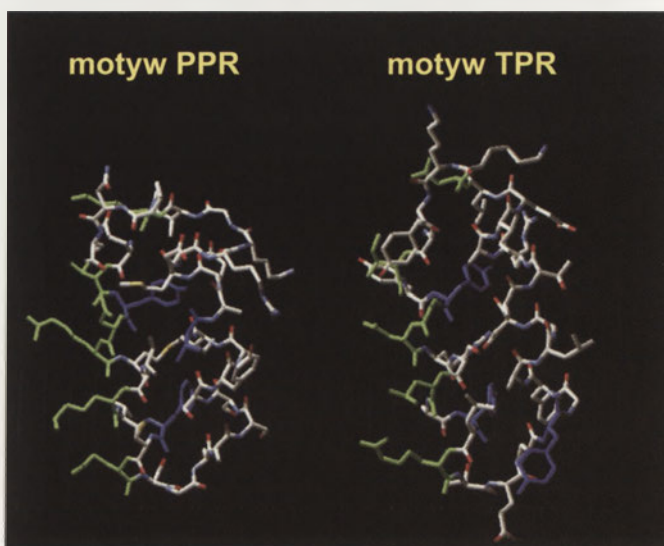
Białka typu PPR należą do rodziny białek zawierających różnej długości powtórzenia helikalne. Mogą one zawierać: motyw Arm o długości 42 aminokwasów [18], motyw HEAT o długości 39 aminokwasów, motyw LRV o długości 24 aminokwasów [19] lub motyw Puf o długości 36 aminokwasów [20,21], względnie motyw TPR o długości 34 aminokwasów [22]. Wszystkie te motywy sekwencji tworzą dwie lub trzy  $\alpha$ -helisy, których powtórzenia mogą tworzyć superhelisy. Motywy HEAT, Arm i TPR uczestniczą w oddziaływaniach

typu białko-białko, natomiast motywy Puf i PPR są odpowiedzialne za oddziaływania typu białko-RNA [2,19]

Białka typu PPR wykazują szczególnie duże podobieństwo do białek typu TPR (ang. *tetratricopeptide repeat*). Różnice między motywami PPR a TPR dotyczą końca helisy B, w miejscu połączenia dwóch tandemowych powtórzeń, oraz zmian w sekwencji aminokwasowej helisy A (Rys. 4).

Białka typu TPR zawierają charakterystyczne, 34-aminokwasowe motywy sekwencji, występujące często w postaci od 2 do 16 tandemowych powtórzeń. Każdy motyw zawiera dwie, antyrównoległe  $\alpha$ -helisy A i B, a tandemowe powtórzenia motywów TPR tworzą prawoskrętną superhelisę co prowadzi do powstania amfipatycznego kanału (bruzdy) który jest miejscem oddziaływania z docelowym białkiem. Reszty aminokwasowe tworzące bruzdę pochodzą od aminokwasów helisy A, natomiast na zewnątrz skierowane są reszty pochodzące zarówno od helisy A jak i B. Pomimo, że motyw TPR jest raczej zdegenerowany, to w jego obrębie znajduje się 8 wysoce zachowawczych aminokwasów, które pełnią istotną rolę w zachowaniu struktury motywu. Są to aminokwasy: W, L, G, Y, A, F, A i P. Mniej zachowawcze reszty aminokwasowe determinują specyficzność oddziaływań międzycząsteczkowych lub wewnątrzcząsteczkowych z białkiem docelowym [23-25].

Białek typu TPR zidentyfikowano dwukrotnie mniej niż białek typu PPR. Występują one w roślinach, u zwierząt, w grzybach i bakteriach – głównie cyjanobakteriach. Są obecne w cytoplazmie, jądrze komórkowym, mitochondriach, plastydach i peroksosomach, gdzie wchodzi w skład kompleksów transportu, zwłaszcza importu, w skład kompleksu APC (ang. *anaphase promoting complex*) kierującego białka do degradacji; mogą też pełnić funkcję chaperonów, regulatorów ekspresji genów, oddziaływać z czynnikami transkrypcyjnymi, uczestniczyć w wycinaniu intronów, fałdowaniu białek, cyklu komórkowym czy neurogeniezie [23,25,26]. Przypuszcza się, że poszczególne motywy TPR



**Rysunek 4.** Modele przestrzennego ułożenia motywów helikalnych w białku PPR i TPR. Kolorem zielonym zaznaczono reszty aminokwasowe odpowiedzialne za oddziaływanie z cząsteczką docelową, natomiast kolorem niebieskim reszty aminokwasów hydrofobowych stabilizujących strukturę motywów (wg [http://www.evry.inra.fr/public/projects/ppr/ppr\_motif.html]).



w danym białku mogą odpowiadać za oddziaływanie z różnymi białkami [24,25].

Niektóre roślinne białka TPR, podobnie jak białka typu PPR uczestniczą w obróbce, stabilizacji transkryptów lub translacji genów organelliowych. Należy do nich białko Nac2 zaangażowane w obróbkę i stabilizację lub translację chloroplastowego transkryptu genu *psbD* [27], czy białko HCF107, które uczestniczy w plastydach *A. thaliana* w aktywacji translacji białek PsbB i PsbH [28]. Białko Mbb1 jest natomiast składnikiem około 300 kDa kompleksu, który w chloroplastach *Chlamydomonas reinhardtii* związany jest z właściwą obróbką pre-mRNA *psbB-psbT-psbH*, oraz stabilizacją i/lub translacją *psbB* [29,30].

#### BIĄŁKA TYPU PPR WYSTĘPUJĄCE W ORGANELLACH

Genom mitochondrialny koduje około 50 białek, a genom chloroplastowy około 100 – 120 białek związanych z utrzymaniem właściwych funkcji organelli, głównie oddychaniem i fotosyntezą. Większość procesów, zwłaszcza procesy potranskrypcyjne takie jak obróbka transkryptów jednostek policistronowych, wycinanie intronów, redagowanie, dojrzewanie 3' i 5' końca transkryptów oraz inicjacja translacji, przeprowadzają białka kodowane jądrowo. Wiele ze zidentyfikowanych dotąd białek jądrowych wchodzi w skład podstawowych kompleksów biorących udział w ekspresji genów, natomiast część uczestniczy tylko w określonych etapach potranskrypcyjnej ekspresji pojedynczych specyficznych ramek odczytu [31-36]. Wśród białek mitochondrialnych i plastydowych, które wiążą się do RNA i kierują ekspresją genów, znajdują się też białka typu PPR.

#### BIĄŁKA TYPU PPR WYSTĘPUJĄCE W MITOCHONDRIACH

Funkcje wielu białek typu PPR występujących w mitochondriach poznano już stosunkowo dobrze. Należy do nich między innymi ludzkie białko LRP130, które koordynuje ekspresję zarówno genów jądrowych jak i mitochondrialnych. Białko to zawiera 11 powtórzeń motywu PPR, analizując mutanty pozbawione kolejnych powtórzeń, wykazano, że wiązanie do RNA może nastąpić już w obecności dwóch, a nawet tylko jednego motywu PPR. Mutacja w genie białka LRP130 wpływa na brak oksydazy cytochromu c, co sugeruje, że białko to może uczestniczyć w dojrzewaniu mitochondrialnych RNA [37]. Homolog białka LRP130 myszy (mLRP130) wykazuje 75% identyczności do białka człowieka i zawiera 9 motywów PPR. Białko mLRP130 wiąże się specyficznie do jednoniciowego rejonu minisatelitarnego DNA bogatego w cytozyny, zwiększając jego stabilność. Jest to jedno z nielicznych doniesień o białkach typu PPR wiążących się do DNA [9]. Białko typu PPR wiążące się do DNA znaleziono również w mitochondriach pszenicy. Białko p63 wykazuje powinowactwo do rejonu promotorowego genu *cox2* i wpływa na zwiększenie transkrypcji tego genu. [8].

Białka typu PPR znaleziono także w mitochondriach grzybów. Na przykład, białko Cya-5 składające się z 1136 aminokwasów jest zaangażowane w potranskrypcyjną ekspresję genu *cox1* w mitochondriach *Neurospora crassa* [4]. Inne białko – PET309, o masie 98 kDa, związane z wewnętrzną błoną mitochondrialną *Saccharomyces cerevisiae*,

oddziałuje z rejonem 5'UTR genu *cox1* i wpływa na jego transkrypcję, stabilność, a także na inicjację translacji dojrzałego transkryptu *cox1* [3,38].

#### BIĄŁKA TYPU PPR WYSTĘPUJĄCE W PLASTYDACH

W plastydach także znaleziono szereg białek typu PPR wykazujących zróżnicowaną funkcję. Jednym z nich jest białko PGR3 występujące w plastydach *Arabidopsis thaliana*, które zawiera aż 27 powtórzeń motywu PPR. W obrębie tych motywów zidentyfikowano trzy substytucje aminokwasowe, a mianowicie: zamianę treoniny w izoleucynę w motywie 15 (mutacja *pgr3-1*) i 12 (mutacja *pgr3-2*) oraz zmianę leucyny w fenyloalaninę w motywie 27 (mutacja *pgr3-3*). W zależności od występujących mutacji zaobserwowano różne zmiany fenotypowe co wskazuje, że w białku PGR3 różne domeny PPR pełnią odmienne funkcje. U roślin z mutacją *pgr3-1* i *pgr3-2* transkrypt *petL-petG*, kodujący dwie małe podjednostki cytochromu *b<sub>f</sub>* staje się niestabilny, co wpływa na obniżenie aktywności cytochromu *b<sub>f</sub>* i ograniczenie transportu elektronów z fotosystemu II do I. U roślin z mutacją *pgr3-1* i *pgr3-3* obniżona jest natomiast ekspresja genu *NdhH*. Białko PGR3 uczestniczy prawdopodobnie także w translacji niektórych genów *ndh* i w procesie potranslacyjnej stabilizacji kompleksu NDH. Białko PGR3 wykazuje więc podwójną funkcję – stabilizuje RNA i aktywuje proces translacji [39]. Podobne własności wykazuje znalezione w kukurydzy białko CRP1 zawierające 13 motywów PPR, z których 12 ułożonych jest tandemowo. Białko CRP1 kierowane jest do plastydów, gdzie zaangażowane jest zarówno w obróbkę genu *petD* jak i aktywację translacji genu *petA* i *petD*. Mutacja w genie *crp1* objawia się brakiem cytochromu *b<sub>f</sub>* i obniżeniem aktywności fotosystemu I [40,41].

Białko P67 wyizolowane z siewek rzodkiewki, wykazuje homologię z białkiem CRP1, zawiera dwa motywy PPR oraz motyw leucynowy przy C-końcu. Białko to wiąże się w plastydach do fragmentu RNA zwanego rBP, obejmującego pierwsze miejsce cięcia pre-rRNA. Rejon rBP tworzy struktury drugorzędowe i jak wykazano eksperymentalnie, zaburzenia struktur pętli w tym rejonie znacznie redukują lub całkowicie uniemożliwiają wiązanie P67. Sugeruje to, że wiązanie białka P67 do rejonu rBP ma charakter oddziaływania białka ze strukturami drugorzędowymi RNA [42].

Niektóre białka typu PPR występują w plastydach w postaci złożonych kompleksów lub dimerów. Przykładem pierwszego typu białek jest białko PPR2, natomiast drugiego – białko HCF152. Białko PPR2 o masie 60 kDa zlokalizowane w stromie chloroplastów kukurydzy wchodzi w skład kompleksu o masie około 550 kDa. PPR2 zawiera 11 tandemowych powtórzeń motywu PPR. U roślin z mutacją w genie *ppr2* pojawia się bielactwo liści, a na poziomie molekularnym obserwuje się brak produktów translacji podstawowych genów plastydowych, na przykład: RUBISCO, podjednostki ATPazy, PsbA, PsbD, PetA. U roślin tych nie obserwuje się również niektórych RNA, jak: 16S rRNA, 5S rRNA, 4.5S rRNA oraz 5' fragmentu 23S rRNA; brak jest także 12 dojrzałych cząsteczek tRNA. We wszystkich tych przypadkach poziom transkryptów pozostaje bez zmian, co wskazuje, że białko PPR2 jest składnikiem aparatu translacyjnego oraz aktywuje rybosomy lub uczestniczy w dojrzewaniu białek rybosomalnych i tRNA w plastydach [43].

Z kolei białko HCF152 występujące w chloroplastach *Arabidopsis thaliana* w postaci homodimeru o masie 180 kDa zawiera 12 powtórzeń motywu PPR. Dziewięć motywów tworzy trzy tandemy. Okazało się, że liczba i budowa motywów PPR determinuje siłę i specyficzność wiązania białka HCF152 do RNA. Bardzo słabe wiązanie występuje już w obecności dwóch powtórzeń PPR, natomiast wraz ze wzrostem ilości motywów wzrasta siła wiązania białko-RNA [44]. Białko HCF152 zaangażowane jest w endonukleolityczne cięcia w obrębie transkrypty *psbH-petB* i odpowiada za usunięcie intronu z *petB* lub stabilizację transkrypty *petB* po splicingu. Mutacja w genie *hcf152* wiąże się z nieprawidłową obróbką pre-mRNA *psbB-psT-psbH-petB-petD* i objawia się brakiem cytochromu *b<sub>f</sub>* [44-46].

## BIAŁKA TYPU PPR U ROŚLIN Z CECHĄ CYTOPLAZMATYCZNEJ MĘSKIEJ STERYLNOŚCI

Cytoplazmatyczna męska sterylność (CMS) jest cechą dziedziczną drogą matczyną. Rośliny z cechą CMS charakteryzują się brakiem lub produkcją nieprawidłowego pyłku, co w konsekwencji prowadzi do sterylności rośliny. W genomie mitochondrialnym tych roślin wykrywa się dodatkowe, chimeryczne ramki odczytu. Za powrót do płodności roślin odpowiadają geny kodowane jądrowo, zwane „restorerami”, które zmieniają ekspresję genów chimerycznych na poziomie RNA lub białka. Opisano już kilka chimerycznych genów odpowiadających za sterylność roślin z cechą CMS, jak również zidentyfikowano odpowiednie geny białek „restorerów”. Część z tych genów koduje białka typu PPR.

W mitochondriach ryżu z cechą CMS, na przykład, obecna jest nowa ramka odczytu *atp6/orf79* obejmująca gen *atp6* oraz dodatkowo 5' fragment tego genu. W obecności genu „restorera” *Rf-1*, transkrypt *atp6/orf79* ulega nieprawidłowej obróbce i jako niedojrzały produkt nie ulega translacji. Nieobecność chimerycznego białka wpływa na przywrócenie płodności rośliny. Gen „restorer” *Rf-1* koduje białko kierowane do mitochondriów, zawierające 16 motywów PPR, z których 14 jest ułożonych tandemowo [47-49].

Za cechę CMS w mitochondriach petunii odpowiedzialny jest chimeryczny gen *pcf*, zawierający fragment genu *atp9* i *cox2*. Okazało się, że u roślin z przywróconą płodnością poziom białka PCF zostaje obniżony około 10-krotnie w porównaniu do roślin sterylnych. Za przywrócenie płodności odpowiada białko *Rf-PPR592*, zawierające 14 powtórzeń motywu PPR. Motywy te ułożone są w dwa tandemowe zbioru — jeden zawierający 3 powtórzenia, a drugi 11 powtórzeń [50].

Cechę CMS typu Ogura i Kosena u rzodkiewki i gatunku *Brassica* wywołują odpowiednio *orf138* i jego krótszy homolog *orf125*, oba zawierające gen *atp9* i *orfB*. U płodnych rewertantów tych roślin zidentyfikowano gen „restorer” *Rfo*. Produktem tego genu jest białko ORF687, zawierające 16 motywów PPR obejmujących trzy grupy tandemowych powtórzeń zlokalizowanych następująco: 5 motywów przy N-końcu, 7 w części centralnej i 4 w rejonie C-końca białka. U roślin z przywróconą płodnością obserwuje się obniżony poziom białka ORF138 i ORF125, co wskazuje, że białko

ORF687 działa na etapie obróbki translacyjnej lub potranslacyjnej [6,51,52].

Jak widać, geny „restorery” ryżu, petunii i rzodkiewki wykazują podobny mechanizm działania — hamują ekspresję genów lub obniżają poziom nieprawidłowych białek związanych z cechą CMS. Motywy PPR w genach „restorerów” wykazują wyższy stopień homologii (w przypadku kilku aminokwasów) w porównaniu do motywów PPR znalezionych w innych białkach. Biorąc pod uwagę fakt, że mechanizm działania większości genów „restorerów” jest podobny, oraz to, że ich konsensusowy motyw PPR jest wysoce zachowawczy, można wnioskować, że geny te stanowią pewną charakterystyczną podgrupę białek typu PPR, co można wykorzystać w poszukiwaniu innych „restorerów”.

## INNE BIAŁKA TYPU PPR

W przypadku części nowo odkrytych białek typu PPR nie określono jeszcze ich lokalizacji komórkowej, a także nie zbadano dokładnie pełnionych przez nie funkcji. Dotyczy to między innymi białka genu *AtC40*, kontrolującego kwitnienie *Arabidopsis thaliana*, które zlokalizowano w liściach tej rośliny. Białko to zawiera 12 tandemowych powtórzeń motywu PPR oraz domenę kinazy serynowo-treoninowej. Przyjmuje się, że funkcją domeny kinazowej może być fosforylacja białka (białek) oddziałującego następnie z domeną PPR [53]. W *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano ostatnio białka zaangażowane w proces embriogenezy. Należy do nich 7 białek typu PPR, które odgrywają istotną rolę w rozwoju zarodków tej rośliny. Mutacje w genach tych białek wywołują różne efekty fenotypowe: od śmierci we wczesnym stadium rozwoju zarodka do drastycznych zmian morfologicznych w późniejszych stadiach rozwoju *A. thaliana* [10].

Z kolei w genomie maszaka EST (ang. *expressed sequence tag*) *Physcomitrella patens* znaleziono 36 EST dla białek typu PPR. Około połowa z nich zawierała motywy kierujące je do mitochondriów, a tylko w czterech zidentyfikowano motywy kierujące do plastydów. Pięć z białek scharakteryzowano i okazało się, że zawierają one od 6 do 14 powtórzeń motywu PPR. Ponieważ nie znaleziono homologów tych białek wśród białek typu PPR ryżu, sądzi się, że są one unikatowe dla mszaków. Dwa z białek, które zlokalizowano w plastydach, a mianowicie: PPR513-10 i PPR566-6, wykazywały zróżnicowaną ekspresję podczas wzrostu rośliny w różnych warunkach świetlnych, co wskazuje, że każde z nich może pełnić odmienną funkcję [54].

Natomiast u *Drosophila melanogaster* wykryto białko BSF, które zawiera 7 kopii motywu PPR, przy czym 3 powtórzenia tandemowe są zlokalizowane przy N-końcu, a 4 rozrzucone w obrębie C-końca. Białko BSF wiąże się specyficznie do struktur drugorzędowych występujących w domenach IV i V rejonu 3' UTR transkrypty genu *bcd* kodującego białko „bicoid” uczestniczące w procesie embriogenezy oraz pełni funkcje stabilizującą mRNA tego genu [55].

## BIAŁKA ZAWIERAJĄCE MOTYW PRZYPOMINAJĄCY PPR

Do białek tego typu należy między innymi białko CRR2 znalezione w *Arabidopsis thaliana*. Białko to należy do rodziny PCMP (ang. *plant combinatorial and modular protein*), liczą-

cej około 200 białek, której sekwencji genów obejmują 1% genomu *A. thaliana* [1]. Białka PCMP zawierają charakterystyczne motywy sekwencji ułożone tandemowo i są blisko spokrewnione z białkami typu PPR. Białko CRR2 kierowane jest do plastydów gdzie odpowiada za właściwą obróbkę cząsteczki pre-mRNA obejmującej geny *rps7* i *ndhB* oraz prawidłową translację *ndhB* [56].

Inne białko, Tbc2, wymagane do inicjacji translacji genu *psbC* *Chlamydomonas reinhardtii*, posiada 9 kopii zdegenerowanego, 38–40 aminokwasowego motywu, który nie jest ani motywu PPR ani TPR. W części C-końcowej tych 9 motywów znajduje się konserwatywna sekwencja PPPEW, która wykazuje homologię z motywami PPR występującymi w białku CRP1 kukurydzy [57].

## UWAGI KOŃCOWE

Białka typu PPR są wyjątkowo dużą i zróżnicowaną rodziną białek wiążących kwasy nukleinowe, głównie RNA. Pomimo, że zebrano już stosunkowo dużo danych o budowie i funkcji tych białek, wciąż wymagane są dodatkowe badania genetyczne, biochemiczne i strukturalne, żeby lepiej określić ich funkcję biologiczną. Konieczne jest między innymi przeprowadzenie większej ilości eksperymentów w celu zidentyfikowania właściwych ligandów, szczególnie *in vivo*, oraz poznanie mechanizmu interakcji pomiędzy białkami typu PPR a mitochondrialnym RNA, jak również lepsze oszacowanie biologicznej roli tych białek w roślinach. W celu określenia wpływu liczby tandemowych powtórzeń motywu PPR na rozmiar tworzącej się bruzdy (tunelu) oraz na rodzaj oddziaływań i ich trwałość z docelowymi cząsteczkami konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych badań strukturalnych. Ważne było by również poznanie roli poszczególnych motywów PPR w tych interakcjach. Z kolei poznanie struktury krystalicznej kompleksów białek typu PPR z docelowymi cząsteczkami oraz przeprowadzenie ukierunkowanej mutagenyzy pozwoliło by także lepiej poznać mechanizm oddziaływania z ligandem oraz otworzyło by możliwość ingerencji w takie oddziaływanie.

## PIŚMIENNICTWO

- Aubourg S, Boudet N, Kreis M, Lecharny A (2000) In *Arabidopsis thaliana*, 1% of the genome codes for a novel protein family unique to plants. *Plant Mol Biol* 42: 603-613
- Small ID, Peeters N (2000) The PPR motif – a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* 25: 46-47
- Manthey GM, McEwen JE (1995) The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14: 4031-4043
- Coffin JW, Dhillon R, Ritzel RG, Nargang FE (1997) The *Neurospora crassa* cya-5 nuclear gene encodes a protein with a region of homology to the *Saccharomyces cerevisiae* PET309 protein and is required in a post-transcriptional step for the expression of the mitochondrially encoded COXI protein. *Curr Genet* 32: 273-280
- Lurin C, Andres C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyere C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Taconnat L, Small I (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16: 2089-2103
- Brown GG, Formanova N, Jin H, Wargachuk R, Dendy C, Patil P, Laforest M, Zhang J, Cheung WY, Landry BS (2003) The radish *Rf6* restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant J* 35: 262-272
- Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, Guzy J, Mangenot S, Arlat M, Billault A, Brottier P, Camus JC, Cattolico L, Chandler M, Choise N, Claudel-Renard C, Cunnac S, Demange N, Gaspin C, Lavie M, Moisan A, Robert C, Saurin W, Schiex T, Siguier P, Thebault P, Whalen M, Wincker P, Levy M, Weissenbach J, Boucher CA (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415: 497-502
- Ikeda TM, Gray MW (1999) Characterization of a DNA-binding protein implicated in transcription in wheat mitochondria. *Mol Cell Biol* 19: 8113-8122
- Tsuchiya N, Fukuda H, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H (2002) LRP130, a protein containing nine pentatricopeptide repeat motifs, interacts with a single-stranded cytosine-rich sequence of mouse hypervariable minisatellite Pc-1. *Eur J Biochem* 269: 2927-2933
- Cushing DA, Forsthoefel NR, Gestaut DR, Vernon DM (2005) *Arabidopsis* emb175 and other ppr knockout mutants reveal essential roles for pentatricopeptide repeat (PPR) proteins in plant embryogenesis. *Planta*, 221: 424-436
- Steinhauser S, Beckert S, Capesius I, Malek O, Knoop V (1999) Plant mitochondrial RNA editing. *J Mol Evol* 48: 303-312
- Tsudzuki T, Wakasugi T, Sugiura M (2001) Comparative analysis of RNA editing sites in higher plant chloroplasts. *J Mol Evol* 53: 327-332
- Chateigner-Boutin AL, Hanson MR (2002) Cross-competition in transgenic chloroplasts expressing single editing sites reveals shared *cis* elements. *Mol Cell Biol* 22: 8448-8456
- Chateigner-Boutin AL, Hanson MR (2003) Developmental co-variation of RNA editing extent of plastid editing sites exhibiting similar *cis*-elements. *Nucleic Acids Res* 31: 2586-2594
- Miyamoto T, Obokata J, Sugiura M (2004) A site-specific factor interacts directly with its cognate RNA editing site in chloroplast transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 48-52
- Rodeheffer MS, Boone BE, Bryan AC, Shadel GS (2001) Nam1p, a protein involved in RNA processing and translation, is coupled to transcription through an interaction with yeast mitochondrial RNA polymerase. *J Biol Chem* 276: 8616-8622
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Huber AH, Nelson WJ, Weis WI (1997) Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90: 871-882
- Groves MR, Barford D (1999) Topological characteristics of helical repeat proteins. *Curr Opin Struct Biol* 9: 383-389
- Edwards TA, Pyle SE, Wharton RP, Aggarwal AK (2001) Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. *Cell* 105: 281-289
- Wang X, McLachlan J, Zamore PD, Hall TM (2002) Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain. *Cell* 110: 501-512
- 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: 1192-1199
- Goebel M, Yanagida M (1991) The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends Biochem Sci* 16: 173-177
- Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci* 20: 257-259
- Blatch GL, Lassle M (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21: 932-939
- Kyrpides NC, Woese CR (1998) Tetratricopeptide-repeat proteins in the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Trends Biochem Sci* 23: 245-247
- Boudreau E, Nickelsen J, Lemaire SD, Ossenbuhl F, Rochaix JD (2000) The *Nac2* gene of *Chlamydomonas* encodes a chloroplast TPR-like protein involved in *psbD* mRNA stability. *EMBO J* 19: 3366-3376
- Felder S, Meierhoff K, Sane AP, Meurer J, Driemel C, Plucken H, Klaff P, Stein B, Bechtold N, Westhoff P (2001) The nucleus-encoded *HCF107* gene of *Arabidopsis* provides a link between intercistronic RNA processing and the accumulation of translation-competent *psbH* transcripts in chloroplasts. *Plant Cell* 13: 2127-2141

29. Vaistij FE, Boudreau E, Lemaire SD, Goldschmidt-Clermont M, Rochaix JD (2000) Characterization of Mbb1, a nucleus-encoded tetratricopeptide-like repeat protein required for expression of the chloroplast *psbB/psbT/psbH* gene cluster in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 14813-14818
30. Vaistij FE, Goldschmidt-Clermont M, Wostrikoff K, Rochaix JD (2000) Stability determinants in the chloroplast *psbB/T/H* mRNAs of *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant J 21: 469-482
31. Barkan A, Goldschmidt-Clermont M (2000) Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. Biochimie 82: 559-572
32. Binder S, Brennicke A (2003) Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 358: 181-188
33. Burger G, Gray MW, Lang BF (2003) Mitochondrial genomes: anything goes. Trends Genet 19: 709-716
34. Nickelsen J (2003) Chloroplast RNA-binding proteins. Curr Genet 43: 392-399
35. Gagliardi D, Gualberto JM (2004) Gene expression in higher plant mitochondria. W: Day DA, Millar H, Whelan J (red) Plant mitochondria: from genome to function. Kluwer Academic Publishers, Great Britain, str. 55-82
36. Sakai A, Takano H, Kuroiwa T (2004) Organelle nuclei in higher plants: structure, composition, function, and evolution. Int Rev Cytol 238: 59-118
37. Mili S, Pinol-Roma S (2003) LRP130, a pentatricopeptide motif protein with a noncanonical RNA-binding domain, is bound *in vivo* to mitochondrial and nuclear RNAs. Mol Cell Biol 23: 4972-4982
38. Manthey GM, Przybyla-Zawislak BD, McEwen JE (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* Pet309 protein is embedded in the mitochondrial inner membrane. Eur J Biochem. 255: 156-161
39. Yamazaki H, Tasaka M, Shikanai T (2004) PPR motifs of the nucleus-encoded factor, PGR3, function in the selective and distinct steps of chloroplast gene expression in *Arabidopsis*. Plant J 38: 152-163
40. Barkan A, Walker M, Nolasco M, Johnson D (1994) A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. EMBO J 13: 3170-3181
41. Fisk DG, Walker MB, Barkan A (1999) Molecular cloning of the maize gene *cp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. EMBO J 18: 2621-2630
42. Lahmy S, Barneche F, Derancourt J, Filipowicz W, Delseny M, Echeverria M (2000) A chloroplastic RNA-binding protein is a new member of the PPR family. FEBS Lett 480: 255-260
43. Williams PM, Barkan A (2003) A chloroplast-localized PPR protein required for plastid ribosome accumulation. Plant J 36: 675-686
44. Nakamura T, Meierhoff K, Westhoff P, Schuster G (2003) RNA-binding properties of HCF152, an *Arabidopsis* PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA. Eur J Biochem 270: 4070-4081
45. Meierhoff K, Felder S, Nakamura T, Bechtold N, Schuster G (2003) HCF152, an *Arabidopsis* RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast *psbB-psbT-psbH-petB-petD* RNAs. Plant Cell. 15: 1480-1495
46. Nakamura T, Schuster G, Sugiura M, Sugita M (2004) Chloroplast RNA-binding and pentatricopeptide repeat proteins. Biochem Soc Trans 32: 571-574
47. Akagi H, Nakamura A, Yokozeki-Misono Y, Inagaki A, Takahashi H, Mori K, Fujimura T (2004) Positional cloning of the rice *Rf-1* gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein. Theor Appl Genet 108: 1449-1457
48. Kazama T, Toriyama K (2003) A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant *atp6* RNA of cytoplasmic male-sterile rice. FEBS Lett 544: 99-102
49. Komori T, Ohta S, Murai N, Takakura Y, Kuraya Y, Suzuki S, Hiei Y, Imaseki H, Nitta N (2004) Map-based cloning of a fertility restorer gene, *Rf-1*, in rice (*Oryza sativa* L.). Plant J 37: 315-325
50. Bentolila S, Alfonso AA, Hanson MR (2002) A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 10887-10892
51. Desloire S, Gherbi H, Laloui W, Marhadour S, Clouet V, Cattolico L, Falentin C, Giancola S, Renard M, Budar F, Small I, Caboche M, Delorme R, Bendahmane A (2003) Identification of the fertility restoration locus, *Rfo*, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. EMBO Rep 4: 588-594
52. Koizuka N, Imai R, Fujimoto H, Hayakawa T, Kimura Y, Kohno-Murase J, Sakai T, Kawasaki S, Imamura J (2003) Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, *orf687*, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile *Kosena radish*. Plant J 34: 407-415
53. Oguchi T, Sage-Ono K, Kamada H, Ono M (2004) Genomic structure of a novel *Arabidopsis* clock-controlled gene, *AtC401*, which encodes a pentatricopeptide repeat protein. Gene 330: 29-37
54. Hattori M, Hasebe M, Sugita M (2004) Identification and characterization of cDNAs encoding pentatricopeptide repeat proteins in the basal land plant, the moss *Physcomitrella patens*. Gene 343: 305-311
55. Mancebo R, Zhou X, Shillinglaw W, Henzel W, Macdonald PM (2001) BSF binds specifically to the bicoid mRNA 3' untranslated region and contributes to stabilization of bicoid mRNA. Mol Cell Biol 21: 3462-3471
56. Hashimoto M, Endo T, Peltier G, Tasaka M, Shikanai T (2003) A nucleus-encoded factor, *CRR2*, is essential for the expression of chloroplast *ndhB* in *Arabidopsis*. Plant J 36: 541-549
57. Auchincloss AH, Zerges W, Perron K, Girard-Bascou J, Rochaix JD (2002) Characterization of *Tbc2*, a nucleus-encoded factor specifically required for translation of the chloroplast *psbC* mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. J Cell Biol 157: 953-962

## Family of pentatricopeptide repeat proteins

Katarzyna Dorota Raczyńska<sup>✉</sup>, Halina Augustyniak

Department of Plant Molecular Biology, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Adam Mickiewicz University, 5 Międzychodzka St., 60-371 Poznań, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: doracz@amu.edu.pl

**Key words:** PPR motif, helical repeats, RNA-binding proteins, organella

### ABSTRACT

PPR proteins belong to large family of nucleic acid binding proteins, mainly RNA-binding proteins. Their name is defined by the presence of so-called pentatricopeptide repeat (PPR), a degenerate 35-aminoacid repeats containing from 2 up to 26 such motifs arrayed in tandem of at least in one pair. PPR motif consists of two  $\alpha$  helices A and B forming a superhelix enclosing a groove or tunnel which is likely to be the ligand-binding site. PPR proteins are targeted mainly to mitochondria and chloroplasts where they are mainly involved in posttranscriptional processes and translation. Among PPR proteins they were also found restorer gene products which restorer pollen fertility. Some PPR proteins play roles as adaptors and partner in protein-protein interaction. PPR protein genes were discovered in all analyzed eukariotic genomes. They are especially abundant in plants.

# Białka przestrzeni międzybłonowej mitochondriów uczestniczące w procesie apoptozy

## STRESZCZENIE

**M**itochondria, obok podstawowej funkcji związanej z transformacją energii zawartej w substratach w cząsteczki ATP, okazały się ośrodkami decyzyjnymi w sygnalizacji apoptotycznej komórek. Organelle te, po otrzymaniu sygnału śmierci ulegają przemianom, w wyniku których uwalniają się z nich białka niezbędne dla przebiegu apoptozy na szlaku mitochondrialnym. Niniejszy artykuł przeglądowy dotyczy charakterystyki i funkcji białek apoptogennych uwalnianych z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, tj. kaspaz, cytochromu c, Smac/DIABLO, proteazy serynowej Omi/HtrA2, AIF oraz endonukleazy G.

## WPROWADZENIE

Apoptoza jest prawidłowym procesem fizjologicznym, genetycznie programowanym, umożliwiającym usuwanie komórek zbędnych podczas różnicowania i organogenezy [1-3]. Proces ten zapewnia eliminację komórek nieprawidłowych, нефункциональных, błędnie umiejscowionych, zainfekowanych czy uszkodzonych [1,4]. Charakteryzuje się niezwykłą różnorodnością zarówno czynników, które indukują proces, jak i szlaków, którymi może przebiegać. Obecnie akceptuje się pogląd, że w komórkach, w których zostaje włączony program apoptozy proces jest inicjowany głównie z udziałem 1) błon komórkowych (z występującymi w nich receptorami śmierci; tzw. ścieżka zewnętrzna; receptorowa) oraz 2) mitochondriów (ścieżka wewnętrzna; mitochondrialna) [4-6]. W mitochondriach komórek apoptotycznych dochodzi do zmian integralności ich błony, co zwykle poprzedza klasyczne symptomy śmierci. Te zmiany dotyczą zarówno błony zewnętrznej (OMM), jak i wewnętrznej (IMM) i prowadzą do spadku potencjału transbłonowego tych organelli ( $\Delta\Psi_m$ ) i uwolnienia do cytosolu umierających komórek białek z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów (IMS) [6,7]. Wciąż rosnąca liczba endogennych, wirusowych, ksenogennych czynników wykazuje działanie na te istotne dla pozyskiwania energii struktury komórkowe, zmieniając ich przepuszczalność. W wielu typach komórek transdukcja sygnału śmierci wiąże się z bezpośrednim działaniem na tzw. megakanały mitochondrialne (MPTP). Stanowią one wielobiałkowe kompleksy budujące zarówno zewnętrzną, jak i wewnętrzną błonę, wśród których część wchodzi w złożone oddziaływania z białkami rodziny Bcl-2, np. Bcl-2, Bax, Bid [8,9]. Członków tej rodziny cechuje aktywność aktywatorów bądź inhibitorów śmierci [3,10,11]. W umierających na drodze apoptozy komórkach otwieranie megakanałów mitochondrialnych przyczynia się m.in. do załamania  $\Delta\Psi_m$ , wpływu z macierzy jonów  $Ca^{2+}$ , zredukowanego poziomu glutationu i uwalniania z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów białek apoptogennych [6,7,12,13]. Białka uwalniane z przestrzeni międzybłonowej to m.in. zymogeny enzymów efektorowych apoptozy – kaspaz (-2, 3, -8, -9) [6,14,15], ich aktywatory (cytochrom c, Smac/DIABLO, niektóre białka szoku termicznego) [16-18] oraz niezależne od kaspaz efekторы śmierci (białko AIF, endonukleaza G) [19,20]. Na wydłużającej się liście białek uwalnianych z przestrzeni międzybłonowej znajduje się zidentyfikowana niedawno proteaza serynowa HtrA2/Omi, uczestnicząca w zależnej i niezależnej od kaspaz apoptozie [21] (Rys. 1). Czynniki uwalniane do cytosolu uczestniczą w przekazywaniu sygnału śmierci lub wiążą się z białkami – inhibitorami apoptozy z rodziny IAP. Ostateczny efekt – realizacja programowanej śmierci lub przekazanie sygnału przeżycia jest wypadkową oddziaływań licznych pro- i antyapoptotycznych składników komórki [7,10,13].

## OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA I FUNKCJE APOPTOGENNYCH BIAŁEK PRZESTRZENI MIĘDZYBŁONOWEJ MITOCHONDRIÓW

Zgodnie z aktualną wiedzą apoptoza może przebiegać z lub bez uczestnictwa proteaz cysteinowych – kaspaz, które przez lata uznawano za główne enzymy uczestniczące w degradacji umierających komórek [22,23]. Udział lub brak w przebiegu programowanej śmierci tych enzymów stał się podstawą podzia-

Jolanta Bednarek

Zofia M. Kiliańska

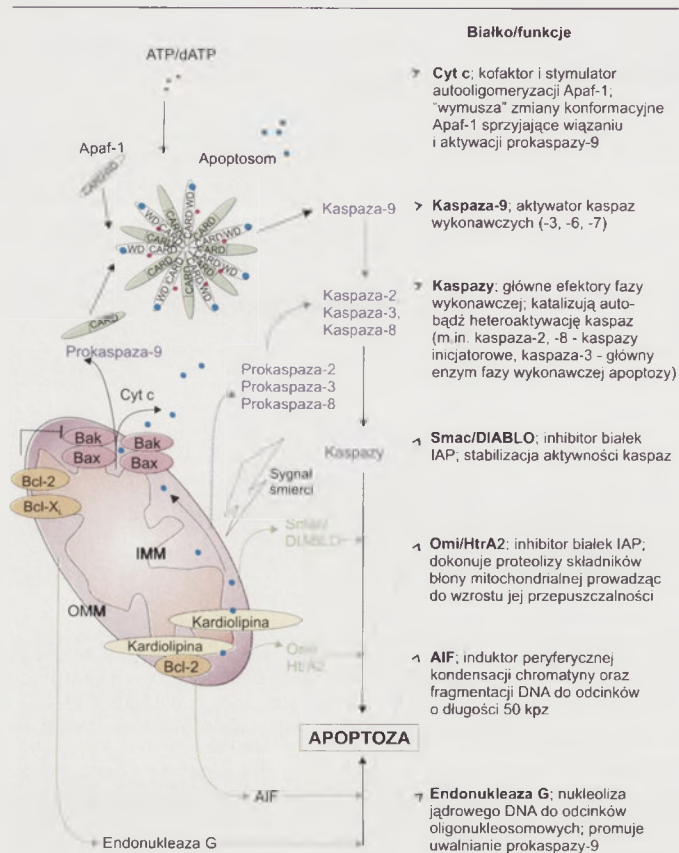
Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego, ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: zkilian@biol.uni.lodz.pl, tel. (42) 635 43 35

Artykuł otrzymano 1 kwietnia 2005 r.  
Artykuł zaakceptowano 12 maja 2005 r.

**Słowa kluczowe:** białka apoptogenne, mitochondria, cytochrom c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF, endonukleaza G

**Wykaz skrótów:** AIF (ang. *apoptosis inducing factor*) – czynnik indukcji apoptozy; Apaf-1 (ang. *apoptosis protease-activating factor-1*) – czynnik 1 aktywujący proteazę w procesie apoptozy; Bcl-2 (ang. *B-cell leukemia/lymphoma-2*) – białko rodziny Bcl-2; CARD (ang. *caspase recruitment domain*) – domena werbunku kaspaz; cyt c – cytochrom c; IAP (ang. *inhibitory apoptosis protein*) – inhibitor apoptozy; IBM (ang. *IAP-binding motif*) – motyw wiążący IAP; IMM (ang. *inner mitochondrial membrane*) – wewnętrzna błona mitochondrialna; IMS (ang. *intermembrane space*) – przestrzeń międzybłonowa mitochondriów; MPTP (ang. *mitochondrial permeability transition pore*) – megakanał mitochondrialny; Omi/HtrA2 (ang. *high temperature requirement protein A2*) – proteaza serynowa; OMM (ang. *outer mitochondrial membrane*) – zewnętrzna błona mitochondrialna; Smac/DIABLO (ang. *second mitochondrial activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI*) – mitochondrialny czynnik 2 aktywujący kaspazy



Rysunek 1. Schemat przedstawiający udział białek przestrzeni międzybłonowej mitochondriów w przebiegu apoptozy.

Łą apoptogennych czynników przestrzeni międzybłonowej mitochondriów na dwie klasy: 1) zależne od kaspaz (cytochrom c, Smac/DIABLO) i 2) niezależne od kaspaz (AIF, endonukleaza G) [7]. W podziale tym nie mieści się proteaza serynowa Omi/HtrA2, której aktywność wykrywa się w komórkach realizujących program apoptotyczny, zarówno bez jak i z udziałem kaspaz [7,21,24].

## KASPAZY

Wszystkie zidentyfikowane dotąd kaspazy syntetyzowane są w komórkach w formie zymogenów o m.c. 30–55 kDa [14,15,22]. Do aktywacji cząsteczek prokaspaz, które zawierają prodomenę oraz podjednostki – większą ( $\alpha$ ; 17–20 kDa) i mniejszą ( $\beta$ ; 9–12 kDa) wymagana jest seria proteolitycznych cięć, w pierwszej kolejności doprowadzających do rozdzielenia podjednostek, a następnie usunięcia prodomeny, po której dochodzi do heterodimeryzacji [5,25]. Aktywne kaspazy funkcjonują jako heterodimery, w których każdy monomer zawiera podjednostkę  $\alpha$  i  $\beta$  oraz konserwatywną sekwencję QACXG w centrum aktywnym. Kaspazy zaangażowane w proces apoptozy dzieli się na dwie grupy: inicjujące (-2, -8, -9, i -10) oraz wykonawcze (-3, -6 i -7) [22,25]. W aktywacji kaspaz inicjujących biorą udział białka adaptorowe, np. Apaf-1 (ang. *apoptosis protease-activating factor-1*) czy FADD (ang. *Fas-associated death domain*). Z kolei aktywne kaspazy inicjujące, uczestniczące w różnych szlakach apoptotycznych, aktywują kaspazy wykonawcze, które dokonują proteolizy licznych białek komórkowych, co prowadzi nieuchronnie do biochemicznych i morfologicz-

nych symptomów apoptozy [2,3,5]. W niniejszym artykule zostaną przedstawione dane związane z udziałem kaspaz w przekazywaniu sygnału na szlaku mitochondrialnym oraz ich mitochondrialną lokalizacją.

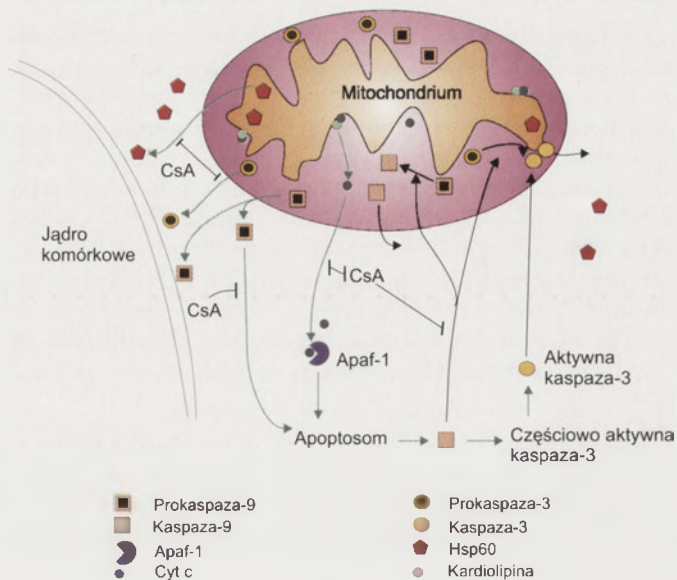
**Udział kaspaz w przekazywaniu sygnału śmierci.** W większości komórek aktywacja kaspaz jest rozważana jako warunek przebiegu apoptozy. Na szlaku mitochondrialnym inicjowanym przez rozmaite bodźce dochodzi do otwarcia megakanałów mitochondrialnych i do spadku  $\Delta\Psi_m$  [3,8,9]. Istotną rolę w uprzepuszczalnieniu błony zewnętrznej mitochondriów odgrywają proapoptotyczne białka rodziny Bcl-2, takie jak: Bax, Bak, Bid, Bim czy Hrk [8,10,11,25]. Uwolnienie z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytosolu białek apoptogennych, w tym przede wszystkim cytochromu c i prokaspazy-9, stwarza możliwość asocjacji z kluczowym aktywatorem prokaspazy-9 – Apaf-1 (z udziałem ATP/dATP) i utworzenia kompleksu, opisywanego jako apoptosom [26,27].

Należy podkreślić, że przekazywanie sygnału śmierci inicjowane pobudzeniem receptorów błonowych (Fas, TNF-R1, TRAIL-R1, TRAIL-2) może przebiegać w niektórych typach komórek z udziałem mitochondriów [1,28,29]. Związanie ligandu z receptorem rozpoczyna szlak receptorowy, na którym sygnał śmierci jest przekazywany na białko adaptorowe (np. FADD), co prowadzi do utworzenia kompleksu DISC (ang. *death inducing signalling complex*), w którym ma miejsce aktywacja prokaspazy-8/-10 (przez autoproteolizę i oligomeryzację). W klasycznym szlaku receptorowym apoptozy aktywna kaspaza-8/-10 (a także inne proteazy np. granzym B) dokonują proteolizy kaspaz wykonawczych (-3, -6, -7), które formują aktywne heterotetramery. Z kolei aktywne kaspazy wykonawcze uczestniczą w proteolitycznej degradacji różnych białek komórkowych, wśród których znajdują się inne kaspazy, co prowadzi do tzw. rozgałęzionej kaskady kaspaz. Uważa się, że występowanie takich kaskad, które przyczyniają się do wzmocnienia sygnalizacji apoptotycznej może być niezbędne dla pełnego przebiegu fazy wykonawczej apoptozy [1,3,22,23]. Stwierdzono, że w pewnych typach komórek kaspaza-8 może dokonywać proteolizy białka Bid. Cięcie przez tę kaspazę uwalnia aktywny polipeptyd, opisywany jako Bid p15 lub tBid (ang. *truncated Bid*) [28]. Zaktywowany tBid może oddziaływać z proapoptotycznymi białkami rodziny Bcl-2 (m.in. Bax, Bak), które po zmianach konformacyjnych mogą jako oligomery włączać się w zewnętrzną błonę mitochondrialną formując pory, przez które wypływają z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów białka apoptogenne, wśród nich cytochrom c i prokaspaza-9 [10,11,30]. Kolejne zdarzenia w przekazie sygnału śmierci, po utworzeniu apoptosomu, bieżą jak na szlaku mitochondrialnym.

**Mitochondrialna lokalizacja kaspaz.** Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie aktywnych kaspaz czy ich zymogenów jest zwykle odmienne, co wydaje się być naturalnym zabezpieczeniem przed przypadkową śmiercią. Potwierdzono, że prokaspazy-2, -3, -8 i -9 mogą występować zarówno w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, jak i cytosolu, bądź organellach komórkowych [14,15,22,31]. Wykazano, że prokaspaza-8 i -9 mogą występować również w jądrach komórkowych [14,15], a prokaspaza-2 – w ją-

drach i aparacie Golgiego [6,32]. W większości komórek po uzyskaniu sygnału śmierci prokaspazy są uwalniane do cytosolu, w którym dochodzi do ich aktywacji. Część aktywnych cząsteczek enzymów przemieszcza się do organelli, w których aktywują inne prokaspazy, proteazy czy endonukleazy (np. DFF/CAD; ang. *DNA fragmentation factor/caspase activated deoxyribonuclease*) [5,22]. Na podkreślenie zasługuje obserwacja zmian lokalizacji aktywnych kaspaz-3 i -9 w fibroblastach człowieka (linia GM701) czy komórkach nowotworowych prostaty (linie LNCaP, PC3), indukowanych do apoptozy różnymi czynnikami [15]. Włączenie do analiz frakcjonowania komórek i techniki Western blot pozwoliło ujawnić, że dojrzałe cząsteczki kaspazy-3 i -9 pojawiają się w mitochondriach po ich translokacji z cytosolu bądź organelli komórkowych. W badanych komórkach odnotowano stosunkowo szybkie uwalnianie do cytosolu prokaspaz-3 i -9, cytochromu c i hsp 60 oraz nieco późniejsze – produktów proteolizy kaspazy-3 (p17 i p20) i kaspazy-9 (p35/37). Przemieszczenie tych apoptogennych czynników w znacznym stopniu hamowała obecność cyklosporyny A – inhibitora otwierania megakanatów. Zaproponowany przez Chandrę i Tanga [15] model ilustruje dynamikę przepływu cząsteczek w umierających komórkach i zakłada możliwość, że dojrzałe kaspazy-9 i -3, po przemieszczeniu z cytosolu do przestrzeni międzybłonowej aktywują mitochondrialne prokaspazy-9 i -3 na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego, biorąc następnie udział w apoptotycznej degradacji białek mitochondrialnych (Rys. 2).

Zaskoczeniem stało się wykrycie lokalizacji prokaspazy-8 w mitochondriach komórek podścieliska u myszy, indukowanych do apoptozy czynnikiem martwicy nowotworu – TNF $\alpha$  [14]. Kaspaza-8 w formie aktywnej (obok kaspazy-10) jest uznanym enzymem w przekazywaniu sygnału śmierci na szlaku receptorowym [1,4]. Mitochondrialną lokalizację prokaspazy-8 w badanym modelu apoptozy potwierdzono stosując znakowanie tego proenzymu koloidalnym złotem i obserwowanie jego rozmieszczenia w mikroskopie elektronowym [14]. Z kolei, analiza submitochondrialnego rozmieszczenia prokaspazy-8 wykazała jej znaczne nagromadzenie w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i nieco niższe w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów oraz w macierzy tych organelli. Śledzenie w czasie przebiegu apoptozy wykazało spadek poziomu ekspresji prokaspazy-8 i cytochromu c (technika Western blot) w mitochondriach z równoczesnym wzrostem immunoreaktywności obydwu białek w cytosolu i pojawieniem się w nim produktów proteolizy prokaspazy-8 (p20). Wprowadzenie do hodowli komórek z zainicjowaną apoptozą cyklosporyny A hamowało w znacznym stopniu wypływ do cytosolu prokaspazy-8, bez zmian w ilości uwalnianego cytochromu c. Biochemicznym potwierdzeniem apoptozy badanych komórek była odnotowana w czasie rozległa fragmentacja DNA. To sygnałne doniesienie o mitochondrialnej lokalizacji prokaspazy-8 wymaga zapewne dodatkowych badań wyjaśniających fizjologiczną potrzebę jej występowania w tych strukturach. Qin i wsp. [14] postulują, że „zamykanie” prokaspazy-8 w mitochondriach może stanowić dla niektórych typów komórek mechanizm zabezpieczający odpowiedni jej poziom, gdy znacznie obniży się jej pula w cytosolu. Badacze ci sugerują, że właśnie prokaspaza-8 może uczestniczyć w dodatkowym szlaku apoptozy, w którym mitochondria



**Rysunek 2.** Hipotetyczny model zmian lokalizacji białek apoptogennych w umierających komórkach (opracowano na podstawie [15]). W mitochondriach komórek apoptotycznych dochodzi do zmian przepuszczalności błon, spadku potencjału transbłonowego ( $\Delta\psi$ ) oraz wypływu z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów proapoptotycznych białek, w tym prokaspaz (-3, -9) i cytochromu c, uwolnionego od oddziaływania z kardiolipiną. Cytochrom c, w obecności ATP/dATP, formuje kompleks z cytosolowym białkiem Apaf-1 – apoptosom, w którym ulega aktywacji prokaspaza-9. Aktywny enzym dokonuje proteolizy kaspaz wykonawczych (np. prokaspaza-3) i innych białek komórkowych (odpowiedź pierwotna oznaczona kolorem czarnym) i brać udział w degradacji białek mitochondrialnych, co prowadzi do dezintegracji funkcji mitochondriów; CsA – cyklosporyna A.

„wzmacniają” sygnał śmierci szlaku receptorowego. Sprawą otwartą pozostaje określenie czynnika wyzwalającego wpływ prokaspazy-8 z mitochondriów komórek stymulowanych do apoptozy TNF $\alpha$ . Jednym z nich może być białko Bid, które w cytosolu ulega proteolizie przez kaspazę-8 i jako tBid przemieszcza się do błon mitochondriów, gdzie może uczestniczyć w formowaniu porów, wspólnie z innymi białkami rodziny Bcl-2, przez które mogą uwalniać się białka proapoptotyczne, w tym prokaspaza-8 [8,11,14].

#### CYTOCHROM C

Dla cytochromu c, powszechnie znanego składnika łańcucha oddechowego, wykryto w połowie lat 90. ubiegłego stulecia inną funkcję, tj. aktywatora cząsteczek kaspaz, co znalazło odbicie w nazwie i symbolu opisującym to białko – Apaf-2 (ang. *apoptosis protease activating factor-2*) [16,26]. Cytochrom c pojawia się w formie aktywnej w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów dzięki katalitycznej aktywności syntazy hemowej, która przyłącza układ hemowy wiązaniami tioestrowymi do apocytochromu c, zsyntetyzowanego na rybosomach z wykorzystaniem jądrowo-kodowanego mRNA [33]. Ten niskocząsteczkowy polipeptyd (104 aa, m.c. 13 kDa) może występować w mitochondriach w formie niezwiązanej – rozpuszczalnej, bądź związanej przez asocjacje z kardiolipiną ich błony wewnętrznej [34]. Kardiolipina, bogaty w nienasycone wyższe kwasy tłuszczowe fosfolipid anionowy, występuje w mitochondriach,

głównie bądź wyłącznie w wewnętrznej błonie [25]. Wiązanie kardiolipiny z cytochromem c odbywa się dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym i hydrofobowym. Obecnie uważa się, że dysocjacja cytochromu c z połączeń z kardiolipiną stanowi krytyczny etap w jego uwalnianiu do cytosolu podczas apoptozy [34-36]. Wykazano, że w cząstkach submitochondrialnych komórek serca wołu eksponowanych na działanie reaktywnych form tlenu, powstających podczas mitochondrialnego utleniania bursztynianu w obecności antymycyny A, dochodzi do dysocjacji z tych struktur cytochromu c z równoczesną utratą kardiolipiny [36]. Zjawisko to było znoszone w obecności dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy. Dysocjacja hemoproteiny z tych struktur wydaje się być spowodowana peroksydacją kardiolipiny.

**Rola cytochromu c w sygnalizacji apoptotycznej.** Molekularny mechanizm odpowiedzialny za przemieszczenie cytochromu c z mitochondriów do cytosolu podczas apoptozy wciąż pozostaje w sferze hipotez [6]. W wielu typach umierających komórek, uwalnianie opisywanej hemoproteiny z mitochondriów, jest zjawiskiem towarzyszącym otwieraniu megakanałów mitochondrialnych – MPTP i załamaniu się  $\Delta\Psi_m$  [8,12,25]. Ostatnio doniesiono, że w komórkach HeLa i CEM, indukowanych do apoptozy staurosporyną lub promieniowaniem UVB przemieszczenie cytochromu c do cytosolu jest zjawiskiem poprzedzającym bądź współwystępującym na etapie aktywacji prokaspazy-3, nie wymaga spadku  $\Delta\Psi_m$  i jest obserwowane zanim wystąpią zmiany morfologiczne typowe dla śmierci programowanej [33]. Uwalnianie cytochromu c z mitochondriów komórek apoptotycznych może przebiegać na drodze zależnej i niezależnej od  $Ca^{2+}$  [6,25]. W przypadku pierwszym duże stężenie tych jonów promuje otwieranie megakanału, a uprzepuszczenie wewnętrznej błony mitochondrialnej przyczynia się do pęcznienia macierzy mitochondriów, rozerwania zewnętrznej błony mitochondrialnej i wypływu tej hemoproteiny i innych białek apoptogennych. Z kolei, niezależne od  $Ca^{2+}$ , uwalnianie cytochromu c jest precyzyjnie kontrolowane przez białka rodziny Bcl-2, główne regulatory szlaku mitochondrialnego apoptozy [6,8,11,37]. Udowodniono, że w umierających komórkach proapoptotyczne białka tej rodziny (np. Bax, Bak) ulegają translokacji z cytosolu do zewnętrznej błony mitochondrialnej, formując w niej pory [8,11,30]. Od niedawna wiadomo, że tBid jest istotny dla tworzenia porów przez białka Bax i Bak, przez które mogą wypływać z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów cytochrom c i inne apoptogenne białka [10,11]. Ponadto wykazano, że polipeptydy Bax i Bak mogą wiązać się z poryną, opisywaną symbolem VDAC (ang. *voltage-dependent anion channel*) współuczestnicząc w formowaniu megakanałów mitochondrialnych, podczas gdy antyapoptotyczne białka rodziny Bcl-2 – Bcl- $X_l$  i Bcl-2 blokują takie oddziaływania [37]. Odnotowano, że inhibitor apoptozy – Bcl-2 blokuje megakanał mitochondrialny i wypływ cytochromu c [10,12,25]. Wyniki badań laboratorium Orreniusa [6,25,34] wykazały, że uwalnianie cytochromu c z mitochondriów stanowi wczesne wydarzenie w transdukcji sygnału apoptotycznego i przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie dochodzi do uwolnienia luźno związanego z mitochondriami cytochromu c jako wynik zmiany siły jonowej, zmian gęstości ładunku na powierzchni lub pH tych organelli. Natomiast w drugim – ma miejsce oksydacja lipidów, głównie

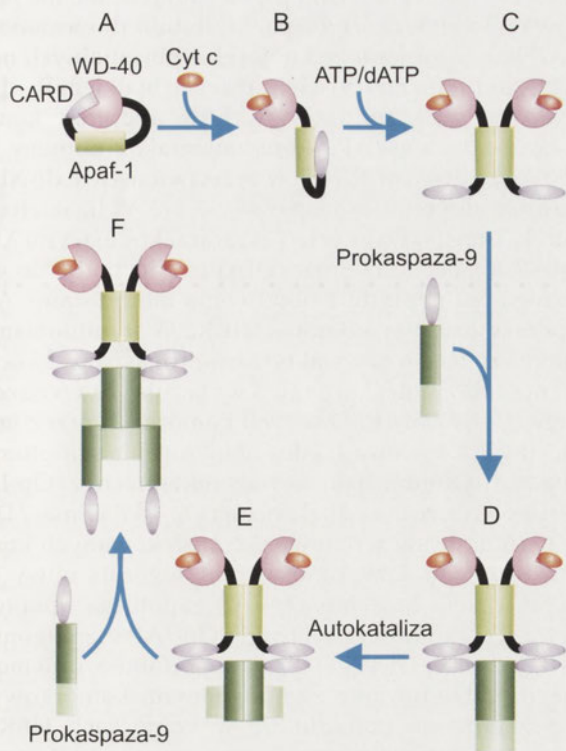
kardiolipiny, od której oddysocjowuje cytochrom c. Odlączenie luźno związanego cytochromu c oraz uprzepuszczenie zewnętrznej błony mitochondrialnej przez oligomery proapoptotycznego białka Bax pozwala na uwolnienie hemoproteiny do cytosolu [34]. Okazało się, że kardiolipina może wiązać się bezpośrednio z innym promującym śmierć białkiem – aktywną formą tBid [38]. Translokacja cytochromu c do cytosolu przebiega zwykle stopniowo, bez istotnych zakłóceń energetyki, gdyż umierające komórki wymagają ATP do realizacji programu śmierci.

W komórkach ssaków ulegających apoptozie uwolnienie cytochromu c inicjuje formowanie multimerycznego kompleksu – apoptosomu [3,26,27], w skład którego wchodzi cząsteczki białka adaptorowego Apaf-1. Zgodnie z hipotetycznym modelem tworzenia apoptosomu zaproponowanym ostatnio przez Hilla i wsp. [27] wiązanie cytochromu c do Apaf-1 „wymusza” bardziej otwartą konformację białka adaptorowego przez przemieszczenie jego domeny CARD (ang. *caspase recruitment domain*). Natomiast energia z hydrolizy dATP/ATP jest wykorzystywana do utworzenia mniej elastycznej, zamkniętej konformacji Apaf-1 z wyeksponowaną domeną CARD (Rys. 3). Cytochrom c oddziałuje z powtórzoną 12-13 razy sekwencją WD-40, obecną na C-końcu każdej z 7 cząsteczek Apaf-1 [27]. Wchodzące w skład motywu WD-40 dwie struktury  $\beta$  pełnią funkcję inhibitora, zamykając w swoim wnętrzu domenę CARD, co uniemożliwia oddziaływanie prokaspazy-9 z rdzeniem apoptosomu, lub po związaniu cytochromu c i przyjęciu otwartej konformacji z domeną CARD prokaspazy-9 [27]. Po oligomeryzacji Apaf-1 i przyłączeniu prokaspazy-9 przez jej domenę CARD dochodzi do aktywacji tej proteazy cysteinowej, enzymu inicjującego zdarzenia proteolityczne związane z aktywacją innych kaspaz (-3, -6, -7), bądź innych enzymów proteolitycznych czy nukleolitycznych (kaspaza-3), co wyzwała apoptotyczną degradację komórek [3-6].

Wykazano, że [39] cytochrom c wiąże się do Apaf-1, przy czym efektywność tego procesu w dużym stopniu zależna jest od stężenia jonów  $K^+$  w komórce. Fizjologiczne stężenie tych kationów blokuje formowanie apoptosomu, prawdopodobnie w wyniku współzawodnictwa o to samo miejsce wiązania w Apaf-1, zabezpieczając tym samym komórkę przed przypadkowym uruchomieniem apoptozy, spowodowanym niewielką ilością cytochromu c w cytosolu.

Należy wspomnieć, że kaspazy mogą być aktywowane bez udziału cytochromu c i Apaf-1, jak to opisywano w przypadku usuwania z organizmu limfocytów linii B, po pokonanej infekcji. W tym procesie istotną funkcję przejmują cytotoksyczne limfocyty T [40]. Podobnie, aktywacją cząsteczek kaspaz w ulegających apoptozie komórkach *C. elegans*, które zawierają homolog białka Apaf-1 – CED4, pozbawiony domeny WD-40, odbywa się również bez cytochromu c [41]. Poziom cytochromu c, niezbędny do przebiegu apoptozy na szlaku mitochondrialnym jest prawdopodobnie różny w zależności od rodzaju komórki, typu i siły sygnału śmierci. Wiadomo, że apoptoza na szlaku mitochondrialnym zachodzi również w dojrzałych neutrofilach, w których w trakcie różnicowania dochodzi do znaczącej utraty tego białka. Pomimo niezwykle niskiej zawartości cytochromu c w mitochondriach neutrofilów (stwierdza się





**Rysunek 3.** Hipotetyczny model formowania apoptosomu i aktywacji prokaspazy-9 (na podstawie [27]). W warunkach fizjologicznych czynnik Apaf-1 występuje w formie niezdolnej do interakcji z prokaspazą-9. Obecny w cząsteczce Apaf-1 motyw WD-40 „zamyka” w swoim wnętrzu domenę CARD, znajdującą się w N-końcu polipeptydu, uniemożliwiając tym samym jej oddziaływanie z prokaspazą-9 (A). Przyłączenie cytochromu c do Apaf-1 uwalnia domenę CARD z oddziaływania z regionem inhibitorowym i ułatwia przyjęcie bardziej „otwartej” konformacji (B). Po związaniu ATP/dATP Apaf-1 ulega oligomeryzacji i przyjmuje mniej elastyczną postać z wyeksponowaną domeną CARD (C), umożliwiając interakcję z prokaspazą-9 (D). W powstałym kompleksie dochodzi do autokatalitycznej proteolizy (cięcie po Asp<sup>15</sup>) w obrębie cząsteczki tej prokaspazy, rozszczepienia mniejszej i większej podjednostki enzymu i jego pełnej aktywacji (E). Do apoptosomu przyłącza się kolejna cząsteczka prokaspazy-9 (F).

tylko 5–6 mitochondriów w komórce), obserwuje się aktywację prokaspazy-9. Wyniki te sugerują, że neutrofile mają zmniejszone wymagania w stosunku do cytochromu c. Możliwe, że niska zawartość tej hemoproteiny w opisywanych komórkach jest częściowo kompensowana przez wysoką ekspresję białka adaptorowego Apaf-1 [42].

#### POLIPEPTYDY REGULUJĄCE BIAŁKOWE INHIBITORY APOPTOZY

Powstanie apoptosomu na szlaku mitochondrialnym nie zawsze wyzwała kaskadową reakcję kaspaz wiodącą do śmierci komórek. Okazało się, że bakulowirusy, bezkręgowce i kręgowce syntetyzują białka o aktywności inhibitorów apoptozy – IAP [3,43–45]. Białka te reprezentują cytosolowe czynniki, które zapobiegają aktywacji prokaspaz i hamują działanie dojrzałych kaspaz [7]. Ich antyapoptotyczna funkcja polega nie tylko na interakcji z kaspazami, ale również z białkami adaptorowymi, np. TRAF (ang. *TNF-R associated factor*) czy białkami o cechach inhibitorów ich aktywności [3,46]. Oddziaływanie c-IAP1 i/lub c-IAP2 z TRAF powoduje zahamowanie apoptozy indukowanej cytokiną TNF na szlaku sygnalizacyjnym angażującym czynnik transkrypcyjny NFκB [45]. Z kolei aktywacja NFκB indukuje ekspre-

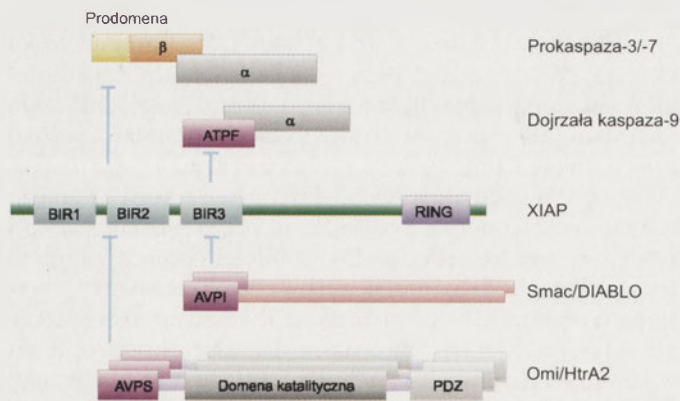
sję tzw. genów przeżycia, prowadząc do wytworzenia dodatniego sprzężenia zwrotnego.

Białka IAP buduje od 150 do 1500 aminokwasów [3,43,45]. W ich cząsteczkach występują dwa rodzaje motywów sekwencyjnych, tj. konserwatywna domena BIR (ang. *baculoviral IAP-like repeat*) o długości 65–80 aminokwasów, oraz domena RING (ang. *really interesting new gene*), usytuowane odpowiednio na N- i C-końcach. Domena BIR może występować samodzielnie [bądź w powtórzeniach (do 3)] i łączy się z RING, czy kolejnymi BIR za pomocą fragmentów o różnej liczbie aminokwasów. W większości IAP występuje motyw RING o naturze palca cynkowego; cechuje go aktywność ligazy ubikwityny E3. Dotychczas opisano w komórkach człowieka 8 członków tej rodziny: NAIP (ang. *neuronal apoptosis inhibitory protein*), c-IAP1, c-IAP2, XIAP (ang. *X-chromosome linked inhibitor of apoptosis*), surwiwina, apollon, liwina i Ts-IAP (ang. *testis specific IAP*) [44,45,47]. Najefektywniejszy i najlepiej poznany wśród nich inhibitor – białko XIAP (497aa) zawiera 3 domeny BIR i może hamować aktywność kaspazy-9 (poziom apoptosomu) i kaspaz wykonawczych (-3, -7) [3,29,45]. Złożony mechanizm regulacji aktywności kaspaz u ssaków został, przynajmniej częściowo, wyjaśniony dzięki identyfikacji białek wiążących IAP, tj. białka Smac myszy i jego ortologa w komórkach człowieka – DIABLO [17,48] oraz proteazy serynowej Omi/HtrA2 [21]. Proapoptotyczne działanie białek wiążących IAP polega na interakcji N-końca ich cząsteczek z domeną BIR inhibitorów i uniemożliwianiu oddziaływania IAP z kaspazami (Rys. 4). Występujące w mitochondriach komórek ssaków białko Smac/DIABLO odgrywa podobną rolę do zidentyfikowanych pierwotnie u *D. melanogaster* cytosolowych polipeptydów Reaper, Grim, HID i Sickie [44,47]. Na N-końcu łańcucha białek antagonizujących funkcje IAP opisano motyw IBM (ang. *IAP-binding motif*), zawierający aminokwasy: Ala-Val-Pro-Ile (AVPI), rozpoznający hydrofobowe rowki w BIR. Podobny motyw – Ala-Thr-Pro-Phe (ATPF) znajduje się w małej podjednostce kaspazy-9, stąd dochodzi do współzawodnictwa między tą kaspazą i Smac/DIABLO o miejsce wiązania z IAP [3,7,48].

**Białko Smac/DIABLO.** Prekursorowa forma Smac/DIABLO (239 aa) po biosyntezie na rybosomach ulega translokacji z cytosolu do przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, gdzie traci sekwencję lokalizacji mitochondrialnej – MLS (55 aa); następuje wówczas odsłonięcie motywu – AVPI, obecnego tylko w dłuższej formie białka (tzw. formie L) [17]. Podczas apoptozy białko Smac/DIABLO-L uwalniane jest wraz z innymi czynnikami do cytoplazmy, gdzie oddziałuje z IAP i zapobiega hamowaniu aktywacji prokaspazy-3 i -9 [48]. Przemieszczanie Smac/DIABLO do cytosolu regulowane jest przez białka z rodziny Bcl-2 [44,49].

#### MECHANIZM DZIAŁANIA BIAŁKO Smac/DIABLO PODCZAS APOPTOZY

Cząsteczki Smac/DIABLO oddziałują z IAP (np. XIAP, c-IAP1, c-IAP2, surwiwina) wyłącznie w formie homodimerów. Monomery o m.c. 21 kDa zawierają 3 α helisy (H1-H3) [44,50]. Aktywne białko tworzy stabilne kompleksy z BIR2 i BIR3 inhibitora XIAP; nie oddziałuje natomiast z jego domeną BIR1. Mutacja punktowa (Phe→Asp) w obszarze za-



**Rysunek 4.** Mechanizm działania XIAP i białek antagonizujących jego funkcje (opracowano na podstawie [3,5,29,44,51-53]). W żywych komórkach białko XIAP oddziałuje z obecnymi w cytosolu kaspazami hamując dojrzewanie prokaspaz -3 i -7 oraz aktywację dojrzałej kaspazy-9. W wiązaniu uczestniczą odpowiednio domeny: BIR2 wraz z poprzedzającym go regionem łącznikowym – w przypadku wykonawczych prokaspaz-3 i -7 lub BIR3 – z inicjatorową kaspazą-9. Podczas apoptozy uwolnione z mitochondriów białko Smac/DIABLO i Omi/HtrA2 przy udziale motywu IBM, obecnego w N-końcu ich cząsteczek, wiążą się z domenami BIR białka XIAP znosząc jego hamowanie. AVPI (Ala-Val-Pro-Ile) i AVPS (Ala-Val-Pro-Ser) – aminokwasy budujące motyw IBM odpowiednio w Smac/DIABLO i Omi/HtrA2 oraz ATPF (Ala-Thr-Pro-Phe) – podobny do IBM motyw wiążący BIR3, występujący w mniejszej podjednostce kaspazy-9.

angażowanym w dimeryzację polipeptydu zachowuje jego zdolność do oddziaływania z BIR3, natomiast uniemożliwia wiązanie formy monomerycznej z BIR2 [50]. Stąd monomery Smac/DIABLO nie znoszą hamowania przez XIAP aktywności kaspazy-3, ponieważ odcinek w bezpośrednim sąsiedztwie BIR2 XIAP uczestniczy w wiązaniu i hamowaniu tej kaspazy. N-końcowy motyw Smac/DIABLO – AVPI może wchodzić w interakcję np. z domeną BIR3 inhibitora XIAP dzięki rozpoznaniu powierzchni rowka tej domeny i wiązaniom wodorowym z alaniną tej domeny. Podstawienie w Smac/DIABLO Ala<sup>1</sup> innym aminokwasem (z wyjątkiem Gly) stwarza zawadę przestrzenną dla oddziaływań z inhibitorami apoptozy i utratę jego funkcji [29]. Szczegóły oddziaływań krytycznych dla hamowania BIR białka XIAP przez Smac/DIABLO, a także hamowania aktywności kaspaz przez XIAP omówiono szeroko w pracach oryginalnych [46,48] oraz w opracowaniach w języku polskim [3,49]. Równoczesna aktywacja kaspaz i uwolnienie Smac/DIABLO są niezbędne do przebiegu apoptozy. Polipeptyd Smac/DIABLO, poza oddziaływaniem z inhibitorami apoptozy z rodziny IAP wiąże się również z kaspazami, dodatkowo je stabilizuje, zapewniając nieodwracalność rozpoczętego procesu. Interakcja Smac/DIABLO z IAP uniemożliwia przyłączenie inhibitora apoptozy do kaspazy-9. Wyniki badań ujawniły, że niezwykle ważny w przepływie sygnału śmierci jest stosunek pomiędzy kompleksami DIABLO/XIAP i kaspaza-9/XIAP. Im jest on wyższy, tym większe jest prawdopodobieństwo wejścia komórki na drogę śmierci [44].

W niektórych komórkach postuluje się funkcjonowanie innego mechanizmu ograniczającego ich śmierć, związanego z unieszkodliwieniem wiążącego IAP białka Smac/DIABLO. W genomach bakulowirusów *Orygia pseudotsugata* i *Cydia pomonella* wykryto białka, opisywane odpowiednio symbolami Op-IAP i Cp-IAP, których

ekspresja ochrania komórki przed śmiercią, ale nie przez hamowanie aktywności kaspaz. Ostatnio doniesiono, że Op-IAP hamuje apoptozę komórek embrjonalnych nerki HEK293, indukowaną po ich transfekcji białkiem Bax [47]. Okazało się, że w indukowanych do apoptozy komórkach cząsteczki Op-IAP, które zawierają 2 domeny BIR i pojedynczą domenę RING, w przeciwieństwie do XIAP, nie hamują aktywności kaspazy-9, -7 i -3. W lisatach tych komórek, transfekowanych wektorami kodującymi XIAP i Op-IAP w obecności Smac/DIABLO dochodzi do wiązania tego polipeptydu z obydwoma inhibitorami. Analiza przeżywalności komórek HEK293 stymulowanych do apoptozy Bax, a także aktywacji prokaspazy-3 i ocena aktywności dojrzałej kaspazy-3 wykazała, że wyciszenie ekspresji Smac/DIABLO w tych komórkach przez interferencyjny RNA prowadzi do zablokowania symptomów apoptozy, podobnie jak w transfektantach z Op-IAP. Z kolei, równoczesna nadekspresja Op-IAP i Smac/DIABLO, zachowywała wrażliwość transfekowanych komórek na apoptozę. Uzyskane wyniki sugerują nowy mechanizm, dzięki któremu Op-IAP zapobiega apoptozie opisywanych komórek. Wiązanie Op-IAP z antagonizującym go Smac/DIABLO prawdopodobnie uniemożliwia jego oddziaływanie z endogennymi komórkowymi IAP. Stwierdzono ponadto, że w komórkach HEK293 transfekowanych wektorem kodującym Op-IAP, pozbawionym domeny RING o aktywności ligazy ubikwityny E3, dochodzi do zaniku aktywacji prokaspazy-3, spadku aktywności kaspazy-3, a badane komórki cechuje wysoka przeżywalność. W takich transfektantach odnotowano utratę zdolności ubikwitylacji białka Smac/DIABLO. Wydaje się, że związana z Op-IAP aktywność ligazy ubikwityny E3 może degradować Smac/DIABLO, co chroni komórki przed apoptozą. Podobny mechanizm prawdopodobnie funkcjonuje w komórkach *D. melanogaster*, w których Op-IAP wiąże się z homologami Smac/DIABLO – Hid, Reaper i Grim [43]. Te ciekawe obserwacje, wymagające dalszych badań wskazują, że niektóre białka IAP mogą ochraniać komórki przed apoptozą poprzez unieszkodliwienie Smac/DIABLO na wczesnym etapie apoptozy [47].

**Proteaza Omi/HtrA2.** Mitochondrialna proteaza serynowa Omi/HtrA2 wykazuje podobieństwa w sekwencji pierwszorzędowej do bakteryjnego polipeptydu HtrA/DegP o cechach proteazy indukowanej temperaturą [21]. Proteaza ta jest syntetyzowana jako prekursor o m.c. 49/50 kDa (458 aa), zawierający N-końcowy (133 aa) sygnał lokalizacji mitochondrialnej. Po odcięciu tej sekwencji powstaje dojrzały enzym o m.c. 36/37 kDa. Prekursor Omi/HtrA2 zawiera istotne dla jego funkcji domeny, tj. transbłonową (105-121 aa), katalityczną (182-330 aa) oraz regulatorową – PDZ (390-445 aa) [51]. Obecność domeny PDZ (nazwa pochodzi od symboli pierwszych liter białek, w których ją zidentyfikowano, tj. PSD95, DlgA i ZO1) opisano w białkach wielu organizmów od bakterii do *Eukaryota*. W funkcjonalnym enzymie występuje trimeryczna struktura w kształcie piramidy z dwiema skierowanymi do wewnątrz C-końcowymi domenami PDZ, osłaniającymi jego centrum aktywne, zaangażowanymi w specyficzne oddziaływania białko-białko [21,52,53]. Rozpoznanie substratu wywołuje zmiany konformacyjne w obrębie poli-

-peptydu, które prowadzą do ekspozycji miejsca wiązania substratu i cięcia go [24].

Wykryty u *Prokaryota* czynnik HtrA/DegP funkcjonuje w temperaturze fizjologicznej jako białko opiekuńcze, a w podwyższonej – ujawnia swą katalityczną aktywność i dokonuje proteolizy nieprawidłowo zwiniętych białek [21]. W procesie tym uczestniczy wspomniana już domena PDZ. Podobieństwo budowy białka człowieka i bakterii sugeruje analogię ich funkcji. Przypuszcza się, że Omi/HtrA2 może u ssaków pełnić rolę „przełącznika”, który w warunkach stresu (ciepłnego czy oksydacyjnego) działa ochronnie na komórkę lub kieruje ją na drogę apoptozy [13,52].

#### FUNKCJE Omi/HtrA2 W SYGNALIZACJI APOPTOTYCZNEJ

Uwolniona z mitochondriów, pod wpływem induktorów apoptozy proteaza Omi/HtrA2, wchodzi w interakcje z cytosolowym białkiem XIAP, umożliwiając aktywację niezbędnych do przebiegu apoptozy kaspaz [21,44,51]. HtrA2 silniej oddziałuje z domeną BIR2 niż BIR3, co może zaburzać interakcje IAP-kaspaza-3 lub IAP-kaspaza-7 [52]. W tym oddziaływaniu uczestniczy motyw IBM – AVPA lub AVPS, odpowiednio w enzymie wydzielonym z komórek myszy i człowieka [7,53]. Mutacja w segmencie genu kodującym N-końcówką resztę Ala funkcjonalnego Omi/HtrA2 uniemożliwia jego wiązanie z XIAP *in vitro* i przeciwdziała uwalnianiu kaspaz z kompleksu IAP-kaspaza; jednakże nie jest to jednoznaczne z zablokowaniem apoptozy [44]. Omi/HtrA2 pełni proapoptotyczną rolę jako inhibitor XIAP oraz proteaza serynowa [51]. Wyniki doświadczeń genetycznych wykazały, że równoczesna mutacja genu *htrA2* w odcinku kodującym Ser<sup>306</sup> w centrum aktywnym oraz Ala<sup>1</sup> – w domenie oddziałującej z IAP, pozbawia enzym zdolności apoptogennej. Natomiast okazało się, że zmiana tylko w jednym z tych miejsc nie znosi całkowicie jego proapoptotycznej aktywności [52]. Dane te sugerują, że proteazowa aktywność Omi/HtrA2 jest również odpowiedzialna za aktywację kaspaz. Suzuki i wsp. [51] opublikowali wyniki doświadczeń zmierzających do wyjaśnienia czy/w jaki sposób dochodzi do aktywacji kaspaz bez udziału regionu wiążącego IAP-IBM. W opinii cytowanych badaczy Omi/HtrA2, albo dokonuje cięcia białek IAP (z wyjątkiem surwiwiny), powodując ich inaktywację, albo przeprowadza proteolizę bliżej niezidentyfikowanych substratów, co prowadzi ostatecznie do wzrostu przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej, uwolnienia cytochromu c i aktywacji kaspaz. Na podkreślenie zasługuje, że enzym ten *in vitro* dokonuje proteolizy różnych białek rodziny IAP, np. c-IAP1, c-IAP2, XIAP, liwiny  $\alpha$  i  $\beta$  oraz DIAP z silną preferencją c-IAP1 [53]. Opiszano preferencyjne, ale nie wyłączne, miejsca cięcia c-IAP1 przez tę proteazę, tj. po reszcie Thr<sup>4</sup>, Asn<sup>133</sup> i Leu<sup>161</sup>. Z uwagi na fakt, że Asn<sup>133</sup> i Leu<sup>161</sup> występują w obszarze oddziaływań z kaspazą-3 i -7 (łącznik pomiędzy domenami BIR1 i BIR2), cięcie w jego obrębie osłabia wiązanie białka inhibitorowego z głównymi enzymami apoptozy i promuje śmierć. Proteoliza c-IAP1 znosi również jego endogenną aktywność ligazy ubikwityny i chroni komórki przed degradacją kaspaz. W przypadku cięcia białek IAP nieodzowny wydaje się być motyw AVPS, natomiast nie jest

on niezbędny do degradacji innych substratów. Wyniki te sugerują, że wspomniana sekwencja stanowi istotny element regulatorowego mechanizmu determinującego cięcie substratów bezpośrednio zaangażowanych w apoptozę.

Ekspresja proteazy Omi/HtrA2 podlega ścisłej regulacji przez białko kodowane przez *p53*, a jej synteza *de novo* jest zdarzeniem kluczowym dla przebiegu apoptozy zależnej od *p53* [54]. Obecność inhibitora proteaz serynowych – 4-(2-aminoetylofenylo)sulfonylofluorku zapobiega natomiast cięciu c-IAP1 i chroni komórki HeLa oraz tymocyty myszy przed apoptozą indukowaną etopozydem. Aktywność Omi/HtrA2 regulowana jest również przez białka rodziny Bcl-2 [51]. Okazało się, że w zależności od Omi/HtrA2 aktywacji kaspaz może uczestniczyć aktywne proapoptotyczne białko tBid, umożliwiające uwolnienie proteazy z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Natomiast efekt hamujący wywiera białko Bcl-X<sub>L</sub> – inhibitor apoptozy.

Proteaza ta „uwrażliwia” komórki na apoptozę indukowaną promieniowaniem UV [13,21]. Embrionalne fibroblasty myszy, transfekowane Omi/HtrA2, nabywają zwiększonej wrażliwości na czynniki indukujące śmierć w porównaniu z typem dzikim. Zaobserwowano jednakże, że enzym ten może być również odpowiedzialny za tzw. „atypową śmierć komórki”, spowodowaną jego nadekspresją w cytosolu [21,44]. O śmierci komórek, w tym przypadku, decyduje wyłącznie aktywność proteolityczna Omi/HtrA2, a rozpoczęty proces nie zależy od aktywacji kaspaz i nie podlega hamowaniu przez ich inhibitory – XIAP czy z-VAD·fmk (N-benzylloksykarbonylo-Val-Ala-Asp·fluorometyloketon) [21]. Wzrost ekspresji aktywnej proteazy w cytosolu powoduje zmiany kształtu komórek (zaokrąglenie i obkurczenie) bez charakterystycznych dla apoptozy zmian morfologicznych w obrębie jądra komórkowego, tworzenia ciał apoptotycznych czy przerwania ciągłości błony.

**Czynnik indukcji apoptozy (AIF).** Białko AIF, podobnie jak cytochrom c, pełni istotne funkcje zarówno w żywych, jak i wchodzących na drogę apoptozy komórkach. W komórkach człowieka koduje go gen zlokalizowany na chromosomie X (*q25-26*) [55]. Po biosyntezie na rybosomach prekursorowa forma (613 aa; m.cz. 67 kDa) przemieszcza się do przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, gdzie traci N-końcówką domenę [19]. Obecnie w pełni poznano strukturę pierwszorzędową tego białka, które budują 3 domeny: N-końcówka z 2 sekwencjami lokalizacji mitochondrialnej (101 aa), łącznik (27 aa) i C-końcówka – oksydoreduktazowa z miejscami wiązania FAD i NADH [31,56]. Analiza cDNA kodującego AIF myszy (612 aa) i człowieka (613 aa) ujawniła wysoki konserwatyzm białek obydwu gatunków wyrażający się 92% identycznością sekwencji [19]. Usunięcie domeny N-końcowej i towarzyszące zmiany konformacyjne wraz z włączeniem cząsteczki FAD dostarczają funkcjonalnej flawoproteiny, powszechnie występującej od bakterii do człowieka [55,57]. Dojrzała forma AIF (m.cz. 57 kDa) wykazuje właściwości oksydoreduktazowe kojarzone z aktywnym życiem komórek oraz C-końcowy segment zdolny do elektrostatycznych oddziaływań z DNA, odpowiedzialny za funkcje proapoptotyczne [57,58]. Delecja C-końcowego odcinka lub podstawienie dodatnio naładowanych aminokwasów tego regionu resztą alaniny blokuje

zdolność wiązania z DNA i apoptogenną aktywność AIF [19,58]. W warunkach fizjologicznych opisywana flawoproteina stanowi istotny składnik przestrzeni międzybłonowej mitochondriów oraz ich błony wewnętrznej [31,59].

Na uwagę zasługują wyniki badań wskazujące na udział AIF w zmiataniu wolnych rodników [60]. Wykazano, że komórki ziarniste mózdzku myszy „arlekin” (ang. *harlequin*, Hq) z mutacją *Aif* (insercja sekwencji prowirusowej w 1. intronie *Aif*) nabywają wysokiej podatności na stres oksydacyjny. Zmutowane komórki mózdzku myszy Hq i szczepu dzikiego wykazują podobną wrażliwość na indukcję apoptozy przez  $H_2O_2$ . Natomiast nadekspresja *Aif* może je chronić przed śmiercią. W zmutowanych komórkach mózdzku (poziom ekspresji AIF spada o ok. 80%) odnotowano w porównaniu z komórkami kontrolnymi podwyższony poziom katalazy i glutationu [60]. Aktualnie panuje pogląd, że AIF ograniczony błonami mitochondriów, stanowi składnik białkowego kompleksu uczestniczącego w ochronie przed reaktywnymi formami tlenu, natomiast jego uwolnienie z tych organelli przekształca go w potencjalny ich generator [61,62].

#### FUNKCJE AIF W PRZEBIEGU APOPTOZY

Indukcja apoptozy w komórkach przez wiele czynników przyczynia się do translokacji AIF z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytosolu, a następnie do jądra komórkowego. Przemieszczeniu AIF towarzyszą symptomy apoptozy, m.in. ekspozycja fosfatydyloseryny na powierzchni błony komórkowej, częściowa kondensacja chromatyny, obkurczenie jąder i fragmentacja DNA do odcinków ok. 50 kbp, jednakże bez aktywacji kaspaz [19,55,57]. Uwalnianie AIF z mitochondriów wydaje się przebiegać, w porównaniu z cytochromem c, z odmienną kinetyką, wciąż słabo poznaną. W wielu modelowych komórkach apoptozy translokacja AIF wyprzedza uwalnianie cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów [19,55,61]. Z kolei w neuronach myszy indukowanych do apoptozy kamptotecyną, której przebieg zależy od białka p53, przemieszczanie cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej do cytosolu odbywa się przed translokacją AIF [63]. Ostatnio doniesiono, że w mitochondriach niektórych komórek (HeLa, 293T) pod wpływem czynników uprzepuszczających ich błonę zewnętrzną (np. rekombinanty białek rodziny Bcl-2, staurosporyna, aktynomycyna D) dochodzi do późniejszego, w porównaniu z cytochromem c, wypływu AIF [59,64]. W tych komórkach inhibitory kaspaz (z-VAD·fmk, BAF) zapobiegają przemieszczaniu się AIF, natomiast nie okazują wpływu na uwalnianie cytochromu c. Translokacja AIF w tych komórkach wymaga aktywności kaspaz [59].

Wśród najnowszych doniesień uwagę przyciągają wyniki badań dotyczące translokacji AIF, wywołanej aktywacją polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 – PARP-1 w komórkach układu nerwowego, stymulowanych różnymi czynnikami uszkadzającymi DNA [61,62]. AIF wydaje się pełnić rolę efektora apoptozy na szlaku angażującym PARP-1. Jego wpływ z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów przyczynia się do zmian apoptotycznych na poziomie jąder komórkowych (kondensacja chromatyny, obkurczenie ją-

der, fragmentacja DNA), poprzedzonych utratą potencjału transbłonowego mitochondriów i ekspozycją fosfatydyloseryny w zewnętrznej warstwie błony komórkowej. Te symptomy apoptozy nie są blokowane w obecności pankaspazowego inhibitora – z-VAD·fmk. Z kolei inhibitor PARP-1 hamuje translokację AIF i przebieg apoptozy [61].

Apoptogenne białko AIF jest niezbędne do realizacji tzw. „pierwszej fali apoptozy” odpowiedzialnej za wczesne etapy embriogenezy [65]. W embrionach myszy pozbawionych AIF obserwowano brak właściwego usuwania części komórek, co prowadziło do śmiertelności embrionów na etapie gastrulacji. Uwalnianie AIF z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów komórek apoptotycznych jest kontrolowane przez białka rodziny Bcl-2 oraz białka szoku cieplnego. Nadekspresja inhibitora apoptozy – Bcl-2 hamuje przemieszczanie AIF z mitochondriów, ale nie wpływa na jego biosyntezę [19]. Potwierdzono cytoprotekcyjną funkcję Hsp70, Hsp72 wynikającą z ich wiązania z AIF [24]. Analiza mutantów delecyjnych AIF ujawniła, że obszar między 150. a 228. aminokwasem tego czynnika wchodzi w interakcję z Hsp70 [56]. W żyjących komórkach Hsp70 i Hsp72 oddziałują z AIF w mitochondriach, co potwierdziły analizy koimmunoprecypitacji obydwu białek. Na obecnym etapie badań cytoprotekcyjne działanie Hsp72 można tłumaczyć blokowaniem wypływu AIF z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, a także ograniczeniem jego gromadzenia w jądrach komórkowych [18]. Słabo poznane mechanizmy uwalniania z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów białka AIF wymagają dalszych badań. W tym kontekście frapujące wydaje się sygnałne doniesienie Polstera i wsp. [66] wskazujące na rolę kalpajny w translokacji AIF z mitochondriów do jąder komórkowych po indukcji apoptotycznej hepatocytów gryzoni. W większości typów komórek transdukcja sygnału śmierci za pośrednictwem AIF odbywa się bez udziału kaspaz [7,19]. Wydaje się jednak, że ten szlak wyewoluował później, gdy zaczęły powstawać organizmy o bardziej złożonej budowie. Potwierdzeniem tego może być funkcjonujące u *C. elegans* zależne od kaspaz uwalnianie do cytosolu, a następnie do jąder umierających komórek homologa AIF – WAH-1 (ang. *worm-AIF homolog-1*) z udziałem białka proapoptotycznego rodziny Bcl-2 – EGL-1 (ang. *egg laying defective*) [67].

Sprawą otwartą pozostaje sposób, w jaki dochodzi do kondensacji chromatyny i fragmentacji DNA z udziałem AIF. Choć białko to wykazuje zdolność bezpośredniego wiązania się z DNA, samo raczej nie przejawia aktywności nukleazowej. Prawdopodobnie funkcjonuje mechanizm(y) rekrutacji i aktywacji nukleaz z udziałem tego czynnika, dokonujących nukleolizy bez zaangażowania kaspaz. Jednym z takich enzymów wydaje się być endonukleaza G, której homolog – CPS-6 (ang. *Ced-3 protease suppressor*) w przypadku *C. elegans*, współdziała z WAH-1 w degradacji apoptotycznej DNA tego nicienia [67].

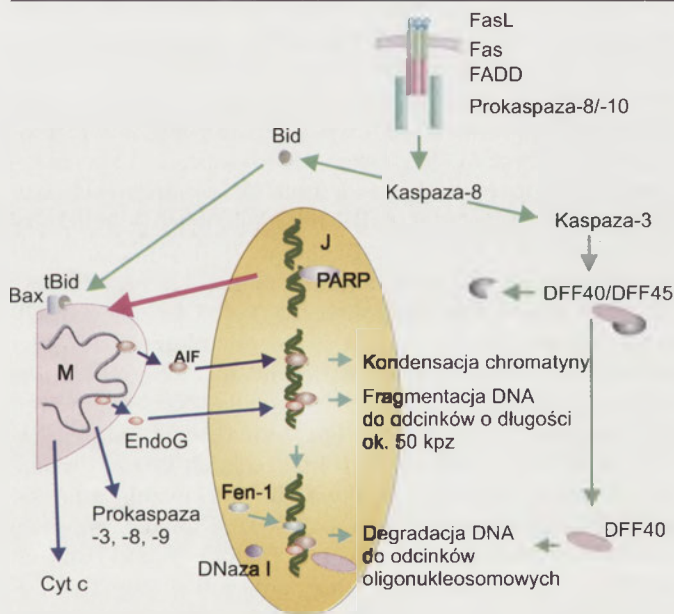
**Endonukleaza G (EndoG)** należy do białek występujących w mitochondriach organizmów eukariotycznych, o zachowanej w ewolucji strukturze pierwszorzędowej [7,68]. W organizmach ssaków enzym ten kodowany jest przez gen jądrowy. Powstające białko, dzięki sygnałowi lokalizacji mitochondrialnej, przemieszcza się następnie do przestrzeni

międzybłonowej mitochondriów, która stanowi jego główny magazyn [7,20,24]. W mitochondriach forma prekursorowa nukleazy (m.cz. ok. 30 kDa) traci N-końcowy odcinek zbudowany z 48 reszt aminokwasowych i przyjmuje formę dojrzałą [24]. W komórkach *Serratia marcescens* aktywny homolog EndoG jest homodimerem, w którym monomery łączą się z wiązaniami disulfidowymi, stabilizującymi jego strukturę. Każdy monomer zawiera wysoce konserwatywne miejsce katalityczne z krytycznymi dla nukleolitycznej aktywności enzymu resztami His w pozycji 89. i Asn w 119. [24]. EndoG ssaków reprezentuje zależny od dwuwartościowych kationów ( $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  i/lub  $Mn^{2+}$ ) enzym, który *in vitro* odpowiada za degradację RNA oraz jedno- i dwuniciowego DNA (w mniejszym stopniu), generując fragmenty zakończone 3'-OH i 5'-P [24,68]. Ponadto charakteryzuje się on wysoką preferencją ataku ewolucyjnie konserwatywnej sekwencji dwunastu powtórzeń nukleotydu guanylowego i komplementarnych do nich nukleotydów cytydylowych. Odcinki takie zidentyfikowano *in vitro* jako miejsce cięcia transkryptu RNA w procesie, który prowadzi do wytworzenia starterów niezbędnych do replikacji mitochondrialnego DNA *in vivo* [68,69]. Sugeruje się, że w warunkach fizjologicznych enzym ten uczestniczy również w rekombinacji i naprawie/degradacji uszkodzeń DNA [24,68].

#### ROLA ENDONUKLEAZY G W APOPTOZIE

W komórkach indukowanych do apoptozy różnymi czynnikami EndoG przemieszcza się z wnętrza mitochondriów do jądra komórkowego. Jak dotąd mechanizm odpowiedzialny za translokację enzymu z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów pozostaje w sferze hipotez. Li i wsp. [20] wykazali aktywność nukleazową w jądrach komórek HeLa, inkubowanych z supernatantem mitochondriów wątroby myszy traktowanych łącznie rekombinantami białka Bid i kaspazy-8. Aktywności tej nie hamowała wcześniejsza preinkubacja z inhibitorem kaspaz – z-VAD·fmk. Fragmentacji DNA nie obserwowano w opisywanym układzie, gdy wprowadzano do niego kontrolny supernatant mitochondriów (po inkubacji z buforem) czy traktowany oddzielnie rekombinantem Bid bądź kaspazy-8. Uzyskane wyniki sugerowały obecność nukleazy, której zdolność do fragmentacji DNA nie zależy od wcześniejszej jej aktywacji przez kaspazy, ale wymaga obecności aktywnej postaci proapoptotycznego białka – tBid. Oczyszczenie enzymu z supernatantu mitochondriów, traktowanych rekombinantami Bid i kaspazy-8 oraz jego obszerne analizy chemiczne i aktywności biologicznej ujawniła, że odpowiada on endonukleazie G o m.cz. 30 kDa. Ponadto cytowani badacze [20] donieśli, że otrzymany przez nich rekombinant EndoG dokonuje fragmentacji jądrowego DNA w sposób zależny od dawki. Uwalnianie EndoG z mitochondriów wątroby myszy inkubowanych z tBid jest wczesnym wydarzeniem współwystępującym z przemieszczeniem z tych struktur cytochromu c. Na podkreślenie zasługują obserwacje, że w fibroblastach embrionów myszy (MEF; ang. *mouse embryonic fibroblast*), pozbawionych endonukleazy DFF/CAD, pod wpływem tBid, a także innego proapoptotycznego białka rodziny Bcl-2 – Bim, dochodzi do uwolnienia EndoG do cytosolu, a następnie przemieszczenia jej do jąder tych komórek. W komórkach MEF odnotowano typową drabinkę apoptotyczną DNA po indukcji apoptozy promieniowaniem UV czy czynnikiem TNF i cykloheksamidem [20].

W obrębie jądra komórkowego enzym dokonuje cięcia DNA na fragmenty oligonukleosomowe [20,24]. Wprowadzenie rekombinanta EndoG człowieka do jąder komórek HeLa i analiza produktów degradacji DNA wykazały zdolność EndoG do cięcia DNA w obrębie nukleosomów na odcinki odległe od siebie o około 10,4 zasady [70]. Aktywność nukleazowa opisywanego enzymu w stosunku do DNA jest stosunkowo niewielka i wymaga obecności dodatkowych czynników stymulujących w postaci koaktywatorów i kofaktorów, podczas gdy degradacja RNA nie wymaga ich udziału [71,72]. U *C. elegans* homolog EndoG – białko CPS-6 wchodzi w skład kompleksu degradującego DNA, zwanego degradosomem [67,72]. Poza CPS-6, kompleks współtworzą inne egzo/endonukleazy, m.in.: CRN-1 (ang. *cell death related nuclease*) – homolog występującego u ssaków Fen-1 (ang. *flap endonuclease-1*), CRN-4, CRN-5, CYP-13 (homolog cyklofiliny E) oraz białko WAH-1 [72]. Udowodniono, że asocjacja CPS-6 z CRN-1 powoduje około 5-krotny wzrost aktywności nukleazowej tych enzymów. Sugeruje się, że obecne u ssaków czynniki, tj. AIF, EndoG i/lub Fen-1 mogą również działać kooperatywnie i wzajemnie stymulować swoją aktywność, prowadząc w kilku etapach do fragmentacji DNA [24,71] (Rys. 5). EndoG działając samodzielnie wydaje się być enzymem wystarczającym, przynajmniej



**Rysunek 5.** Proponowany model udziału białka AIF i EndoG w apoptotycznej fragmentacji DNA niezależnej od kaspaz (opracowano na podstawie [62,71,72]). EndoG i AIF uczestniczą głównie w apoptozie niezależnej od kaspaz indukowanej, np. przez uszkodzenia DNA, wiązanie ligandu (FasL) z receptorem śmierci (Fas) czy czynniki zwiększające przepuszczalność błon mitochondrialnych. Łącznikiem między szlakiem receptorowym i mitochondrialnym jest polipeptyd tBid oddziałujący z proapoptotycznymi białkami rodziny Bcl-2 (np. Bax). Rozległe uszkodzenia DNA rozpoznawane są natomiast przez PARP, enzym naprawy DNA, który przynajmniej w niektórych typach komórek, przekazuje sygnał do mitochondrium. Indukcji śmierci towarzyszy spadek potencjału transbłonowego mitochondrium ( $\Delta\Psi_m$ ), wzrost przepuszczalności błony zewnętrznej organelum i uwolnienie białek z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Czynnikiem AIF przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z DNA i uczestniczy w peryferycznej kondensacji chromatyny. Prawdopodobnie AIF odpowiada również za rekrutację do jądra komórkowego enzymów uczestniczących we fragmentacji DNA do odcinków o długości 50 kbp. EndoG w obecności innych nukleaz, np. Fen-1, DNaza I czy DFF40 – uwolnionego z kompleksu z jego inhibitorem – DFF45 może dokonywać degradacji DNA do fragmentów będących wielokrotnością nukleosomowego DNA; J – jądro komórkowe, M – mitochondrium, FADD – białko adaptorowe oddziałujące z Fas.

do częściowej fragmentacji DNA [20], a obok innych nukleaz (np. DNazy I i/lub Exo III) – niezbędnym do jego pełnej degradacji i wydajnej apoptozy [69,70].

Obecnie uważa się, że czynnik AIF i EndoG mogą odgrywać rolę w fazie wykonawczej programowanej śmierci komórki w sytuacji, gdy aktywacja kaspaz jest ograniczona. Może to mieć miejsce podczas infekcji wirusowych lub w warunkach działania mechanizmów inaktywujących te proteazy, indukowanych przez NO lub reaktywne formy tlenu [7]. Ostatnio opublikowano wyniki doświadczeń sugerujące, że przynajmniej w niektórych typach komórek uwolnienie EndoG z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, podobnie jak i białka AIF, wymaga obecności kaspaz i zachodzi po ich wcześniejszej aktywacji w apoptosomie [59].

## UWAGI KOŃCOWE

Kluczowa rola mitochondriów w przebiegu apoptozy wynika z faktu zmiany przepuszczalności błon tych organeli po otrzymaniu sygnału śmierci i wpływu z ich przestrzeni międzybłonowej szeregu białek. W warunkach fizjologicznych białka te zapewniają komórkom przebieg szeregu istotnych procesów oraz utrzymanie homeostazy organizmu. Po indukcji apoptozy niektóre białka występujące w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów uwalniane są do cytosolu, a część z nich ulega ponadto translokacji do jąder umierających komórek. Po opuszczeniu przestrzeni międzybłonowej mitochondriów albo uczestniczą w formowaniu apoptosomu (cytochrom c, prokaspaza-9) i po aktywacji dokonują proteolizy wielu białek komórkowych, czy też aktywują kaspazy hamując antagonizujące je białka inhibitorowe IAP (Smac/DIABLO, Omi/HtrA2). Translokacja do jąder umierających komórek białka AIF oraz EndoG „włącza” degradację nukleolityczną, której przebieg wiąże się z degradacją DNA najpierw do odcinków o długości około 50 kbp, a następnie do fragmentów oligonukleosomowych. Przebieg degradacji DNA w większości komórek apoptotycznych wydaje się nie wymagać obecności kaspaz, choć w pewnych typach komórek ich udział wydaje się być warunkiem niezbędnym dla inicjowania zdarzeń związanych z uwalnianiem z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów zarówno AIF, jak i EndoG. Wśród ostatnio opublikowanych wyników należy odnotować sygnałne doniesienie Arnoulta i wsp. [59] sugerujące, że w niektórych typach komórek uprzepuszczenie zewnętrznej błony mitochondrialnej przez białka Bax, tBid i leki wpływające na stosunek Bax/Bak, przyczynia się do uwalniania apoptogennych białek z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów w uporządkowany sposób; najpierw przemieszcza się cytochrom c, Smac/DIABLO i Omi/HtrA2, a następnie po aktywacji kaspaz dochodzi do translokacji EndoG i AIF. Translokacja apoptogennych białek z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytosolu jest wypadkową wielu procesów i zależy w głównym stopniu od aktywności pro- i antyapoptotycznej rodziny białek Bcl-2. Bogactwo, często sprzecznych, danych literaturowych i brak uniwersalnego mechanizmu(-ów) uwalniania apoptogennych białek z mitochondriów sugerują, że przebieg apoptozy na szlaku mitochondrialnym w znacznym stopniu zależy od typu komórki, rodzaju oraz siły induktora śmierci programowanej.

Szczegółowe poznanie szlaków apoptotycznych i ich regulacji stanowi ogromne wyzwanie dla nauk biomedycznych. Gruntowna wiedza na ten temat może stanowić szansę rozwoju nowych terapii wielu chorób poprzez efektywne „sterowanie” apoptozą, tj. indukcję procesu, gdy komórki utraciły wrażliwość na sygnały śmierci (wiele typów nowotworów) bądź wyciszenie dużej podatności komórek na te sygnały (osteoporoza, choroby neurodegeneracyjne, niedobory immunologiczne).


## PIŚMIENNICTWO

1. Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, McManus BM (1998) Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 78: 893-913
2. Grzelakowska-Sztabert B (1998) Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej poprzez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R. *Post Biochem* 44: 8-21
3. Kiliańska ZM (2002) Apoptoza organizmów zwierzęcych, W: Klyszejko-Stefanowicz L (red). *Cytobiochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 772-815
4. Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandennebe P (2001) Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* 58: 356-370
5. Kiliańska ZM, Miśkiewicz A (2003) Kaspazy kręgowców; ich rola w przebiegu apoptozy. *Post Biol Kom* 30: 129-152
6. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4: 552-565
7. van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saclens X, Vandennebe P (2003) Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 487-497
8. Desagher S, Martinou JC (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10: 369-375
9. Grądzka I (2000) Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Post Biochem* 46: 2-16
10. Cory S, Huang DCS, Adams JM (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607
11. Borner C (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 39: 615-647
12. Zamzani N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey J, Castedo M, Kroemer G (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 183: 1533-1544
13. Lindholm D, Eriksson O, Korhonen L (2004) Mitochondrial proteins in neuronal degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 753-758
14. Qin Z-H, Wang Y, Kikly KK, Sapp E, Kegel KB, Aronin N, DiFiglia M (2001) Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and release into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *J Biol Chem* 276: 8079-8086
15. Chandra D, Tang DG (2003) Mitochondrially localized active caspase-9 and caspase-3 result mostly from translocation from the cytosol and partly from caspase-mediated activation in the organelle. *J Biol Chem* 278: 17408-17420
16. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157
17. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42
18. Ruchalski K, Mao H, Singh SK, Wang Y, Mosser DD, Li F, Schwartz JH, Borkan SC (2003) HSP72 inhibits apoptosis-inducing factor release in ATP-depleted renal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C1483-C1493
19. Susin SA, Lorenzo H, Zamzani N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446

20. Li LY, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-99
21. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8: 613-621
22. Chang HY, Yang X (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 821-846
23. Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003) A decade of caspases. *Oncogene* 22: 8543-8567
24. Lorenzo HK, Susin SA (2004) Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. *FEBS Lett* 557: 14-20
25. Orrenius S (2004) Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett* 149: 19-23
26. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405-413
27. Hill MM, Adrain C, Martin SJ (2003) Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol Interv* 3: 19-26
28. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501
29. Shi Y (2002) Mechanism of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9: 459-470
30. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14: 2060-2071
31. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prévost M-C, Alzari PM, Kroemer G (1999) Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 189: 381-393
32. Mancini M, Machamer CE, Roy S, Nicholson D, Thornberry NA, Casciola-Rosen LA, Rosen A (2000) Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol* 149: 603-612
33. Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR (1998) Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J* 17: 37-49
34. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S (2002) Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1259-1263
35. Ostrander DB, Sparagna GC, Amoscato AA, McMillin JB, Dowhan W (2001) Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 276: 38061-38067
36. Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolesse M, Paradies G (2001) Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis. *FEBS Lett* 509: 435-438
37. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399: 483-487
38. Lutter M, Fang M, Luo X, Nishijima M, Xie X, Wang X (2000) Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol* 2: 754-761
39. Cain K, Langlais C, Sun X-M, Brown DG, Cohen GM (2001) Physiological concentrations of K<sup>+</sup> inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *J Biol Chem* 276: 41985-41990
40. Duke RC, Ojcius DM, Young JD (1997) Śmierć komórki w zdrowiu i chorobie. *Świat Nauki* 66: 24-32
41. Yang X, Chang HY, Baltimore D (1998) Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 281: 1355-1357
42. Maianski NA, Geissler J, Srinivasula SM, Alnemri ES, Roos D, Kuipers TW (2004) Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. *Cell Death Differ* 11: 143-153
43. Grzelakowska-Sztartab B (1999) Udział wirusowych i komórkowych białek IAP w regulacji apoptozy i przeżycia komórek. *Post Biochem* 45: 167-176
44. Vaux DL, Silke J (2003) Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 499-504
45. de Graaf AO, de Witte T, Jansen JH (2004) Inhibitor of apoptosis proteins: new therapeutic targets in hematological cancer? *Leukemia* 18: 1751-1759
46. Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES (2001) A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410: 112-116
47. Wilkinson JC, Wilkinson AS, Scott FL, Csomos RA, Salvesen GS, Duckett CS (2004) Neutralization of Smac/DIABLO by inhibitors of apoptosis (IAPs): a caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition. *J Biol Chem* 279: 51082-51090
48. Wu G, Chai J, Suber TL, Wu J-W, Du C, Wang X, Shi Y (2000) Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 408: 1008-1012
49. Motyl T, Gajkowska B, Górka M, Godlewski MM, Lamparska-Przybylska M (2004) Kinetyka oraz regulacja uwalniania Smac/DIABLO z mitochondriów komórek nowotworowych pod wpływem stymulacji apoptogennej. *Post Biol Kom* 31: 219-233
50. Chai J, Du C, Wu J-W, Kyin S, Wang X, Shi Y (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406: 855-862
51. Suzuki Y, Takahashi-Niki K, Akagi T, Hashikawa T, Takahashi R (2004) Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways. *Cell Death Differ* 11: 208-216
52. Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrabel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2002) HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277: 445-454
53. Yang QH, Church-Hajduk R, Ren J, Newton ML, Du C (2003) Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Develop* 17: 1487-1496
54. Jin S, Kalkum M, Overholtzer M, Stoffel A, Chait BT, Levine AJ (2003) CIAP1 and the serine protease HtrA2 are involved in a novel p53-dependent apoptosis pathway in mammals. *Genes Develop* 17: 359-367
55. Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G (2000) Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* 476: 118-123
56. Schmitt E, Parcellier A, Gurbuxani S, Cande C, Hamman A, Morales MC, Hunt CR, Dix DJ, Kroemer RT, Giordanetto F, Jäättelä M, Penninger JM, Pance A, Kroemer G, Garrido C (2003) Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer Res* 63: 8233-8240
57. Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* 115: 4727-4734
58. Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H (2002) DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* 9: 680-684
59. Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ (2003) Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J* 22: 4385-4399
60. Klein JA, Longo-Guess CM, Rossman MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL (2002) The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419: 367-374
61. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297: 259-263

62. Yu SW, Wang H, Dawson TM, Dawson VL (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 14: 303-317
63. Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu S-W, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS (2002) Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* 158: 507-517
64. Arnoult D, Parone P, Martinou J-C, Antonsson B, Estaquier J, Ameisen JC (2002) Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J Cell Biol* 159: 923-929
65. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410: 549-554
66. Polster BM, Basanez G, Etxebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG (2005) Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem* 280: 6447-6454
67. Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D (2002) Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 298: 1587-1592
68. Low RL (2003) Mitochondrial Endonuclease G function in apoptosis and mtDNA metabolism: a historical perspective. *Mitochondrion* 2: 225-236
69. Zhang J, Dong M, Li L, Fan Y, Pathre P, Dong J, Lou D, Wells JM, Olivares-Villagomez D, Kaer LV, Wang X, Xu M (2003) Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15782-15787
70. Widlak P, Garrard WT (2005) Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* 94: 1078-1087
71. Parrish JZ, Yang C, Shen B, Xue D (2003) CRN-1, a *Caenorhabditis elegans* FEN-1 homologue, cooperates with CPS-6/EndoG to promote apoptotic DNA degradation. *EMBO J* 22: 3451-3460
72. Parrish JZ, Xue D (2003) Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in *C. elegans*. *Mol Cell* 11: 987-996

## Mitochondrial intermembrane space proteins in apoptosis process

Jolanta Bednarek, Zofia M. Kiliańska 

Department of Cytochemistry, University of Łódź, 12/16 S. Banacha St., 90-237 Łódź, Poland

e-mail: zkilian@biol.uni.lodz.pl

**Key words:** apoptogenic proteins, mitochondria, cytochrome c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF, endonuclease G

### ABSTRACT

Mitochondria, despite their function in cellular energy metabolism, play an important role in the apoptotic signaling pathways. These organelles in response to the death signal undergo changes resulting in the release of proteins which are essential to conduct apoptosis *via* mitochondrial pathway. This article is focused on the properties and functions of apoptogenic proteins released from the mitochondrial intermembrane space, i.e., caspases, cytochrome c, Smac/DIABLO, serine protease Omi/HtrA2, AIF and endonuclease G.



# Periplazmatyczne oksydoreduktazy disiarczkowe bakterii *Escherichia coli* – budowa i funkcja

## STRESZCZENIE

Wprowadzanie wiązań disiarczkowych o prawidłowej topologii jest jednym z kluczowych etapów związania wielu białek o pozacytoplazmatycznej lokalizacji, występującym zarówno u organizmów eukariotycznych, jak i prokariotycznych. W Gram ujemnej bakterii *Escherichia coli* proces ten jest katalizowany przez grupę periplazmatycznych oksydoreduktaz, zwanych Dsb. Białka te funkcjonują w dwóch niezależnych szlakach: (1) utleniającym (system DsbA/DsbB), odpowiedzialnym za utlenianie grup SH cystein, i (2) redukującym (białka DsbC/DsbD, DsbG, CcmG i CcmH), pełniącym rolę w izomeryzacji błędnie wprowadzonych wiązań S-S, a także biorącym udział w „dojrzeniu” cytochromu *c*. System utleniający działa w ścisłym związku z błonowym systemem przekaźników elektronów łańcucha oddechowego i wykorzystuje cząsteczki chinonów jako bezpośrednie akceptory elektronów. Szlak redukujący wykorzystuje natomiast jako źródło elektronów cytoplazmatyczny system tioredoksyny. Większość białek Dsb należy do nadrodziny tioredoksyny i zawierają one w swoich centrach katalitycznych konserwowaną sekwencję Cys-X-X-Cys. Celem tej pracy jest omówienie własności białek Dsb, ze szczególnym uwzględnieniem zależności pomiędzy ich budową i funkcją.

## WPROWADZENIE


Wiązania disiarczkowe są typowymi modyfikacjami potranslacyjnymi wielu białek pozacytoplazmatycznych. U organizmów eukariotycznych proces ten zachodzi w siateczce śródplazmatycznej, natomiast u bakterii tworzenie wiązań S-S zachodzi w utleniającym środowisku periplazmy w reakcjach katalizowanych przez enzymy z rodziny Dsb (ang. *disulfide bond*). Białka te należą do nadrodziny tioredoksyny i wszystkie zawierają w centrum katalitycznym dwie cysteiny w sekwencji Cys-X-X-Cys (X-dowolna reszta aminokwasowa). Cechą charakterystyczną ich budowy przestrzennej jest układ obejmujący cztery  $\beta$ -harmonijki otoczone przez trzy helisy  $\alpha$ . Jest to tzw. struktura/domena tioredoksynowa (ang. *thioredoxin fold*). Białka należące do nadrodziny tioredoksyny zawierają ten układ przestrzenny mimo często niskiej homologii na poziomie aminokwasowym [1].

Wprowadzenie wiązania S-S o prawidłowej topologii wymaga często dwóch typów reakcji: utworzenia wiązania S-S i izomeryzacji wiązania S-S [2]. Każda z tych reakcji jest katalizowana przez inną parę białek Dsb i jest związana z odrębnym szlakiem transportu elektronów w bakterii *Escherichia coli*. Wprowadzenie wiązania disiarczkowego polega na utlenieniu zredukowanych, nowo wprowadzonych do periplazmy białek przez oksydazę DsbA. Regeneracja aktywnej, utlenionej formy DsbA jest katalizowana przez błonowe białko DsbB. Utleniające działanie DsbA w stosunku do białek zawierających więcej niż dwie cysteiny często prowadzi do wytworzenia błędnych wiązań S-S, nie występujących w aktywnym, prawidłowo zwinionym białku. W takim przypadku konieczne jest działanie drugiej pary białek Dsb: DsbC i DsbD. DsbC przeprowadza izomeryzację wiązań, natomiast DsbD utrzymuje białko DsbC w stanie zredukowanym. W periplazmie bakterii *E. coli* zidentyfikowano jeszcze dodatkowe białko Dsb: DsbG o nieznanym jak dotąd funkcji oraz dwie wyspecjalizowane oksydoreduktazy: CcmG i CcmH [3].

## SYSTEM ODPOWIEDZIALNY ZA UTLENIANIE BIAŁEK

### OKSYDAZA DsbA

Oksydaza DsbA jest rozpuszczalnym, monomerycznym białkiem o ciężarze cząsteczkowym 21,1 kDa. W obrębie trójwymiarowej struktury białka można wyróżnić domenę tioredoksynową oraz domenę helikalną (Rys. 1). Domena tioredoksynowa w DsbA (reszty aminokwasowe 1-61 i 140-189) zawiera dodatkową  $\beta$ -harmonijkę, która powiększa centralną płaszczyznę  $\beta$ . Domena  $\alpha$ -helikalna (reszty aminokwasowe 62-139) stanowi wstawkę w obrębie domeny tioredoksynowej i zawiera pięć helis  $\alpha$ . Miejsce aktywne znajduje się w domenie

Joanna Skórko-Glonek 

Anna Sobiecka

Katedra Biochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet Gdański, Gdańsk

Katedra Biochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; e-mail: glonek@biotech.univ.gda.pl, tel. (58) 301 22 41 wew. 385

Artykuł otrzymano 12 maja 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 7 lipca 2005 r.

**Słowa kluczowe:** mostki disiarczkowe, oksydoreduktazy, białka Dsb, potencjał redoks

**Wykaz skrótów:** BPTI – inhibitor trypsyny trzustki bydłowej; DTT – ditiotreitol; PDI – disulfidoizomeraza białek; RBI – dwufunkcyjny inhibitor  $\alpha$ -amylazy/trypsyny z *Eleusine coracana*; S-S – wiązanie disiarczkowe; grupy SH – grupy sulfhydrylowe; RNaza A – rybonukleaza A; NADPH – zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego

**Podziękowania:** Autorki pragną podziękować Pani prof. dr hab. Barbarze Lipińskiej za cenne uwagi podczas pisania niniejszej pracy. Praca powstała w trakcie realizacji grantu badawczego KBN nr 1074/P04/2004/26. Druk artykułu został częściowo sfinansowany z grantu Uniwersytetu Gdańskiego: BW-R-300



**Rysunek 1.** Model budowy przestrzennej białka DsbA na podstawie struktury krystalicznej [67]. Rysunek wykonano w oparciu o dane zawarte w pliku pdb1A-2J zawartym w bazie danych NCBI ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) programem Cn3D4.1. Na rysunku w kolorze zielonym zostały przedstawione struktury helisy  $\alpha$ ; w kolorze żółtym – harmonijki  $\beta$ ; w kolorze turkusowym – struktury nieporządkowane; czarnymi kropkami zaznaczono pozycję reaktywnych cystein.

tioredoksynowej i jest otoczone przez hydrofobowe reszty aminokwasowe. W domenie tioredoksynowej, poniżej miejsca aktywnego znajduje się jeszcze dodatkowe zagłębienie hydrofobowe. Oba te niepolarne miejsca mogą pełnić istotną funkcję w rozpoznawaniu i wiązaniu niezwiniętego substratu [4]. Takie niekowalencyjne wiązania DsbA z białkami zostały wykazane np. dla zmutowanej formy RN-azy T1 [5]. Dzięki rozpoznawaniu hydrofobowych regionów DsbA jest w stanie oddziaływać z białkami niezwiniętymi lub zwiniętymi tylko częściowo i wprowadzać do nich wiązania S-S.

Centrum katalityczne zawiera pojedynczą katalityczną parę reszt cystein: Cys<sub>30</sub> i Cys<sub>33</sub>, leżącą w obrębie sekwencji Cys-Pro-His-Cys [6,7]. Cysteiny te w formie aktywnej są utlenione. DsbA katalizuje utlenienie przypadkowej pary cystein w niezwiniętym substracie przeprowadzając bardzo szybką reakcję wymiany S-S/SH. Jako białko o charakterze utleniającym DsbA posiada wysoki potencjał utleniający (-0,125 V w warunkach standardowych) [8]. Dla porównania wzorcowy potencjał redoks tioredoksyny, cytoplazmatycznego białka o charakterze redukującym, wynosi -0,270 V [9]. Utleniający potencjał DsbA wynika między innymi z własności cysteiny 30, która posiada wyjątkowo niską wartość pK<sub>a</sub>; ok. 3,5, świadcząca o wysokiej reaktywności tej grupy [10]. Tylko ta cysteina jest dostępna dla substratu, natomiast Cys<sub>33</sub> jest ukryta w łańcuchu polipeptydowym białka i nie reaguje ze związkami specyficznymi względem grup hydrosulfidowych [4]. Stwierdzono, że decydujący wpływ na własności utleniające cystein DsbA mają dwie reszty aminokwasowe rozdzielające aktywne cysteiny: Pro<sub>31</sub> i His<sub>32</sub> [11]. Oprócz aktywności utleniającej DsbA wykazuje także słabą aktywność izomerazy, jednakże ze względu na bardzo niską wydajność, aktywność ta nie ma prawdopodobnie większego znaczenia [12].

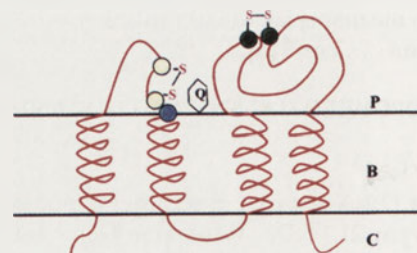
Brak funkcjonalnego genu *dsbA* prowadzi do bardzo złożonego fenotypu. Mutanty *dsbA*<sup>-</sup> są wrażliwe na obecność zredukowanego DTT i benzylopenicyliny. Wykazują zaburzenia wielu procesów, wymagających tworzenia wiązań disiarczkowych. (i) Odnaczają się bardzo niską aktywno-

ścią alkalicznej fosfatazy i brakiem białka błony zewnętrznej OmpA [6,7]. (ii) Nie są zdolne do ruchliwości w podłożach półpłynnych ze względu na zakłócenia w formowaniu prawidłowej wici [13]. (iii) Nie są wrażliwe na infekcję bakteriofagiem M13 z powodu braku pili płciowych F [6] (iiii) Nie posiadają funkcjonalnych fimbrii typu P, typu I oraz IV ([14-16]. W przypadku składania fimbrii typu P wykazano, że jest niezbędna nie tylko aktywność utleniająca DsbA, lecz także aktywność opiekuńcza tego białka [14]. Rolę aktywności opiekuńczej DsbA w prawidłowym funkcjonowaniu komórki potwierdziły badania dotyczące wydzielania pullulanazy. Proces ten wymagał obecności DsbA, lecz był niezależny od tworzenia wiązań disiarczkowych [17]. Ten dodatkowy rodzaj aktywności DsbA został potwierdzony w testach *in vitro* [18]. Pozostałe fenotypy mutacji *dsbA* obejmują brak holocytochromu *c*, zaburzenia w wydzielaniu enterotoksyny I i w fałdowaniu periplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej zależnej od Cu i Zn, a także wrażliwość na jony Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> i Hg<sup>+</sup> [3].

## BIAŁKO DsbB

DsbB jest transbłonowym białkiem błony cytoplazmatycznej o ciężarze cząsteczkowym około 20 kDa. W obrębie struktury można wyróżnić cztery transbłonowe helisy i dwie pętle periplazmatyczne (Rys. 2). Każda z pętli zawiera parę cystein zdolnych do tworzenia mostka disiarczkowego. Dwie cysteiny z pierwszej pętli są elementem katalitycznej sekwencji aminokwasowej charakterystycznej dla wszystkich białek Dsb: Cys<sub>41</sub>-Val-Leu-Cys<sub>44</sub>. Cysteiny z drugiej pętli (Cys<sub>104</sub> i Cys<sub>130</sub>) są natomiast oddzielone dwudziestoma pięcioma resztami aminokwasów [19]. W obrębie pierwszej periplazmatycznej części znajduje się także miejsce do wiązania chinonu [20,21], a istotną rolę w tym procesie pełni Arg<sub>48</sub> [22]. W warunkach tlenowych DsbB oddziałuje z ubichinonem Q8, natomiast przy braku tlenu elektrony są przenoszone na menachinon [23].

Funkcją białka DsbB jest ponowne utlenianie białka DsbA i przenoszenie elektronów z DsbA na chinon [24,25]. W mutantach *dsbB*<sup>-</sup> ulega nagromadzeniu zredukowana forma DsbA, niezdolna do pełnienia funkcji oksydazy [26]. W związku z tym fenotyp mutantów zawierających niefunkcyjalny gen *dsbB* jest podobny do fenotypu mutantów *dsbA*<sup>-</sup>. Bakterie *E. coli dsbB*<sup>-</sup> odznaczają się wrażliwością na DTT i benzylopenicylinę, obniżoną aktywnością alkalicznej fosfatazy i zaburzeniami w dojrzewaniu cytochromu *c*, brakiem ruchliwości w podłożach półpłynnych [13,26,27].



**Rysunek 2.** Model topologiczny białka DsbB, wg [22]. Na rysunku zaznaczono dwa aktywne disiarczki w pętlach periplazmatycznych: Cys<sub>41</sub>-Cys<sub>44</sub> (kółka żółte) i Cys<sub>104</sub>-Cys<sub>130</sub> (kółka zielone) oraz Arg<sub>48</sub> (kółko niebieskie), istotną w oddziaływaniu DsbB z cząsteczką chinonu. Oznaczenia skróto: P – perioplazma; B – błona plazmatyczna; C – cytoplazma; Q – chinon.

## SYSTEM ODPOWIEDZIALNY ZA IZOMERYZACJĘ WIĄZAŃ DISIARCZKOWYCH

### DISULFIDOIZOMERAZA DsbC

DsbC jest rozpuszczalnym periplazmatycznym białkiem tworzącym homodimer, składający się z podjednostek o ciężarze cząsteczkowym 23,5 kDa. Każda z podjednostek zawiera centrum katalityczne zbudowane z motywu Cys-X-X-Cys, którego cysteiny (Cys<sub>98</sub> i Cys<sub>101</sub>) tworzą niestabilny, reaktywny disiarczek [28,29]. W komórkach niezmutowanych DsbC występuje głównie w formie zredukowanej [30]. Podobnie jak w białku DsbA, jedynie cysteina 98 jest ekspozowana do środowiska. Białko DsbC zawiera ponadto inną parę cystein (Cys<sub>141</sub> i Cys<sub>163</sub>), tworzących mostek o charakterze strukturalnym [29]. Obie podjednostki są połączone ze sobą dimeryzacyjnymi domenami N-końcowymi i tworzą strukturę o kształcie litery V (Rys. 3A). Domeny o strukturze tioredoksynowej, zawierające sekwencje katalityczne, znajdują się w rejonach C-końcowych na końcach ramion dimeru. Wnętrze dimeru stanowi zagłębienie o charakterze niepolarnym, zdolne do wiązania substratu. Cysteiny w pozycji 98 każdej podjednostki są wyeksponowane do wnętrza tego zagłębienia i mogą oddziaływać bezpośrednio z substratem [31].

Główną funkcją DsbC w periplazmie jest izomeryzacja błędnie wprowadzonych przez DsbA wiązań disiarczkowych. Funkcja ta została wykazana *in vivo* względem naturalnego substratu – alkalicznej fosfatazy, zawierającej dwa disiarczki [32], dla periplazmatycznej rybonukleazy (4 disiarczki) i białka Mep (3 disiarczki) [33], a także dla urokinazy (12 disiarczków) [34]. Dalszych przykładów dostarczyły badania w układzie *in vitro*. Białko DsbC wydajnie wprowadzało wiązania S-S o prawidłowej topologii do

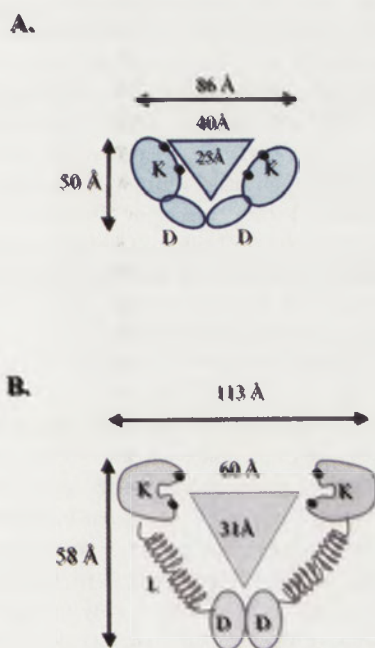
substratów zawierających więcej niż dwie cysteiny, np do BPTI [29] i RBI [35].

Proces izomeryzacji wiązań S-S rozpoczyna się od nukleofilowego ataku wolnej grupy sulfhydrylowej DsbC na wiązanie disiarczkowe substratu. W rezultacie powstaje mieszany disiarczek pomiędzy izomerazą a substratem. Zerwanie wiązania pomiędzy DsbC a substratem może hipotetycznie zajść dwiema drogami: (1) DsbC może zredukować wiązanie S-S substratu i pozostawić je do ponownego utlenienia przez DsbA lub (2) mieszany disiarczek może się rozpaść na skutek oddziaływania z kolejną cysteiną substratu, powodując utworzenie wiązań S-S pomiędzy innymi cysteinami (jak w przypadku eukariotycznej izomerazy PDI). Według modelu Gilberta [36] główna aktywność DsbC nie polega na bezpośrednim tasowaniu mostków disiarczkowych, lecz raczej na redukcji błędnie wprowadzonego mostka w białku substratowym. Na tym etapie ponownie wkracza DsbA przeprowadzając kolejną reakcję utleniania cystein w białku. Prawdopodobieństwo wprowadzenia wiązania o prawidłowej topologii jest w tym przypadku już większe, ponieważ pomiędzy kolejnymi reakcjami utleniania białko podlegało procesowi zwijania. Po uwolnieniu substratu DsbC pozostaje w formie utlenionej i wymaga regeneracji aktywnej, zredukowanej formy. Funkcję utrzymywania DsbC w formie zredukowanej pełni kolejne białko z rodziny Dsb: DsbD [34]. W testach *in vitro* funkcja DsbC zależała od statusu redoks tego białka. W formie zredukowanej funkcjonowało ono jako izomeraza, natomiast w formie utlenionej, podobnie jak DsbA, wprowadzało wiązania S-S do substratu [30]. Z tego faktu może wynikać zdolność do supresji fenotypu *dsbA* przez nadprodukcję białka DsbC [37].

Bakterie *E. coli* pozbawione genu *dsbC* wykazują zaburzenia w tworzeniu wiązań disiarczkowych, ale znacznie słabsze niż w przypadku mutantów *dsbA*<sup>-</sup> i *dsbB*<sup>-</sup>. Status redoks białka DsbA nie ma wpływu na stan DsbC, co wskazuje na równoległy i niezależny szlak przekazywania elektronów w obu systemach [37]. Przyczyną łagodniejszego fenotypu mutantów *dsbC*<sup>-</sup> może być stosunkowo mała ilość białek wymagających izomeryzacji wiązań S-S. W periplazmie i błonie zewnętrznej występuje niewiele białek zawierających więcej niż jedno wiązanie disiarczkowe. Poza tym sugeruje się, że wprowadzanie wiązań S-S może zachodzić równocześnie z procesem translokacji polipeptydu przez błonę cytoplazmatyczną. W tej sytuacji, jeśli wiązanie o prawidłowej topologii powinno łączyć kolejne w sekwencji liniowej cysteiny, aktywność utleniająca DsbA jest wystarczająca do osiągnięcia prawidłowej struktury [30]. Podobnie jak w przypadku białka DsbA, wykazano, że DsbC posiada także aktywność opiekuńczą. W układzie *in vitro* pokazano, że DsbC umożliwiało reaktywację zdenaturowanej dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego w procesie niezależnym od reakcji typu redoks [38].

### BIAŁKO DsbD (DIPZ)

Izomeraza DsbC wymaga obecności zredukowanych grup SH cystein centrum katalitycznego. W utleniającym środowisku periplazmy elektrony są dostarczane z cytoplazmy za pośrednictwem transbłonowego białka DsbD [39]. Jest to duże białko (546 reszt aminokwasowych), w struktu-



**Rysunek 3.** Modele budowy izomeraz wiązań S-S (A) DsbC i (B) DsbG, wg [47]. Oznaczenia skrótów: K – domena katalityczna; D – domena dimeryzacyjna; L – helisa połączeniowa. W obrębie domen katalitycznych czarnymi kropkami zaznaczono aktywne reszty cysteiny.

rze którego można wyróżnić trzy domeny: N-kończącą domenę o typie fałdowania immunoglobuliny ( $\alpha$ DsbD), centralną transbłonową domenę ( $\beta$ ) przypuszczalnie złożoną z 8 helis i C-kończącą domenę o typie fałdowania tioredoksyny ( $\gamma$ DsbD) (Rys. 4). Każda domena zawiera parę cystein, niezbędnych do transportu elektronów do periplazmy. Obie skrajne domeny,  $\alpha$ DsbD i  $\gamma$ DsbD, są zwrócone do periplazmy [40]. Za redukcję DsbC jest bezpośrednio odpowiedzialna domena  $\alpha$ DsbD, której Cys<sub>109</sub> tworzy mieszany disiarczek z Cys<sub>98</sub> w białku DsbC [41]. Cysteina w pozycji 109 jest także odpowiedzialna za reakcję z innymi dotychczas poznanymi substratami DsbD: DsbG [42] i CcmG [43].

Fenotyp mutantów *dsbD*<sup>-</sup> związany jest z funkcjami pełnionymi przez substraty DsbD, które przy braku DsbD występują w formie utlenionej. Charakteryzuje się on zaburzeniami w „dojrzywaniu” cytochromu *c* [44] i we wprowadzaniu prawidłowych wiązań S-S do odpowiednich białek, a także cechami typowymi dla wszystkich mutantów *dsb*: zwiększoną wrażliwością na DTT i benzylopenicylinę [45]. Z drugiej strony, mutacje w genie *dsbD* prowadzą do częściowej supresji fenotypów bakterii *dsbA*<sup>-</sup> i *dsbB*<sup>-</sup>, zależnej od obecności białka DsbC. W tej sytuacji DsbC, występujące w utlenionej formie, może najprawdopodobniej zastępować DsbA w procesie utleniania grup SH [39,45]. Podwójne mutanty *dsbC dsbD*<sup>-</sup> wykazują bardziej złożony fenotyp. Mają one na przykład ograniczoną ruchliwość w podłożach półpłynnych, podczas gdy pojedyncze mutanty *dsbC*<sup>-</sup> lub *dsbD*<sup>-</sup> wykazują ruchliwość porównywalną do niezmutowanych bakterii [45].

#### BIAŁKO DsbG

DsbG jest białkiem rozpuszczalnym o ciężarze cząsteczkowym 25,7 kDa, homologiczne do DsbC, wykazujące 29% identyczności na poziomie aminokwasowym. Podobnie jak DsbC, jest ono homodimerem i zawiera domeny tioredoksynowe z charakterystyczną sekwencją Cys<sub>126</sub>-Pro-Tyr-Cys<sub>129</sub>. W komórce sekwencja ta jest utrzymywana w stanie zredukowanym przez białko DsbD. W układzie *in vitro* białko to wykazuje aktywność izomerazy disiarczkowej, także *in vivo* nadprodukcja DsbG łagodzi efekt mutacji *dsbC*<sup>-</sup>. Z drugiej strony DsbG nie posiada zdolności do redukcji insuliny oraz do refaldowania zdenaturowanej RN-azy A w układzie *in vitro*. Nie wykryto także szkodliwego wpływu braku *dsbG*

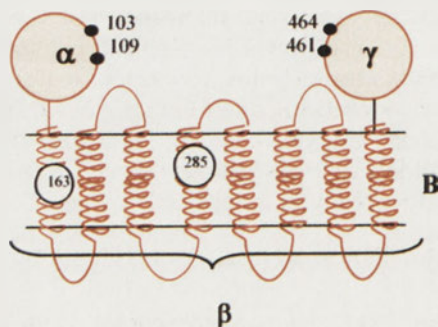
ani na wzrost bakterii ani na związanie periplazmatycznych białek [42,46]. Nie jest też znany żaden substrat tego białka *in vivo*.

Więcej informacji dostarczyła analiza kryształów uzyskanych dla utlenionych i zredukowanych form tego białka [47]. Według zaproponowanego modelu struktura przestrzenna DsbG przypomina kształtem homologiczne białko DsbC (Rys. 3B). Podobnie jak w przypadku DsbC, dwie podjednostki tworzą strukturę przypominającą literę V, w zagłębieniu której znajduje się miejsce wiązania substratu. Do wnętrza tego zagłębienia są wyeksponowane obie sekwencje katalityczne Cys-X-X-Cys, zdolne do tworzenia niestabilnego wiązania S-S. Jednakże istnieją zasadnicze różnice pomiędzy strukturami tych dwóch izomeraz. (i) Wielkość DsbG jest znacznie większa niż DsbC ze względu na długość łącznika pomiędzy domeną katalityczną a domeną dimeryzacyjną. Fakt ten znacząco wpływa na rozmiary zagłębienia wiążącego substrat: w białku DsbG jest ono prawie dwa razy większe niż w DsbC. (ii) Wnętrze zagłębienia wiążącego substrat ma generalnie charakter hydrofobowy w obu białkach. Jednakże w DsbG występują dodatkowo reszty aminokwasów o charakterze kwaśnym: 3 reszty Asp i 4 Glu, podczas gdy w DsbC znajdują się w tym miejscu wyłącznie aminokwasy hydrofobowe lub nienaładowane. (iii) W białku DsbG występuje dodatkowo naładowane zagłębienie w pętli łączącej dwie struktury  $\beta$  w N-końcowej domenie dimeryzacyjnej. Pętla ta w DsbG jest dłuższa, a dodatkowe reszty aminokwasowe mają charakter polarny i naładowany (Tyr, Gln, Asp).

Wymienione różnice w strukturze mogą mieć znaczący wpływ na specyficzność substratową DsbG. Autorzy modelu [47] postulują, że substratami DsbG, w przeciwieństwie do DsbC, mogą być białka już częściowo związane. Takie substraty mogą posiadać na powierzchni polarne reszty aminokwasowe, zdolne do oddziaływania z naładowanymi powierzchniami DsbG. Także rozmiary kieszeni wewnątrz dimeru V świadczą, że substrat może być zdecydowanie większy (np. częściowo związany fragment białka). W przypadku DsbC, małe rozmiary kieszeni wiążącej i jej hydrofobowy charakter są zgodne z postulowaną specyficznością względem rozwiniętych fragmentów niezwiązanych jeszcze białek. Proponowane różnice w specyficzności substratowej mogą wyjaśniać fakt występowania w periplazmie *E. coli* aż dwóch enzymów o aktywności izomerazowej wiązań S-S.

#### INNE PERIPLAZMATYCZNE BIAŁKA O AKTYWNOŚCI OKSYDOREDUKCYJNEJ

Do chwili obecnej zidentyfikowano dwa kolejne białka zawierające sekwencję Cys-X-X-Cys: CcmG (DsbE) oraz CcmH. Oba te białka biorą udział w procesie „dojrzywania” cytochromów typu *c* [48,49]. CcmG jest białkiem o ciężarze cząsteczkowym 20 kDa zakotwiczonym w błonie cytoplazmatycznej N-kończącym polipeptydem. Część C-kończąca jest eksponowana do periplazmy i zawiera miejsce aktywne: Cys<sub>80</sub>-Pro-Thr-Cys<sub>83</sub>. CcmG wykazuje wysoką specyficzność substratową. W przeciwieństwie do wielu innych oksydoreduktaz nie posiada zdolności do redukcji insuliny w układzie *in vitro*. Także w układzie *in vivo* brak genu *ccmG* nie ma wpływu na aktywność alkalicznej fosfatazy [50,51].



**Rysunek 4.** Model topologiczny białka DsbD, wg [63]. Oznaczenia skrótów: B – błona plazmatyczna;  $\alpha$  i  $\gamma$  – domeny periplazmatyczne, zawierające po 1 aktywnym disiarczku (cysteiny oznaczone czarnymi kropkami);  $\beta$  – domena transbłonowa, zawierająca 1 aktywny disiarczek (cysteiny przedstawione w formie kółek z numerem pozycji w łańcuchu polipeptydowym).

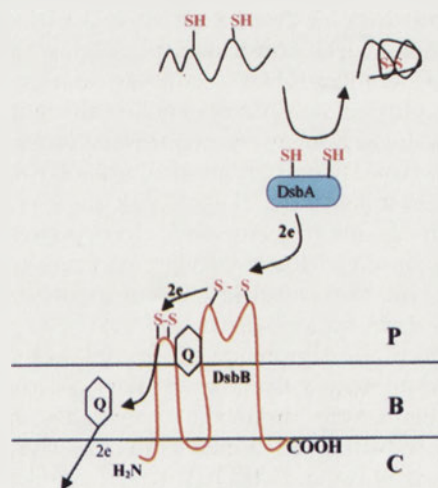
Jedynymi znanymi substratami CcmG są białka DsbD i CcmH. CcmG pobiera elektrony od DsbD, a następnie przekazuje je do kolejnego białka: CcmH, które może być bezpośrednim reduktorem cytochromu *c* [52]. Tak wysoka specyficzność CcmG może wynikać ze znacznych różnic w budowie przestrzennej w porównaniu z innymi białkami z nadrodziny tioredoksyny: (i) w obrębie domeny tioredoksynowej występuje wstawienie 24 reszt aminokwasowych, (ii) na końcu N białka występuje 30 dodatkowych reszt aminokwasowych. Razem tworzą one zagłębienie w pobliżu miejsca katalitycznego. Te wstawki są zachowane w ewolucji w homologach CcmG z innych bakterii, a usunięcie centralnej wstawki powoduje zahamowanie procesu biogenezy cytochromu *c*. Dodatkową niezwykłą cechą domeny tioredoksynowej w CcmG jest kwaśne środowisko miejsca aktywnego. W pobliżu sekwencji Cys-X-X-Cys występują reszty aminokwasowe o charakterze kwasowym: Asp<sub>377</sub>, Glu<sub>158</sub> i Glu<sub>168</sub>. Substrat CcmG, białko CcmH, posiada natomiast konserwowaną ewolucyjnie argininę, bezpośrednio poprzedzającą sekwencję Cys-X-X-Cys, mogącą mieć wpływ na oddziaływanie obu białek [53]. CcmH jest także białkiem związanym z błoną cytoplazmatyczną, eksponującym sekwencję Cys<sub>43</sub>-Pro-Lys-Cys<sub>46</sub> do periplazmy. CcmH z bakterii *E. coli* jest szczególnym białkiem, gdyż powstało najprawdopodobniej w wyniku połączenia dwóch genów kodujących u innych bakterii Gram ujemnych dwa osobne białka: CcmH i CcmI. Część N-końcowa CcmH z *E. coli* zawiera domenę tioredoksynową z sekwencją Cys-X-X-Cys, natomiast część C-końcowa odpowiada białku CcmI [54].

Cytochromy typu *c* są syntetyzowane w bakterii *Escherichia coli* w warunkach beztlenowych, ich funkcją jest przekazywanie elektronów na końcowy akceptor, którym może być azotan lub tlenek trimetyloaminy [3]. Cytochrom *c* po translokacji do periplazmy jest utleniany przez DsbA, które najprawdopodobniej także dopomaga w osiągnięciu konformacji właściwej do związania cząsteczki hemu. Mutanty *dsbA*<sup>-</sup> i *dsbB*<sup>-</sup> nie zawierają dojrzałej formy cytochromu *c* [55]. Jednakże, aby reszty cystein sekwencji Cys-X-X-Cys cytochromu mogły związać się z resztami winylowymi hemu, muszą znajdować się w zredukowanej formie. Stąd występuje konieczność redukcji wiązania S-S cytochromu *c* przez system CcmG/CcmH [54].

### SZLAK UTLENIAJĄCY W PERIPLAZMIE – PRZEPIYW ELEKTRONÓW OD BIAŁEK PERIPLAZMATYCZNYCH DO CHINONU

Z analizy genomu bakterii *E. coli* wynika, że co najmniej 300 białek zawierających przynajmniej 2 reszty cystein może być eksportowanych do przestrzeni periplazmatycznej. Białka te mogą być potencjalnymi substratami dla oksydazy DsbA. W procesie utleniania białko DsbA, zawierające niestabilny mostek disiarczkowy, wiąże się z niezwinętym substratem i dochodzi do wytworzenia przejściowego mieszanego disiarczku pomiędzy DsbA a substratem. Następnie mieszany disiarczek jest atakowany przez kolejną wolną grupę tiolową substratu. W rezultacie powstaje wiązanie S-S w białku i zredukowane DsbA [wg 9]. Aby DsbA mogło ponownie działać jako oksydaza, cysteiny centrum katalitycznego muszą być ponownie utlenione. Funkcję tę pełni błonowe białko DsbB, zawierające dwa wiązania S-S,

niezbędne do aktywności enzymatycznej. Trzy niezależne zespoły zaproponowały modele działania DsbB [56-58], różniące się w szczegółach dotyczących sposobu przekazywania elektronów i własności katalitycznych wiązań S-S. Wspólną cechą tych modeli była hipoteza postulująca, że potencjał redoks obu wiązań S-S w DsbB jest niższy niż białka DsbA, w związku z tym przekazywanie elektronu poprzez DsbB zachodziło by „pod prąd” (od potencjału bardziej utleniającego do bardziej redukującego). Wynikającą z wartości potencjałów redoks sprzeczność próbował tłumaczyć model, w którym przekazywanie elektronów odbywało by się bezpośrednio pomiędzy DsbA a ubichinonem, niezależnie od obecności cystein w DsbB [57]. Wątpliwości dotyczące mechanizmu przekazywania elektronów w systemie DsbA-DsbB wyjaśniła najnowsza praca [25], w której autorzy ponownie określili potencjały redoks wiązań S-S białka DsbB i kolejno zrewidowali poszczególne etapy katalizy. W doświadczeniach autorzy wykorzystali DsbB, z którego usunęli związany ubichinon. Wyznaczone przez nich potencjały redoks wiązań Cys<sub>41</sub>-Cys<sub>44</sub> i Cys<sub>104</sub>-Cys<sub>130</sub> w DsbB wynosiły odpowiednio -0,069 V i -0,186 V. Na podstawie tej pracy i na bazie poprzednich modeli można przedstawić zarys mechanizmu działania DsbB jako przenośnika elektronów pomiędzy DsbA i chinonem (Rys. 5). W pierwszym etapie wyeksponowany do środowiska anion tiolowy cysteiny 30 z białka DsbA atakuje wiązanie disiarczkowe pomiędzy Cys<sub>104</sub> a Cys<sub>130</sub> białka DsbB i tworzy się mieszany disiarczek. Wiązanie to jest z kolei atakowane przez Cys<sub>33</sub> z białka DsbA. W wyniku tego etapu dochodzi do regeneracji utlenionej formy DsbA i do redukcji jednego mostka disiarczkowego w DsbB. Etap ten potwierdzają doświadczenia, w których wykryto obecność mieszanych disiarczków pomiędzy Cys<sub>104</sub> DsbB a Cys<sub>30</sub> DsbA [59,60]. Powyższa reakcja jest energetycznie niekorzystna (+12,4 kJ/mol) ze względu na bardziej utleniający charakter wiązania S-S w DsbA w stosunku do wiązania Cys<sub>104</sub>-Cys<sub>130</sub> w DsbB. Jednakże jest ona napędzana następną reakcją: wewnątrzcząsteczkowym przekazaniem elektronów na kolejny mostek disiarczkowy Cys<sub>41</sub>-Cys<sub>44</sub> w DsbB (-22,6 kJ/mol), którego potencjał



Rysunek 5. Model działania szlaku utleniającego DsbA/DsbB, wg [3,25]. DsbA utlenia białko substratowe, ulegając jednocześnie redukcji. Utlenioną formę DsbA regeneruje DsbB. Elektrony (e) z DsbA przepływają przez DsbB na cząsteczkę chinonu (Q), a następnie są przekazywane na łańcuch oddechowy. Oznaczenia skrótów: P – periplazma, B – błona cytoplazmatyczna, C – cytoplazma.

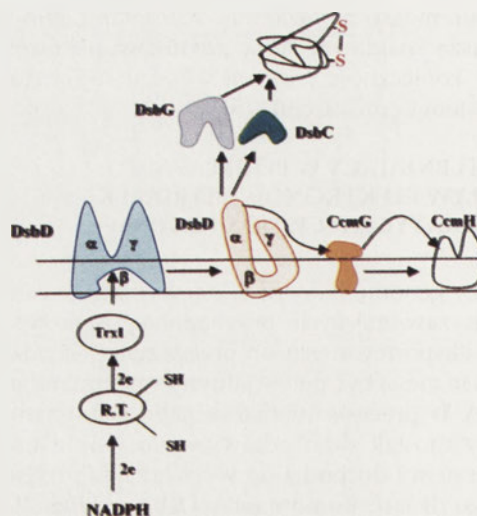
redoks posiada jak dotąd najwyższą wartość wyznaczoną dla wiązań S-S w białkach. Końcowym etapem jest przekazanie elektronów na związany w tym rejonie chinon i regeneracja utlenionej formy DsbB. Ta ostatnia reakcja jest etapem najbardziej korzystnym energetycznie ze względu na zdecydowanie bardziej utleniający charakter chinonu [25]. W bakteriach żyjących w warunkach tlenowych elektrony z DsbB są pobierane przez ubiquinon (Q8), a następnie są przekazywane na oksydazę cytochromową bd lub bo. Końcowym akceptorem elektronów jest tlen [23]. W warunkach beztlenowych w *E. coli* dochodzi do indukcji syntezy menachinonu. Menachinon jest zdolny do redukcji DsbB *in vitro*, a pobrane elektrony mogą być następnie przekazane przez odpowiednie reduktazy do końcowych akceptorów: fumaranu, azotanów lub azotynów [61].

#### SZLAK REDUKUJĄCY W PERIPLAZMIE – PRZEPIY W ELEKTRONÓW OD TIOREDOKSYNY DO PERIPLAZMATYCZNYCH BIAŁEK

Funkcja białek Dsb nie ogranicza się jedynie do utleniania wolnych grup SH białek związanych w periplazmie. W niektórych przypadkach niezbędna jest redukcja istniejących wiązań S-S. Taka konieczność zachodzi w przypadku błędnie wprowadzonych mostków disiarczkowych w białkach zawierających wiele reszt cysteinowych lub w procesie biogenezy cytochromu *c* w etapie poprzedzającym przyłączenie hemu. W tym celu elektrony są transportowane z cytoplazmy przez błonę cytoplazmatyczną za pośrednictwem transbłonowego białka DsbD (Rys. 6). Bezpośrednim donorem elektronów dla DsbD jest tioredoksyna, która jest z kolei redukowana przez reduktazę tioredoksynową w reakcji zależnej od NADPH [62]. Głównym źródłem elektronów dla DsbD jest tioredoksyna 1; tioredoksyna 2 może zastąpić tioredoksynę 1, gdy jest nadprodukowana [63]. Białko DsbD oddziałuje z tioredoksyną za pośrednictwem aktywnego disiarczku Cys<sub>163</sub>-Cys<sub>285</sub> w transbłonowej domenie β. Elektrony są w dalszej kolejności przenoszone na disiarczek Cys<sub>461</sub>-Cys<sub>464</sub> w periplazmatycznej domenie γ białka DsbD, a następnie na disiarczek Cys<sub>103</sub>-Cys<sub>109</sub> w domenie periplazmatycznej α. W końcowej fazie elektrony redukują substraty białka DsbD, np. DsbC. Szlak przenoszenia elektronów poprzez DsbD został scharakteryzowany dzięki konstrukcji plazmidów kodujących poszczególne domeny DsbD. Jednoczesna ekspresja tych plazmidów prowadziła do zniesienia efektu mutacji *dsbD<sup>-</sup>*, co wskazywało, że domeny syntetyzowane osobno mogą ze sobą oddziaływać i tworzyć funkcjonalne białko [62]. Usunięcie aktywnego disiarczku z jakiegokolwiek domeny prowadziło do nagromadzenia zredukowanych form poprzedzających funkcjonowanie danej domeny i nagromadzenia utlenionych białek, będących biorcami elektronów ze zmutowanej domeny. Na przykład usunięcie disiarczku Cys<sub>461</sub>-Cys<sub>464</sub> w domenie γ powodowało nagromadzenie zredukowanej domeny β i utlenionej domeny α. Dodatkowym potwierdzeniem było wykrycie mieszanych disiarczków pomiędzy tioredoksyną a Cys<sub>163</sub> w białku DsbD oraz pomiędzy Cys<sub>109</sub> domeny αDsbD a Cys<sub>98</sub> w białku DsbC [62,64]. Zidentyfikowano także mieszany disiarczek pomiędzy dwiema periplazmatycznymi domenami DsbD i określono metodą krystalografii jego strukturę przestrzenną. Wykazano, że w tym oddziaływaniu uczestniczą Cys<sub>109</sub> z domeny αDsbD i Cys<sub>461</sub> z domeny γ. Aby mogło być utworzone to wiązanie S-S, musi dojść do

znacznych przesunięć obu domen. Samo oddziaływanie domeny αDsbD z domeną γ przypomina oddziaływanie domeny αDsbD z białkiem DsbC. Jest ono stabilizowane przez niewielką ilość międzypodjednostkowych wiązań wodorowych (4–6 wiązań). W przeciwieństwie do tego wewnątrzcząsteczkowego disiarczku w DsbD, mieszany disiarczek pomiędzy DsbC i DsbD jest stabilizowany przez dodatkowe oddziaływanie między DsbD a drugą podjednostką w dimerze DsbC [65]. Jak dotąd nie udało się jednak „uchwycić” mieszanych disiarczków pomiędzy domenami γ i β. Być może te intermedyaty w obrębie DsbD są bardziej niestabilne niż pozostałe mieszane disiarczki. Za wymienioną kolejnością przepływu elektronów przemawiają także wartości potencjałów redoks uzyskane dla poszczególnych domen. Domeny α i γ posiadają bardziej utleniające potencjały (odpowiednio -232 mV i -235 mV) niż tioredoksyna (-270 mV), ale mają bardziej redukujący charakter od DsbC (-140 mV). Wartości te świadczą, że przepływ elektronów może być stymulowany wyłącznie termodynamicznie [65].

Podczas gdy przekazywanie elektronów pomiędzy periplazmatycznymi domenami DsbD oraz pomiędzy DsbD a DsbC zostało zbadane szczegółowo, sposób, w jaki elektrony są przenoszone w poprzek błony cytoplazmatycznej w obrębie podjednostki βDsbD nadal wymaga wyjaśnienia. W procesie tym niezbędne są cysteiny Cys<sub>163</sub> i Cys<sub>285</sub>, ale nie można wykluczyć obecności dodatkowych kofaktorów, zdolnych do przenoszenia elektronów, np. cząsteczek chinonów (podobnie jak w DsbB). Brak wykrytych mieszanych disiarczków pomiędzy podjednostkami β i γ oraz wyniki doświadczeń pokazujące, że Cys<sub>163</sub> i Cys<sub>285</sub> są dostępne od strony cytoplazmatycznej poddają w wątpliwość hipotezę przekazywania elektronów wyłącznie poprzez cysteiny DsbD [wg 9]. Z drugiej strony zwolennicy modelu działania DsbD bez kofaktora postulują, że DsbD na skutek redukcji wiązania Cys<sub>163</sub>-Cys<sub>285</sub> ulega znacznym zmianom konformacyjnym, w wyniku których Cys<sub>163</sub>-Cys<sub>285</sub> stają się eksponowane do strony periplazmatycznej, gdzie mogą oddziaływać z Cys<sub>461</sub> podjednostki γ [63]. Sumaryczny model



Rysunek 6. Model działania szlaku redukującego, wg [3,63]. DsbC redukuje błędnie wprowadzone mostki disiarczkowe. Aktywna zredukowana forma DsbC jest regenerowana przez DsbD, które odbiera elektrony od cytoplazmatycznego systemu tioredoksyny. DsbD redukuje także inne białka: izomerazę DsbG oraz białko uczestniczące w biogenezie cytochromu *c*, CcmG. CcmG z kolei redukuje białko CcmH, przekazując elektrony na utlenioną formę cytochromu *c*. Skróty oznaczają: R.T. – reduktaza tioredoksynowa; Trx – tioredoksyna; e – elektron.

mechanizmu przepływu elektronów z cytoplazmy do perioplazmy przez białko DsbD przedstawia rysunek 6.

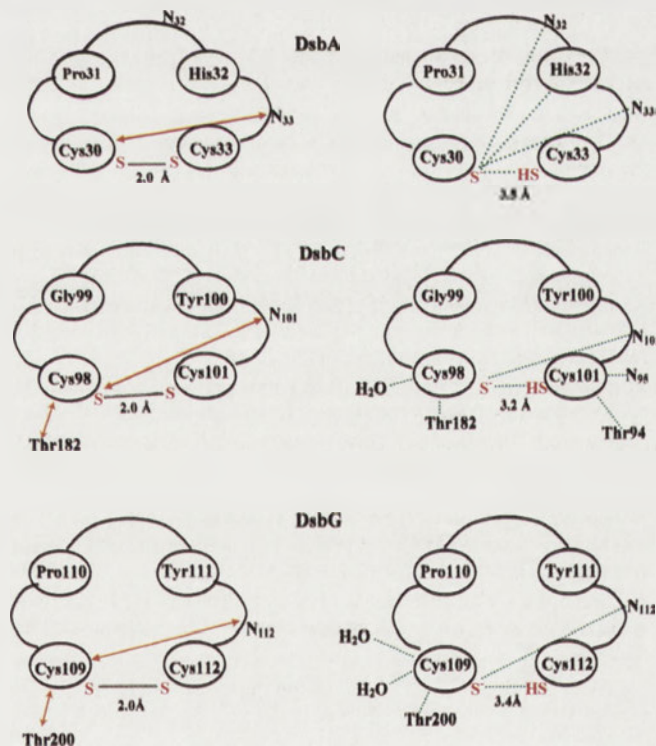
### DLACZEGO DsbA/DsbB ORAZ DsbC/DsbD FUNKCJONUJĄ W PERIPLAZMIE JAKO DWA ODRĘBNE SYSTEMY OKSYDOREDUKCYJNE?

Wprowadzenie mostków disiarczkowych do białek translokowanych do perioplazmy wymaga utleniającego działania systemu DsbA/DsbB. Białka te zawierają wiązania S-S o najbardziej utleniającym potencjale redoks wśród scharakteryzowanych dotąd białek. DsbA, jako bezpośredni utleniacz, jest utrzymywane przez DsbB w stanie utlenionym. Białko drugiego systemu – DsbC – odpowiedzialne za izomeryzację wiązań S-S o nieprawidłowej topologii, utrzymywane jest w stanie zredukowanym. Mimo, że DsbD i DsbC mają niższe wartości potencjałów redoks niż DsbA i DsbB, nie są przez ten system utleniane [9]. Przyczyny tego rozgraniczenia długo pozostawały niejasne. Ostatnia praca Rozhkovej i wsp. [65], przyczyniła się znacznie do wyjaśnienia tego problemu. Autorzy określili w układzie *in vitro* stałe prędkości reakcji redoks pomiędzy poszczególnymi białkami Dsb i okazało się, że reakcje nienaturalne zachodzą  $10^3$ - $10^7$  razy wolniej niż prawidłowe reakcje pomiędzy DsbA i DsbB lub DsbC i DsbD. Istnieją więc ogromne bariery kinetyczne pomiędzy białkami obu systemów, które powodują, że w żywej komórce nie zachodzi między nimi przekazywanie elektronów. Proponowaną przez autorów przyczyną istnienia tych barier kinetycznych jest niedopasowanie przestrzenne białek obu systemów. Hipotezę tę może potwierdzać fakt, że zmutowane białko DsbC, niezdolne do tworzenia dimeru, staje się *in vivo* i *in vitro* substratem dla DsbB i może znosić efekt mutacji *dsbA* [66]. Być może dimeryzacja DsbC chroni to białko przed oddziaływaniem i utlenieniem przez DsbB.

### PRZYCZYNY NISKIEJ STABILNOŚCI WIĄZAŃ S-S W OBRĘBIE KATALITYCZNYCH SEKWENCJI BIAŁEK Dsb

Utworzenie wiązania disiarczkowego z reguły stabilizuje białko i zapewnia mu korzystniejszą termodynamicznie strukturę. Wyjątkiem od tej reguły są wiązania S-S w centrach katalitycznych białek Dsb w motywach Cys-X-X-Cys. Cysteiny z tych sekwencji tworzą mostki disiarczkowe odznaczające się bardzo małą trwałością. Przyczyny tego zjawiska były szczegółowo badane i wydaje się, że zasadniczą rolę odgrywają przede wszystkim reszty aminokwasowe sąsiadujące bezpośrednio z aktywnymi cysteinami, zwłaszcza dwie reszty rozdzielających aminokwasów (X-X) [3]. W momencie utworzenia mostka disiarczkowego powstaje charakterystyczna struktura przypominająca pętlę (Rys. 7). Analiza struktury przestrzennej białek DsbA, DsbC i DsbG sugeruje, że w obrębie tej pętli w utlenionych białkach występują oddziaływania destabilizujące. Dochodzi tam do oddziaływania pomiędzy siarką pierwszej cysteiny z sekwencji Cys-X-X-Cys a azotem z głównego łańcucha drugiej cysteiny. W utlenionych DsbG i DsbC występuje dodatkowo oddziaływanie destabilizujące: pomiędzy siarką pierwszej cysteiny a grupą hydroksylową łańcucha bocznego treoniny. Te reszty aminokwasowe są oddalone w sekwencji liniowej, ale w zwiniętym białku leżą w odległości około 3.5 Å [47]. Taki bliski kontakt łańcucha bocznego Thr i Cys może destabilizować disiarczek poprzez dostarczanie grup donoro-

wych protonów, ułatwiających redukcję. Z drugiej strony anion tiolowy może wytwarzać wiązania wodorowe, które stabilizują zredukowaną formę. Na przykład z analizy krystalograficznej utlenionego i zredukowanego DsbA wynika, że anion tiolowy wytwarza wiązania wodorowe z grupą tiolową Cys<sub>33</sub>, a także z atomami azotu grup amidowych His<sub>32</sub> i Cys<sub>33</sub>. Dodatkowo mogą występować oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy anionem tiolowym a łańcuchem bocznym His<sub>32</sub>. W utlenionym białku oddziaływanie z His<sub>32</sub> już nie występuje [67]. Analiza porównawcza struktur przestrzennych dwóch białek o skrajnie przeciwstawnych potencjałach redoks: redukującej tioredoksyny i utleniającego DsbA wykazała, że w tioredoksynie brak jest części oddziaływań, stabilizujących anion tiolowy zredukowanej formy. W tioredoksynie w pozycji histydyny występuje reszta prolina, niezdolna do tworzenia wiązań wodorowych. Ponadto najprawdopodobniej nie powstaje w zredukowanej tioredoksynie wiązanie wodorowe pomiędzy anionem tiolowym a grupą amidową drugiej cysteiny. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na własności centrum katalitycznego DsbA może być postulowane niekorzystne oddziaływanie elektrostatyczne His<sub>32</sub> z odcinkiem helikalnym, na którego końcu N leży ten aminokwas. Oddziaływanie to występuje zarówno w formie zredukowanej, jak i utlenionej, jednakże w tej pierwszej jest ono kompensowane przez korzystne dla stabilności wiązania wodorowe. Występująca w tej pozycji w tioredoksynie reszta prolina nie posiada analogicznych własności. Przypuszcza się, że wymienione różnice w oddziaływaniach dotyczących rejonów centrów katalitycznych tioredoksyny i DsbA leżą u podstaw różnej stabilności wiązań disiarczkowych, łączących aktywne cysteiny [67]. Wiązanie S-S w centrach katalitycznych białek DsbC i DsbG jest także niestabilne, jednakże występowa-



Rysunek 7. Oddziaływania stabilizujące i destabilizujące w obrębie centrów katalitycznych DsbA, DsbC i DsbG, wg [47]. Lewa kolumna przedstawia centra katalityczne w formie utlenionej, prawa – w zredukowanej. Linie kropkowane w kolorze zielonym oznaczają wiązania wodorowe stabilizujące anion tiolowy, symbol strzałki w kolorze pomarańczowym – oddziaływania destabilizujące.

nie formy zredukowanej tych białek jest nieco mniej korzystne niż w przypadku DsbA. Prawdopodobną przyczyną jest brak w sekwencji Cys-X-X-Cys tych białek reszty histydy, pełniącej kluczową rolę w DsbA.

## PODSUMOWANIE

Historia badań oksydoreduktaz periplazmatycznych w bakterii *Escherichia coli* nie jest długa i obejmuje zaledwie ostatnie 15 lat. Do tej pory zidentyfikowano siedem periplazmatycznych białek zaangażowanych w reakcje redoks dotyczące mostków disiarczkowych. Prowadzone w tym czasie intensywne badania doprowadziły do znacznego postępu w zrozumieniu funkcjonowania białek Dsb. Stwierdzono, że działają one w dwóch niezależnych systemach: (i) utleniającym, odprowadzającym elektrony ze zwijanych białek na ubichinon; (ii) redukującym, pobierającym elektrony z cytoplazmatycznej tioredoksyny i umożliwiającym izomeryzację wiązań S-S oraz „dojrzwianie” cytochromu *c*. Białka należące do tych dwóch szlaków funkcjonują odrębnie dzięki dużym barierom kinetycznym zapobiegającym ich wzajemnym oddziaływaniom. Wiele kwestii nadal wymaga wyjaśnienia. Nie jest znany sposób przekazywania elektronów z DsbB na ubichinon. Nie wiadomo, w jaki sposób transbłonowa domena DsbD przenosi elektrony z cytoplazmatycznej strony błony na periplazmatyczną. Także naturalne substraty DsbG oczekują na odkrycie.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bardwell JCA (1997) PDI and thioredoxin-related proteins – an overview, W: Gething MJ (red) Guidebook to Molecular Chaperones and protein-folding catalysts. A Sambrook & Toozee Publications at Oxford University Press, Oxford, New York, str. 311-313
2. Ritz D, Beckwith J (2001) Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55: 21-48
3. Fabianek RA, Hennecke H, Thony-Meyer L (2000) Periplasmic protein thiol: disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 24: 303-316
4. Martin JL, Bardwell JCA, Kuriyan J (1993) Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation *in vivo*. *Nature* 365: 464-468
5. Frech C, Wunderlich M, Glockshuber R, Schmid FX (1996) Preferential binding of an unfolded protein to DsbA. *EMBO J* 15: 392-398
6. Bardwell JCA, McGovern K, Beckwith J (1991) Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell* 67: 581-589
7. Kamitani S, Akiyama Y, Ito K (1992) Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase. *EMBO J* 11: 57-62
8. Wunderlich M, Glockshuber R (1993) Redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) from *Escherichia coli*. *Protein Sci* 2: 717-736
9. Nakamoto H, Bardwell JCA (2004) Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the *Escherichia coli* periplasm. *Biochim Biophys Acta* 1694: 111-119
10. Nelson JW, Creighton TE (1994) Reactivity and ionization of the active site cysteine residue of DsbA, a protein required for disulphide bond formation *in vivo*. *Biochemistry* 32: 5083-5092
11. Grauschopf U, Winther JR, Korber P, Zander T, Dallinger P, Bardwell JCA (1995) Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell* 83: 947-955
12. Zapun A, Creighton TE (1994) Effects of DsbA on the disulfide folding of bovine pancreatic trypsin inhibitor and  $\alpha$ -lactalbumin. *Biochemistry* 33: 5202-5211
13. Dailey FE, Berg HC (1993) Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1043-1047
14. Jacob-Debuisson F, Pinkner J, Xu Z, Striker R, Padmanabhan A, Hultgren SJ (1994) PapD chaperone function in pilus biogenesis depends on oxidant and chaperone-like activities of DsbA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11552-11556
15. Genevaux P, Bauda P, DuBow MS, Oudega B (1999) Identification of Tn10 insertions in the *dsbA* gene affecting *Escherichia coli* biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 173: 403-409.
16. Zhang H-Z, Donnenberg MS (1993) DsbA is required for stability of the type IV pilin of the enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 21: 787-797
17. Sauvonnnet N, Pugsley AP (1998) The requirement for DsbA in pullulanase secretion is independent of disulphide bond formation in the enzyme. *Mol Microbiol* 27: 661-667
18. Zheng WD, Quan H, Song JL, Yang SL, Wang C (1999) Does DsbA have chaperone like activity? *Arch Biochem Biophys* 337: 326-331
19. Jander G, Martin NL, Beckwith J (1994) Two cysteines in each periplasmic domain of the membrane protein DsbB are required for its function in protein disulfide bond formation. *EMBO J* 13: 5121-5127
20. Bader MW, Xie T, Yu CA, Bardwell JC (2000) Disulfide bonds are generated by quinone reduction. *J Biol Chem* 275: 26082-26088
21. Xie T, Yu L, Bader MW, Bardwell JC, Yu CA (2002) Identification of the ubiquinone-binding domain in the disulfide catalyst disulfide bond protein B. *J Biol Chem* 277: 1649-1652
22. Kadokura H, Bader M, Tian H, Bardwell JC, Beckwith J (2000) Roles of a conserved arginine residue of DsbB in linking protein disulfide bond formation pathway to the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10884-10889
23. Kawamukai M (2002) Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. *J Biosci Bioeng* 94: 511-517
24. Bardwell JC, Lee JO, Jander G, Martin N, Belin D, Beckwith J (1993) A pathway for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell* 67: 581-589
25. Grauschopf U, Fritz A, Glockshuber R. (2003) Mechanism of the electron transfer catalyst DsbB from *Escherichia coli*. *EMBO J* 22: 3503-3513
26. Missiakas D, Georgopoulos C, Raina S (1993) Identification and characterization of the *Escherichia coli* gene *dsbB*, whose product is involved in the formation of disulfide bonds *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7084-7088
27. Sambongi Y, Ferguson SJ (1996) Mutants of *Escherichia coli* lacking sulphide oxidoreductases DsbA and DsbB cannot synthesise an exogenous monohaem c-type cytochrome except in the presence of disulphide compounds. *FEBS Lett* 398: 265-268
28. Frishman D (1996) DsbC protein: a new member of the thioredoxin fold containing family. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 686-689
29. Zapun A, Missiakas D, Raina S, Creighton TE (1995) Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 34: 5075-5089
30. Joly JC, Swartz JR (1997) *In vitro* and *in vivo* redox states of the *Escherichia coli* periplasmic oxidoreductases DsbA and DsbC. *Biochemistry* 36: 10067-10072
31. McCarthy AA, Haebel PW, Torronen A, Rybin V, Baker EN, Metcalf P (2000) Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* 7: 196-199
32. Sone M, Akiyama Y, Ito K (1997) Differential *in vivo* roles played by DsbA and DsbC in the formation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem* 272: 10349-10352
33. Hiniker J, Bardwell JCA (2004) *In vivo* substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem* 279: 12967-12973
34. Rietsch A, Belin D, Martin M, Beckwith J (1996) *In vivo* pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13048-13053
35. Maskos K, Huber-Wunderlich M, Glockshuber R (2003) DsbA and DsbC-catalysed oxidative folding of proteins with complex disulfide bridge patterns *in vitro* and *in vivo*. *J Mol Biol* 325: 495-513
36. Walker KW, Gilbert HF (1997) Scanning and escape during protein-disulfide isomerase-assisted protein folding. *J Biol Chem* 272: 8845-8848
37. Missiakas D, Georgopoulos C, Raina S (1994) The *Escherichia coli dsbC* (*xprA*) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *EMBO J* 13: 2013-2020
38. Chen J, Song J, Zhang S, Wang Y, Ciu D, Wang C (1999) Chaperone activity of DsbC. *J Biol Chem* 274: 19601-19605



39. Rietsch A, Bessette P, Georgiou G, Beckwith J (1997) Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J Bacteriol* 179: 6602-6608
40. Gordon EH, Page MD, Willis AC, Ferguson SJ (2000) *Escherichia coli* DipZ: anatomy of a transmembrane protein disulphide reductase in which three pairs of cysteine residues, one in each of three domains, contribute differentially to function. *Mol Microbiol* 35: 1360-1374
41. Haebel PW, Goldstone D, Katzen F, Beckwith J, Metcalf P (2002) The disulfide bond isomerase DsbC is activated by an immunoglobulin-fold thiol oxidoreductase: crystal structure of the DsbC-DsbD $\alpha$  complex. *EMBO J* 21: 4774-4784
42. Bessette PH, Cotto JJ, Gilbert HF, Georgiou G (1999) In vivo and in vitro function of the *Escherichia coli* periplasmic cysteine oxidoreductase DsbG. *J Biol Chem* 274: 7784-7792
43. Katzen F, Deshmukh M, Daldal F, Beckwith J (2002) Evolutionary domain fusion expanded the substrate specificity of the transmembrane electron transporter DsbD. *EMBO J* 21: 3960-3969
44. Croke H, Cole J (1995) The biogenesis of c-type cytochromes in *Escherichia coli* requires a membrane-bound protein, DipZ, with a protein disulfide isomerase-like domain. *Mol Microbiol* 15: 1139-1150
45. Missiakas D, Schwager F, Raina S (1995) Identification and characterization of a new disulfide-isomerase like protein (dsbD) in *Escherichia coli*. *EMBO J* 14: 3415-3424
46. Andersen CL, Matthey-Dupraz A, Missiakas D, Raina S (1997) A new *Escherichia coli* gene, dsbG, encodes a periplasmic protein involved in disulphide bond formation, required for recycling DsbA/DsbB and DsbC redox proteins. *Mol Microbiol* 26: 121-132
47. Heras B, Edeling MA, Schirra HJ, Raina S, Martin JL (2004) Crystal structures of the DsbG disulfide isomerase reveal an unstable disulfide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8876-8881
48. Thony-Meyer L, Fischer F, Kunzler P, Ritz D, Henneke H (1995) *Escherichia coli* genes required for cytochrome c maturation. *J Bacteriol* 177: 4321-4326
49. Grove J, Tanapongpipat S, Thomas G, Griffiths L, Croke H, Cole J (1996) *Escherichia coli* K-12 genes essential for the synthesis c-type cytochromes and a third nitrite reductase located in the periplasm. *Mol Microbiol* 19: 467-481
50. Fabianek RA, Huber-Wunderlich M, Glockshuber R, Kunzler P, Henneke H, Thony-Meyer L (1997) Characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* CysY protein, a membrane-anchored periplasmic thioredoxin that may play a role as a reductant in the biogenesis of c-type cytochromes. *J Biol Chem* 272: 4467-4473
51. Page MD, Ferguson SJ (1997) *Paracoccus denitrificans* CcmG is periplasmic protein-disulphide oxidoreductase required for c- and aa3-type cytochrome biogenesis; evidence for a reductase *in vivo*. *Mol Microbiol* 24: 977-990
52. Reid E, Cole J, Eaves DJ (2001) The *Escherichia coli* CcmG protein fulfils a specific role in cytochrome c assembly. *Biochem J* 355: 51-58
53. Edeling MA, Guddat LW, Fabianek RA, Thony-Meyer L, Martin JL (2002) Structure of CcmG/DsbE at 1.14 Å resolution: high fidelity reducing activity in an indiscriminately oxidizing environment. *Structure* 10: 973-979
54. Fabianek RA, Hofer T, Thony-Meyer L (1999) Characterisation of the *Escherichia coli* protein CcmH reveals new insight into the redox pathway required for cytochrome c maturation. *Arch Microbiol* 171: 92-100
55. Metherringham R, Griffiths L, Croke H, Forsythe S, Cole J (1995) An essential role for DsbA in cytochrome c synthesis and formate-dependent nitrite reduction by *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 164: 301-307
56. Inaba K, Ito K (2002) Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction cascade. *EMBO J* 21: 2646-2654
57. Regeimbal J, Bardwell JC (2002) dsbB catalyses disulfide bond formation de novo. *J Biol Chem* 277: 32706-32713
58. Kadokura H, Beckwith J (2002) Four cysteines of membrane protein DsbB act in concert to oxidize its substrate DsbA. *EMBO J* 21: 2354-2363
59. Kishigami S, Kanaya E, Kikuchi M, Ito K (1995) DsbA-DsbB interaction through their active site cysteines. Evidence from an odd cysteine mutant of DsbA. *J Biol Chem* 270: 17072-17074
60. Guillhot C, Jander G, Martin NL, Beckwith J (1995) Evidence that the pathway of disulfide bond formation in *Escherichia coli* involves interactions between the cysteines of DsbB and DsbA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9895-9899
61. Bader M, Muse W, Ballou DP, Gassner C, Bardwell JC (1999) Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell* 98: 217-227
62. Katzen F, Beckwith J (2000) Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell* 103: 769-779
63. Porat A, Cho S-H, Beckwith J (2004) The unusual transmembrane electron transporter DsbD and its homologues: a bacterial family of disulfide reductases. *Res Microbiol* 155: 617-622
64. Krupp R, Chan C, Missiakas D (2001) DsbD catalyzed transport of electrons across the membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276: 3696-3701
65. Rozhkova A, Stirnimann CU, Frei P, Graushopf U, Brunisholtz R, Grutter MG, Capitani G, Glockshuber R (2004) Structural basis and kinetics of inter- and intramolecular disulfide exchange in the redox catalyst DsbD. *EMBO J* 23: 1709-1719
66. Bader MW, Hiniker A, Regeimbal J, Goldstone D, Haebel PW, Riemer J, Metcalf P, Bardwell JC (2001) Turning a disulfide isomerase into an oxidase: DsbC mutants that imitate DsbA. *EMBO J* 20: 1555-1562
67. Guddat LW, Bardwell JCA, Martin JL (1998) Crystal structures of reduced and oxidized DsbA: investigation of domain motion and thiolate stabilization. *Structure* 6: 757-767

## Periplasmic disulfide oxidoreductases from bacterium *Escherichia coli* – their structure and function

Joanna Skórko-Glonek<sup>✉</sup>, Anna Sobiecka

Department of Biochemistry, Institute of Biology, University of Gdańsk, 24 Kładki St., 80-822 Gdańsk, Poland  
<sup>✉</sup>e-mail: glonek@biotech.univ.gda.pl

**Key words:** disulfide bonds, oxidoreductases, Dsb proteins, redox potential

### ABSTRACT

The formation of proper structural disulfide bonds is one of the key steps during the folding of many secretory proteins and occurs both in prokaryotes and eukaryotes. In Gram negative bacterium *Escherichia coli* this process is catalyzed by a set of periplasmic oxidoreductases, termed Dsb. These proteins function in two separate pathways: (1) oxidizing (DsbA/DsbB system), responsible for introducing S-S bonds, and (2) reducing (DsbC/DsbD system, DsbG, CcmG and CcmH) which acts to isomerase wrongly formed disulfide bonds and participates in maturation of cytochrome c. The first system acts in connection with the inner membrane electron transfer system, using quinone molecules as electron acceptors, whereas reducing pathway relies on constant supply of electrons provided by the cytoplasmic thioredoxin system. Majority of Dsb proteins belongs to the thioredoxin superfamily and they contain the conserved Cys-X-X-Cys motif in their active site. The redox properties of Dsb proteins with the particular focus on structure-function dependence are in this review discussed.

# 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 w fragmentach w innym czasopiśmie wymagać będzie uprzedniej zgody Redakcji.

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

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

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

### WSKAZÓWKI SZCZEGÓŁOWE:

Przed przystąpieniem do napisania artykułu Autorzy są proszeni o zapoznanie się z najnowszym numerem „Postępy Biochemii”, aby przygotować pracę pod względem edytorskim, językowym oraz jakości materiału ilustracyjnego, które będą odpowiadały aktualnym wymogom Redakcji. Artykuły powinny być pisane językiem naukowym, lecz zrozumiałym dla niespecjalistów. Poprawność logiczną i stylistyczną 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<sup>+</sup> channels in an open conformation. *Nature* 430: 806-810
2. Toyoshima C, Inesi G (2004) Structural basis of ion pumping by Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73: 269-292
3. Dołowy K, Szewczyk A, Pikuła S (2003) *Blony 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. Darzynkiewicz E, Jankowska-Anyszka M (2000) Struktura i funkcja końca 5' (KAPU) mRNA i U snRNA, W: Koroniak H, Barciszewski J (red) *Na pograniczu chemii i biologii, t. IV*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, str. 143-179

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

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

Prace w formie elektronicznej prosimy przysyłać na adres:

[postepy@nencki.gov.pl](mailto: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

# MILLIPORE

## Twój partner w analizie i detekcji białek

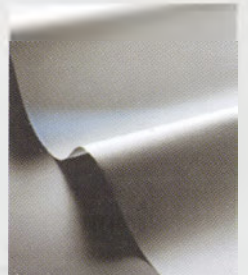
W naszej ofercie znajdziecie Państwo m.in.:

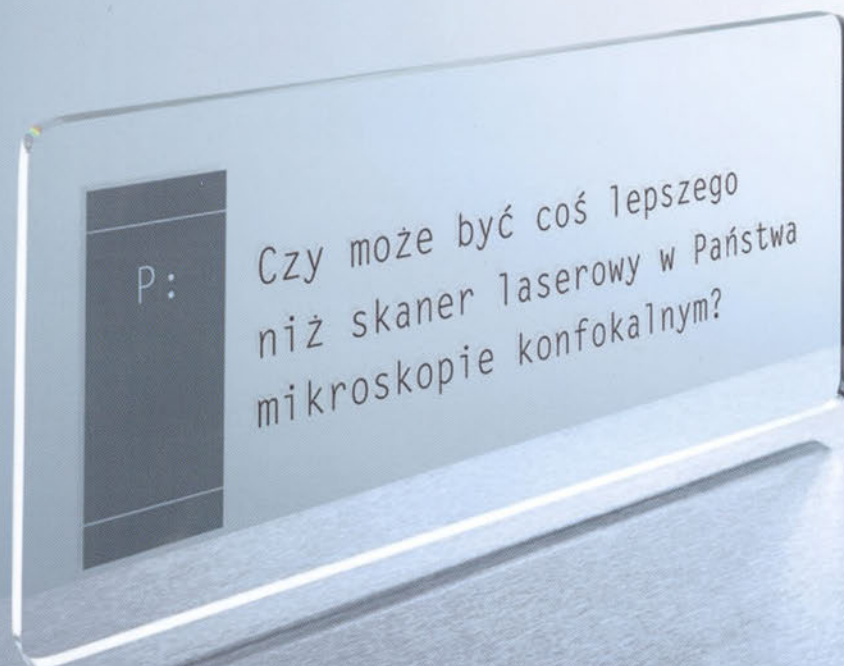
filtry nastrzykawkowe

wirówkowe systemy do oczyszczania,  
frakcjonowania i zagęszczania białek

membrany do immunoblottingu

odczynniki do immunodetekcji





## O: TAK DWA SKANERY LASEROWE

Odpowiedź jest prosta: nowy mikroskop konfokalny Olympus FluoView FV1000 pracuje z dwoma skanerami, a nie jak inne podobne systemy, tylko z jednym. Wprowadzenie dodatkowego skanera stwarza zupełnie nowe możliwości w analizie żywych komórek, rozwiązuje problem utraty danych podczas rejestracji procesów. W systemach konfokalnych poprzedniej generacji do pobudzania komórek i do obserwacji używany był jeden tylko układ skanujący. Powodowało to, że niemożliwe było rejestrowanie szybkiej odpowiedzi komórek podczas i bezpośrednio po stymulacji. Dwa zsynchronizowane układy skanujące zastosowane w mikroskopie FV1000 umożliwiają jednoczesne prowadzenie obserwacji procesów oraz dokonywanie stymulacji. Ułatwia to wszechstronną, precyzyjną dokumentację i analizę zjawisk na poziomie komórkowym, bez utraty istotnych informacji. FluoView FV1000 wprowadza nową jakość w badaniach procesów przeżyciowych: rejestrację i zrozumienie zjawisk w stopniu poprzednio nieosiągalnym. Wystarczy tylko chwila pracy z naszym nowym systemem, aby to potwierdzić. Z nami rozwiązanie Państwa problemów badawczych będzie dwa razy prostsze.

Wiecej informacji pod adresem:  
Olympus Polska Sp. z o.o.  
Tel. (22) 860 00 77, Faks (22) 831 04 53  
mikroskopy@olympus.pl  
[www.olympus.pl](http://www.olympus.pl)

