

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 50, NR 3, 2004

Mikrosatelitarny DNA	198
Bakteryjne polimerazy DNA	209
Silnie wiążące inhibitory PNP	218
Biogeneza białek łańcucha oddechowego	228
Struktura i funkcja dynaminy	240
Fibrynoliza w miażdżycy	248
Hormony tkanki tłuszczowej	256
Kaweole i AGE	272
Białko zielonej fluorescencji	282

Krajowa Nagroda Naukowa z Zakresu Genetyki Roślin im. Stefana Barbackiego 2004

Rada Naukowa Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu ustanowiła Krajową Nagrodę Naukową z zakresu Genetyki Roślin im. Stefana Barbackiego.

Ideą nagrody jest wyróżnianie młodych naukowców zajmujących się genetyką roślin i promowanie osiągnięć będących rezultatem badań prowadzonych w warunkach krajowych laboratoriów.

Nagroda przyznawana jest przez Kapitułę Nagrody od 1994 roku corocznie za oryginalne prace badawcze udokumentowane publikacją w okresie ostatnich trzech lat, dotychczas nienagradzane.

W roku 2004 Kapituła przyznała

nagrodę I stopnia dr AGNIESZCE MARASEK

(Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach)

za: **„Określenie i wykorzystanie markerów chromosomowych do identyfikacji mieszańców oddalonych w rodzaju Lilium”**

Sponsorami funduszu nagród byli: „Spójnia” Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze Nochowo, Śrem; Hodowla Roślin „Danko”, Choryń; Poznańska Hodowla Roślin, Tulce; Hodowla Roślin Rolniczych „Nasiona Kobierzyce”, Kobierzyce.

WYDAWCA

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

REDAKTOR SENIOR

Senior Editor
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 831-24-03

REDAKTOR NACZELNY

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

REDAKTORZY

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

BIURO REDAKCJI

Editorial office
SEKRETARZ
Secretary
HANNA LASKOWSKA
poniedziałki, czwartki
monday—thursday
14—16
tel. 589-24-41
SKŁAD I ŁAMANIE
Typesetting
MAŁGORZATA BASAJ

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
JACEK BARTKOWIAK (Łódź)
JAN GÓRSKI (Białystok)
PIOTR PANETH (Łódź)
MARIA JOLANTA RĘDOWICZ
(Warszawa)
LECH WOJTCZAK (Warszawa)
KRZYSZTOF WOROWSKI
(Białystok)
MACIEJ ZABEL (Wrocław)
JOLANTA ZAKRZEWSKA-
CZERWIŃSKA (Wrocław)

ADRES REDAKCJI

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

SPIS TREŚCI

CONTENTS

Mikrosatelitarny DNA Microsatellite DNA JACEK TURYN	198
Nowopoznane bakteryjne polimerazy DNA – ich rola w tolerancji uszkodzeń genomu Novel bacterial DNA polymerases – their role in the damage tolerance PAWEŁ KARPIŃSKI, DOROTA DZIADKOWIEC	209
Silnie wiążące analogi stanu przejściowego fosforylasy nukleotydów purynowych – znaczenie, projektowanie i właściwości Tight binding transition state analogues of purine nucleoside phosphorylase – meaning, design and properties ANDRZEJ LEWANDOWICZ	218
Wybrane aspekty biogenezy białek łańcucha oddechowego w mitochondriach ssaków Selected aspects of biogenesis of respiratory chain in mammalian mitochondria JANUSZ PIECHOTA, ROMAN SZCZĘSNY	228
Struktura i funkcja dynaminy oraz białek dynamino-podobnych Structure and function of dynamin and dynamin-like proteins JOLANTA WIEJAK, ELŻBIETA WYROBA	240
Układ fibrynolityczny w rozwoju miażdżycy Fibrinolytic system in atherogenesis JOANNA KOŁODZIEJCZYK, PAWEŁ NOWAK	248
Wydzielnicza funkcja tkanki tłuszczowej Secretory function of adipose tissue ZDZISŁAW KOCHAN, JOANNA KARBOWSKA	256
Rola kaweoli śród błonki w endocytozie późnych produktów glikacji Role of endothelial caveoles in the endocytosis of advanced glycation endproducts JOLANTA ZUWAŁA-JAGIEŁO	272
Białko zielonej fluorescencji (GFP) – struktura, własności i zastosowanie w biologii molekularnej roślin Green fluorescent protein (GFP) – structure, features and applications in molecular biology of plants MATEUSZ WYDRO, PRZEMYSŁAW LEHMANN	282

Mikrosatelitarny DNA

Microsatellite DNA

JACEK TURYN

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Definicje
- III. Biologia mikrosatelitów
- IV. Rola mikrosatelitarnego DNA
- V. Zastosowanie markerów mikrosatelitarnych
- VI. Choroby związane z mikrosatelitami
 - VI-1. Mikrosatelity a choroby neurodegeneracyjne
 - VI-2. Mikrosatelity w nowotworach
- VII. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Definitions
- III. Biology of microsatellites
- IV. Role of microsatellite DNA
- V. Applications of microsatellite markers
- VI. Diseases associated with microsatellites
 - VI-1. Microsatellites and neurodegenerative diseases
 - VI-2. Microsatellites in tumors
- VII. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: CUGBP1 — białko wiążące się z sekwencją CUG (ang. *CUG binding protein*); HNPCC — dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego (ang. *hereditary non-polyposis colorectal cancer*); LOH — utrata heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity*); MMR — system naprawy błędnie sparowanych zasad (ang. *mismatch repair*); MSI — niestabilność mikrosatelitarna (ang. *microsatellite instability*); ORF — otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame*); PCR — łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*); SSR — proste sekwencje powtarzalne (ang. *simple sequence repeats*); STR — krótkie tandemowe powtórzenia (ang. *short tandem repeats*); TNR — powtórzenia trójnukleotydowe (ang. *trinucleotide repeats*); UTR — region nie ulegający translacji (ang. *untranslated region*); VNTR — sekwencje o zmiennej liczbie tandemowych powtórzeń (ang. *variable number of tandem repeats*).

I. Wstęp

Mikrosatelity są to proste tandemowe powtórzenia krótkich sekwencji DNA. Występują w dużej ilości w genomach wszystkich organizmów żywych i

organellach subkomórkowych zawierających materiał genetyczny. Z powodu bardzo dużej częstości występowania i wysokiego polimorfizmu znalazły szerokie zastosowanie jako marker segmentów chromosomów, w badaniach gatunków, populacji, a także pojedynczych osobników. Stosowane są w analizach pokrewieństwa, medycynie sądowej i badaniu biologicznych materiałów o znaczeniu historycznym [1]. U wyższych kręgowców najczęściej występującymi mikrosatelitami są sekwencje zbudowane z jednostki powtarzalnej $(CA)_n$, a średni dystans między mikrosatelitami wynosi około 25 tys. par zasad [2]. U ludzi 90% najczęściej występujących mikrosatelitów o sekwencji $(CA)_n$ ma długość poniżej 20 powtórzeń jednostki repetytywnej, a 1-2% ma powyżej 30 powtórzeń [3]. W niektórych stanach patologicznych stwierdza się zmiany w sekwencjach mikrosatelitarnych. W eksonach mogą występować sekwencje o motywie powtarzalnym długości trzech nukleotydów. Nadmierna liczba powtórzeń w takiej sekwencji może stanowić molekularne podłoże niektórych chorób, najczęściej związanych z układem nerwowym [4]. W komórkach nowotworowych również mogą pojawić się zmiany w sekwencjach mikrosate-

Mgr, Katedra i Zakład Biochemii, Akademia Medyczna w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, turyn@amg.gda.pl

litarnych. Może to być wykorzystane w diagnostyce tej choroby.

II. Definicje

W latach 60-tych odkryto, że 10% genomu myszy stanowią sekwencje o liczbie powtórzeń rzędu 10^6 [5]. Dalsze badania wykazały, że wszystkie sekwencje repetytywne stanowią 30% mysiego genomu. Występują one licznie także u wielu innych gatunków kręgowców oraz u roślin, bezkręgowców, a nawet u *Protozoa* i drożdży [6]. Sekwencje powtarzające się wielokrotnie w genomie, o długości 130-300 par zasad, nazwane zostały SINES (ang. *short interspersed repeats*). Sekwencje dłuższe — do kilkudziesięciu tysięcy par zasad — nazwano LINES (ang. *long interspersed repeats*). Wyróżnia się także sekwencje, których motyw powtarzający się tworzy ciąg powtórzeń ustawionych tandemowo [7]. Są to: satelitarny DNA, minisatelity oraz mikrosatelity. Satelitarny DNA o rdzeniu powtarzalnym dłuższym niż sto par zasad i o całkowitej długości do kilku milionów par zasad, stanowi dobrze poznaną i zdefiniowaną rodzinę powtórzeń tandemowych. Kolejną grupę stanowią minisatelity. Pierwszym odkrytym minisatelitą była sekwencja o 15-to nukleotydowym rdzeniu powtarzalnym znajdująca się w pobliżu genu kodującego insulinę [8]. W 1985 roku Jeffrey i wsp. [9] opisali minisatelity o sekwencjach powtarzalnych długości od 16 do 64 par zasad, a wielkość całych sekwencji wahała się od 100 do 3000 par zasad. Obecnie za minisatelitę przyjmuje się sekwencje o powtarzającym się motywie długości od 10 do 100 par zasad i całkowitej długości od 100 do 100 tysięcy par zasad [1, 10]. Klasą o najmniejszej jednostce repetytywnej są mikrosatelity. Po raz pierwszy zostały opisane w roku 1989 [11, 12]. Długość sekwencji powtarzalnej jest definiowana różnie przez różnych autorów jako 1-6 [7, 13], 1-5 [14], 2-6 [1] czy 2-5 par zasad [15]. Niektórzy wyodrębniają z mikrosatelitów jako oddzielną grupę ciągi mononukleotydowe [1]. Rozbieżności pojawiają się także w nomenklaturze. Definicje pojęć przyjęto za zaleceniami Chambers i MacAvoy [1]. Termin VNTR (ang. *variable number of tandem repeats* — sekwencje o zmiennej liczbie tandemowych powtórzeń) przyjęto jako określenie mini- i mikrosatelitów, natomiast pojęcia: STR (ang. *short tandem repeats* — krótkie tandemowe powtórzenia) i SSR (ang. *simple sequence repeats* — proste sekwencje powtarzalne) dla określania wyłącznie sekwencji mikrosatelitarnych. Ważne jest zachowanie wyraźnego rozdziału pomiędzy mini- i mikrosatelitami, ponieważ ich powstawanie i ewolu-

cja zachodzą poprzez odmienne mechanizmy [10]. Za mutacje w sekwencjach mikrosatelitarnych odpowiedzialne są błędy mające miejsce w czasie replikacji nici opóźnionej. Natomiast zmiana ilości powtórzeń jednostki repetytywnej w minisatelitach zachodzi przeważnie w komórkach linii płciowej w procesie podobnym do konwersji genów w czasie rekombinacji zachodzącej podczas mejozy i związana jest z pęknięciami obu nici DNA [10]. Przyporządkowanie VNTR o rdzeniu długości 7-10 par zasad do odpowiedniej grupy sekwencji repetytywnych następować będzie wraz z dalszym postępowaniem badań nad sposobem mutowania tych sekwencji [1]. Mikrosatelity podzielono na cztery grupy: mikrosatelity zupełne, niezupełne, złożone oraz złożone niezupełne. Mikrosatelity zupełne zawierają nieprzerwane ciągi sekwencji repetytywnych, natomiast w mikrosatelitach niezupełnych ciągi te są przerywane wstawkami 1-4 nukleotydowymi. Mikrosatelity złożone — zbudowane są z dwu i więcej ciągów sekwencji powtarzalnych, które w złożonych niezupełnych są rozdzielone kilkunukleotydowymi wtrąceniami [3, 16]. Do tej pory nie ustanowiono ogólnie przyjętych zasad sposobu zapisywania sekwencji powtarzalnych. Formuła ta powinna być jak najprostsza i zapis podlegać powinien porządkowi alfabetycznemu. W związku z tym, mimo iż sekwencję tego samego mikrosatelity można zapisać w postaci $(CA)_n$ oraz $(TG)_n$ to według powyższej zasady poprawniejszy jest pierwszy zapis. Wyjątek stanowią tu tandemy w sekwencjach kodujących, gdzie poprawniejszy będzie zapis sekwencji nici kodującej. Zapis sekwencji może uwzględniać obie nici np.: $(CA)_n(TG)_n$ lub $(CA)_n/(TG)_n$ [1].

III. Biologia mikrosatelitów

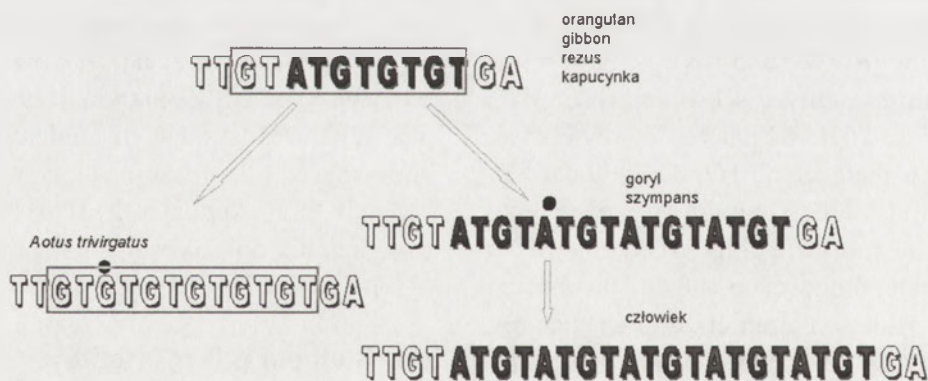
Można stwierdzić z dużym prawdopodobieństwem, że mikrosatelity występują licznie w genomach wszystkich organizmów. Lokalizacja chromosomalna mikrosatelitów jest dobrze poznana dla takich organizmów jak człowiek [17, 18], mysz [19, 20], szczur [21, 22]. Sekwencje te zlokalizowane są wzdłuż całych chromosomów z wyłączeniem telomerów [1]. Podobny wzór jest przedstawiany dla bezkręgowców np. komara *Anopheles gambiae* [23]. Analiza bibliotek sekwencji kodujących i niekodujących różnych grup organizmów od drożdży przez rośliny, owady po naczelnę wskazuje na niższą częstość występowania sekwencji STR (mono-, di-, tetra- i pentanukleotydowych) w sekwencjach kodujących w porównaniu z niekodującymi. W sekwencjach trinukleotydowych zaobserwowano tylko

niewielkie różnice [24]. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* około 5% mikrosatelitów o rdzeniu mono-, di- i tetranukleotydowym (zbudowanych co najmniej z 15 powtórzeń) znajduje się w ORF (ang. *open reading frame* — otwarta ramka odczytu). Natomiast około 80% o rdzeniu trinukleotydowym występuje w sekwencjach kodujących [25].

Niewiele wiadomo o pochodzeniu ewolucyjnym mikrosatelitów. Pewne światło na ten problem rzuca niezależne powstanie dwu różnych *loci* mikrosatelitarnych w krótkim fragmencie pseudogenu η -globiny u naczelnych. U części gatunków w tym rejonie występuje zmiana sekwencji, powstała najprawdopodobniej na skutek mononukleotydowej substytucji u ich wspólnego przodka. Zjawisko to stwierdzono u części człekokształtnych i ludzi, gdzie doszło do zamiany G na A. W wyniku tej mutacji powstało tetranukleotydowe tandemowe powtórzenie (ATGT)₂, które uległo wydłużeniu do (ATGT)₄ u szympanów i goryli oraz do (ATGT)₅ u ludzi. Inna mutacja nastąpiła u przodka północnicy (łac. *Aotus trivirgatus*), małpy południowoamerykańskiej, gdzie w wyniku tranzycji A na G powstało dinukleotydowe powtórzenie (GT)₅, które uległo wydłużeniu u tego gatunku do (GT)₆ [15] (Ryc. 1). Mikrosatelity powstają

nia nad ludzkim genomem umożliwiły testowanie dużej ilości różnych *loci*. Wynika z nich bardzo wysoka częstość mutacji mikrosatelitów, średnio 2×10^{-3} na *locus* na mejozę. Danych tych nie można uogólniać dla innych organizmów z powodu bardzo dużych różnic międzygatunkowych [29]. Dla przykładu: średni poziom mutacji jednego *locus* u muszki owocowej (łac. *Drosophila melanogaster*) jest znacznie niższy (od 6×10^{-6} do 9×10^{-6}) [30, 31].

Powtórzenia o całkowitej długości <8 nukleotydów występują w genomie z częstością oczekiwaną dla przypadkowych sekwencji. Sekwencje powtarzalne dłuższe od tej wartości granicznej występują częściej niż można by tego oczekiwać dla takich sekwencji powstałych w wyniku przypadkowego ustawienia nukleotydów. [1]. Dominującym mechanizmem mutacyjnym w sekwencjach mikrosatelitarnych jest tzw. błędne parowanie na nici opóźnionej (ang. *slipped strand mispairing*) [32, 33]. Podczas replikacji nici opóźnionej może dojść do powstania pętli złożonej z pełnego motywu powtarzalnego lub jego wielokrotności. Jeśli replikacja jest kontynuowana bez naprawy, na nowo powstającej nici dochodzi do zmiany ilości powtórzeń rdzenia repetytywnego. Jeśli pętla powstanie na matrycy, to nowo



Ryc. 1. Hipotetyczne powstanie dwu mikrosatelitarnych *loci* w pseudogenie η -globiny u naczelnych na drodze pojedynczych mutacji punktowych (miejsca mutacji oznaczone czarną kropką) i duplikacji motywów powtarzalnych.

z rejonów tzw. ang. *cryptic simplicity*, to jest krótkich rejonów, w których powtarza się jeden kilkunukleotydowy motyw w bardzo niewielkiej odległości od siebie [26]. Przykładem takiej sekwencji jest omawiany powyżej rejon w pseudogenie η -globiny. Chambers i MacAvoy [1] sugerują, by za początek istnienia mikrosatelity uznawać moment, gdy długość ciągu powtórzeń przekroczy 8 nukleotydów, poniżej której istniałyby tylko sekwencje zwane *cryptic simplicity*.

Eukariotyczne sekwencje unikalne mutują z częstością około 10^{-9} zmian na nukleotyd na pokolenie [27], natomiast sekwencje mikrosatelitarne mutują w zakresie 10^{-3} - 10^{-4} na *locus* na pokolenie [28]. Bada-

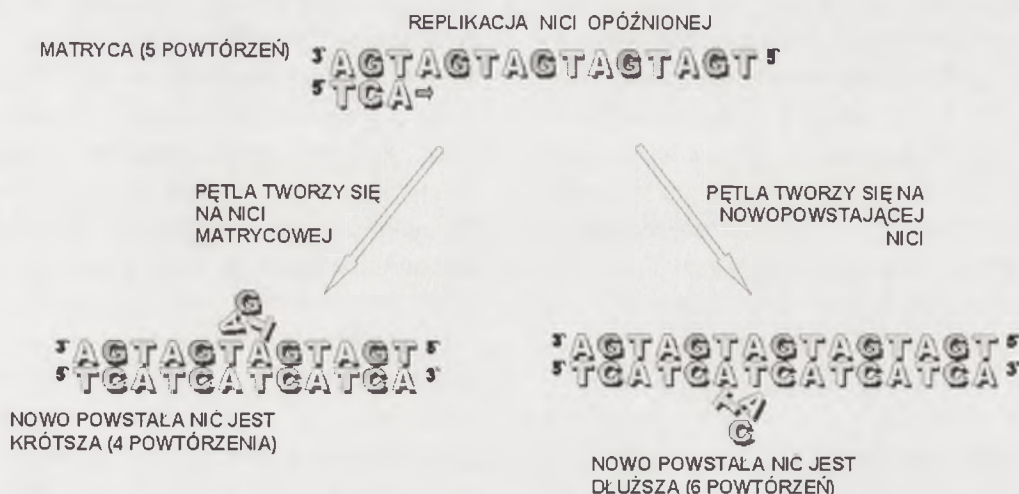
zsyntetyzowana nić ulegnie skróceniu o tyle powtórzeń, ile uległo wypętleniu. Jeżeli natomiast pętla utworzy się na nici powstającej, nastąpi wzrost ilości powtórzeń [29] (Ryc. 2). Za rozpoznawanie i usuwanie takich błędów odpowiedzialny jest w komórkach system MMR (ang. *mismatch repair* — system naprawy błędnie sparowanych zasad). Uszkodzenie tego systemu prowadzi w sekwencjach mikrosatelitarnych i ciągach mononukleotydowych do wzrostu ilości mutacji 100-700 razy. Eliminacja funkcji korektorskich z polimeraz DNA δ i ϵ w komórkach drożdży nie wywołuje takiego efektu [34]. Na podstawie scharakteryzowanych już sekwencji STR można przedstawić następujące wnioski: mikrosate-

lity występują częściej i są dłuższe u kręgowców niż u bezkręgowców; wśród kręgowców zmiennościplnych mają średnio więcej powtórzeń [1].

Częstość mutacji mikrosatelitów wykazuje różnice międzygatunkowe, ale także różni się wewnątrz gatunku pomiędzy poszczególnymi *loci*. O różnicach tych decyduje głównie długość samego mikrosatelity [3]. Analizy rodowodów [28, 31] oraz obserwacje

kwencje otaczające, aktywność transkrypcyjna. Dane na ten temat są jednak nieliczne i niejednoznaczne [35].

Zupełnie inny mechanizm powstawania mikrosatelitów rozważany jest w związku z retrotranspozonomi. Nadi i wsp. [41] sugerują, że mononukleotydowe ciągi nukleotydów adeninowych powstać mogły w wyniku, podobnego do mechanizmu odpo-



Ryc. 2. Schemat mechanizmu (ang. *slipped strand mispairing*) odpowiedzialnego za zmiany ilości powtórzeń motywu repetytywnego w mikrosatelitach.

populacji [35] i klonowanych mikrosatelitów [36] wykazały, że ilość mutacji w tych sekwencjach wzrasta wraz z ilością powtórzeń jednostki repetytywnej. Inne badania dowodzą też, że dodatkowe czynniki mają wpływ na tę zależność [35]. Jednym z takich czynników może być wielkość motywu powtarzalnego. Bezpośrednie obserwacje mutacji mikrosatelitarnych w analizach rodowodów sugerują, że poziom mutacji sekwencji o rdzeniu tetranukleotydowym jest wyższy niż sekwencji o rdzeniu dinukleotydowym [28]. Natomiast badania naturalnych populacji wykazują zjawisko zupełnie odwrotne [37, 38]. Późniejsze obserwacje wykazały, że przy analizie sekwencji o tej samej liczbie powtórzeń, sekwencje tetranukleotydowe mutują wolniej [39]. Jest to zgodne z wynikami badań *in vitro* nad mechanizmem mutacji mikrosatelitów. Wykazano w nich, że istnieje ujemna korelacja między długością sekwencji powtarzalnej a powstawaniem pętli w czasie replikacji [33]. Występowanie przerw w ciągu powtórzeń (mikrosatelity niezupełne) wpływa na tempo mutacji danego *locus*. W analizach rodowodowych, allele z kilkunukleotydowymi wtrąceniami w szeregu powtórzeń tego samego *locus* mikrosatelitarnego mutowały znacznie rzadziej od nieprzerwanych [40]. Ponadto przypuszcza się, że na tempo mutacji mogą mieć wpływ takie czynniki jak: sekwencja motywu powtarzalnego, se-

wiedzialnego za poliadenylację końca 3' mRNA, procesu wydłużania końca 3' retrotranspozonu.

U ssaków i *Drosophila* dominują powtórzenia (CA)_n natomiast u *Arabidopsis thaliana* i drożdży częściej występują (AT)_n. Mikrosatelity (CT)_n, które u ssaków występują stosunkowo najrzadziej, są przeważającym typem mikrosatelity u robaka *Caenorhabditis elegans* [35]. Te różnice mogą być wynikiem specyficznych cech systemu MMR danego taksonu [42].

IV. Rola mikrosatelitarnego DNA

Mikrosatelitarny DNA jest uważany za neutralny ewolucyjnie, chociaż część sekwencji tego typu może spełniać ważne biologiczne funkcje. Niektóre aspekty dystrybucji mikrosatelitów w genomie wskazują na ich prawdopodobną rolę w tworzeniu specyficznych dla gatunku struktur w chromatynie [43]. Mikrosatelity (CCG)_n i (CAG)_n wykazują bardzo różną zdolność przyłączania histonów. Powtórzenia (CAG)_n wykazują wyższe od innych powinowactwo do białek nukleosomu, natomiast (CCG)_n najniższe ze znanych sekwencji [44]. U wielu gatunków centromery chromosomów zawierają dużą liczbę różnorodnych sekwencji powtarzalnych, co wpływa na organizację tych rejonów [43]. We

wszystkich centromerach pomidora *Lycopersicon esculentum* znaleziono mikrosatelitę (GATA)_n oraz długie dinukleotydy powtórzenia [45]. W genomie buraka *Beta vulgaris* analiza metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* wykazała duży wzrost ilości sekwencji (GATA)_n i (CAC)_n w rejonie centromerowym 3 z 9 par chromosomów, natomiast (CA)_n w 8 [46].

Mikrosatelity są zdolne do tworzenia niezwykłych drugorzędowych struktur DNA. Sekwencje (GT)_n mają zdolność do tworzenia lewoskrętnej helisy Z-DNA [47], a w powtórzeniach trinukleotydowych (CCG)_n/(CGG)_n obie nici jako jednoniciowe DNA mogą tworzyć struktury „szpilki do włosów” [44]. Podobnie w TNR (ang. *trinucleotide repeats* — powtórzenia trinukleotydowe) (CAG)_n/(CTG)_n po przekroczeniu wartości krytycznej ilości powtórzeń, pojedyncza nić zbudowana z ciągu trójek CTG może tworzyć stabilną strukturę „szpilki do włosów”. Powstanie takiej struktury na nowo powstającej cząsteczce DNA w czasie replikacji nici opóźnionej, prowadzi do znacznego wzrostu ilości motywu powtarzalnego [48]. Sekwencje (CAG)_n/(CTG)_n mogą ponadto tworzyć struktury potrójnego heliksu z wytworzeniem par typu Hoogsteena i powstaniem połączeń C·G·C oraz T·A·T. W pewnych warunkach jednoniciowe sekwencje (CGG)_n i (CAGGG)_n w obecności jonów K⁺ mogą utworzyć strukturę czterniciową, co może powodować zatrzymanie polimerazy DNA w czasie replikacji [44, 49].

Wykazano, że sekwencje powtarzalne mogą być odpowiedzialne za powstanie rejonów o znacząco wyższej od oczekiwanej częstości występowania rekombinacji [43]. Dinukleotydy mikrosatelity (CT)_n, (GT)_n i (CA)_n są preferencyjnie wiązane przez białko RecA pałeczki okrężnicy (łac. *Escherichia coli*) oraz jego analogi: białka scRad51 *S. cerevisiae* i hsRad51 człowieka, odgrywające istotną rolę w rekombinacji DNA [50]. Analiza 22 chromosomu ludzkiego wykazała związek pomiędzy rozmieszczeniem tandemów (GT)_n a częstością rekombinacji [47]. Innym aspektem metabolizmu DNA, na który wpływ mogą mieć sekwencje STR, jest naprawa błędnie sparowanych zasad. Eksony genów systemu MMR: *MSH6*, *MSH3*, *PMS2*, *MLH3* ssaków, owadów i drożdży zawierają mononukleotydy powtórzenia o długości od 8 do 10 nukleotydów. Mikrosatelity są narażone na delecje bądź insercje znacznie bardziej niż przypadkowe sekwencje. Jeśli powtórzenia mononukleotydy znajdują się w rejonie kodującym, to mutacja taka grozi zmianą ramki odczytu i powstaniem niefunkcjonalnego białka. Paradoksalnie — białka limitujące mutacje w mikrosatelitarnym DNA

są podatne na takie mutacje. Istnieje hipoteza, że w organizmach eukariotycznych mononukleotydy powtórzenia w genach MMR spełniają rolę przełącznika pozwalającego na łagodne zwiększenie częstości mutacji, a przez to potencjalny wzrost przystosowania do zmieniających się warunków [51].

Wielu autorów sugeruje, że sekwencje mikrosatelitarne mogą wpływać na poziom ekspresji niektórych genów. Delecja znajdującej się w rejonie promotora genu *c-KI-ras* sekwencji (TCCC)₇, powoduje znaczący spadek aktywności transkrypcyjnej tego genu. Podobny efekt przynosi usunięcie motywu (TC)₁₁ z promotora genu *hsp26* u *Drosophila* [52]. Na ekspresję genu mogą wpływać także sekwencje powtarzalne znajdujące się poza rejonem promotorem. Poziom transkrypcji genu kodującego receptor czynnika wzrostu naskórka jest zależny od ilości powtórzeń motywu CA w dinukleotydy sekwencji STR, znajdującej się w intronie 1 tego genu [53]. Mikrosatelity mogą także pełnić funkcje wzmacniaczy transkrypcji. *In vitro* wykazano, że taką rolę spełnia HUMTH01. Jest to mikrosatelita tetranukleotydy umiejscowiony w intronie 1 genu kodującego hydroksylazę tyrozynową [54]. Ilość powtórzeń repetytywnego rdzenia może bardzo różnie wpływać na ekspresję genu. Gdy sekwencję (CTG)_n wbudowano do promotora genu *URA3* w układzie drożdżowym, nastąpiło zahamowanie ekspresji tego genu, kiedy tandem zbudowany był z 30 powtórzeń [48]. Odmiennie na aktywność promotora wpływa dinukleotydy mikrosatelita znajdujący się około tysiąca par zasad przed miejscem inicjacji transkrypcji genu *PAX-6*. Gdy powtórzeń jest 29 to aktywność tego promotora wzrasta 4-9 krotnie w porównaniu z komórkami zawierającymi allele o 26 powtórzeniach [55]. Natomiast mikrosatelita (GAA)_n w rejonie promotorem genu *M9/pMGA* u *Mycoplasma gallisepticum* musi się składać dokładnie z 12 powtórzeń, aby zachodziła transkrypcja [56].

Kolejnymi etapami ekspresji genów, na które mogą wpływać sekwencje powtarzalne, są składanie pre-mRNA i translacja [43]. W intronie 5 pre-mRNA genu *cTNT* występuje sekwencja zbudowana z powtórzeń CUG. Z sekwencją tą wiąże się białko CUGBP1 (ang. *CUG binding protein* — białko wiążące się z sekwencją CUG). Jego nadmierne nagromadzenie się w jądrze komórkowym kardiomiocytów powoduje nieprawidłowe wbudowywanie eksonu 5 w mRNA *cTNT* [57]. Białko CUGBP1 ma zdolność wiązania także powtórzeń CGG występujących w mRNA. Może ono znajdować się zarówno w jądrze komórkowym, jak i w cytosolu. W

mRNA dla C/EBP białko CUGBP1 wiąże się z obydwoma rodzajami sekwencji powtarzalnych i stabilizuje strukturę faworyzującą alternatywny kodon startu translacji, a przez to syntezę krótszej izoformy białka C/EBP [58].

V. Zastosowanie markerów mikrosatelitarnych

Mapowanie genów jest bardzo ważnym elementem badań genetycznych roślin i zwierząt. Dostępność map genowych umożliwia identyfikację i precyzyjne klonowanie genów [59], tworzenie fizycznych map chromosomów [60] i badania nad ewolucją genomów [61]. W drugiej połowie lat osiemdziesiątych do mapowania genów zaczęto wykorzystywać sekwencje VNTR. W porównaniu do wcześniej stosowanych markerów wykazywały one dużo większą zmienność. Dzięki wysokiej informatywności można było zastosować je do genotypowania rodzin i wyznaczania sposobu dziedziczenia genów w rodzinach obciążonych badaną chorobą [62] lub do szukania *loci* potencjalnie związanych z powstawaniem danego zespołu chorobowego [63]. U ludzi znanych jest wiele tysięcy mikrosatelitarnych markerów [17] precyzyjnie zlokalizowanych wzdłuż każdego segmentu każdego z chromosomów [1]. Podobne mapy istnieją już dla wielu innych organizmów [20, 21, 23]. W regionie kodującym HLA klasy II występuje ponad 150 polimorficznych *loci* mikrosatelitarnych. Dokonywane są próby wykorzystania ich do analizy haplotypów HLA w analizie dawców do przeszczepów szpiku kostnego [64]. Ponadto próbuje się zastosować je do badania sprzężeń układu HLA z występowaniem różnych chorób u człowieka [65].

U gatunków, których genom został całkowicie bądź częściowo zsekwencjonowany, mikrosatelity mogą być wyszukiwane poprzez analizę baz danych [66]. W innym przypadku sekwencje powtarzalne znajduje się postępując według ogólnego schematu: najpierw analizowany genom podlega fragmentacji, fragmenty odpowiedniej długości łączy się z wektorem, klonuje, a następnie selekcionuje się klony przy użyciu sond zbudowanych z poszukiwanych sekwencji powtarzalnych i klony hybrydujące z sondą sekwencjonuje się wraz z unikalnymi sekwencjami otaczającymi, będącymi źródłem sekwencji starterów dla reakcji PCR (ang. *polymerase chain reaction* — łańcuchowa reakcja polimerazy) [67].

Ponieważ mikrosatelitarne *loci* często posiadają po kilka alleli występujących ze stosunkowo dużą częstością i wykazują bardzo wysoką heterozygotyczność, stały się idealnym narzędziem do molekularnej

identyfikacji osobników [1]. Są podobnie jak minisatelity wykorzystywane rutynowo w badaniach genetycznych, w medycynie sądowej m. in. w sprawach o ustalenie ojcostwa. Zastosowanie 13 polimorficznych *loci* mikrosatelitarnych pozwala wykluczyć ojcostwo z prawdopodobieństwem ponad 99,99% [68] (lub z dużym prawdopodobieństwem je potwierdzić). Stosowane są również do identyfikacji zwłok [1]. Badania przeprowadzone na sekwencjach tetranukleotydowych wykazały dużą stabilność sekwencji mikrosatelitarnych w różnych tkankach, nawet przy wysokim stopniu rozkładu zwłok [69]. Markery te dzięki dużej trwałości cząsteczki DNA i jej odporności na czynniki środowiskowe są użyteczne w analizie dowodów rzeczowych jakie stanowić mogą różnorodne ślady biologiczne np.: krew, włosy, naskórek, sperma, ślina. Wystarczają piko-gramowe ilości matrycy, nawet w dużym stopniu zdegradowanej, aby przy zastosowaniu technik PCR dokonać ich analizy [68]. Stąd też mikrosatelity są bardzo użyteczne w badaniach historycznego materiału biologicznego [70]. Mała ilość materiału badawczego (np.: pojedyncze łuski, włosy, wylinki węży, niewielka ilość krwi, a nawet kości z wypluwek sów) sprawia, że analizy te mogą być mało- lub wręcz nieinwazyjne i wpływają w niewielkim stopniu na kondycję badanych, nawet małych organizmów [71, 72]. Są także stosowane w badaniach prenatalnych u ludzi w diagnostyce chorób genetycznych [73].

Mikrosatelity są dobrym markerem do badania różnic pomiędzy blisko spokrewnionymi populacjami. Stanowią doskonałe narzędzie do monitorowania zmian różnorodności genetycznej populacji, a także do analizy pokrewieństwa i identyfikacji osobników rodzicielskich wewnątrz dużych populacji. Takie analizy są użyteczne w zarządzaniu hodowlami i zasobami naturalnymi, w zrozumieniu wzorów pokrewieństwa w dzikich populacjach [74, 75] oraz ochronie środowiska np.: ochronie wykorzystywanych gospodarczo gatunków ryb przed przełowieniem [76].

Problemem w badaniach populacyjnych wykorzystujących mikrosatelity mogącym znacząco wpływać na obserwowaną zmienność danego *locus* są „allele zerowe”. Są to allele nie ulegające amplifikacji w wyniku mutacji w rejonie wiązania starterów dla reakcji PCR w sekwencjach otaczających mikrosatelitę [77]. Mogą one występować z częstością nawet do 15% na *locus*. Gdy występują „allele zerowe”, heterozygoty mogą być mylone z homozygotami, a gdy u osobnika występują dwa takie allele, brak u niego jakichkolwiek produktów amplifikacji [78].

Wygodną cechą mikrosatelitów jest to, że homologiczne *loci* mogą być z dużym prawdopodobieństwem amplifikowane w spokrewnionych gatunkach przy zastosowaniu tych samych starterów [79]. Gatunki nie muszą być nawet bardzo blisko spokrewnione, ale procent amplifikowanych *loci* może obniżyć się wraz ze wzrostem przedziału czasu od rozejścia się gatunków [66]. Inne dane wykazują, że mimo dużego dystansu czasowego (nawet do 300 milionów lat od szacowanego momentu rozejścia się gatunków) dzielącego gatunki z dwu różnych rodzin morskich zółwi udało się powielić sześć analizowanych *loci* u sześciu badanych gatunków [80]. Niemniej jednak „allele zerowe” są opisywane często wewnątrz populacji tego samego gatunku [66].

VI. Choroby związane z mikrosatelitami

VI-1. Mikrosatelity a choroby neurodegeneracyjne

Mikrosatelity trinukleotydomowe, nazywane też TNR mogą występować w rejonach międzygenowych oraz w sekwencjach kodujących. Zidentyfikowano 2135 genów, które zawierają takie sekwencje (o długości czterech lub więcej powtórzeń) w eksonach [81]. Eksony, tak jak i rejony UTR (ang. *untranslated region* — region nie ulegający translacji), mogą zawierać różne sekwencje tego typu. W eksonach najliczniej występuje sekwencja zbudowana z $(AGC)_n$. Mniej licznie reprezentowane są tandemy o powtarzającym się motywie $(AGG)_n$ i $(CCG)_n$. Natomiast mikrosatelity takie jak $(ACG)_n$ i $(ACT)_n$ występują rzadko. Sekwencja ACT może być również odczytana jako kodon „stop” — TGA. Może to tłumaczyć jej rzadsze występowanie w eksonach. Wszystkie te sekwencje występują bardzo rzadko w rejonach międzygenowych i w intronach, gdzie najliczniejsze TNR to $(AAT)_n$. $(AAT)_n$ jest najczęściej występującym u człowieka tandemem o jednostce powtarzalnej długości trzech nukleotydów. Sekwencje $(CCG)_n$ często występują w rejonach przed miejscem startu transkrypcji genu i w rejonach UTR [81].

Antycypacja jest to zjawisko ostrzejszego przebiegu i wcześniejszego występowania objawów chorób dziedzicznych w kolejnych pokoleniach. Jej podłoże molekularne stanowi niestabilność sekwencji powtarzalnych. Zjawisko to opisano dla wielu chorób neurodegeneracyjnych i związane jest z mutacjami dynamicznymi. Mutacje te polegają na wielokrotnieniu, na przestrzeni kilku pokoleń, najczęściej trinukleotydomowego motywu powtarzalnego, umiejscowionego w genie [82]. Prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji dynamicznych zależy od

ilości nieprzerwanych podjednostek repetytywnych [83].

Pierwszą opisaną genetyczną chorobą związaną z mutacjami dynamicznymi sekwencji STR był zespół kruchego chromosomu X (FRAXA). Jest to jedna z najczęściej występujących form rodzinnego upośledzenia umysłowego [84]. Związana jest ze znacznym wzrostem ilości powtórzeń w mikrosatelicie $(CCG)_n$ znajdującym się w rejonie 5'UTR w genie *FMR1* [85]. W normalnym chromosomie w mikrosatelicie tym występuje od 5 do 55 powtórzeń. Gdy ilość ich wzrośnie powyżej 55, liczba powtórzeń zaczyna szybko rosnąć z każdą następną generacją. Brak jest jednak objawów klinicznych i produkowane jest funkcjonalne białko FMR1 (FMRP). Zjawisko takie określa się jako premutację. Kiedy ilość powtórzeń motywu CCG przekroczy 230, dochodzi do pełnej mutacji [86]. W normalnych warunkach promotor genu *FMR1* nie jest zmetylowany, jednak gdy występuje pełna mutacja ulega on metylacji i jego ekspresja zostaje obniżona. *In vitro* gen ten może odzyskać swoją aktywność, gdy potraktuje się go związkami demetylującymi. Ten fakt w połączeniu z obserwacjami ludzi o normalnym ilorazie inteligencji z pełną mutacją, ale bez zmetylowanego promotora, u których poziom białka FMR1 zbliżony jest do normalnego, wskazuje, że to metylacja promotora a nie wydłużenie sekwencji $(CCG)_n$, uszkadza funkcje tego genu [87].

FRAXA jest związany z miejscem, w którym w specyficznych warunkach może nastąpić pęknięcie chromosomu X. Miejsca takie w chromosomach nazywane są miejscami kruchymi (ang. *fragile sites*). Część z tych miejsc związana jest z powtórzeniami tandemowymi [88] (Tab. 1).

Mikrosatelitarne sekwencje związane z chorobami mogą być umiejscowione w genach zarówno w rejonach niekodujących (Tab. 2), jak i w ORF. Choroba Huntingtona wywołana jest podobnie jak kilka innych chorób neurodegeneracyjnych przez ekspansję trinukleotydomowych powtórzeń $(CAG)_n$ znajdujących się w ORF i kodujących ciągi glutamin (poli-Q) [89]. W przeciwieństwie do wcześniej omawianych chorób, gdzie do powstania choroby ilość powtórzeń jednostki repetytywnej wzrastać musiała kilkukrotnie w stosunku do normalnego poziomu (a osiągać mogła ilości nawet ponad 1000 powtórzeń), w tych chorobach nawet 5% wzrost ilości motywu powtarzalnego może prowadzić do rozwoju choroby [83]. W genie *IT15 (HD)* związanym z chorobą Huntingtona [82] normalna długość tandemu wynosi 8 do 35 powtórzeń rdzenia CAG [89], u chorych natomiast od 36 do 121 [4]. Do chorób związanych z wydłuże-

niem się mikrosatelitów (CAG)_n w sekwencjach kodujących zalicza się obecnie 9 podobnych schorzeń objawiających się postępująca dysfunkcją neuronów i silną neurodegeneracją (Tab. 3).

Tabela 1.

Miejsca kruche w chromosomach (ang. *fragile sites*) związane z ekspansją tandemowych sekwencji repetytywnych

Miejsce kruche	Sekwencja ulegająca zwiokrotnieniu	Piśmienictwo
FRAXA	(CCG) _n	[4, 86, 88]
FRAXE	(CCG) _n	[4, 86, 88]
FRAXF	(CCG) _n	[88]
FRA10B	minisatelita	[86]
FRA11B	(CCG) _n	[88]
FRA16A	(CCG) _n	[88]
FRA16B	minisatelita	[86]

Bezpośrednią przyczyną uszkodzeń komórek w tych chorobach jest wzrost długości rdzenia glutaminowego w białku. Pomimo iż izolowane ciągi poliglutaminowe są bardzo toksyczne dla komórek, gdy występują w białkach stają się patogenne dopiero po przekroczeniu długości granicznych charakterystycznych dla danego białka. Prawdopodobnie po-

Tabela 2.

Choroby wywołane przez zmiany ilości powtórzeń jednostki repetytywnej w mikrosatelitach znajdujących się poza ORF (otwartą ramką odczytu)

Choroba	Motyw powtarzalny	Lokalizacja w genie	Gen	Piśmienictwo
Zespół kruchego chromosomu X (FRAXA)	CCG	5'UTR	<i>FMR1</i>	4, 82, 88
Upośledzenie umysłowe związane z FRAXE	CCG	5'UTR	<i>FMR2</i>	4, 82, 88,
Beźład rdzeniowo-mózdkowy typ 8	CTG	3'UTR	<i>KLHL1</i>	4, 109
Beźład rdzeniowo-mózdkowy typ 10	ATTCT	Intron 9	<i>SCA10</i>	109, 110
Beźład rdzeniowo-mózdkowy typ 12	CAG	5'UTR	<i>PPP2R2B</i>	4, 82, 109
Dystrofia miotoniczna typ 1	CTG	3'UTR	<i>DMPK</i>	4, 109,
Dystrofia miotoniczna typ 2	CCTG	Intron 1	<i>ZNF9</i>	109
Beźład Friedreicha	GAA	Intron 1	<i>X25</i>	4, 82, 109

wodują one agregację białek o wydłużonym rdzeniu glutaminowym z innymi. Powstawanie takich agregatów może zaburzać strukturę i funkcję jądra komórkowego oraz białek, z którymi agregują [4]. Wykazano, że białka z wydłużonym ciągiem glutamin mogą aktywować niektóre kaspazy odgrywające ważną rolę w procesie apoptozy [4, 90].

VI-2. Mikrosatelity w nowotworach

Transformacja nowotworowa jest procesem wieloetapowym, związanym z różnorodnymi zmianami w genomie. Zmiany te mogą dotyczyć również sekwencji mikrosatelitarnych. W komórkach nowotworowych obserwujemy dwa typy zmian w tych rejonach DNA: niestabilność mikrosatelitarną (MSI — ang. *microsatellite instability*) i utratę heterozygotyczności (LOH — ang. *loss of heterozygosity*).

MSI opisano w 1993 roku w dziedzicznym niepolipowatym raku jelita grubego (HNPCC — ang. *hereditary non-polyposis colorectal cancer*). Niestabilność w rozumieniu pojedynczego *locus*, polega na zmianach ilości powtórzeń repetytywnego rdzenia w markerze mikrosatelitarnym w DNA komórek nowotworowych w stosunku do DNA w niezmiennych komórkach tego samego pacjenta [91, 92]. MSI stosuje się także jako określenie fenotypu nowotworu wykazującego niestabilność *loci* mikrosatelitarnych [91]. Występuje on w większości przypadków raka jelita grubego w rodzinach obciążonych HNPCC (55-90% — różnice wynikają z analizy różnej liczby pacjentów i stosowania różnych zestawów markerów przez badaczy) [93, 94]. HNPCC wiąże się z wadliwym działaniem systemu MMR, głównie z genami *MSH2* i *MLH1*, rzadziej z genem *MSH6* [95]. Przynajmniej u 50% rodzin obciążonych HNPCC znale-

ziono dziedziczne mutacje w jednym z genów MMR. Natomiast tylko 10-15% sporadycznych przypadków raka jelita grubego wykazuje fenotyp MSI [94, 96]. Dla innych sporadycznych nowotworów dane są bardzo rozbieżne, np. w raku prostaty 2-65%, w nowotworach głowy i szyi 2-30%, a w raku żołądka MSI wykazuje 2-15% przypadków [96].

Utrata heterozygotyczności jest efektem delecji oraz dużych niestabilności chromosomalnych związanych z transformacją nowotworową [97, 98]. Dzięki rozpowszechnieniu w genomie i wysokiemu stopniowi heterozygotyczności sekwencje STR są bardzo użytecznymi markerami tego typu zmian. LOH objawia się redukcją ilości produktu amplifika-

DNA, zatrzymaniem cyklu komórkowego i aktywację szlaku prowadzącego do apoptozy [96].

Utrata heterozygotyczności (LOH) jest stosowana do analizy delecji w rejonach istotnych dla komórki, na przykład zmian w rejonach kodujących supresory transformacji nowotworowej (np.: białka p53 [101], BRCA1 i BRCA2 [102]). Użyteczność LOH i MSI w

Tabela 3.

Choroby związane z ekspansją ciągów poliglutaminowych w białkach kodowanych przez geny zawierające mikrosatelity (CAG)_n w sekwencjach kodujących

Choroba	Gen	Piśmien- nictwo
Choroba Huntingtona	<i>IT15</i>	4, 82
Zanik mięśni rdzeniowo-opuszkowy (choroba Kennedy'ego)	gen receptora androgenów (<i>AR</i>)	4, 82
Epilepsja miokloniczna z ruchami płaśawiczymi (DRPLA)	<i>B37 (DRPLA)</i>	4, 82
Bezład rdzeniowo-mózdkowy typ 1	<i>SCA1</i>	4, 82
Bezład rdzeniowo-mózdkowy typ 2	<i>SCA2</i>	4, 82
Bezład rdzeniowo-mózdkowy typ 3 (Choroba Machado-Josepha)	<i>SCA3 (MJD1)</i>	4, 82
Bezład rdzeniowo-mózdkowy typ 6	<i>SCA6 (CACNA1A)</i>	4, 82
Bezład rdzeniowo-mózdkowy typ 7	<i>SCA7</i>	4, 82
Bezład rdzeniowo-mózdkowy typ 17	<i>SCA17</i>	111

cji jednego z alleli markera mikrosatelitarnego. W przypadku, gdy marker jest homozygotyczny u danego pacjenta, uzyskanie informatywnego wyniku jest niemożliwe [99]. LOH została znaleziona na wielu chromosomach w prawie wszystkich częściej występujących nowotworach. Wykazuje ona charakterystyczny wzór dla danego typu nowotworu [97].

Trwają prace nad zastosowaniem mikrosatelitów w diagnostyce chorób nowotworowych. W niektórych nowotworach fenotyp MSI jest wskaźnikiem prognostycznym. W raku jelita grubego i żołądka jest on związany z wyższym procentem przeżyć pięcioletnich oraz niższym prawdopodobieństwem wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych [96]. System MMR jest istotny w skutecznym działaniu wielu terapii nowotworowych. Linie komórkowe z niesfunkcjonującym systemem MMR są odporne na czynniki metylujące DNA i cisplatynę, a toksyczność takich chemoterapeutyków jak doxorubicyna czy busulfan jest w takich komórkach zredukowana [100]. Ponadto linie te wykazują niewielki ale istotny statystycznie spadek wrażliwości na promieniowanie jonizujące [96]. Może być to związane z brakiem białek systemu MMR rozpoznających zmodyfikowane zasady, uszkodzenia DNA wywołanych przez cisplatynę i promieniowanie jonizujące. Jak się wydaje, system ten jest związany z rozpoznawaniem niemożliwych do naprawienia uszkodzeń

diagnostyce polega głównie nie na badaniu samego guza, ale przede wszystkim na pośrednim wykrywaniu DNA nowotworowego w płynach ustrojowych takich jak: mocz, ślina, płwocina, a zwłaszcza krew [99]. Już w latach 70-tych wykazano, że duża część pacjentów z chorobą nowotworową ma znacznie wyższe stężenie wolnego DNA krążącego we krwi niż osoby zdrowe [103]. Później stwierdzono, że wykazuje on cechy charakterystyczne dla DNA nowotworowego [104]. W roku 1996 w DNA izolowanym z osocza znaleziono MSI i LOH w raku płuc [105] oraz nowotworach głowy i szyi [106]. Podobne wyniki uzyskano dla wielu innych typów nowotworów [107]. LOH/MSI obserwuje się w DNA w osoczu, surowicy oraz w moczu pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. Część z tych zmian może nie być wykrywana w tkance nowotworowej [108]. Do badania guza stosuje się jego fragment. W wyniku klonalnego rozwoju nowotworu część zmian występująca w innej części guza może zostać pominięta [97].

Wiadomo powszechnie jak istotne dla skuteczności terapii jest wczesne wykrycie nowotworu. Dzięki małej inwazyjności analiza *loci* mikrosatelitarnych w płynach ustrojowych może stanowić doskonałe narzędzie nie tylko wczesnego wykrywania nowotworu, ale także monitorowania pacjentów podczas terapii i wykrywania nawrotu choroby [107]. Jeżeli przyszłe badania przyniosą opracowanie zestawów

markerów o odpowiedniej czułości, to zastosowanie mikrosatelitów w diagnostyce raka stanie się możliwe.

VII. Uwagi końcowe

Mikrosatelity występują licznie w całym genomie u wszystkich znanych organizmów żywych. Przez zdolność do wiązania specyficznych białek oraz tworzenia struktur drugorzędowych mogą spełniać ważną rolę w różnych aspektach metabolizmu DNA i w regulacji syntezy białek. Zmiany w tych sekwencjach mogą być objawem bądź przyczyną wielu chorób. Mikrosatelity mutują częściej niż przypadkowe sekwencje nukleotydów, stąd też wykazują bardzo dużą różnorodność i często wysoki stopień polimorfizmu w obrębie jednego *locus*. Dzięki tym cechom znalazły szerokie zastosowanie jako marker molekularny w badaniach genetycznych i populacyjnych.

Podziękowania

Dziękuję Panu Prof. dr hab. Julianowi Świerczyńskiemu z Katedry i Zakładu Biochemii AMG za cenne uwagi w czasie przygotowywania manuskryptu. Praca finansowana z grantu Ministerstwa Nauki nr 0670/P05/2001/20.

Artykuł otrzymano 19 kwietnia 2004

Zaakceptowano do druku 29 lipca 2004

Piśmiennictwo

- Chambers GK, MacAvoy ES (2000) *Com Biochem Physiol B* 126: 455-476
- Stallings RL, Ford AF, Nelson D, Torney DC, Hildebrand CE, Moyzis RK (1991) *Genomics* 10: 807-815
- Weber JL (1990) *Genomics* 7: 524-530
- Cummings CJ, Zoghbi HY (2000) *Hum Mol Genet* 9: 909-916
- Waring M, Britten RJ (1966) *Science* 152: 791-794
- Britten RJ, Kohne DE (1968) *Science* 161: 529-520
- Bal J, Bocian E (2001) W: Bal J (red) *Biologia molekularna w medycynie, elementy genetyki medycznej*. PWN, Warszawa, str. 32-47
- Bell GI, Selby MJ, Rutter WJ (1982) *Nature* 295: 31-35
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) *Nature* 314: 67-73
- Girauderau F, Petit E, Avet-Loiseau H, Hauck Y, Vergnaud G, Amarger V (1999) *Genome Res* 9: 647-653
- Litt M, Luty JA (1989) *Am J Hum Genet* 44: 397-401
- Tautz D (1989) *Nucleic Acids Res* 17: 6463-6471
- Hearne CM, Ghosh S, Todd JA (1992) *Trends Genet* 8: 288-294
- Rassmann K, Schlötterer C, Tautz D (1991) *Electrophoresis* 12: 113-118
- Messier W, Li S, Stewart C (1996) *Nature* 381: 483
- Wąs A, Wenne R (1998) *Raporty MIR* 1997: 37-48
- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996) *Nature* 380: 152-152
- Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M (1992) *Nature* 359: 794-801
- Hearne CM, McAleer MA, Love JM, Aitman TJ, Cornall RJ, Ghosh S, Knight AM, Prins JB, Todd JA (1991) *Mamm Genome* 1: 273-282
- Dietrich WF, Miller J, Steen R, Merchant MA, Damron-Boles D, Husain Z, Dredge R, Daly MJ, Ingalls KA, O'Connor TJ, Evans CA, DeAngelis MM, Levinson DM, Kruglyak L, Goodman N, Copeland NG, Jenkins NA, Hawkins TL, Stein L, Page DC, Lander ES (1996) *Nature* 380: 149-152
- Watanabe TK, Bihoreau MT, McCarthy LC, Kinguwa SL, Hishigaki H, Tsuji A, Browne J, Yamasaki Y, Mizoguchi-Miyakita A, Oga K, Ono T, Okuno S, Kanemoto N, Takahashi E, Tomita K, Hayashi H, Adachi M, Webber C, Davis M, Kiel S, Knights C, Smith A, Critcher R, Miller J, Thangarajah T, Day PJR, Hudson JR Jr, Irie Y, Takagi T, Nakamura Y, Goodfellow PN, Lathrop GM, Tanigami A, James MR (1999) *Nat Genet* 22: 27-36
- Brown DM, Matisse TC, Koike G, Simon JS, Winer ES, Zangen S, McLaughlin MG, Shiozawa M, Atkinson OS, Hudson JR Jr, Chakravarti A, Lander ES, Jacob HJ (1998) *Mamm Genome* 9: 521-530
- Zheng L, Collins FH, Kumar V, Kafatos FC (1993) *Science* 261: 605-608
- Metzgar D, Bytof J, Wills C (2000) *Genome Res* 10: 72-80
- Young ET, Sloan JS, Van Riper K (2000) *Genetics* 152: 1053-1068
- Tautz D, Trick M, Dover GA (1986) *Nature* 322: 652-654
- Crow JF (1993) *Environ Mol Mutagen* 21: 122-129
- Weber JL, Wong C (1993) *Hum Mol Genet* 2: 1123-1128
- Ellegren H (2000) *Trends Genet* 16: 551-558
- Schlötterer C, Ritter R, Harr B, Brem G (1998) *Mol Biol Evol* 15: 1269-1274
- Schug MD, Hutter CM, Wetterstrand KA, Gaudette MS, Mackay TFC, Aquadro CF (1998) *Mol Biol Evol* 15: 1751-1760
- Levinson G, Gutman GA (1987) *Mol Biol Evol* 4: 203-221
- Schlötterer C, Tautz D (1992) *Nucleic Acids Res* 20: 211-215
- Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD (1993) *Nature* 365: 274-276
- Schlötterer C (2000) *Chromosoma* 109: 365-371
- Wierdl M, Dominska M, Petes TD (1997) *Genetics* 146: 769-779
- Chakraborty R, Kimmel M, Stivers DN, Davison LJ, Deka R (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1041-1046
- Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R (1992) *Genomics* 12: 241-253
- Lee JS, Hanford MG, Genova JL, Farber RA (1999) *Hum Mol Genet* 8: 2547-2572
- Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, Hühne J, Rolf B (1998) *Am J Hum Genet* 62: 1408-1415
- Nadir E, Margalit H, Gallily T, Ben-Sasson SA (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6470-6475
- Marra G, Schar P (1999) *Biochem J* 338: 1-13
- Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) *Mol Ecol* 11: 2453-2465
- Pearson CE, Sinden RR (1998) *Curr Opin Structural Biol* 8: 321-330
- Areshchenkova T, Ganai MW (1999) *Genome* 42: 536-524
- Schmidt T, Heslop-Harrison JS (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8761-8765
- Majewski J, Ott J (2000) *Genome Res* 10: 1108-1114

48. Miret JJ, Pessoa-Brandao L, Lahue RS (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12438-12443
49. Weitzmann MN, Woodford KJ, Usdin K (1997) *J Biol Chem* **272**: 9517-9523
50. Biet E, Sun J-S, Dutreix M (1999) *Nucleic Acids Res* **27**: 596-900
51. Chang DK, Metzgar D, Wills C, Boland CR (2001) *Genome Res* **11**: 1145-1146
52. Kashi Y, King D, Soller M (1997) *Trends Genet* **13**: 74-78
53. Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B (1999) *J Biol Chem* **274**: 13176-13180
54. Meloni R, Albanese V, Ravessard P, Treilhou F, Malet J (1998) *Hum Mol Genet* **7**: 423-428
55. Okladnova O, Syagailo YV, Tranitz M, Stober G, Riederer P, Mossner R, Lesch KP (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 402-405
56. Liu L, Dybvig K, Panangala VS, van Santen VL, French CT (2000) *Infect Immun* **68**: 871-876
57. Philips AV, Timchenko LT, Cooper TA (1998) *Science* **280**: 737-741
58. Timchenko NA, Welm AL, Lu X, Timchenko LT (1999) *Nucleic Acids Res* **27**: 4517-4525
59. Martin GB, Brommonshenkel S, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD (1993) *Science* **262**: 1432-1435
60. Kurata N, Umehara Y, Tanoue H, Sasaki T (1997) *Plant Mol Biol* **35**: 101-113
61. Ganai MW, Bonierbale MW, Roeder MS, Park WD, Tanksley SD (1991) *Mol Gen Genet* **225**: 501-509
62. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, White R (1987) *Science* **235**: 1616-1622
63. Caulfield M, Munroe P, Pembroke J, Samani N, Dominiczak A, Brown M, Benjamin N, Webster J, Ratcliffe P, O'Shea S, Papp J, Taylor E, Dodson R, Knight J, Newhouse S, Hooper J, Lee W, Brain N, Clayton D, Lathrop MG, Farrall M, Connell J (2003) *Lancet* **361**: 2118-2122
64. Foissac A, Fort M, Clayton J, Abbal M, Raffoux C, Moine A, Bensa JC, Bignon JD, Mercier P, Cambon-Thomsen A (2001) *Transplant Proc* **33**: 491-492
65. Brojer E (2001) W: Bal J (red) *Biologia molekularna w medycynie, elementy genetyki medycznej*. PWN, Warszawa, str. 181-229
66. Jarne P, Lagoda PJJ (1996) *Trends Ecol Evol* **11**: 424-429
67. Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) *Mol Ecol* **11**: 1-16
68. Kozioł P (2001) W: Bal J (red) *Biologia molekularna w medycynie, elementy genetyki medycznej*. PWN, Warszawa, str. 312-341
69. Hoff-Olsen P, Jacobsen S, Mevag B, Olaisen B (2001) *Forensic Sci Int* **119**: 273-278
70. Bramanti B, Hummel S, Chiarelli B, Herrmann B (2003) *Hum Biol* **75**: 105-115
71. Goossens B, Waits LP, Taberlet P (1998) *Mol Ecol* **7**: 1237-1241
72. Taberlet P, Waits LP, Luicart G (1999) *Trends Ecol Evol* **14**: 323-327
73. Beroud C, Karliova M, Bonnefont JP, Benach A, Munnich A, Dumez Y, Lacour B, Paterlini-Brechot P (2003) *Lancet* **361**: 1013-1014
74. Toro MA, Barragan C, Oviló C (2003) *Anim Genet* **34**: 226-228
75. O'Connell M, Wright JM (1997) *Rev Fish Biol Fish* **4**: 351-373
76. Hauser L, Adcock GJ, Smith PJ, Bernal Ramirez JH, Carvalho GR (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11742-11747
77. Pemberton JM, Slate J, Bancroft DR, Barrett JA (1995) *Mol Ecol* **4**: 249-252
78. van Treuren R (1998) *Mol Ecol* **7**: 1413-1417
79. Estoup A, Presa P, Krieg F, Vaiman D, Guyonard R (1993) *Heredity* **71**: 488-496
80. FitzSimmons NN, Moritz C, Moore SS (1995) *Mol Biol Evol* **12**: 432-440
81. Subramanian S, Madgula VM, George R, Mishra RK, Pandit MW, Kumar CS, Singh L (2003) *Bioinformatics* **19**: 549-552
82. Bal J, Bocian E (2001) W: Bal J (red) *Biologia molekularna w medycynie, elementy genetyki medycznej*. PWN, Warszawa, str. 59-79
83. Sutherland GR, Richards RI (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3636-3641
84. Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, Mulley JC, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI (1991) *Science* **252**: 1179-1181
85. Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI (1991) *Science* **252**: 1711-1714
86. Sutherland GR, Baker E, Richards RI (1998) *Trends Genet* **14**: 501-506
87. Weinhausel A, Haas OA (2001) *Hum Genet* **108**: 450-458
88. Mangel L, Ternes T, Schmitz B, Doerfler W (1998) *J Biol Chem* **273**: 30466-30471
89. Rubinsztein DC, Amos B, Cooper G (1999) *Phil Trans R Soc Lond* **354**: 1095-1099
90. Parniewski P, Staczek P (2002) *Adv Exp Med Biol* **516**: 1-25
91. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S (1998) *Cancer Res* **58**: 5248-5257
92. Hussein MR, Wood GS (2002) *J Cutan Pathol* **29**: 257-267
93. Kordek R, Bartkowiak J (1999) *Onkol Pol* **2**: 109-112
94. Hoogerbrugge N, Willems R, van Krieken HJ, Kiemeny LA, Weijmans M, Nagengast FM, Arts N, Brunner HG, Lightenberg MJL (2003) *Clin Genet* **63**: 64-70
95. Kariola R, Raevaara TE, Lonnqvist KE, Nyström-Lahti M (2002) *Hum Mol Genet* **11**: 1303-1310
96. Lawes DA, SenGupta S, Boulos PB (2003) *Eur J Surg Oncol* **29**: 201-212
97. Devilee P, Cleton-Jansen A-M, Cornelisse CJ (2001) *Trends Genet* **17**: 569-573
98. Boland CR (2002) *Rev Gastroenterol Disord* **2** Suppl 1: S12-S19
99. Bevilacqua RAU, Nunes DN, Stroun M, Anker P (1998) *Semin Cancer Biol* **8**: 447-453
100. Claij N, te Riele H (1999) *Exp Cell Res* **246**: 1-10
101. Jones MH, Nakamura Y (1992) *Genes Chromosomes Cancer* **5**: 89-90
102. Kirse M, Zhu J-J, Black PM (1997) *Genes Chromosomes Cancer* **20**: 53-59
103. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ (1977) *Cancer Res* **37**: 646-650
104. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M (1989) *Oncology* **46**: 318-322
105. Chen X, Stroun M, Magnenat J-L, Nicod LP, Kurt A-M, Lyautey J, Lederrey C, Anker P (1996) *Nat Med* **2**: 1033-1035
106. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D (1996) *Nat Med* **2**: 1035-1037
107. Chan AKC, Chiu RWK, Lo D (2003) *Ann Clin Biochem* **40**: 122-130
108. Utting M, Werner W, Dahse R, Schubert J, Junker K (2002) *Clin Cancer Res* **8**: 35-40
109. Ranum LPW, Day JW (2002) *Curr Opin Genet Devel* **12**: 266-271
110. Matsuura T, Yamagata T, Burgess DL, Rasmussen A, Grewal RP, Watase K, Khajavi M, McCall AE, Davis CF, Zu L, Achari M, Pulst SM, Alonso E, Noebels JL, Nelson DL, Zoghbi HY, Ashizawa T (2000) *Nat Genet* **26**: 191-194
111. Owecki M, Kozubski W (2002) *Post Hig* **56**: 779-788

Nowopoznane bakteryjne polimerazy DNA — ich rola w tolerancji uszkodzeń genomu.

Novel bacterial DNA polymerases — their role in the damage tolerance

PAWEŁ KARPIŃSKI¹, DOROTA DZIADKOWIEC²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Replikacja DNA
- III. Uszkodzenia DNA
- IV. Polimeraza DNA II — reinicjacja replikacji
- V. Polimeraza DNA V — synteza poprzez uszkodzenie
- VI. Polimeraza DNA IV- niekierowana mutageneza w stacjonarnej fazie wzrostu
- VII. Współzawodnictwo polimeraz
- VIII. Porównanie budowy nowych polimeraz DNA
- IX. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: kDa — kilodaltony; pol I, II, III, IV, V — polimeraza I, II, III, IV, V; pol III HE — holoenzym polimerazy III; SSB — białka wiążące jednoniciowy DNA (ang. *single strand binding proteins*); ssDNA — jednoniciowy DNA (ang. *single strand DNA*); TLS — synteza poprzez uszkodzenie (ang. *translesion synthesis*).

I. Wstęp

Szereg czynników, takich jak promieniowanie UV lub promieniowanie gamma, związki chemiczne pochodzące ze środowiska lub będące produktami metabolizmu samej komórki, może modyfikować strukturę materiału genetycznego. Efektem działania tych czynników są fizyczne uszkodzenia DNA lub chemiczne modyfikacje czterech podstawowych zasad. Uszkodzenia te mogą zaburzać procesy replikacji, prowadzić do powstawania mutacji, a nawet śmierci komórki. Najczęściej jednak są one usuwane przez obecne w komórce systemy naprawcze, któ-

Contents:

- I. Introduction
- II. DNA replication
- III. Effect of DNA damage on replication
- IV. DNA Polymerase II — reinitiation of replication
- V. DNA Polymerase V — translesion synthesis
- VI. DNA Polymerase IV- stationary phase undirected mutagenesis
- VII. Competition between polymerases
- VIII. Structure comparison of the novel DNA polymerases
- IX. Conclusions

rych zadaniem jest przywrócenie pierwotnej, niezmięnionej sekwencji i struktury DNA.

Zdarza się jednak, że systemy te nie są wystarczająco wydajne, aby usunąć wszystkie zmiany w DNA. Próba replikacji sekwencji zawierających takie nie naprawione uszkodzenia może powodować oddysocjowanie holoenzymu polimerazy DNA III od matrycy i rozpad widełek replikacyjnych. Takie przerywanie procesu replikacji jest niebezpieczne dla komórki ze względu na możliwość powstania wielu luk w nowo syntetyzowanej cząsteczce DNA, czyli zniekształcenie lub utratę informacji genetycznej.

Badania z ostatnich trzech lat pokazały, że istnieje grupa białek, wykazujących aktywność polimerazową, które umożliwiają prowadzenie replikacji uszkodzonego DNA w procesie nazywanym TLS (ang. *translesion synthesis* — synteza poprzez uszkodzenie). Do białek tych należą między innymi niedawno odkryte w komórkach *Escherichia coli* polimerazy DNA IV i V oraz znana wcześniej polimeraza II DNA.

Rolą tych polimeraz w komórkach jest kontynuacja replikacji po oddysocjowaniu holoenzymu polimerazy DNA III, na krótkich odcinkach matrycy zdeformowanej przez uszkodzenia (TLS). Po zakończeniu procesu TLS następuje ponowne włączenie holo-

¹Student, ²dr, Pracownia Biotransformacji, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław, e-mail: dorota@microb.uni.wroc.pl

enzymu DNA polimerazy III do replikacji. Podczas TLS polimerazy IV i V często wstawiają niewłaściwe nukleotydy, dlatego nazywane są polimerazami skłonnymi do popełniania błędów (ang. *error-prone polymerases*). Jednak dla komórki ryzyko wprowadzenia niewłaściwego nukleotydu do DNA jest mniej niebezpieczne niż niemożność przeprowadzenia pełnej replikacji materiału genetycznego.

Proces TLS należy postrzegać jako mechanizm tolerancji uszkodzeń, ponieważ nie dochodzi w nim do ich usunięcia. Uszkodzenia te naprawiane są przez inne systemy naprawcze dopiero po zakończeniu replikacji.

Replikacja uszkodzonego DNA oraz reinicjacja replikacji mają dla organizmów kluczowe znaczenie. Świadczy o tym fakt, że białka przeprowadzające TLS charakteryzują się bardzo konserwatywną strukturą, a ich homologi można spotkać u wszystkich grup organizmów: *Archae*, *Bacteriae*, a wśród *Eucaryota* zarówno u drożdży jak i człowieka. Te ciekawe nowopoznane polimerazy zostaną opisane poniżej na przykładzie *E. coli*.

II. Replikacja DNA

Procesem zapewniającym powstanie dwóch identycznych cząsteczek DNA jest replikacja. Możliwie największa wierność kopiowania jest osiągana nie tylko dzięki precyzji działania głównych polimeraz DNA, ale także dzięki udziałowi systemów naprawy DNA. Są one zdolne do wykrycia i naprawy różnych typów uszkodzeń i błędów w DNA powstałych podczas jego replikacji, bądź w cząsteczce już zreplikowanej. Dzięki tym systemom błędy powodujące powstawanie mutacji pojawiają się niezwykle rzadko. Głównymi enzymami replikującymi materiał genetyczny w komórkach *Escherichia coli* są polimerazy DNA III i I.

Polimeraza DNA III (pol III), odkryta w roku 1972, jest głównym enzymem replikującym DNA w komórkach *E. coli*. Polimeraza ta jest zdolna również do korygowania własnych błędów dzięki posiadaniu aktywności egz nukleolitycznej w kierunku $3' \rightarrow 5'$. Polimeraza ta wstawia średnio jeden niewłaściwy nukleotyd na 5×10^9 wprowadzonych podczas replikacji. Polimeraza DNA III jest dużym kompleksem białkowym złożonym z dziesięciu różnych podjednostek o masie sumarycznej równej około 900 kilodaltonów (kDa). Podjednostki α , ϵ i θ stanowią rdzeń polimerazy, który wykazuje aktywność polimerazyjną (podjednostka α) i egz nukleolityczną w kierunku $3' \rightarrow 5'$ (podjednostka ϵ) [1]. Podjednostka τ umożliwia dimeryzację dwóch kompleksów

rdzenia. W skład holoenzymu polimerazy III wchodzi także kompleks γ (ang. *clamp loader*), który umieszcza rdzeń polimerazy na pierścieniu β (ang. *sliding clamp*). O wysokiej procesywności polimerazy DNA III decyduje pierścień złożony z dwóch podjednostek β (Ryc. 2), który obejmuje łańcuch DNA, przytrzymując jednocześnie holoenzym na matrycy [2].

Polimeraza III charakteryzuje się najwyższą procesywnością (tworzy 5×10^5 wiązań fosfodiesterowych bez oddysocjowywania od matrycy [3]) i szybkością polimeryzacji (1000 nukleotydów na sekundę) spośród wszystkich dotychczas poznanych polimeraz prokariotycznych.

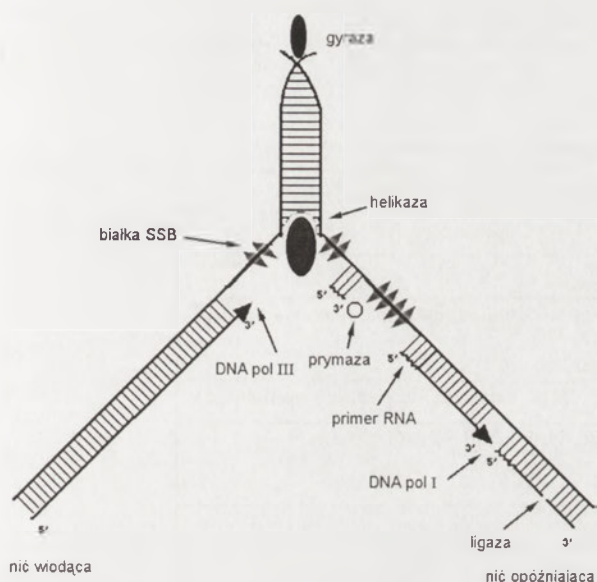
Ponieważ wszystkie znane polimerazy DNA katalizują dołączanie nukleotydów tylko w kierunku od końca $5'$ do końca $3'$, synteza nowych nici w obrębie widełek replikacyjnych jest procesem asymetrycznym. Dlatego tylko jedna z nici może być syntetyzowana w sposób ciągły, zgodnie z kierunkiem przesuwania się widełek. Nazywana jest ona nicią wiodącą lub prowadzącą (ang. *leading strand*). Druga nić, syntetyzowana w kierunku przeciwnym do ruchu widełek, w postaci krótkich fragmentów o długości 1000-2000 nukleotydów (fragmentów Okazaki, odkrytych przez R e i j i O k a z a k i w 1967 roku), nosi miano nici opóźniającej (ang. *lagging strand*) [1].

Polimeraza DNA I (pol I) została odkryta najwcześniej (w 1956 roku przez K o r n b e r g a). Enzym ten wykazuje również dużą wierność polimeryzacji, wprowadza jeden niewłaściwy nukleotyd na 5×10^7 [1]. Polimeraza I charakteryzuje się niską procesywnością (katalizuje powstanie do 20 wiązań fosfodiesterowych bez oddysocjowywania od matrycy) i małą prędkością polimeryzacji (około 11 nukleotydów na sekundę) [1].

Rolą pol I jest usuwanie z fragmentów Okazaki starterowych odcinków RNA, a następnie wstawianie w ich miejsce kilku nukleotydów. Startery nie mogą być usunięte przez polimerazę III, gdyż nie posiada ona aktywności egz nukleolitycznej o kierunku $5' \rightarrow 3'$. Enzym ten odłącza się więc od nici matrycowej, a jego miejsce zajmuje polimeraza I, posiadająca taką aktywność. Taka zamiana polimeraz (ang. *polymerase switch*) ma miejsce podczas replikacji wielokrotnie. Polimeraza I bierze też udział w procesach naprawy DNA, wypełniając luki powstałe po usunięciu uszkodzonych nukleotydów. Proces replikacji DNA przedstawia schematycznie Rycina 1.

Polimeraza DNA II (pol II) znana była jeszcze wcześniej niż polimeraza III, jednak jej funkcja pozostawała nieznana do roku 1999 [4]. Największą niespodzianką ostatnich kilku lat było odkrycie, że

pol II, wraz z białkami UmuC i UmuD oraz DinB, również wykazującymi aktywność polimerazową, bierze udział w replikacji uszkodzonego DNA i mutagenezie [5]. Kompleks UmuC i UmuD oraz białko DinB zostały nazwane odpowiednio polimerazami V i IV.



Ryc. 1. Schemat działania enzymów w widelkach replikacyjnych *E. coli* (na podstawie [6]).

III. Uszkodzenia DNA

Chociaż cząsteczka DNA jest genetycznie stabilna (błąd popełniany przez aparat replikacyjny zdarza się raz na około 10^9 wprowadzanych nukleotydów [6]), to różne czynniki chemiczne i fizyczne mogą powodować zmiany jej struktury. Efektem działania tych czynników są pęknięcia fosfodiesterowego łańcucha kwasów nukleinowych lub chemiczne modyfikacje czterech podstawowych zasad. Dlatego też wszystkie organizmy wykształciły wiele mechanizmów usuwających takie zmiany lub pozwalających im przeżyć pomimo tych zmian.

Wyróżnia się wiele rodzajów uszkodzeń DNA, między innymi pęknięcia pojedynczej i podwójnej nici DNA, depurynacje oraz chemiczne modyfikacje nukleotydów [7]. Niektóre z tych uszkodzeń powodują odkształcenie struktury podwójnej helisy i stanowią barierę dla procesu replikacji DNA. Jeżeli nie zostaną one usunięte przed rozpoczęciem kolejnej tury replikacji, to mogą powodować jej przerwanie, oddysocjowanie pol III od matrycy i uruchomienie rekombinacyjnych systemów naprawy DNA, zależnych od białka RecA.

W sytuacji gdy uszkodzenia DNA są rozległe i konstytutywnie syntetyzowane systemy naprawcze nie mogą ich usunąć i umożliwić kontynuację replikacji, indukowany jest regulon odpowiedzi SOS, czyli zbiór wielu grup genów, będących pod kontrolą represora LexA i induktora RecA, białka o kluczowej roli w naprawie uszkodzeń DNA na drodze rekombinacji homologicznej. Niektóre geny należące do tego regulonu, których produkty biorą udział w różnych procesach, związanych z naprawą lub tolerancją uszkodzeń w DNA zebrano w Tabeli 1.

W wyniku odpowiedzi SOS następuje pełna replikacja materiału genetycznego, ale pojawiają się w nim również spontaniczne mutacje (np. wstawienie niekomplementarnych zasad, przesunięcie ramki odczytu). Zjawisko to określa się mianem mutagenezy SOS [7]. Do niedawna nie znano przyczyn powstawania tych błędów, obecnie jednak wiadomo, że do białek uczestniczących w tej mutagenezie zaliczyć można: niedawno odkryte polimerazy DNA IV i V, białko RecA, białka SSB, polimerazę DNA II oraz niektóre podjednostki polimerazy DNA III [4, 8].

IV. Polimeraza DNA II — reinicjacja replikacji

Główną rolą polimerazy II (pol II) jest szybka reinicjacja replikacji po oddysocjowaniu polimerazy III spowodowanym obecnością uszkodzenia odkształcającego helisę DNA. Ponieważ białko LexA bardzo słabo wiąże się z sekwencją regulatorową tej polimerazy, występuje ona w dość dużym stężeniu w normalnie rosnących komórkach. Jest to też jedno z białek najszybciej indukowanych w odpowiedzi SOS: reinicjacja replikacji zahamowanej naświetleniem komórek promieniowaniem UV następuje najpóźniej po 10 minutach [4].

Dotychczasowe badania pokazują, że polimeraza II, dzięki aktywności egzonukleolitycznej (sprawdzającej) w kierunku $3' \rightarrow 5'$, jest wierna w stosunku do matrycy. To tłumaczy jej duże stężenie w komórkach bakteryjnych oraz znacznie szybszą aktywację w porównaniu z polimerazą V [8].

Drugą ważną funkcją polimerazy II jest przeprowadzenie dla niektórych uszkodzeń matrycy syntezy DNA w procesie TLS. Proces ten zostanie szczegółowo omówiony dla polimerazy V w kolejnym rozdziale.

Naprawa uszkodzeń DNA przez polimerazę II jest z reguły wierna. Istnieją jednak takie uszkodzenia matrycy, jak pokazano w rozdziale VII, przy naprawie których to właśnie pol II a nie pol V wprowadza mutacje do matrycy (najczęściej przesunięcie ramki odczytu o 1 lub 2 nukleotydy) [5].

Tabela 1.

Niektóre białka systemu SOS (opracowano na podstawie [7])

Gen kodujący białko	Funkcja białka
<i>lexA</i>	Represor systemu SOS
<i>recA</i>	Regulator systemu SOS, naprawa rekombinacyjna, replikacja poprzez uszkodzenie (TLS).
<i>recN</i>	Naprawa rekombinacyjna, naprawa pęknięć podwójnej nici DNA
<i>ruvB</i>	Rekombinacja homologiczna
<i>ruvA</i>	Rekombinacja homologiczna
<i>umuC</i>	Podjednostka DNA polimerazy V, replikacja poprzez uszkodzenie (TLS)
<i>umuD</i>	Podjednostka DNA polimerazy V, replikacja poprzez uszkodzenie (TLS)
<i>uvrA</i>	Naprawa poprzez wycięcie nukleotydów
<i>uvrB</i>	Naprawa poprzez wycięcie nukleotydów
<i>uvrD</i>	Naprawa poprzez wycięcie nukleotydów, naprawa rekombinacyjna, naprawa pęknięć podwójnej nici DNA
<i>dinA</i>	DNA polimeraza II, reinicjacja replikacji DNA po naświetleniu promienowaniem UV
<i>dinB</i>	DNA polimeraza IV, replikacja poprzez uszkodzenie (TLS), mutageneza nieuszkodzonej matrycy
<i>sulA</i>	Zatrzymanie podziałów komórkowych
<i>ssb</i>	SSB- białka wiążące pojedynczą nić DNA

V. Polimeraza DNA V — synteza poprzez uszkodzenie

Polimeraza DNA V jest kompleksem białkowym, którego podjednostki kodowane są przez dwa geny *umuC* i *umuD* (od ang. *unmutable*). Geny kodujące podjednostki tej polimerazy oraz udział ich produktów w mutagenezie SOS znane były już od połowy lat siedemdziesiątych. Mechanizm ich działania oraz struktura chemiczna poznana została dopiero w ostatnich latach przez niezależne zespoły naukowców (Tang i wsp. oraz Reuven i wsp. w 1998 roku za [9]), natomiast aktywność polimerazowa kompleksu tych białek została odkryta w 1999 roku (Tang i wsp. za [9]).

Synteza polimerazy V jest regulowana zarówno transkrypcyjnie (geny kodujące to białko należą do regulonu SOS), jak i potranslacyjnie. Białko UmuC wykazuje aktywność polimerazową, ale do przeprowadzania TLS na uszkodzonym DNA bezwzględnie wymagana jest obecność białka UmuD'. Powstaje ono w wyniku samonacięcia N-końca podjednostki UmuD (katalizowanego przez białko RecA połączone z jednoniciowym DNA). W wyniku interakcji dwóch naciętych podjednostek UmuD', białka UmuC oraz RecA-ssDNA powstaje w pełni aktywny kompleks polimerazy V (kompleks UmuD'₂C) [10].

Główną rolą pol V jest przeprowadzanie syntezy poprzez uszkodzenie w DNA (TLS). W trakcie tego procesu białko to czasami wprowadza niekomplementarne nukleotydy. Model mechanizmu TLS przedstawia Rycina 2 (opracowana na podstawie [8]).

Holoenzym polimerazy III (pol III HE) napotykać uszkodzenie DNA (odkształconą strukturę DNA), oddysocjowuje, nie mogąc kontynuować replikacji (Ryc. 2a). Uszkodzone miejsce jest rozpoznawane przez białko RecA, które polimeryzuje tworząc długi filament owinięty wokół pojedynczej, uszkodzonej nici DNA (Ryc. 2b i c). RecA inicjuje też indukcję genów regulonu SOS. Po około 40 minutach od indukcji, kompleks polimerazy V (UmuD'₂C) jest już uformowany.

Kompleks połączonych ze sobą białek SSB, polimerazy V, dimeru β, kompleksu γ (rolą dimeru β i kompleksu γ jest przyłączenie polimerazy do nici DNA) oraz RecA-ssDNA (nazwany tu pol V Mut od ang. *polymerase V mutasome*) (Ryc. 2d i e) prowadzi replikację uszkodzonego DNA najczęściej wprowadzając niekomplementarne nukleotydy. W przypadku TT (6-4) fotoproduktu, pol V Mut prawie zawsze przyłącza do tyminy znajdującej się przy końcu 3' nici DNA guaninę (sześć razy częściej niż adeninę), co w następnej turze replikacji powoduje tranzycję

tymina → cytozyna, a tyminę końca 5' paruje najczęściej z adeniną. W przypadku dimeru tyminy z pierścieniem cyklobutanowym, pol V Mut naprzeciwko tymin prawie zawsze wstawia adeninę.

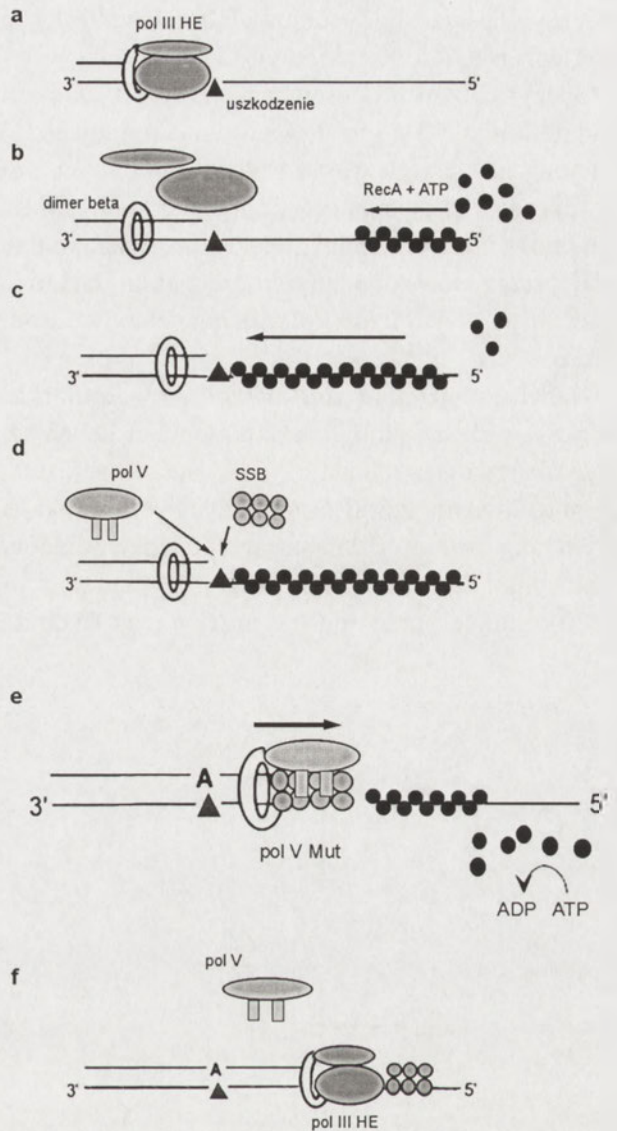
Po przeprowadzeniu TLS, polimeraza V razem z innymi białkami oddysocjuje, do matrycy przyłącza się kompleks holoenzymu polimerazy III i kontynuuje syntezę DNA (Ryc. 2f). Jest to zjawisko wymiany polimeraz (ang. *polymerase switch*) bardzo podobne do tego, które zachodzi pomiędzy pol I i pol III w trakcie normalnej replikacji.

Polimeraza V charakteryzuje się niską procesywnością (zaraz po przeprowadzeniu TLS oddysocjuje), jak również zaskakująco niską wiernością replikacji nieuszkodzonej matrycy. W eksperymentach *in vitro*, na nieuszkodzonej nici, ilość błędów wprowadzanych przez tę polimerazę równa była jednemu nieprawidłowemu nukleotydomu na 10^3 wprowadzonych. Natomiast zdolność pol V do przeprowadzania TLS jest największa wśród opisanych u *E. coli* polimeraz. Prowadzi ona ten proces około 50 razy wydajniej niż pol III lub pol IV [8].

Produkty genów *umuC* i *umuD* oprócz przeprowadzania TLS uczestniczą także w innych procesach biologicznych. Kompleks UmuD₂C (ale nie UmuD'₂C) bierze udział w kontroli replikacji DNA. Spawalnia ją, co daje więcej czasu nie wprowadzającym błędów mechanizmom naprawczym (np. systemowi wycinania nukleotydów) na usunięcie uszkodzeń z DNA przed replikacją genomu [10]. Zwiększone stężenia kompleksu UmuD'₂C prowadzą zaś do zatrzymania RecA-zależnej rekombinacji homologicznej i w naprawie uszkodzeń DNA większą rolę zaczyna odgrywać mutagenna TLS [10].

Inną rolą pol V jest reinicjacja replikacji. O ile proces bezbłędnej reinicjacji replikacji katalizowanej przez pol II rozpoczyna się już po 2 minutach od naświetlenia komórek promieniami UV, to działanie UmuD'₂C można zaobserwować dopiero po 50 minutach, jeśli pierwszy system zawiedzie [8, 11].

Homologi białek UmuC i UmuD znaleziono również na plazmidach koniugacyjnych (np. na plazmidzie pKM101) zawierających geny oporności na różne antybiotyki, których gospodarzami może być wiele gatunków bakterii. Białkami tymi są między innymi białka MucA i MucB, które tworzą razem kompleks MucA'B zdolny do przeprowadzania TLS. Przypuszcza się, że funkcją tych homologów jest udział w spontanicznej mutagenezie, a ponieważ plazmidy te niosą geny oporności na antybiotyki, białka MucA i B oraz inne ich homologi mogą grać rolę w rozprzestrzenianiu się antybiotykooporności wśród różnych gatunków bakterii [12].



Ryc. 2. Mechanizm przeprowadzania TLS przez polimerazę V (na podstawie [8]).

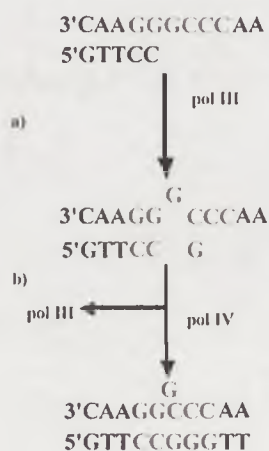
VI. Polimeraza IV — niekierowana mutageneza w stacjonarnej fazie wzrostu

Polimeraza DNA IV (pol IV) jest kodowana przez jeden gen *dinB*, podlegający kontroli systemu SOS. Dopiero badania Wagnera i wsp. z 1999 r. dowiodły, że białko to wykazuje aktywność polimerazową [13]. Chociaż molekularny mechanizm działania tego białka nie jest jeszcze znany, wykazano, że jest ono zaangażowane w kilka procesów. Polimeraza IV jest zdolna do przeprowadzania TLS *in vivo* dla niektórych rodzajów uszkodzeń [5] (podobnie jak w przypadku polimerazy V, odbywa się to przy udziale dimeru β i kompleksu γ), jednak jej udział w tym procesie obserwowany był znacznie rzadziej niż w przypadku polimerazy V. Białko to,

podobnie jak pol V, wykazuje się wyjątkowo niską procesywnością, oddysocjując od matrycy po przyłączeniu 6 do 8 nukleotydów [14].

Specyficznym procesem związanym z aktywnością polimerazy IV, jest niekierowana mutagenesa w stacjonarnej fazie wzrostu bakterii poddanych stresowi środowiskowemu [15]. Zjawisko to objawia się zahamowaniem wzrostu i zwiększoną liczbą mutacji wśród szczepów poddanych głodzeniu, traktowanych antybiotykami lub kolonizujących nowe środowisko.

Nadekspresja genu *dinB* powoduje w komórkach bakteryjnych indukcję wielu mutacji, a do najczęściej obserwowanych zaliczyć można mutacje zmiany podstawienia zasad oraz przesunięcie ramki odczytu (ang. *frameshift*) najczęściej o jeden nukleotyd w stosunku do rodzicielskiej nici. Mechanizm reinicjacji replikacji przez pol IV przedstawia Rycina 3.



Ryc. 3. Mechanizm powstawania mutacji typu zmiana ramki odczytu (na podstawie [13]).

Mutacje powodujące przesunięcia ramki odczytu wprowadzane przez pol IV najczęściej powstają spontanicznie w obrębie sekwencji palindromowych (sekwencje, które posiadają oś symetrii rotacyjnej) (Ryc. 3a). W sekwencjach takich często dochodzi do wewnątrznicowego parowania zasad (ang. *intra-strand pairing*), co w konsekwencji prowadzi do powstania struktury spinki do włosów (ang. *hairpin formation*) i deformacji nici DNA [16], a także tak zwanego poślizgu (ang. *slippage*), czyli przesunięcia jednej nici względem drugiej o jeden lub dwa nukleotydy (Ryc. 3b). Przesunięcie takie prowadzi często do przerwania replikacji, której reinicjację w tym przypadku umożliwia właśnie pol IV, utrwalając jed-

nak w tym procesie przesunięcie ramki odczytu (Ryc. 3b).

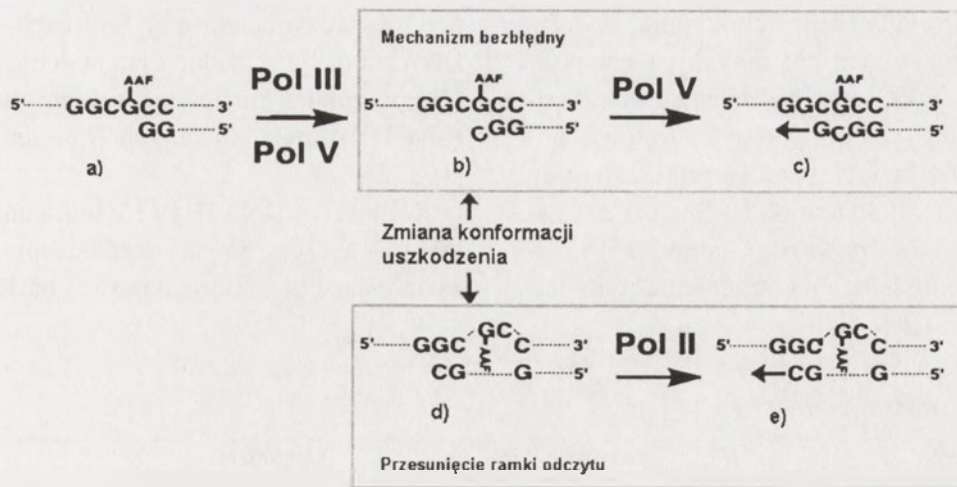
W wielu przypadkach, a szczególnie w warunkach stresu środowiskowego, mutacje typu *frameshift* generowane na sekwencjach palindromowych mogą brać udział we „włączaniu” i „wyłączeniu” różnych genów, zwiększając znacznie szansę przeżycia bakterii w niekorzystnych warunkach [15].

VII. Współzawodnictwo polimeraz

Pierwsze badania nad TLS dotyczyły przebiegu syntezy poprzez odkształcenie DNA wywołane obecnością dimeru tyminy. Nie było jednak wiadomo, jakie polimerazy biorą udział w naprawie innych uszkodzeń i czy naprawiają je w sposób wierny, czy też wprowadzają błędy. Przesłanką wskazującą na to, że proces ten jest bardzo skomplikowany i niejednoznaczny, mogą być wyniki eksperymentów dotyczących naprawy DNA zawierającego guaninę podstawioną grupą acetyloaminofluorenową (dG-AAF) w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny *Nar I* [11].

Badania procesu TLS w DNA niosącym zmodyfikowaną guaninę, dG-AAF, pokazały, że rodzaj polimerazy syntetyzującej nukleotydy poprzez to uszkodzenie zależy od konformacji, jaką przyjmie sekwencja zawierająca ten podstawiony nukleotyd. Okazało się, że polimeraza V, uznawana za mutagenną, nie popełniała w tym przypadku żadnych błędów, podczas gdy skutkiem działania polimerazy II, normalnie bardzo wiernej, było przesunięcie ramki odczytu o dwa nukleotydy (nowa nić była krótsza o dwa nukleotydy w stosunku do nici matrycowej) [11]. Model przeprowadzania TLS poprzez dG-AAF przedstawiono na Rycinie 4.

W tym procesie komplementarny nukleotyd (cytozyna) zostaje wstawiony naprzeciw dG-AAF przez pol III lub pol V (Ryc. 4a i b). Dalszy sposób replikacji zależy od konformacji, jaką przyjmie replikowany region. Jeżeli konformacja, w jakiej znajduje się ostatnio dołączony nukleotyd (cytozyna), jest zaburzona (Ryc. 4b), to tylko pol V będzie w stanie dosyntetyzować kilka następnych nukleotydów. Sekwencja DNA w obrębie uszkodzenia nie zostanie zmieniona (Ryc. 4c). Jeżeli dojdzie do przesunięcia nici względem siebie o dwa nukleotydy (konformacja ostatniego dołączonego nukleotydu będzie prawidłowa) (Ryc. 4d), to syntezy będzie mogła kontynuować pol II (Ryc. 4e). W tym przypadku dojdzie do przesunięcia ramki odczytu o 2 nukleotydy.



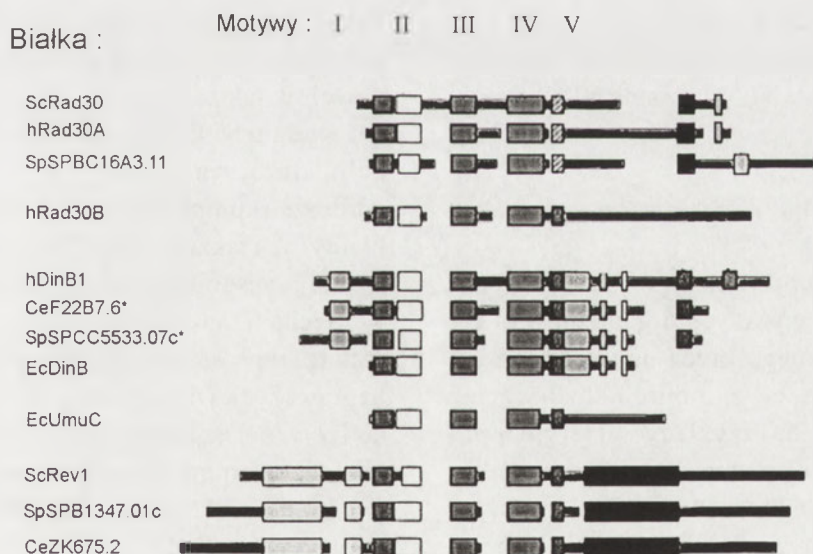
Ryc. 4. Model przeprowadzania TLS poprzez dG-AAF w obrębie sekwencji *Nar I* (na podstawie [11]).

VIII. Porównanie budowy nowych polimeraz DNA

Wśród polimeraz DNA wyróżnia się pięć głównych rodzin: A (np. pol I u *E. coli*, mitochondrialna pol γ u człowieka), B (np. pol α u człowieka), C (np. pol III u *E. coli*), X (np. pol β i pol λ u człowieka) [10]. W 2001 roku O h o m o r i i wsp. wyróżnili nową rodzinę polimeraz Y, do której zalicza się mię-

szych i niższych *Eucaryota* (it), co przedstawia Tabela 2. Wspólnym mechanizmem przeprowadzania TLS, dla tak odległych organizmów jak bakterie, drożdże czy człowiek, odpowiadają białka o bardzo podobnej strukturze należące do rodziny Y polimeraz [18,19], co przedstawia Rycina 5.

W strukturze pierwszorzędowej tych białek wyróżniono pięć bardzo konserwatywnych motywów aminokwasowych znajdujących się w pobliżu ich



Ryc. 5. Schematycznie przedstawiona struktura białek należących do rodziny Y polimeraz [19]. Skróty przy nazwie białek oznaczają: Sc — *Saccharomyces cerevisiae*, h — *Homo sapiens*, Ce — *Caenorhabditis elegans*, Ec — *Escherichia coli*, Sp — *Schizosaccharomyces pombe*.

dzy innymi pol IV i pol V *E. coli*. Cechy wspólne tej rodziny białek to: brak aktywności egzonukleolitycznej w kierunku $3' \rightarrow 5'$, zdolność do polimeryzacji DNA *in vitro* z bardzo małą dokładnością i słabą procesywnością. Bardzo interesującą cechą tych białek jest ich zdolność do przeprowadzania TLS [17].

Polimerazy typu Y występują u wszystkich głównych grup organizmów *Bacteriae*, *Archae* (it), wyż-

N-końca. Motywy I i III zawierają aminokwasy odpowiadające za aktywność polimerazową, motywy II i IV oddziałują z przyłączanym nukleotydem, natomiast motyw V odpowiada za kontakt polimerazy z nicią DNA [20].

Wszystkie skrytalizowane dotąd polimerazy DNA zbudowane są według reguły prawej ręki. W trzeciorzędowej budowie polimeraz należących do grupy Y też można wyróżnić motywy dłoni (ang.

palm), palca (ang. *finger*) oraz kciuka (ang. *thumb*), charakterystyczne również dla innych rodzin polimeraz. Motywy kciuka i palca polimeraz grupy Y odbiegają budową od tych spotykanych wśród typowych polimeraz replikacyjnych. To właśnie region palca odpowiada za dokładność polimeraz, sprawdzając powierzchnię powstałą pomiędzy nadchodzącym nukleotydem a komplementarnym nu-

przeprowadzania wiernej replikacji uszkodzonego DNA, mutacja w kodującym ją genie sprawia, że jej rolę przejmują mutagenne systemy naprawy uszkodzeń DNA powodowanych promieniowaniem UV [10, 22].

Polimerazy DNA II, IV i V biorą udział w syntezie DNA poprzez różne uszkodzenia, często odkształcające nić, które stanowią barierę dla pol III,

Tabela 2.

Przykładowe polimerazy należące do grupy Y [9, 10 i 18].

Gen	Nazwa białka	Organizm
<i>umuC, umuD</i>	polimeraza V	<i>E. coli</i>
<i>dinB</i>	polimeraza IV	<i>E. coli</i>
<i>dinP</i>	Dpo4	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
<i>rev1, rev3, rev7</i>	polimeraza ζ	<i>S. cerevisiae</i>
SPBC16A3.11	homolog Rad30	<i>S. pombe</i>
<i>hREV1</i>	REV1	<i>H. sapiens</i>
<i>hDINB1</i>	polimeraza κ	<i>H. sapiens</i>
<i>hRAD30B</i>	polimeraza ι	<i>H. sapiens</i>
<i>hRAD30A/XP-V</i>	polimeraza η	<i>H. sapiens</i>

kleotydem na matrycy [17]. Możliwe, iż właśnie odmienna budowa tego regionu warunkuje charakterystyczne właściwości polimeraz grupy Y, ich zdolność do przeprowadzania TLS oraz stosunkowo małą wierność [18].

IX. Podsumowanie

Powszechność występowania procesu TLS wśród bakterii, drożdży jak i wyższych organizmów eukariotycznych, prowadzonego przez polimerazy z rodziny Y [10] wskazuje na jego ogromne znaczenie dla procesów życiowych. Przykłady bakteryjnej polimerazy IV, generującej mutacje w stacjonarnej fazie wzrostu komórek [15] oraz ludzkiej polimerazy η uczestniczącej w somatycznych hypermutacjach immunoglobulin (co zwiększa ich różnorodność) [21], świadczą o zaangażowaniu tej rodziny polimeraz w dostosowywanie się organizmów żywych do zmieniających warunków środowiskowych.

Innym przykładem ogromnego znaczenia polimeraz z rodziny Y dla prawidłowego funkcjonowania organizmów jest ich rola w *Xeroderma pigmentosum-variant*, chorobie objawiającej się nadwrażliwością skóry na światło UV oraz zwiększoną częstością występowania czerniaka złośliwego. Choroba ta jest wynikiem mutacji w genie kodującym polimerazę η. Ponieważ polimeraza ta jest zdolna do

głównej bakteryjnej polimerazy replikacyjnej. Udział danej polimerazy zależy od rodzaju uszkodzenia i jego konformacji oraz sekwencji nukleotydowej, w jakiej to uszkodzenie się znajduje [5, 23]. Od wielu czynników zależy więc będzie, czy dana polimeraza wprowadzi w uszkodzone miejsce prawidłowe (komplementarne), czy też zmienione nukleotydy, a także czy dojdzie w replikowanym obszarze do przesunięcia ramki odczytu.

Mechanizmów syntezy poprzez uszkodzenie czy restartu replikacji nie możemy zaliczyć do systemów naprawczych DNA, ponieważ nie doprowadzają one do fizycznej naprawy uszkodzenia, a jedynie umożliwiają jego ominięcie w procesie replikacji DNA. Pozwala to komórce powielić całkowicie materiał genetyczny. Naprawa uszkodzeń może być przeprowadzana w komórkach potomnych przed kolejną turą replikacji przez tradycyjne systemy naprawy DNA. Należy podkreślić również, że w trakcie replikacji uszkodzonej matrycy przez polimerazy z rodziny Y dochodzi często do powstawania mutacji (przesunięcie ramki odczytu, wstawienie niekomplementarnej zasady). Jednak w pewnych sytuacjach (szczególnie w warunkach zmiennego, wywołującego stres środowiska) może się to okazać bardzo korzystne dla komórki bakteryjnej [15, 22]. Replikacja uszkodzonego DNA umożliwia jego duplikację, ale kosztem zmniejszenia wierności przekazu informacji gene-

tycznej. Polimerazy z rodziny Y są więc bardzo istotnym składnikiem systemu tolerancji uszkodzeń DNA.

Artykuł otrzymano 6 lutego 2003

Zaakceptowano do druku 17 czerwca 2004

Piśmiennictwo

1. Węgleński P (2000) *Genetyka molekularna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
2. Lander University, Biology 403, *Molecular Biology Lecture Outlines* (2000) http://www.lander.edu/flux/403_lecture_outlines.htm
3. Web Books Publications 2003 <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7B.htm>
4. Rangarajan S, Woodgate R, Goodman MF (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 9224-9229
5. Wagner J, Etienne H, Janel-Bintz R, Fuchs RPP (2002) *DNA Repair* **1**: 159-167
6. Kimball's Biology Pages, DNA Replication <http://www.ultranet.com/~jkimball/BiologyPages/D/DNAReplication.html>
7. Joset F, Guespin-Michel J (1993) *Prokaryotic Genetics: Genome organization, transfer and plasticity*. Blackwell Science, London
8. Pham P, Rangarajan S, Woodgate R, Goodman MF (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8350-8354
9. Woodgate R (1999) *Genes & Development* **13**: 2191-2195
10. Sutton MD, Walker GC (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8342-8349
11. Becherel OJ, Fuchs RPP (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8566-8571
12. Goldsmith M, Sarov-Biat L, Livneh Z (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11227-11231
13. Wagner J, Gruz P, Fuchs RPP, Yamada M (1999) *Molecular Cell* **4**: 281-286
14. Tang M, Pham P, Shen X, Taylor JS, O'Donnell M, Woodgate R, Goodman MF (2000) *Nature* **404**: 1014-1018
15. Bull HJ, Lombardo MJ, Ronsberg SM (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8334-8341
16. Bzymek M, Lovetta S (2001) *Genetics* **158**: 527-540
17. Friedberg EC, Fischhaber PL, Kisker C (2001) *Cell* **107**: 9-12
18. Boudsocq F, Iwai S, Hanaoka F, Woodgate R (2001) *Nucleic Acids Research* **29**: 4607-4616
19. Johnson RE, Washington MT, Prakash S, Prakash L (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12224-12226
20. Ling H, Woodgate R, Boudsocq F (2001) *Cell* **107**: 92-102
21. Zeng X, Winter DB, Kasmer C, Kraemer KH, Lehmann AR, Gearhart PJ (2001) *Nature Immunology* **2**: 537-541
22. Livneh Z (2001) *J Biol Chem* **276**: 25639-25642
23. Napolitano R, Janel-Bintz R, Wagner J, Fuchs RPP (2000) *The EMBO Journal* **19**: 6259-6265

Silnie wiążące analogi stanu przejściowego fosforylasy nukleozydów purynowych — znaczenie, projektowanie i właściwości

Tight binding transition state analogues of purine nucleoside phosphorylase — meaning, design and properties

ANDRZEJ LEWANDOWICZ

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
 - I-1. Analogi stanu przejściowego
 - I-2. Kinetyczne efekty izotopowe — wgląd w strukturę stanu przejściowego
 - I-3. Fosforylasy nukleozydów purynowych — biologiczny cel projektowanych inhibitorów
 - I-4. Efekt *in vivo* inhibicji ludzkiej PNP
 - I-5. Znaczenie inhibicji PNP zarodźca malarii
- II. Projektowane analogi stanu przejściowego PNP
 - II-1. Rodzina immucillin
- III. Model stanu przejściowego ludzkiej i zarodźcowej PNP
- IV. Analogi stanu przejściowego PNP II generacji. Modyfikacja DADMe
 - IV-1. DADMeImmucillina H I DADMeImmucillina G. Terminologia
 - IV-2. Modyfikacje poprawiające schemat oddziaływań analog TS — centrum aktywne
 - IV-3. Właściwości kinetyczne i stałe dysocjacji
 - IV-4. Częsteczkowe powierzchnie potencjałów elektrostatycznych
 - IV-5. Znaczna poprawa właściwości farmakologicznych DADMeImmH wykazana na modelu *in vivo* u myszy
- V. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: DADMeImmG — DADMeImmucillina G; DADMeImmH — DADMeImmucillina H; dCK — kinaza deoksycytydynowa (ang. *deoxycytidine kinase*); EIE — równowagowy efekt izotopowy (ang. *equilibrium isotope effect*); ImmH — immucillina H; KIE — kinetyczny efekt izotopowy (ang. *kinetic isotope effect*); MEP — częsteczkowy potencjał elektrostatyczny (ang. *molecular electrostatic potential*); MTAP — fosforylaza metyltioadenozynowa (ang. *met-*

Contents:

- I. Introduction
 - I-1. Transition state analogues
 - I-2. Kinetic isotope effects — insight into transition state
 - I-3. Purine nucleoside phosphorylase (PNP) — the biological target of designed inhibitors
 - I-4. Effect *in vivo* of human PNP inhibition
 - I-5. Role of *Plasmodium falciparum* PNP inhibition
- II. Designed transition state analogues of PNP
 - II-1. Immucillin family
- III. Transition state models of human and *Plasmodium falciparum* PNP
- IV. Second generation transition state analogues of PNP. DADMe modification
 - IV-1. DADMeImmucillin H I DADMeImmucillin G. Terminology
 - IV-2. Modification improving interaction pattern of TS analogue in active center
 - IV-3. Kinetic and binding constants
 - IV-4. Molecular electrostatic potential surfaces
 - IV-5. Improvement of pharmacological properties shown in mouse *in vivo* model
- V. Conclusions

hlythioadenosine phosphorylase); PNP — fosforylaza nukleozydów purynowych (ang. *purine nucleoside phosphorylase*); TS — stan przejściowy (ang. *transition state*).

I. Wprowadzenie

I-1. Analogi stanu przejściowego

Blokowanie enzymów stanowi podstawę działania wielu grup leków, włączając np. środki przeciwbakteryjne (inhibitory reduktazy dihydrofolianowej), leki przeciwzapalne (inhibitory cyklooksygenazy), leki przeciwnadciśnieniowe (inhibitory konwertazy angiotensyny), wiele chemioterapeuty-

Dr, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa, e-mail: alewand@iimcb.gov.pl

ków stosowanych w onkologii, jak inhibitory glikozylacji, transferazy fernazyłowej, kinaz białkowych itp. [1]. Osiągnięcie efektu terapeutycznego możliwe jest m.in. na drodze inhibicji kompetycyjnej (współzawodniczej), gdzie inhibitor konkuruje z substratem, nie wiążąc się jednak kowalencyjnie z enzymem. Poprzez projektowanie analogów substratu bądź produktu, na podstawie struktur krystalograficznych kompleksów enzym-reagent uzyskano wiele inhibitorów charakteryzujących się nawet nanomolarnymi stałymi dysocjacji [2, 3]. W wielu przypadkach nie jest to jednak wynik wystarczający dla osiągnięcia efektu biologicznego, możliwego przy całkowitej inhibicji enzymu i stężeniach inhibitora nie zaburzających innych fizjologicznych parametrów [4-6].

Zgodnie z teorią stanów przejściowych reakcji enzymatycznych, enzym wiąże stan przejściowy (TS) silniej niż substrat, co powoduje obniżenie energii aktywacji. Stabilny analog substratu podobny do stanu przejściowego wykorzystuje tę różnicę energii jako energię wiązania, mając stąd potencjał wiązania od 10^{10} do 10^{23} razy silniejszy niż sam substrat [7-9]. Nawet częściowe przybliżenie struktury inhibitora do stanu przejściowego reakcji enzymatycznej pozwala osiągnąć bardzo dużą entalpię swobodną wiązania w porównaniu z inhibitorami projektowanymi w oparciu o strukturę stabilnych reagentów [10-12]. Do racjonalnego projektowania analogów stanu przejściowego niezbędne jest poznanie jego struktury.

Jednak mimo prostoty założenia, że im większe podobieństwo projektowanego związku do struktury TS tym silniejsze jego wiązanie z enzymem, znalezienie potencjalnego inhibitora o odpowiednich właściwościach biochemicznych i farmakologicznych jest bardzo żmudnym i długim procesem, a badania obejmują wiele dziedzin, włączając chemię obliczeniową, enzymologię, badania kinetyczne, skomplikowaną syntezę organiczną czy fazę końcową, tj. próby kliniczne, które nie zawsze prowadzą przecież do zamierzonych celów.

I-2. Kinetyczne efekty izotopowe — wgląd w strukturę stanu przejściowego

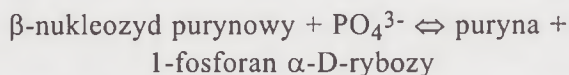
Chociaż struktura stanu przejściowego nie jest możliwa do zobrazowania za pomocą metod krystalograficznych i spektroskopowych, jak w przypadku struktury stabilnych reagentów, czy nawet produktów pośrednich, kinetyczne efekty izotopowe stanowią bardzo użyteczne narzędzie do analizy struktury TS. Kinetyczny efekt izotopowy (KIE) zdefiniowany

jest jako stosunek stałej szybkości reakcji dla substratu niepodstawionego do stałej szybkości reakcji substratu podstawionego izotopowo, przy czym przyjmuje się, że substrat podstawiony izotopowo to ciężki izotopomer. Kinetyczny efekt izotopowy odzwierciedla zmiany otoczenia wibracyjnego wokół centrum reakcji na drodze od reagentów do stanu przejściowego, który znajduje się na szczycie bariery energetycznej wzdłuż rozpatrywanej współrzędnej reakcji. W przypadku, gdy atom ciężki związany jest silniej w stanie równowagowym (ang. *ground state*) niż w stanie przejściowym, kinetyczny efekt izotopowy ma wartość normalną, większą od jedności, tzn. lekki izotopomer reaguje szybciej. Ciężki substrat reaguje natomiast szybciej w przypadku, gdy atom ciężki jest silniej związany w stanie przejściowym. Kinetyczne efekty izotopowe odzwierciedlają stąd zmianę mocy wiązań wokół centrum reakcji podczas konwersji substratu do stanu przejściowego. Z kolei, równowagowe efekty izotopowe (EIE) obrazują tę różnicę między stabilnym substratem i produktem, względnie substratem i produktem pośrednim [13-15]. Wczesne analizy enzymatycznych stanów przejściowych z wykorzystaniem kinetycznych efektów izotopowych ustaliły oksokarbeniowy stan przejściowy dla lizozymu [16]. Późniejsze badania nad transferazą O-metylokatecholową z mapowaniem stanów przejściowych ustaliły rzędy wiązań Paulinga grupy atakującej i odchodzącej [17]. Obecnie analizy enzymatycznych stanów przejściowych opierają się na pomiarze kinetycznych efektów izotopowych dla wielu atomów, dostarczając informacji o reagujących atomach, jak i ich sąsiedztwie [18-24]. Analiza kinetycznych efektów izotopowych umożliwiła poznanie struktur stanów przejściowych wielu reakcji, ważnych z farmakologicznego punktu widzenia [25-33].

I-3. Fosforylaza nukleozydów purynowych — biologiczny cel projektowanych inhibitorów

Analiza enzymatycznych stanów przejściowych pozwoliła osiągnąć ostatnio pikomolowe stałe dysocjacji dla związków chemicznych będących potencjalnymi lekami [34-36]. Szczególnie interesujące osiągnięcia w dziedzinie projektowania analogów stanu przejściowego otrzymano na polu badań N-rybozylotransferaz, które katalizują przeniesienie reszty rybozylowej pomiędzy azotem puryn, pyrimidyn lub pyridin i nukleofilowym atomem tlenu wody, fosforanu, czy też pirofosforanu [37]. Enzymem odkrytym w 1947 r. i należącym do N-rybozylotransferaz jest fosforylaza nukleozydów purynowych (EC

2.4.2.1, PNP), która katalizuje przeniesienie reszty rybozylowej z nukleozydów purynowych na tlen fosforanowy [38-41].

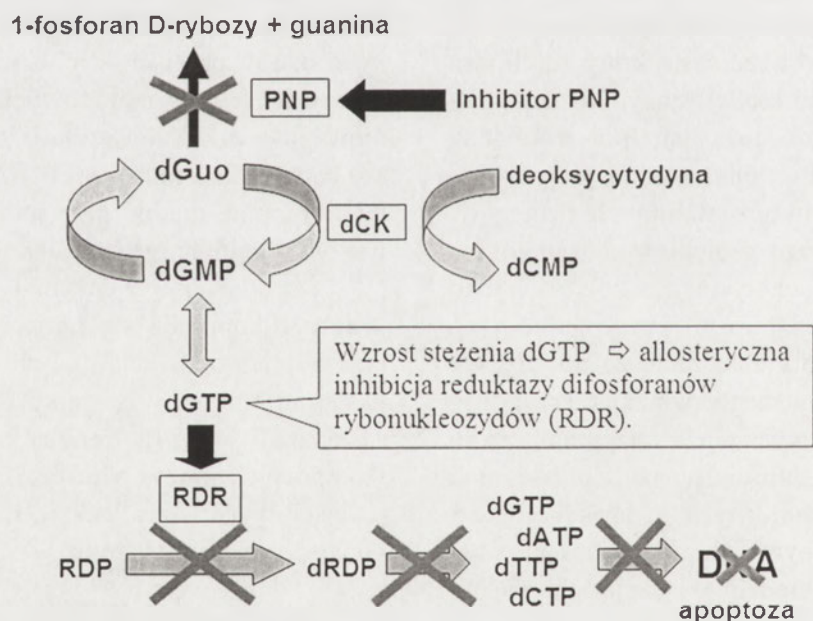


I-4. Efekt *in vivo* inhibicji ludzkiej PNP

Naturalnymi substratami ludzkiego izoenzymu PNP są 6-oksopuryny, deoksyguanozyna, guanozyna, inozyna oraz deoksyinozyna [42]. Ze względu na kluczowe znaczenie PNP w metabolizmie puryn zarówno ssaków jak i organizmów o znaczeniu chorobotwórczym, enzym ten jest intensywnie badany pod względem struktury, mechanizmów reakcji oraz projektowania inhibitorów o zastosowaniu farmakologicznym [43-47].

W 1975 r. G i b l e t t zauważył, że u dzieci z limfopenią i upośledzoną funkcją limfocytów T, jakkolwiek prawidłową odpowiedzią immunologiczną ze

anozyny, fizjologicznie degradowanej do guaniny. Dzieliące się, aktywowane limfocyty T wytwarzają kinazę deoksycytydynową (dCK), przekształcającą deoksycytydynę w dCMP [53]. Deoksyguanozyna, która akumuluje się (wzrost stężenia nawet do 10 μM) przy zahamowanej aktywności fosforylasy nukleozydów purynowych, jest również substratem dla dCK, która przekształca ją w dGMP [54], podczas gdy w warunkach normalnych stężenie deoksyguanozyny, dzięki wysokiej aktywności PNP w wątrobie, śledzionie, jelitach oraz erytrocytach ludzkich utrzymuje się poniżej 0.1 μM [55]. W konsekwencji, nagromadzony dGTP allosterycznie blokuje reduktazę difosforanów rybonukleozydów, a zaburzenie w puli nukleotydów indukuje apoptotyczną śmierć komórki [56-57] (Ryc. 1). Hamowanie ludzkiej fosforylasy nukleozydów purynowych rozpatruje się jako bardzo istotny cel w leczeniu nowotworów wywodzących się z linii limfocytów T, jak również wielu chorób autoimmunologicznych związanych z nadmierną aktywacją limfocytów T, włączając łuszczy-



Ryc. 1. Skutki inhibicji ludzkiej PNP. Inhibicja PNP prowadzi do nagromadzenia dGMP, na drodze fosforylacji katalizowanej przez kinazę deoksycytydynową (dCK). dGMP po konwersji do dGTP prowadzi do allosterycznej inhibicji reduktazy difosforanów rybonukleozydów (RDR), a zaburzenie puli deoksyrbonukleotydów (dRDP) skutkuje apoptozą.

strony limfocytów B, miał miejsce całkowity brak aktywności fosforylasy nukleozydów purynowych [48]. Następne badania wykazały, że biochemiczny związek między brakiem aktywności PNP i upośledzeniem funkcji limfocytów T polega na zahamowaniu degradacji deoksyguanozyny i jej następczej konwersji do dGTP w aktywowanych komórkach T [49-52]. Proliferacja limfocytów T wymaga wzmoczonej syntezy DNA. Przy zahamowanej aktywności PNP następuje wzrost stężenia deoksygu-

aniny, czy reakcję odrzucania przeszczepu [58-61]. W dotychczasowych badaniach biologicznych testowany był analog stanu przejściowego — immucillina H zaprojektowany w oparciu o strukturę stanu przejściowego wyznaczoną na podstawie kinetycznych efektów izotopowych dla wołowego izoenzymu PNP [32].

Wykazano, że inhibicja PNP za pomocą immucilliny H w hodowli komórek białaczki T-komórkowej, linii CCRF-CEM i MOLT-4, wytwarzających dCK

podczas aktywacji, spowodowała indukcję apoptozy. Limfocyty B nie wytwarzające dCK nie były jednak podatne na działanie inhibitorów PNP, jak również linie komórkowe z wysoką aktywnością 5'-nukleotydazy nie ulegały apoptozie wskutek inhibicji PNP [62]. Zaobserwowano również, że immucillina H była tak samo skuteczna w przedłużaniu życia gospodarza w modelu reakcji odrzucania przeszczepu, jak cyklosporyna A [63]. Obecnie związek ten znajduje się w fazie I/II prób klinicznych z pacjentami z rozrostami T-komórkowymi [57].

I-5. Znaczenie inhibicji PNP zarodźca malarii

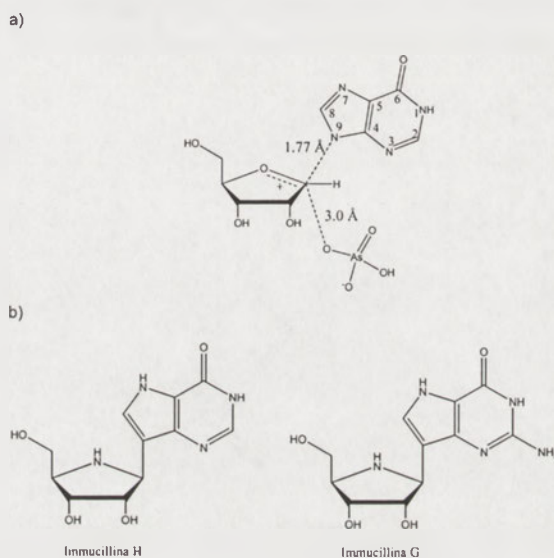
Istotnym izoenzymem PNP, wzbudzającym zainteresowanie pod kątem projektowania inhibitorów, jest fosforylaza nukleozydów purynowych z zarodźca sierpowatego (*Plasmodium falciparum*), wywołującego malarię, przyczynę 1 do 2 mln zgonów rocznie [64, 65]. Ze względu na rosnącą lekooporność zarodźca, znalezienie alternatywnych leków jest kwestią kluczową dla skutecznej terapii tej choroby [66, 67]. Od dawna przypuszczano, że szlak purynowy może stanowić przeciwmalaryczny cel [68-70]. Zarodziec malarii, pasożyt bytujący wewnątrz erytrocytów krwi ludzkiej, jest niezdolny do syntezy puryn *de novo*, jak również erytrocyty nie posiadają zdolności syntezy puryn. Replikacja pasożyta wymaga ciągłego dostarczania zasad purynowych do syntezy DNA i RNA (ang. *purine salvage*). Głównym prekursorem nukleozydów purynowych dla zarodźca malarii jest hipoksantyna, powstająca podczas fosforolizy inozyny. Reakcja ta katalizowana jest przez fosforylaze nukleozydów purynowych, dlatego też zarodziec malarii jest wrażliwy na blokowanie PNP. Wykazano, że inhibicja PNP powoduje śmierć pasożyta w hodowli erytrocytów *in vitro* [70-72]. Do tej pory nie wiadomo jednak, czy do wywołania śmierci pasożyta wystarczająca jest inhibicja zarodźcowego izoenzymu PNP, czy również ludzkiej fosforylazy nukleozydów purynowych. Nie znaleziono bowiem inhibitora selektywnie blokującego zarodźcową PNP, co umożliwiłoby znalezienie odpowiedzi. Do niedawna nie były znane również struktury stanów przejściowych obu izoenzymów, niezbędne do zaprojektowania selektywnych analogów stanu przejściowego, a poznano jedynie strukturę TS dla PNP wołu.

Hamowanie fosforylazy nukleozydów purynowych jest również rozważane jako potencjalny środek przeciwko gruźlicy, tym bardziej że również w przypadku *Mycobacterium tuberculosis* obserwuje się rosnącą lekooporność [73].

II. Projektowane analogi stanu przejściowego PNP

II-1. Grupa immucillin

Analiza struktury stanu przejściowego reakcji arsenolizy wołowej PNP doprowadziła do zaprojektowania i syntezy analogu stanu przejściowego immucilliny H, będącej chemicznie (1*S*)-1-(9-deazahipoksantyn-9-yl)-1,4-dideoksy-1,4-imino-D-rybitolem oraz immucilliny G czyli (1*S*)-1-(9-deazaguanin-9-yl)-1,4-dideoksy-1,4-imino-D-rybitolem [30-32] (Ryc. 2). Stan przejściowy reakcji katalizowanej



Ryc. 2. Immucillina H i immucillina G (b). Analogi stanu przejściowego zaprojektowane na podstawie analizy struktury TS wyznaczonej w oparciu o kinetyczne efekty izotopowe reakcji arsenolizy katalizowanej przez wołową PNP (a).

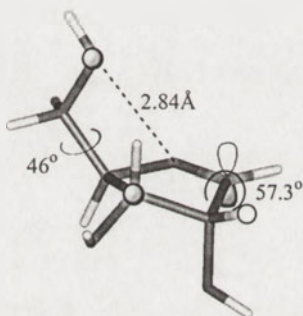
przez wołową PNP charakteryzuje się znikomym rzędem wiązania między atomem C1' i atakującym tlenem nukleofila (<0.02) oraz zachowanym częściowo rzędem wiązania z azotem N9 grupy odchodzącej. Długość wiązania C1'-N9 na podstawie analizy KIE oszacowano na 1.77 Å, podczas gdy długość wiązania C1'-C9 w immucillinach wynosi 1.5 Å. Oksakarbeniowy charakter stanu przejściowego inhibitorów z grupy immucillin naśladują poprzez uprotynowany atom azotu 4' pierścienia imminorybitolowego, z tym że ładunek zlokalizowany jest praktycznie na atomie 4', podczas gdy w TS między atomem C1' i O4'. Immucillina H charakteryzuje się 23 pM stałą dysocjacji względem wołowego izoenzymu oraz 56 pM względem izoenzymu ludzkiego. Wykazuje jednak znacznie słabsze wiązanie w stosunku do PNP z *Plasmodium falciparum* (stała dysocjacji 0.6 nM). Dodatkowa grupa aminowa w immucillinie G

poprawiła siłę wiązania inhibitora, poprzez umożliwienie dodatkowych wiązań wodorowych w przypadku ludzkiej PNP [74] (Tab. 1).

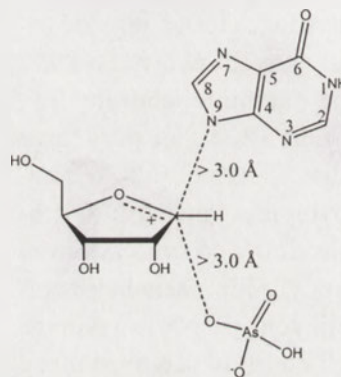
III. Model stanu przejściowego ludzkiej i zarodźcowej PNP

Analiza stanów przejściowych ludzkiej i zarodźcowej PNP przeprowadzona ostatnio za pomocą kinetycznych efektów izotopowych pozwoliła na lepsze zrozumienie oddziaływań w centrum aktywnym w fazie stanu przejściowego [29]. Ustalono, że reakcja arsenolizy katalizowana przez izoenzym ludzki i zarodźcowy przechodzi poprzez jon oksakarbeniowy stabilizowany przez sieć wiązań wodorowych oraz inne oddziaływania elektrostatyczne,

a)



b)



Ryc. 3. Wymodelowana geometria jonu oksakarbeniowego (a) — nietrwałego produktu pośredniego, przez który przebiega reakcja katalizowana przez ludzką i zarodźcową PNP (pokazana struktura dla ludzkiego izoenzymu). Różnica obu struktur wyraża się jedynie różnymi kątami dwuściennymi H2'-C2'-C1'-H1', 57.3° dla ludzkiej i 55.7° dla zarodźcowej PNP. (b) Schemat stanu przejściowego reakcji. Odległości azotu N9 grupy odchodzącej i atakującego nukleofila > 3.0 Å na etapie stanu przejściowego tłumaczą otrzymane efekty izotopowe.

który powinien mieć czas życia dłuższy niż czas pojedynczego drgania wiązania. Wykazano, że zgodnie z teorią efektów izotopowych tylko przy takim założeniu możliwe jest zaobserwowanie równowagowego efektu izotopowego atomu C1', który ma wartość bliską jedności. Struktura wymodelowanego jonu oksakarbeniowego będącego produktem pośrednim reakcji przedstawiona jest na rycinie 3a. Produkt ten powstaje poprzez stan przejściowy, w którym udział grupy odchodzącej jest znikomy, odległości C1'-N9 i C1'-O są większe od 3.0 Å, a ładunek dodatni zlokalizowany jest głównie wokół atomu C1' (Ryc. 3b). Otrzymane efekty izotopowe nie przeczą hipotezie pary jonowej — silnego stabilizującego oddziaływania elektrostatycznego między atomem C1' i tlenem nukleofila (fosforanu), które uważa się za jeden z czynników determinujących siłę wiązania analogów stanu przejściowego (patrz niżej). Musi to być jednak oddziaływanie niemające

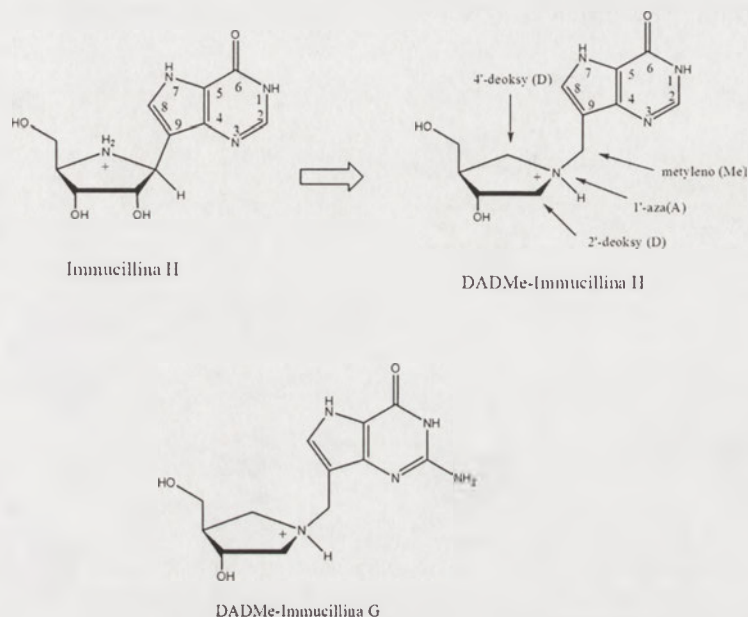
IV. Analogi stanu przejściowego PNP II generacji. Modyfikacja DADMe

Uwzględnienie cech nowo scharakteryzowanych stanów przejściowych, tj. bardziej dysocjacyjnego charakteru, jak i ładunku zlokalizowanego głównie wokół atomu C1', dokonano poprzez włączenie mostka metylenowego między atom 1' imminorybitolu i atom C9 9-deazapuryny odsuwając od siebie oba pierścienie. Centralne umieszczenie ładunku dodatniego w pozycji 1' jonu oksakarbeniowego, uzyskano poprzez umieszczenie uprotonowanego atomu azotu w pozycji 1' pierścienia imminorybitolu w stabilnym analogu TS (Ryc. 4). W skrócie modyfikacja ta określana jest jako DADMe (patrz niżej). Poprzez tę modyfikację uzyskano niebywałe zwiększenie siły wiązania inhibitorów. Najniższa stała dysocjacji dla ludzkiej PNP wyniosła 6.8 pM w przypadku DADMeImmucilliny G.

IV-1. DADMeImmucillina H i DADMeImmucillina G. Terminologia

Podstawą nazewnictwa nowo otrzymanej grupy inhibitorów PNP drugiej generacji pozostała immucillina H lub immucillina G (odpowiednio w przypadku hipoksantyny lub guaniny). Przedrostek DADMe wskazuje na modyfikację 4'-deaza-1'-aza-2'-deoksymetyleno- i chociaż jest to termi-

tychczasowe inhibitory bardziej podobne do substratu, jak rodzina immucillin [34]. Analiza krystalograficzna kompleksów DADMeImmucilliny H potwierdza kluczową rolę wiązań wodorowych tworzonych między atomem wodoru związanym z azotem N7, tlenem O6 i azotem N1 w wiązaniu pierścienia purynowego. Odseparowanie puryny od pierścienia iminorybitolu za pomocą mostka metylenowego włączonego pomiędzy atomy C1' i C9 również umo-



Ryc. 4. Nowo zsyntezowane analogi stanu przejściowego ludzkiej i zarodkowej PNP. Wyjaśnione pochodzenie przedrostka DADMe charakteryzującego modyfikacje wprowadzone do inhibitorów II generacji.

nologia opracowana na użytek własny autorów, w sposób najprostszy wskazuje na nową rodzinę inhibitorów [34] (Ryc. 4).

IV-2. Modyfikacje poprawiające schemat oddziaływań analog TS — centrum aktywne

Struktura DADMeImmucilliny H i DADMeImmucilliny G uwzględnia fakt znikomego rzędu wiązania między C1' i atomem N9 hipoksantyny w stanie przejściowym [77, 78]. Odległość C1'-C9 w DADMeImmucillinach wynosi 2.5 Å, a więc jest o 0.7 Å dłuższa niż dla poprzednio modelowanego stanu przejściowego wołowej PNP i o 1 Å dłuższa niż w przypadku immucillin, gdzie wynosi 1.5 Å [30, 31], jednocześnie pozostaje nieco poniżej wartości oczekiwanych dla ludzkiej bądź zarodkowej PNP (>3.0 Å). Ze względu na naśladowanie późnego stanu przejściowego, DADMeImmucillina H została scharakteryzowana również jako „over the barrier transition state analogue”, przybliżający strukturę stanu przejściowego bardziej od strony produktu, niż do-

zliwia uprzywilejowanie oddziaływania elektrostatycznego między dodatnio naładowanym azotem N1' i atomem tlenu nukleofila (odległość 2.7 Å w DADMe zamiast 3.3 Å w przypadku struktur kompleksów z PNP z *M. tuberculosis*) [34].

Przeprowadzono wiele analiz powiązań struktury i właściwości dla analogów immucillin i DADMeImmucillin. Sprawdzono na przykład, że modyfikacja polaryzacji wiązania N7-H poprzez wprowadzenie atomu azotu N8 w pochodnej 8-aza- skutkuje znacznym osłabieniem siły wiązania inhibitora przez podwyższenie pK_a donora protonu dla wiązania wodorowego.

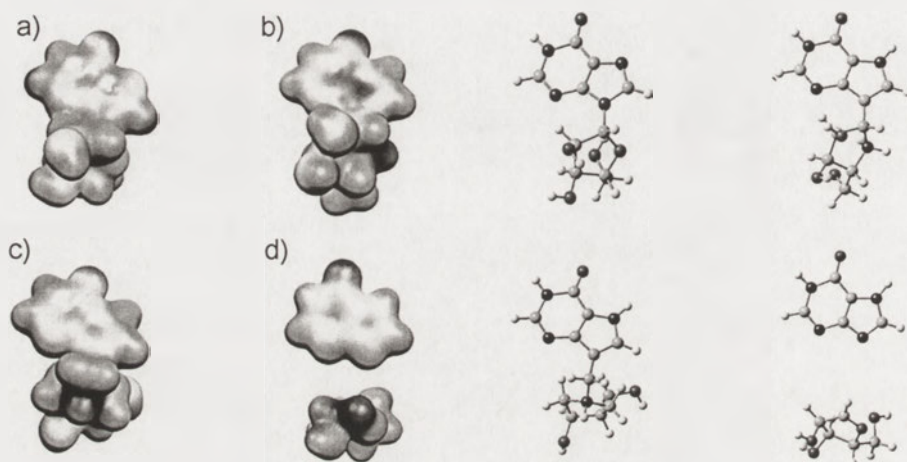
Z obecnie zsyntezowanych analogów immucillin i DADMe-Immucillin, najniższe stałe dysocjacji wykazują jednak opisane tutaj DADMeImmH i DADMeImmG [35, 77, 78].

IV-3. Właściwości kinetyczne i stałe dysocjacji

Wykazano, że podobnie jak immucilliny, analogi DADMe przejawiają dwufazowy przebieg inhibicji.

Po początkowym związaniu analogu w centrum aktywnym enzymu, prawdopodobnie obojętnej cząsteczki inhibitora, następuje jego protonacja i w konsekwencji zmiany konformacyjne centrum aktywnego, co prowadzi do ścisłego, równowagowego związania analogu stanu przejściowego [34, 79]. Początkową fazę inhibicji charakteryzuje stała dysocjacji K_i , fazę równowagową (powolne ustalenie się inhibicji (ang. *inhibition slow-onset*) — stała K_i^* . W praktyce faza równowagowa ustala się w przeciągu kilku — kilkunastu minut. Modyfikacja DADMe

większe podobieństwo między strukturą DADMeImmucilliną H oraz modelem jonu oksakarbeniowego, przez który przebiega reakcja ludzkiej i zarodkowej PNP, niż analogiczne podobieństwo z immucilliną H [29]. Dodatkowo naładowany, uprotonowany atom azotu N1' w DADMeImmucillinie H naśladuje ładunek dodatni jonu oksakarbeniowego zlokalizowany wokół centrum elektrofilowego C1'-O4'. Umożliwia to wytworzenie silnego oddziaływania elektrostatycznego z atomem tlenu atakującego nukleofila, który z kolei związany jest poprzez sieć wiązań wo-



Ryc. 5. Cząsteczkowe powierzchnie potencjałów elektrostatycznych obliczone dla struktur zoptymalizowanych na poziomie teorii funkcjonalów gęstości [29]. (a) inozyna, (b) immucillina H, (c) DADMeImmucillina H, (d) model jonu oksakarbeniowego, który jest zbliżony do struktury stanu przejściowego reakcji ludzkiej i zarodkowej PNP.

proceeds to almost fourfold decrease of the equilibrium dissociation constant of immucillin H (16 instead of 56 pM) and 6-fold decrease for immucillin G (6.8 pM and 42 pM for DADMeImmucillin G and immucillin G).

Chociaż analiza kinetycznych efektów izotopowych wskazywała na podobne stany przejściowe ludzkiej i zarodkowej PNP, stałe dysocjacji dla drugiego izoenzymu są o dwa rzędy wielkości wyższe. W celu wyjaśnienia tej różnicy wysunięto hipotezę, że w związku z obserwowaną niższą stałą katalityczną dla izoenzymu zarodkowego, białko to musi wiązać słabiej również stan przejściowy, co skutkuje też słabszym wiązaniem analogów stanu przejściowego [29].

IV-4. Cząsteczkowe powierzchnie potencjałów elektrostatycznych inhibitorów

Pomocną w wyjaśnieniu silniejszego wiązania inhibitorów drugiej generacji była również analiza cząsteczkowych powierzchni potencjałów elektrostatycznych (MEP) obliczonych na podstawie modelowania struktur substratu, inhibitorów i stanu przejściowego. Porównanie MEP pozwoliło wykazać

dorowych w centrum aktywnym. Ładunek dodatni na azocie N4' immucilliny H zlokalizowany jest asymetrycznie, przez co oddziaływanie elektrostatyczne odgrywa mniejszą rolę (Ryc. 5).

Właściwe położenie dodatnio naładowanego atomu azotu, naśladującego centrum elektrofilowe przy atomie 1', okazało się warunkiem decydującym o sile wiązania inhibitora, nawet bardziej istotnym, niż separacja 9-deazapuryny od pierścienia iminorybitolu poprzez mostek metylenowy. 1'-(9-metyleno)-immucillina H, w której włączono mostek metylenowy przy zachowanym azocie w położeniu 4', charakteryzuje się bowiem bardzo słabym wiązaniem (Tab. 1).

IV-5. Znaczna poprawa właściwości farmakologicznych DADMeImmH wykazana na modelu *in vivo* u myszy

Przeprowadzono wstępne eksperymenty na myszach *in vivo*, które wykazały doskonałą biodostępność nowego inhibitora PNP DADMeImmucilliny H, po podaniu zarówno dootrzewnowym jak i doustnym. Wykazano również przepuszczalność błony erytrocytarnej dla DADMeImmucilliny H. 50 % in-

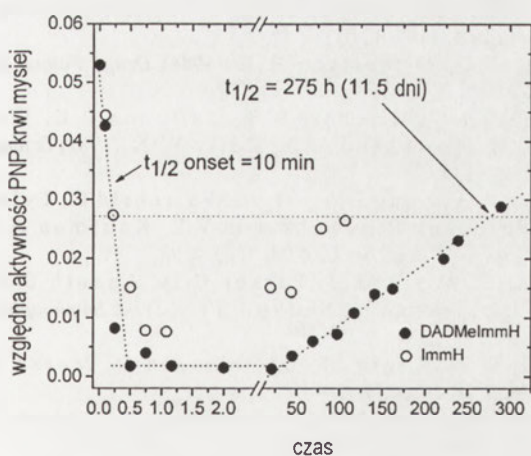
hibicję mysiej erytrocytarnej PNP uzyskano po 10 minutach od podania doustnego pojedynczej dawki 10 nmoli (27 μ g). W przypadku dawki 10 nmoli (27 μ g) immucilliny H, $t_{1/2}$ ustalenia inhibicji wyniósł 14 minut. Czas połowiczny odzyskania aktywności wynosił natomiast 275 h (11.5 dnia) dla DADMeImmH, co przy 25 dniowym połowicznym okresie życia ery-

Tabela 1.

Porównanie stałych dysocjacji dla niektórych immucillin i DADMeImmucillin wobec ludzkiej i zarodźcowej PNP. Podane wartości stałych dysocjacji początkowych (K_i) i równowagowych (K_i^*) [77].

	PNP ludzka		PNP zarodźcowa	
	K_i [pM]	K_i^* [pM]	K_i [pM]	K_i^* [pM]
immucillina H	3300 \pm 200	56 \pm 15	-	860 \pm 80
immucillina G	540 \pm 100	42 \pm 6	-	900 \pm 200
DADMeImmucillina H	1100 \pm 120	16 \pm 1.4	-	500 \pm 40
DADMeImmucillina G	163 \pm 25	6.8 \pm 1.2	-	890 \pm 60

trocytów mysich sugeruje, że odzyskanie aktywności związane było raczej w dużym stopniu z syntezą i wymianą erytrocytów na nowe, niż z samą dysocjacją i wydaleniem inhibitora [80]. Inhibicja za pomocą immucilliny H charakteryzowała się czasem połowicznym odzyskania aktywności równym 100 godzin (Ryc. 6).



Ryc. 6. Dostępność biologiczna po podaniu doustnym immucilliny H (10 nmoli, O), lub DADMeImmucilliny H (10 nmoli, ●). $T_{1/2}$ dla początkowego fragmentu krzywej oznacza czas po którym następuje 50 % inhibicja PNP krwi mysiej. Otrzymało 10 min dla DADMeImmucilliny H i 14 min dla immucilliny H. Powrót aktywności po podaniu doustnym pojedynczej dawki inhibitora charakteryzuje połowiczny czas $t_{1/2}$ =275 h dla DADMeImmucilliny H i 100 h w przypadku immucilliny H. Aktywność wyrażona w jednostkach — absorbancja kwasu moczowego w sprzężonym oznaczeniu z oksydazą ksantynową przy 293 nm/min [80].

V. Podsumowanie

Logiczne projektowanie nowej generacji analogów stanu przejściowego oparte na analizie kinetycznych efektów izotopowych pozwoliło otrzymać bardzo silnie wiążące inhibitory o pikomolowych stałych dysocjacji dla fosforylaz nukleozydów pury-

nowych. Ostatnio przeprowadzone analizy stanów przejściowych ludzkiej i zarodźcowej PNP wraz z analizą krystalograficzną pozwalają wnioskować o oddziaływaniach wewnątrz centrum aktywnego, odpowiedzialnych za silne wiązanie analogu TS. Otrzymany nowy inhibitor PNP, DADMeImmucillina H, wierniej naśladujący strukturę stanu przejściowego ze względu na właściwości biologiczne może stać się wkrótce efektywniejszą alternatywą dla immucilliny H, będącej obecnie w fazie badań klinicznych z udziałem pacjentów z rozrostami T-komórkowymi. Badania nad skutecznością DADMeImmucilliny H wobec *Plasmodium falciparum* wywołującym malarię są w dalszym ciągu w toku. Okazało się również, że nowo opracowana modyfikacja immucillin określana jako DADMe, ma charakter bardziej uniwersalny. Opisano już nowo zsyntezowane inhibitory oparte na modyfikacji DADMe dla innych N-nukleozydaz jak fosforylasy metyloioadenozynowej (MTAP), kluczowego enzymu szlaku syntezy poliamin, uważanego za cel dla terapii m.in. raka prostaty. W tym przypadku uzyskano również pikomolowe stałe dysocjacji [81].

Artykuł otrzymano 31 maja 2004

Zaakceptowano do druku 26 lipca 2004

Piśmiennictwo

- Murray R K, Granner D K, Mayes P A, Rodwell V W, (2000) *Harper's Biochemistry*, 25th Ed., McGraw-Hill Companies, Inc. New York. 1015-1016

2. Ealick S E, Rule S A, Carter D C, Greenhough T J, Babu Y S, Cook W J, Habash J, Helliwell J R, Stoeckler J D, Parks R E (1990) *J Biol Chem* **265**: 1812-1820
3. Ealick S E, Babu Y S, Bugg C E, Erion M D, Guida W C, Montgomery J A, Secrist J A (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11540-11544
4. Montgomery J A, Niwas S, Rose J D, Secrist J A, Babu Y S, Bugg C E, Erion M D, Guida W C, Ealick S E (1993) *J Med Chem* **36**: 55-69
5. Duvic M, Olsen E A, Omura G A, Maize J C, Vonderheid E C, Elmets C A, Shupack J L, Demierre M F, Kuzel T M, Sanders D Y (2001) *J Am Acad Dermatol* **44**: 940-947
6. Morris P E, Montgomery J A (1998) *Exp. Opin. Ther. Patents* **8**: 283-299
7. Wolfenden R (1999) *Bioorg Med. Chem* **7**: 647-652
8. Wolfenden R, Kati W M (1991) *Acc Chem Res* **24**: 209-215
9. Schramm V L (1998) *Annu Rev Biochem* **67**: 693-720
10. Schramm V L (1999) *Methods Enzymol* **308**: 301-355
11. Schramm V L (2001) *Curr Opin Chem Biol* **5**: 556-563
12. Schramm V L (2003) *Acc Chem Res* **36**: 588-596
13. Bigeleisen J, Mayer M G, *J Chem Phys*, **15**:261
14. Melander L, Saunders W H (1980) *Reaction Rates of Isotopic Molecules*, Wiley and Sons, New York
15. Cook P F (1991) *Enzyme Mechanism from Isotope Effects*, CRC Press, 4
16. Smith L E H, Mohr L H, Raftery, M A (1973) *J Am Chem Soc* **95**:7497
17. Rodgers J, Femec D A, Schowen R L (1982) *J Am Chem Soc* **104**: 3263
18. Horenstein B A, Parkin D W, Estupinan B, Schramm V L (1991) *Biochemistry* **30**: 10788-10795
19. Kline P C, Schramm V L (1993) *Biochemistry* **32**: 13212-13219
20. Berti P J (1999) *Methods Enzymol* **308**:355-397
21. Glad S S, Jensen F (1997) *J Am Chem Soc* **119**:227-232
22. Pham T V, Fang Y R, Westaway K C (1997) *J Am Chem Soc* **119**: 3670-3676
23. Sicinska D, Truhlar, D G, Paneth P (2001) *J Am Chem Soc* **123**: 7683-7686
24. Fang Y R, Gao Y, Ryberg P, Eriksson J, Koldziejaska-Huben M, Dybala-Defratyka A, Madhavan S, Danielsson R, Paneth P, Matsson O, Westaway K C (2003) *Chem Eur J* **9**: 2696-2709
25. Chen X Y, Berti P J, Schramm V L (2000) *J Am Chem Soc* **122**: 6527-6534
26. Chen X Y, Berti P J, Schramm V L (2000) *J Am Chem Soc* **122**: 1609-1617
27. Berti P J, Tanaka K S E (2002) *Advances Phys Org Chem* **37**: 239-314
28. Parikh S L, Schramm V L (2004) *Biochemistry* **43**: 1204-1212
29. Lewandowicz A, Schramm V L (2004) *Biochemistry* **43**: 1458-1468
30. Kline P C, Schramm V L (1995) *Biochemistry* **34**: 1153-1162
31. Kline P C, Schramm V L (1993) *Biochemistry* **32**: 13212-13219
32. Miles R W, Tyler P C, Furneaux R H, Bagdassarian C K, Schramm V L (1998) *Biochemistry* **37**: 8615-8621
33. Birck M R, Schramm V L (2004) *J Am Chem Soc* **126**: 2447-2453
34. Lewandowicz A, Shi W, Evans G B, Tyler P C, Furneaux R H, Basso L A, Santos D S, Almo S C, Schramm V L (2003) *Biochemistry* **42**: 6057-6066
35. Kicska G A, Tyler P C, Evans G B, Furneaux R H, Shi W, Fedorov A, Lewandowicz A, Cahill S M, Almo S C, Schramm V L (2002) *Biochemistry* **41**: 14489-14498
36. Evans G B, Furneaux R H, Gainsford G J, Hanson J C, Kicska G A, Sauve A A, Schramm V L, Tyler P C (2003) *J Med Chem* **46**: 155-160
37. Schramm V L, Shi W (2001) *Curr Opin Struct Biol* **11**: 657-665
38. Kalckar H M (1947) *J Biol Chem* **167**: 429-443
39. Kalckar H M (1947) *J Biol Chem* **167**: 477-486
40. Friedkin M, Kalckar H (1961) *Enzymes* **5**: 237-256
41. Pugmire M J, Ealick S E (2002) *Biochem J* **361**: 1-25
42. Bzowska A, Kulikowska E, Shugara D (2000) *Pharmacology & Therapeutics* **88**: 349-425
43. Bzowska A (2002) *Biochim Biophys Acta* **1596**: 293-317
44. Ray A S, Olson L, Fridland A (2004) *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1089-95
45. Koellner G, Bzowska A, Wielgus-Kutrowska B, Luic M, Steiner T, Saenger W, Stepiński J. (2002) *J Mol Biol* **315**: 351-371
46. Kredich N M, Hershfield M S Stanbury J B, Wynngaarden J B, Fredrickson D S, (1989) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th edition New York, McGraw-Hill, 1045-1075
47. Markert M L (1991) *Immunodeficiency Rev* **3**:45-81
48. Giblett E R, Ammann A J, Wara D W, Sandman R, Diamond L K (1975) *Lancet* **1**: 1010-1013
49. Chan T S (1978) *Cell* **14**: 523-530
50. Cohen A, Gudas L J, Ammann A J, Staal G E J Martin D E (1978) *J Clin Invest* **61**: 1405-1409
51. Cohen A, Doyle D, Martin D W, Ammann A J. (1976) *N Engl J Med* **295**: 1449-54
52. Siegenbeek van Heukelom LK, Staal G E J, Stoop J W, Zegers B J M. (1976) *Clin Chim Acta* **72**: 117-124
53. Datta, N S, Shewach D S, Mitchell B S, Fox I H (1989) *J Biol Chem* **264**: 9359-9364
54. Mansson E, Flordal E, Lilemark J, Spasokotskaja T, Elford H, Lagercrantz S, Eriksson S, Albertioni F (2003) *Biochem Pharmacol* **65**: 237-247
55. Osborne W R (1980) *J Biol Chem* **255**: 7089-7092
56. Ullman B, Clift, S M, Gudas L J, Levinson B B, Wormsted M A, Martin D E, (1980) *J Biol Chem* **255**: 8308-8314
57. Bantia S, Ananth S L, Parker C D, Horn L L, Upshaw R (2003) *Int Immunopharmacol.* **3**: 879-887
58. Schramm V L (2002) *Biochim Biophys Acta* **1587**: 107-117
59. Bantia S, Miller P J, Parker C D, Ananth S L, Horn L L, Kilpatrick J M, Morris P E, Hutchison T L, Montgomery J A, Sandhu J .S (2001) *Int Immunopharmacol* **1**: 1199-1210
60. Sircar J C, Gilbertsen R B (1988) *Drugs Future* **13**: 653-668
61. Kazmers I S, Mitchell B S, DaDonna P E, Wotring I I, Townsend L B, Kelly W N (1981) *Science* **214**: 1137-1139
62. Kicska G A, Long L, Horig H, Fairchild C, Tyler P C, Furneaux R H, Schramm V L, Kaufman H L (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 4593-4598
63. Bantia S, Miller P J, Parker C D, Ananth S L, Horn L L, Babu Y S, Sadhu J S (2002) *Int. Immunopharmacol.* **2**: 913-923
64. Snow, R W, Craig M, Dieichmann U, Marsh K (1999) *Bull. W. H. O.* **77**: 624-640
65. Snow R W, Craig M H, Deichmann U, le Sueur D (1999) *Parasitol Today* **15**: 99-104
66. Krudsood S, Buchachart K, Chalermrut K, Charusabha C, Treepreasantuk S, Haoharn O, Duangdee C, Looareesuwan S (2002) *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **33**: 525-531
67. Winstanley P A, Ward S A, Snow R W (2002) *Microbes Infect* **4**: 157-164
68. Sherman I W (1979) *Microbiol Rev* **43**: 453-495
69. Subbaya IN, Ray S S, Balam P, Balam H (1997) *Indian J Med, Res* **106**: 79-94
70. Queen S A, Jagt D L, Reyes P (1990) *Antimicrob Agents Chemother* **34**: 1393-1398
71. Kicska G A, Tyler P C, Evans G B, Furneaux R H, Schramm V L, Kim K (2003) *J Biol Chem* **277**: 3226-3231

72. Kicska G A, Tyler P C, Evans G B, Furneaux R H, Kim K, Schramm V L (2002) *J Biol Chem* 277: 3219-3225
73. Basso L A, Santos D S, Shi W, Furneaux R H, Tyler P C, Schramm V L, Blanchard J S (2001) *Biochemistry* 40: 8196-8203
74. Kicska G A, Tyler P C, Evans G B, Furneaux R H, Shi W, Fedorov A, Lewandowicz A, Cahill S M, Almo S C, Schramm V L (2002) *Biochemistry* 41: 14489-14498
75. Sunko D E, Szelc I, Hehre W J (1977) *J Am Chem Soc* 99: 5000-5005
76. Swain C G, Stivers E C, Reuver J F, Schaad L J (1958) *J Am Chem Soc* 80: 5885-5893
77. Evans G B, Furneaux R H, Lewandowicz A, Schramm V L, Tyler P C (2003) *J Med Chem* 46: 5271-5276
78. Evans G B, Furneaux R H, Lewandowicz A, Schramm V L, Tyler P C (2003) *J Med Chem* 46: 3412-3423
79. Sauve A A, Cahill S M, Zech S G, Basso L A, Lewandowicz A, Santos D S, Grubmeyer C, Evans G B, Furneaux R H, Tyler P C, McDermott A, Girvin M E, Schramm V L (2003) *Biochemistry* 42: 5694-5705
80. Lewandowicz A, Tyler P C, Evans G B, Furneaux R H, Schramm V L (2003) *J Biol Chem* 278: 31465-31468
81. Singh V, Shi W, Evans G B, Tyler P C, Furneaux R H, Almo S C, Schramm V L (2004) *Biochemistry* 43: 9-18

Wybrane aspekty biogenezy białek łańcucha oddechowego w mitochondriach ssaków

Selected aspects of biogenesis of respiratory chain proteins in mammalian mitochondria

JANUSZ PIECHOTA¹, ROMAN SZCZĘSNY²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Koordynacja ekspresji genomu mitochondrialnego i jądrowego
 - II-1. NRF-1
 - II-2. NRF-2
 - II-3. Regulacja ekspresji i aktywności NRF-1 i NRF-2
 - II-4. PGC-1
- III. Biogeneza mitochondriów w okresie poporodowym
- IV. Hormon tarczycy
 - IV-1. Wpływ na proliferację i różnicowanie się mitochondriów
 - IV-2. Regulacja ekspresji białek mitochondrialnych kodowanych jądrowo
 - IV-3. Regulacja ekspresji genomu mitochondrialnego

Contents:

- I. Introduction
- II. Coordination of the nuclear and mitochondrial genome expression
 - II-1. NRF-1
 - II-2. NRF-2
 - II-3. Regulation of the NRF-1 and NRF-2 expression and activity
 - II-4. PGC-1
- III. Postnatal biogenesis of the mitochondria
- IV. Thyroid hormone
 - IV-1. The influence on the mitochondrial proliferation and differentiation
 - IV-2. Expression regulation of the mitochondrial proteins encoded in the nucleus
 - IV-3. Regulation of the mitochondrial genome expression

Wykaz stosowanych skrótów: 3'βFBP — białko wiążące 3'-UTR mRNA podjednostki β F1-ATPazy (ang. β-F1-ATPase mRNA 3'-UTR *Binding Protein*); ALAS — syntaza kwasu 5-aminolewulinowego (ang. *5-aminolevulinic acid synthase*); COX — oksydaza cytochromu *c* (ang. *Cytochrome c oxidase*); mtDNA — mitochondrialny DNA (ang. *mitochondrial DNA*); mt-mRNA — mitochondrialny mRNA (ang. *mitochondrial mRNA*); mtTFA — mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A (ang. *mitochondrial Transcription Factor A*); NRF-1, 2 — czynnik transkrypcyjny-1, 2 kontrolujący oddychanie (ang. *Nuclear Respiratory Factor — 1, 2*); OXPHOS — fosforylacja oksydacyjna (ang. *oxidative phosphorylation*); PGC-1 — koaktywator-1 receptora aktywowanego czynnikiem proliferacji peroksysomów γ (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1*); RNAza MRP, TR — receptor hormonu tarczycy (ang. *Thyroid Hormone-Receptor*); TRE — element odpowiedzi na hormon tarczycy (ang. *Thyroid Hormone Response Element*); UCP — białko rozprzegające (ang. *Uncoupling Protein*).

I. Wstęp

Mitochondria występują w cytoplazmie prawie wszystkich komórek eukariotycznych. Główną ich funkcją jest przeprowadzanie procesu fosforylacji oksydacyjnej. Ponadto mitochondria uczestniczą w innych procesach niezbędnych do funkcjonowania komórki, np. biosyntezie porfiryn czy cyklu mocznikowym. Mitochondria poszczególnych tkanek zwierzęcych różnią się zarówno strukturą, jak i funkcją. Komórki różnego typu zawierają różną liczbę mitochondriów, która może się wahać od kilkuset do kilku tysięcy. Cechy te w dużej mierze zależą od wymagań energetycznych danej tkanki. W odpowiedzi na sygnał wewnątrzkomórkowy lub zewnątrzkomórkowy (hormony, temperatura, zapotrzebowanie na ATP) funkcja oraz aktywność mitochondriów może ulec zmianie [1].

Mitochondria zawierają ponad 1000 różnych białek, z których tylko znikoma część kodowana jest przez genom mitochondrialny. Struktura oraz organizacja genów w DNA mitochondriów u różnych ssaków jest bardzo podobna. Ssaczy genom mitochon-

¹Mgr, ²magistrant, Zakład Genetyki, Uniwersytet Warszawski, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, tel. (022) 5923231, e-mail: jkpiechota@wp.pl

drialny jest kolistą, dwuniciową cząsteczką DNA o długości około 16569 pz, kodującą 37 genów. Dwa-dziesiąt cztery geny mitochondrialne kodują cząsteczki RNA wchodzące w skład mitochondrialnego aparatu translacyjnego (22 tRNA oraz 2 rRNA), pozostałe 13 genów koduje podjednostki kompleksów łańcucha oddechowego [2].

Mitochondria są szczególnymi organellami komórki zwierzęcej. Ich funkcjonowanie, a zwłaszcza wytwarzanie przez nie ATP, zależy od dwóch systemów genetycznych. Do prawidłowej biogenezy oraz funkcjonowania mitochondriów niezbędna jest współpraca genomu jądrowego z genomem mitochondrialnym. Biogenezę mitochondriów można rozpatrywać jako dwa odrębne procesy: proliferacja mitochondriów oraz ich różnicowanie się w organelle zdolne do fosforylacji oksydacyjnej [3]. Obydwa te procesy są związane ze zmianą ilościową i jakościową białek znajdujących się w mitochondriach. Zatem zagadnienia dotyczące poszczególnych białek mitochondrialnych pozostają w ścisłym związku z procesem biogenezy mitochondriów. Obecnie coraz lepiej poznajemy ten proces. Poznano czynniki transkrypcyjne, których aktywność umożliwia skoordynowaną ekspresję genomu mitochondrialnego oraz genów jądrowych kodujących białka mitochondrialne. Poszerza się także wiedza na temat czynników pozakomórkowych, np. hormon tarczycy, mogących wpływać na proliferację i różnicowanie się mitochondriów. Zidentyfikowano również białko PGC-1, które jest jednym z elementów na ścieżce przekazu informacji o tym, że potrzebna jest biogeneza mitochondriów w odpowiedzi na zwiększone zapotrzebowanie na energię cieplną.

Zagadnienia związane z biogenezą mitochondriów stanowią bardzo obszerny temat, którego pełne omówienie przekracza możliwości tego artykułu. Intencją autorów było przybliżenie zagadnień biogenezy mitochondriów związanych z aktywnością łańcucha oddechowego. Jednakże w wielu miejscach niniejszego artykułu jest mowa o biogenezie mitochondriów w szerszym ujęciu. Wiąże się to z faktem, że mitochondria stanowią bardzo skomplikowany układ, z którego nie da się w prosty sposób wyodrębnić poszczególnych jego elementów. Na aktywność łańcucha oddechowego ma wpływ nie tylko bezpośrednia synteza białek wchodzących w jego skład, ale system transportu białek z cytoplazmy do mitochondriów, skład lipidowy błon mitochondrialnych, koordynacja ekspresji genomu jądrowego i mitochondrialnego, synteza hemu wchodzącego w skład cytochromów, a także liczba mitochondriów w komórce i stopień ich różnicowania.

II. Koordynacja ekspresji genomu mitochondrialnego i jądrowego

Mechanizm zapewniający „współpracę” między genomem mitochondrialnym i jądrowym musi podlegać regulacji w odpowiedzi na różnorodne bodźce. Skoordynowaną ekspresję genomu mitochondrialnego i jądrowego zapewniają czynniki transkrypcyjne, a ich ilość czy też aktywność może ulegać zmianie w odpowiedzi na sygnały wewnątrzkomórkowe i/lub zewnątrzkomórkowe [4].

Poznane dotychczas promotory genów jądrowych kodujących białka mitochondrialne wykazują znaczne zróżnicowanie pod względem struktury, jak i obecności sekwencji wiążących czynniki transkrypcyjne [5]. W promotorach tych występują cztery elementy *cis* określane jako NRF1, NRF2, OXBOX/REBOX oraz Mt1, 3, 4. O tych ostatnich sądzi się, że są specyficzne dla genów kodujących białka łańcucha oddechowego. W żadnym ze scharakteryzowanych promotorów nie ma wszystkich tych elementów. Ani jeden ze wspomnianych elementów *cis* nie występuje we wszystkich dotąd poznanych jądrowych genach kodujących białka mitochondrialne [5]. Scarpulla [4] sugeruje, że skoordynowanej regulacji podlegają tylko te geny, których produkty mają decydujące znaczenie dla aktywności oddechowej mitochondriów.

Obserwacje uzyskane dla oksydazy cytochromu *c* potwierdzają istnienie skoordynowanej ekspresji jej podjednostek kodowanych w mtDNA i w jądrze w takich organizmach, jak szczur [6], mysz [7] i człowiek [8, 9]. Na przykład Hood i wsp. [6] wykazali, że przewlekła stymulacja mięśni szkieletowych szczura prowadzi do 3-4-krotnego wzrostu aktywności oksydazy cytochromu *c* (COX). Towarzyszy temu 2-krotny wzrost poziomu podjednostki III (kodowana w mtDNA) i VIc (kodowana w jądrze). Ważnym czynnikiem regulującym skoordynowaną ekspresję genomu jądrowego i mitochondrialnego jest także hormon tarczycy (Rozdział IV).

Dotychczasowe badania wskazują, że trzy czynniki transkrypcyjne odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu i biogenezie mitochondriów. Są to: NRF-1, NRF-2 oraz PGC-1.

II-1. NRF-1

NRF-1 jest białkiem jądrowym, które wiąże się z DNA jako homodimer. Domena aktywująca transkrypcję znajduje się w C-końcowej części tego białka. Natomiast N-końcowy fragment zawiera do-

menę wiążącą DNA oraz sygnał lokalizacji jądrowej [10, 11].

Wykazano, że NRF-1 reguluje aktywność transkrypcyjną jądrowych genów kodujących niektóre polipeptydy wchodzące w skład kompleksów łańcucha oddechowego (Tab. 1). Sekwencje rozpoznawane przez NRF-1 występują w obszarach promotorowych genów kodujących mtTFA [12] i podjednostkę rybonukleinową RNAzy MRP [4]. Pierwszy z tych genów koduje mitochondrialny czynnik transkrypcyjny związany z inicjacją transkrypcji i replikacji mtDNA, drugi nukleazę, która przecina powstającą nić RNA, tworząc w ten sposób starter niezbędny do

Tabela 1.

Jądrowe geny kodujące białka mitochondrialne regulowane przez NRF-1 i NRF-2. Dane pochodzą z [4, 12, 14, 15].

Nazwa genu (pochodzenie)	NRF-1	NRF-2
geny OXPHOS		
cytochrom c (człowiek, szczur)	+	
<i>Kompleks I :</i>		
podjednostka 8 (człowiek)	+	
<i>Kompleks II :</i>		
podjednostka B, C oraz D (człowiek)	+	+
<i>Kompleks III :</i>		
białko wiążące ubichinon (człowiek)	+	
białko rdzenia I (człowiek)	+	
<i>Kompleks IV :</i>		
podjednostka IV (mysz, szczur)		+
podjednostka Vb (człowiek, mysz, szczur)	+	+
podjednostka VIc (szczur)	+	
podjednostka VIIc (krowa)		+
podjednostka VIaL (człowiek)	+	+
podjednostka VIIaL (człowiek)		+
<i>Kompleks V :</i>		
podjednostka a (człowiek)		+
podjednostka c (człowiek)	+	
podjednostka g (krowa)	+	
pozostałe geny		
podjednostka rybonukleinowa RNAzy MRP (człowiek, mysz)	+	
mtTFA (człowiek)	+	+
ALAS (szczur)	+	
mitorybosomalne białko S12 (człowiek)	+	+
Tom20 (człowiek)	+	+

rozpoczęcia replikacji mtDNA. Tak więc, NRF-1 jest czynnikiem, który transkrypcję i replikację genomu mitochondrialnego wiąże z ekspresją genów jądrowych kodujących wybrane podjednostki wchodzące w skład aparatu oddechowego mitochondriów. Bada-

nia Huo i Scarpulla [13] potwierdzają udział NRF-1 w utrzymaniu odpowiedniego poziomu mtDNA. Wykazali oni, że unieczynnienie genu kodującego NRF-1 powoduje znaczne obniżenie ilości mtDNA w blastomerach 3,5-dniowego zarodka myszy, który obumiera w okresie przedimplantacyjnym. Autorzy pracy wykazali, że brak NRF-1 nie indukuje apoptozy. Tak więc obniżenie poziomu mtDNA nie zostało spowodowane tym, że w komórce następuje proces śmierci samobójczej.

Udział NRF-1 w koordynacji ekspresji genomu mitochondrialnego i jądrowego potwierdza fakt, że ekspresja genu kodującego syntazę ALAS wymaga obecności w obszarze promotora dwóch sekwencji wiążących NRF-1. Aktywność tego enzymu ma decydujące znaczenie dla przebiegu szlaku biosyntezy hemu będącego kofaktorem cytochromów, białek kodowanych zarówno przez genom mitochondrialny, jak i jądrowy i wchodzących w skład łańcucha oddechowego [4].

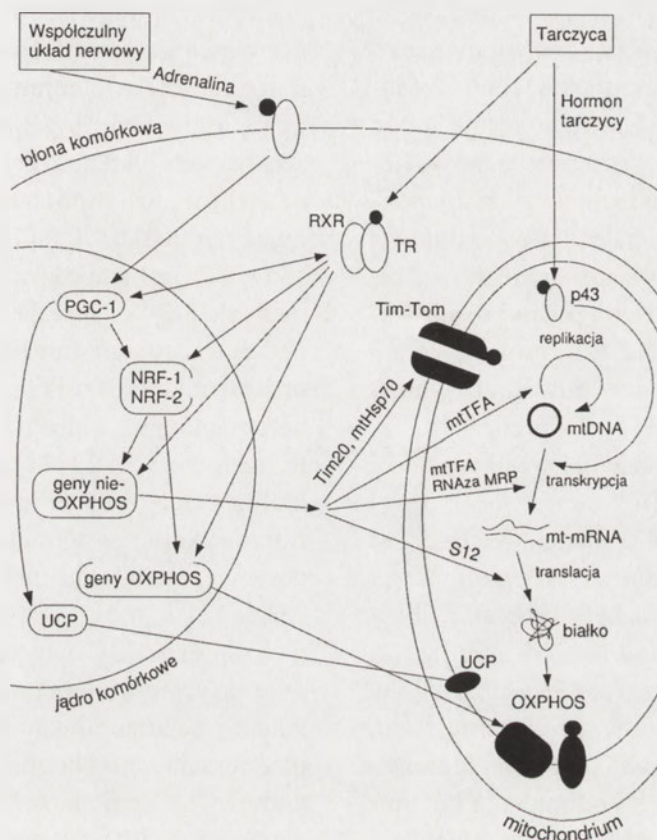
Obecność funkcjonalnej sekwencji wiążącej NRF-1 w promotorze genu białka S12, wchodzącego w skład mitochondrialnego rybosomu (mitorybosomu) [14] (Tab. 1), wskazuje, że NRF-1 reguluje poziom białek kodowanych przez genom mitochondrialny także poprzez wpływ na translację mitochondrialnego mRNA. Poza tym wykazano, że NRF-1 reguluje również ekspresję genu kodującego białko Tom20, które bierze udział w imporcie białek do mitochondriów [15] (Tab. 1). Wskazuje to, że NRF-1 wpływa nie tylko na aktywność oddechową mitochondriów, ale także na ogólną aktywność metaboliczną mitochondriów.

NRF-1 prawdopodobnie odgrywa kluczową rolę w procesie biogenezy mitochondriów. Potwierdzają to wyniki badań Xia i wsp. [16], którzy wykazali, że od ekspresji genu kodującego NRF-1 zależy wzrost ekspresji genów związanych z proliferacją mitochondriów w miocytach mięśnia sercowego stymulowanych elektrycznie.

Rola NRF-1 nie ogranicza się tylko do regulacji funkcjonowania oraz biogenezy mitochondriów. NRF-1 reguluje również ekspresję genów, których produkty białkowe nie są bezpośrednio związane z funkcjonowaniem mitochondriów. Białka kodowane przez te geny uczestniczą w podstawowych procesach komórkowych — metabolizmie aminokwasów (aminotransferaza tyrozyny) czy inicjacji translacji (eIF-2 α). Analiza komputerowa pozwoliła na znalezienie potencjalnych miejsc wiążących NRF-1 w promotorach genów kodujących białka, które uczestniczą w transdukcji sygnału (np. ludzki gen receptora insuliny), metabolizmie kwasów nukleinowych (np.

ludzki gen topoizomerazy I), regulacji cyklu komórkowego (np. ludzki gen *cdc2*), a także w genach kodujących enzymy różnych szlaków metabolicznych (np. ludzki gen α -enolazy). Wskazuje to, że NRF-1 może być czynnikiem, który zapewnia odpowiedni poziom fosforylacji oksydacyjnej w zależności od potrzeb energetycznych komórki [10].

NRF-2 wiąże się z DNA. Podjednostki β i γ w C-koncowej części zawierają domenę aktywującą transkrypcję, nie posiada jej podjednostka α [4]. Podjednostka β tworzy heterotetramer z podjednostką α znacznie zwiększający jej powinowactwo do DNA [17]. Podjednostka γ , która różni się od podjednostki β brakiem domeny homodimeryzacyjnej, również



Ryc. 1. Koordynacja ekspresji genów kodowanych jądrowo i mitochondrialnie odpowiadających za biogenezę mitochondriów.

II-2. NRF-2

Drugim czynnikiem zaangażowanym w regulację ekspresji niektórych genów mitochondrialnych jest NRF-2 — białko kodowane jądrowo. Udział tego białka w regulacji genów mitochondrialnych został słabiej poznany niż w przypadku białka NRF-1 [4].

Wykazano, że NRF-2 reguluje ekspresję genów kodujących niektóre podjednostki kompleksu dehydrogenazy bursztynianowej, kompleksu oksydazy cytochromu *c* oraz genu kodującego podjednostkę β syntazy ATP, a także ekspresję genu kodującego mtTFA, mitorybosomalne białko S12, oraz genu kodującego białko Tom 20 (Tab. 1).

W przeciwieństwie do NRF-1, NRF-2 składa się z trzech podjednostek α , β , γ . U człowieka istnieją dwie izoformy podjednostek β (β_1 , β_2) i γ (γ_1 , γ_2), jednakże ich funkcja nie została dotąd poznana [4]. Jedynie podjednostka α czynnika transkrypcyjnego

tworzy kompleks z podjednostką α , jednakże ma on mniejsze powinowactwo do DNA niż kompleks $\alpha\beta$. Kompleksy te, $\alpha\beta$ i $\alpha\gamma$, nie wykazują różnic pod względem specyficzności wobec sekwencji DNA, z którymi się wiążą [4].

II-3. Regulacja ekspresji i aktywności NRF-1 i NRF-2

Dotychczasowe badania wskazują, że ważnym czynnikiem regulującym poziom NRF-1 i podjednostki NRF-2 w komórce jest PGC-1 [18] (Rozdział II-4). Poza tym poziom mRNA NRF-1 jest regulowany przez hormon tarczycy [19] (Rozdział IV).

Regulacja aktywności NRF-1 następuje na skutek jego fosforylacji. Ufosforylowana forma NRF-1 ma znacznie większą zdolność wiązania się z DNA niż forma niefosforylowana [11]. Badania Guignea i Scarpulla [11], wskazują, że reakcję fosforyla-

cji NRF-1 katalizuje kinaza kazeinowa II. Nie jest to jednak pewne, gdyż sami autorzy tej pracy podkreślają, że niektóre aminokwasy wchodzące w skład NRF-1, które są fosforylowane przez kinazę kazeinową II *in vitro*, nie ulegają fosforylacji *in vivo*.

W przypadku NRF-2 zdolność wiązania się z DNA jest większa dla $\alpha\beta$ heterodimeru niż $\alpha\gamma$. Dotychczas nic nie wiadomo o czynnikach regulujących poziom podjednostek β i γ . Wykazano natomiast, że czynniki utleniające zmniejszają powinowactwo podjednostki α do DNA natomiast związki redukujące powodują jego zwiększenie. Sugeruje to, że NRF-2 mógłby regulować ekspresję genów kodujących składniki aparatu oddechowego mitochondriów w zależności od potencjału oksydoredukcyjnego komórki. Zbyt niska aktywność oddechowa mitochondriów prowadzi do wzrostu poziomu substratów oddechowych (NADH i FADH₂) i tym samym do wzrostu aktywności NRF-2, co powoduje wzrost transkrypcji genów regulowanych przez NRF-2. Konsekwencją tego jest zwiększenie się aktywności oddechowej mitochondriów [4].

Ilość poszczególnych podjednostek NRF-2 jest specyficzna tkankowo. Poziom mRNA kodującego daną podjednostkę nie odpowiada ilości białka obecnego w komórce. Podczas, gdy mRNA kodującego podjednostkę α w wątrobie szczura jest mniej niż w mózgu czy jądrach, białka podjednostki α jest tam najwięcej. Poziom mRNA kodującego podjednostkę α jest największy w jądrach i odpowiada mu najmniejszy poziom białka tej podjednostki [20, 21]. Powyższe wyniki pozwalają stwierdzić, że regulacja ilości poszczególnych podjednostek odbywa się na poziomie posttranskrypcyjnym. Ponadto fakt, że powinowactwo podjednostki α do DNA jest uzależnione od podjednostki, z którą ona oddziałuje, oraz że poziom poszczególnych podjednostek NRF-2 jest zróżnicowany tkankowo sugeruje, że geny regulowane przez NRF-2 mogą podlegać regulacji tkankowo-specyficznej.

Dotychczasowe badania nad NRF-1 i NRF-2 umożliwiły opracowanie modelu skoordynowanej ekspresji genomu mitochondrialnego oraz niektórych jądrowych genów OXPHOS (Ryc. 1). Model ten nie uwzględnia jednak genów OXPHOS nie zawierających w swoich promotorach sekwencji wiążących NRF-1 lub NRF-2.

II-4. PGC-1

PGC-1 został początkowo zidentyfikowany jako czynnik regulujący ekspresję białka UCP-1 [22]. Białko to odgrywa kluczową rolę w procesie termo-

genezy bezdrzeniowej uruchamianym przez organizm podczas zwiększonego zapotrzebowania na energię cieplną. Molekularny mechanizm tego procesu polega na zwiększeniu przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej dla protonów, których energia jest rozpraszana w postaci ciepła. Białka UCP stanowią swoiste rozpręgacze fosforylacji oksydacyjnej.

Proces termogenezy bezdrzeniowej związany jest bezpośrednio z funkcjonowaniem oraz biogenezą mitochondriów. Obejmuje on zarówno zwiększenie liczby mitochondriów, jak i wzrost ekspresji genów kodujących białka, które wchodzą w skład aparatu oddechowego mitochondriów oraz genów kodujących białka UCP [22].

PGC-1 jest koaktywatorem czynników transkrypcyjnych. Jego ekspresja jest tkankowo specyficzna i podlega regulacji zależnej od fizjologicznego stanu organizmu. Białko PGC-1 ulega ekspresji w sercu, nerce, mózgu, wątrobie oraz w brunatnej tkance tłuszczowej [19, 22, 23]. Poziom mRNA kodującego białko PGC-1 znacznie wzrasta w brunatnej tkance tłuszczowej oraz w mięśniach szkieletowych myszy poddanej działaniu niskiej temperatury (4°C) [22, 23].

Ekspresja PGC-1 w kulturach tkankowych powoduje aktywację wielu procesów związanych z termogenezą bezdrzeniową. Aktywowana jest zarówno proliferacja mitochondriów, jak i ekspresja genów kodujących podjednostki kompleksów łańcucha oddechowego [18]. W komórkach mięśniowych, podobnie jak w komórkach tłuszczowych, zwiększony poziom PGC-1 powoduje wzrost poziomu mRNA kodującego podjednostkę II i IV oksydazy cytochromu *c* oraz podjednostkę β syntazy ATP [18, 22]. Ekspresja PGC-1, zarówno w hodowli komórek mięśniowych, jak i tłuszczowych powoduje wzrost poziomu mtDNA. Towarzyszy temu wzrost liczby mitochondriów [18, 22].

Ekspresja białka PGC-1 w hodowli miocytów szczura powoduje wzrost poziomu białek mitochondrialnych kodowanych zarówno przez genom jądrowy (podjednostki COX IV, Va, Vb, cytochrom *c*), jak i przez genom mitochondrialny (podjednostka COX II) [24]. Jednocześnie ze wzrostem poziomu podjednostek COX II, COX IV, Va, Vb, oraz cytochromu *c* obserwuje się wzrost liczby mitochondriów [24].

Wykazano również, że PGC-1 reguluje poziom cząsteczek mRNA kodujących NRF-1 oraz podjednostkę α NRF-2 oraz, że jest on koaktywatorem receptora hormonu tarczycy, z czym bezpośrednio związany jest wzrost poziomu mRNA kodującego mtTFA [18, 22]. Wyniki powyższych badań sugerują,

że PGC-1 jest jednym z elementów ścieżki sygnałowej prowadzącej do aktywacji ekspresji genów mitochondrialnych kodowanych jądrowo oraz aktywacji genomu mitochondrialnego.

Puigserver i wsp. [22] wykazali, że ekspresja PGC-1 jest indukowana w hodowli komórek brunatnej tkanki tłuszczowej przez agonistę receptorów β -adrenergicznych. Na podstawie wyników dotychczasowych badań nad termogenezą bezdrzeniową zaproponowano mechanizm, według którego PGC-1 reguluje biogenezę oraz funkcję mitochondriów w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiskowe. Wiadomo, że niska temperatura oraz wysokokaloryczna dieta pobudza współczulny układ nerwowy. Prowadzi to do wydzielania noradrenaliny, neurotransmitera stymulującego receptory β -adrenergiczne. Wskutek aktywacji receptora β -adrenergicznego uruchamiana jest ścieżka sygnałowa, co powoduje wzrost poziomu cAMP. Prowadzi to do wzrostu ekspresji genu kodującego PGC-1, prawdopodobnie poprzez przyłączenie się białka CREB do promotora genu kodującego PGC-1 [23]. Ponadto obecność w białku PGC-1 sekwencji rozpoznawanej przez białkową kinazę A sugeruje możliwość regulacji aktywności PGC-1 poprzez modyfikacje posttranslacyjne [22]. PGC-1, poprzez NRF-1, NRF-2 oraz receptor hormonu tarczycy, aktywuje biogenezę mitochondriów i białek mitochondrialnych.

III. Biogeneza mitochondriów w okresie poporodowym

Większość komórek dorosłych ssaków uzyskuje ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej. Jednakże w okresie rozwoju płodowego głównym źródłem ATP jest glikoliza. Wynika to z małej liczby mitochondriów oraz ich niskiej aktywności metabolicznej. Zarówno enzymy uczestniczące w utlenianiu substratów oddechowych, jak i enzymy wchodzące w skład innych szlaków metabolicznych znajdujących się na terenie mitochondriów, wykazują niską aktywność w okresie rozwoju płodowego. Moment narodzin oraz pierwszy okres życia pozamacicznego jest ściśle związany z biogenezą mitochondriów. Wzrasta ich aktywność metaboliczna — zwłaszcza oddechowa, a w późniejszym okresie życia wzrasta także ich liczba. Z tego powodu zmiany okołoporodowe zachodzące w organizmie zwierzęcym stanowią bardzo dobry model do badań nad biogenezą mitochondriów oraz czynnikami regulującymi ten proces. Wiele z tych badań przeprowadzono śledząc biogenezę mitochondriów w rozwijającej się wątrobie szczura [25].

Valcarce i wsp. [26] wykazali, że w mitochondriach hepatocytów szczura w ciągu pierwszej godziny życia pozamacicznego następuje gwałtowny wzrost zawartości białek. Jest on cztery razy większy niż wzrost całkowitego poziomu białka w komórkach wątroby. Jednakże z badań Izquierdo i wsp. [27] wynika, że nie dotyczy to w równym stopniu wszystkich białek mitochondrialnych. Na przykład, ilość podjednostki β syntazy ATP zwiększa się dwukrotnie [26-29], natomiast ilość podjednostki syntazy ATP pozostaje stała. Ilość białka podjednostki β syntazy ATP w mitochondriach hepatocytów szczura osiągnięta w ciągu pierwszej godziny życia pozamacicznego pozostaje bez zmian w trakcie dalszego rozwoju szczura [26, 30]. Valcarce i wsp. [26] wykazali, że wzrost ilości białka podjednostki syntazy ATP w mitochondriach hepatocytów szczura jest skorelowany ze wzrostem kontroli oddechowej.

Uważa się, że podjednostka β syntazy ATP jest markerem biogenezy mitochondriów [25-29]. Na podstawie zmian jej poziomu w mitochondriach można wnioskować o stopniu ich różnicowania. Natomiast zmiany poziomu podjednostki β syntazy ATP w białkach homogenatu danej tkanki w stosunku do poziomu podjednostki α w mitochondriach pozwalają wnioskować o zmianach w liczbie mitochondriów [27].

Mechanizm warunkujący szybki wzrost zawartości podjednostki β syntazy ATP w mitochondriach jest bardzo złożony. Izquierdo i wsp. [28] wykazali, że w hepatocytach płodu dwa dni przed urodzeniem się szczura następuje wzrost poziomu mRNA kodującego podjednostkę β syntazy ATP. Pomimo tego ilość białka pozostaje niezmienną. Podwyższony poziom tego mRNA utrzymuje się przez pierwsze godziny życia pozamacicznego po czym następuje jego stopniowy, 6-7-krotny spadek do poziomu obserwowanego w hepatocytach szczura dorosłego [27-29]. Wysoki poziom mRNA w okresie okołoporodowym nie jest spowodowany podwyższonym poziomem transkrypcji lecz zwiększoną stabilnością mRNA. Jest ona około cztery razy większa w hepatocytach nowonarodzonego szczura niż w hepatocytach szczura dorosłego [28].

Wykazano również, że w ciągu pierwszej godziny życia pozamacicznego szczura następuje znaczny wzrost wydajności translacji mRNA kodującego podjednostkę β syntazy ATP [29]. Szczegółowe badania przeprowadzone przez Izquierdo i Cuezva [31] doprowadziły do identyfikacji białka 3 β 'FBP, które reguluje translację mRNA kodującego podjednostkę β syntazy ATP. Białko 3 β 'FBP

przyłącza się do regionu 3'UTR mRNA podjednostki β syntazy ATP znacznie zmniejszając jego wydajność translacji. Wydaje się, że główną funkcją białka 3 β 'FBP jest niedopuszczenie do przedwczesnego wzrostu ilości podjednostki β syntazy ATP. Białko 3 β 'FBP wyizolowane z wątroby nowonarodzonego szczura ma o wiele większą zdolność do wiązania się z mRNA kodującym podjednostkę β syntazy ATP i tym samym do obniżania wydajności jego translacji niż białko 3 β 'FBP wyizolowane z wątroby szczura jednogodzinnego. Prawdopodobnie to aktywność białka 3 β 'FBP powoduje, że mimo wysokiego poziomu mRNA kodującego podjednostkę β syntazy ATP w hepatocytach szczura pod koniec rozwoju płodowego poziom białka kodowanego przez to mRNA jest niski.

Kolejnym ważnym czynnikiem warunkującym szybki wzrost ilości białka podjednostki β syntazy ATP w ciągu pierwszej godziny życia pozamacicznego szczura są właściwości regionu 3'UTR mRNA kodującego to białko. Okazuje się bowiem, że region ten spełnia rolę wzmacniacza translacji. Przyłączenie sekwencji tego regionu do genu reporterowego powoduje dziesięciokrotne zwiększenie szybkości jego translacji *in vitro* [31].

W ciągu pierwszej doby życia pozamacicznego szczura całkowita liczba mitochondriów w wątrobie prawie nie ulega zmianie, natomiast zmniejsza się liczba mitochondriów w komórce, co związane jest z intensywnymi podziałami hepatocytów. Po pierwszym dniu życia pozamacicznego, pomimo podziałów hepatocytów, obserwuje się wzrost liczby mitochondriów w komórkach, co świadczy o intensywnej proliferacji mitochondriów [32]. Podobne wyniki uzyskano badając poziom mtDNA. W hepatocytach szczura obserwuje się stały poziom mtDNA w okresie trzech ostatnich dni rozwoju płodowego oraz niewielki wzrost poziomu mtDNA w ciągu pierwszego dnia życia pozamacicznego. Natomiast po pierwszym dniu życia pozamacicznego następuje intensywny wzrost poziomu mtDNA w komórkach wątroby [33].

Badania przeprowadzone dla oksydazy cytochromu *c* wskazują, że aktywność tego kompleksu enzymatycznego zmienia się w trakcie rozwoju embrionalnego i w okresie poporodowym. Ponadto w przypadku podjednostek COX obserwuje się korelację pomiędzy zmianą ekspresji podjednostek kodowanych w mtDNA i w jądrze. Oksydaza cytochromu *c* składa się z 13 podjednostek. Trzy z nich (COX I, II, III) są zakodowane w genomie mitochondrialnym, pozostałe zaś w jądrowym [34]. Skoordynowaną ekspresję podjednostek COX obserwuje się w róż-

nych stadiach rozwoju organizmu człowieka. Potwierdzają to badania przeprowadzone dla podjednostek II i IV na sercach pobranych od płodów we wczesnej (45-65 dni) i późnej ciąży (85-110 dni) oraz od niemowląt w wieku 1-30 dni [8]. Pomiedzy wczesną a późną ciążą obserwowano 2-krotny wzrost aktywności oksydazy cytochromu *c*, czemu towarzyszył dwukrotny wzrost poziomu podjednostki II. Poziom podjednostki IV był niewykrywalny w płodach z wczesnej ciąży i dobrze wykrywalny w płodach z późnej ciąży. Pomiedzy stadium późnej ciąży a okresem poporodowym następował 3-3,5-krotny wzrost ilości obydwu podjednostek, przy 1,3-krotnym wzroście aktywności oksydazy cytochromu *c*.

Jednakże badania B o n n e i wsp. [9] wskazują, że zmiany w poziomie ekspresji genów kodujących poszczególne podjednostki mogą zależeć od typu tkanki. Badając różnice w poziomach mRNA pomiędzy ludzkimi płodami w wieku 20-28 tygodni a dwoma osobami dorosłymi w wieku 35 i 55 lat wykazali oni, że w sercu i mięśniach szkieletowych wzrost poziomu transkryptów mitochondrialnych i jądrowych kodujących podjednostki COX jest skorelowany ze wzrostem aktywności COX. Natomiast w wątrobie, pomimo dwukrotnego wzrostu aktywności COX, nie obserwowano wzrostu poziomu transkryptów, oprócz tych, które kodują izoformy podjednostek specyficzne dla wątroby (VIaL i VIIaL). Powyższe obserwacje potwierdzają badania przeprowadzone na myszach, u których badano zmianę ekspresji podjednostek COX w okresie poporodowym [7]. Wykazano 3-10-krotny wzrost poziomu mRNA jednostek kodowanych mitochondrialnie i jądrowo w okresie od porodu do osiągnięcia wieku dojrzałego. W trakcie rozwoju osobniczego zaobserwowano ponadto zmiany ekspresji podjednostek kodujących izoformy tkankowo-specyficzne. Na przykład, zaraz po narodzinach we wszystkich badanych tkankach obserwowano wysoki poziom ekspresji podjednostek VIaL i VIII L. Poziom ten następnie obniżał się w mięśniach szkieletowych i sercu, natomiast wzrastał w nerkach i mózgu. mRNA podjednostki VIaH w pierwszym dniu po porodzie zostało wykryte jedynie w mięśniach szkieletowych i sercu i tylko w tych dwóch tkankach następował wzrost jego poziomu podczas dalszego rozwoju myszy.

IV. Hormon tarczycy

Dotychczasowe badania nad biogenezą mitochondriów u szczurów wykazały, że hormon tarczycy — trijodotyronina — jest ważnym czynnikiem regulującym różnicowanie i proliferację mitochondriów

w rozwoju płodowym oraz pierwszej fazie życia pozamacicznego. Hormon tarczycy regulując poziom podstawowej przemiany materii realizuje swoją funkcję poprzez wpływ na funkcjonowanie oraz biogenezę mitochondriów. Hormon ten oddziałuje na morfologię, liczbę oraz strukturę mitochondriów [35], a także reguluje ekspresję genomu mitochondrialnego [36] oraz jądrowego [37] i powoduje wzrost aktywności oddechowej mitochondriów. Hormon tarczycy reguluje skład fosfolipidowy wewnętrznej błony mitochondrialnej m.in. przez stymulację aktywności syntazy kardiolipin. Tym samym, wpływa na aktywność enzymów, które aktywowane są przez kardiolipiny [38].

IV-1. Wpływ na proliferację i różnicowanie się mitochondriów

W badaniach nad wpływem hormonu tarczycy na biogenezę mitochondriów stosuje się model badawczy polegający na wywoływaniu u ciężarnej samicy szczura stanu hipotyreozy (nieprawidłowa czynność tarczycy prowadząca do obniżenia poziomu hormonu tarczycy we krwi) i badaniu funkcjonowania mitochondriów u jej potomstwa. Dalsze rozwinięcie tego modelu polega na podtrzymywaniu stanu hipotyreozy u nowonarodzonych zwierząt [27, 30, 35]. W tych badaniach markerem proliferacji i różnicowania się mitochondriów są także zmiany w poziomie podjednostki β syntazy ATP.

Obniżony poziom hormonu tarczycy nie powoduje zaburzeń w różnicowaniu się mitochondriów w okresie rozwoju płodowego. Powoduje natomiast zmniejszenie liczby mitochondriów. Wykazano bowiem, że mitochondria wyizolowane z wątroby potomstwa szczurów z hipotyreozą zawierają podobną do kontroli ilość podjednostki β syntazy ATP, natomiast poziom tego białka w całkowitym homogenacie z wątroby jest o 50% niższy niż w homogenacie z wątroby nowonarodzonego szczura, urodzonego przez samicę z prawidłowym poziomem hormonu tarczycy (eutyreoza) [27]. Badanie wykonano zaraz po urodzeniu oraz po jednej i dwóch godzinach życia pozamacicznego. W przypadku mitochondriów szczurów urodzonych przez samicę z obniżonym poziomem hormonu tarczycy w hepatocytach nie obserwuje się wzrostu poziomu białka podjednostki β syntazy ATP w ciągu dwóch pierwszych godzin życia. Poziom hormonu tarczycy nie wpływa natomiast na ilość białka podjednostki α syntazy ATP, co potwierdza specyficzny wpływ hormonu tarczycy na zmianę ilości poszczególnych białek mitochondrialnych [27]. Jednakże badania przeprowadzone na jed-

nodniowych szczurach, u których po narodzinach podtrzymywano stan hipotyreozy, wskazują, że ich mitochondria zawierają taką samą ilość białka podjednostki β syntazy ATP jak mitochondria jednodniowego szczura z eutyreozą, urodzonego przez samicę z prawidłowym poziomem hormonu tarczycy [30]. Zatem obniżony poziom hormonu tarczycy nie blokuje różnicowania się mitochondriów hepatocytów szczura, jednakże znacząco spowalnia ten proces. Przyczyn może być kilka. Przede wszystkim obniżony poziom hormonu tarczycy może prowadzić do obniżenia poziomu mRNA kodującego podjednostkę β syntazy ATP. Wykazano, że hormon tarczycy reguluje transkrypcję genu kodującego podjednostkę β syntazy ATP [39]. Poziom mRNA kodującego podjednostkę β syntazy ATP w komórkach wątroby nowonarodzonego oraz jednogodzinnego szczura, potomka samicy z hipotyreozą, stanowi jedynie 25% poziomu rejestrowanego w hepatocytach szczura urodzonego przez samicę z eutyreozą [27]. Podanie zaraz po porodzie trijodotyroniny szczurowi urodzonemu przez samicę z hipotyreozą, powoduje w ciągu pierwszej godziny życia pozamacicznego dwukrotny wzrost poziomu mRNA kodującego podjednostkę β syntazy ATP. Jednocześnie ze wzrostem poziomu mRNA obserwuje się wzrost ilości białka podjednostki β syntazy ATP w mitochondriach hepatocytów szczura. Wzrost ten prowadzi do osiągnięcia po godzinie od porodu (i iniekcji trijodotyroniny) poziomu, jaki obserwowany jest w mitochondriach hepatocytów normalnie rozwijającego się szczura [27]. Prawidłowy poziom białka przy poziomie mRNA obniżonym o 50% sugeruje istnienie dodatkowego mechanizmu kompensacyjnego. Możliwe, że hormon tarczycy wpływa na aktywność białka 3β 'FBP i tym samym reguluje wydajność translacji mRNA kodującego podjednostkę β syntazy ATP.

Wpływ hormonu tarczycy na biogenezę mitochondriów oraz na ich aktywność oddechową zależy od rodzaju badanej tkanki. Dowodów na to dostarczają badania Stevens i wsp. [40]. W sercach zdrowych szczurów podczas pierwszych 56 dni życia obserwuje się ok. 2,3-krotny wzrost aktywności COX, przy czym największe tempo wzrostu obserwuje się podczas pierwszych dwóch dni życia pozamacicznego. Poziom aktywności COX w mięśni szkieletowym pozostaje na niezmiennym poziomie. U 56-dniowych szczurów z hipotyreozą obserwuje się o 50% mniejszą aktywność COX w sercu w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi, natomiast stan hipotyreozy nie wpływa na aktywność COX w mięśni szkieletowym.

Prawdopodobnie główną funkcją hormonu tarczycy jest koordynacja grupy genów związanych z aktywnością metaboliczną mitochondriów. Dlatego właśnie niedobór hormonu tarczycy powoduje zmianę ekspresji szeregu genów prowadzącą do zaburzenia różnicowania się mitochondriów oraz do zmiany ich aktywności metabolicznej, zwłaszcza oddechowej. Niedobór hormonu tarczycy może nawet prowadzić do zmian w tkankowo-specyficznej ekspresji niektórych genów. Jako przykład mogą posłużyć izoformy COX VIaH, VIaL, VIIIH i VIIIL [41]. W sercach płodów szczurów występują głównie izoformy VIaL i VIIIL. Poziom mRNA kodujący izoformy VIaH i VIIIL jest bardzo niski lub niewykrywalny. Po porodzie następuje zanik ekspresji izoform VIaL i VIIIL i duży wzrost ekspresji izoform VIaH i VIIIH. Niedobór hormonu tarczycy powoduje zaburzenie mechanizmu prowadzącego do przełączenia ekspresji odpowiednich izoform podjednostek COX VI i VIII. U 14-dniowego szczura z hipotyreozą poziom izoform VIIIH i VIaL jest silnie zmniejszony w porównaniu z kontrolą, natomiast poziom izoform VIaH i VIIIL pozostaje bez zmian. Prace Ho o d i wsp. [42] wykazały, że niedobór hormonu tarczycy powoduje całkowite zniesienie skoordynowanej regulacji ekspresji pozostałych podjednostek wchodzących w skład oksydazy cytochromu *c*.

Proces różnicowania mitochondriów polega nie tylko na wzroście aktywności poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego oraz syntazy ATP, ale także na zmianach dotyczących właściwości wewnętrznej błony mitochondrialnej. Almeida i wsp. [35] wykazali, że hormon tarczycy jest niezbędny do zmniejszenia przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej dla protonów. Tym samym hormon tarczycy nie tylko zwiększa poziom fosforylacji oksydacyjnej poprzez wpływ na poziom białek łańcucha oddechowego, ale także wpływa na wydajność tego procesu. Almeida i wsp. [35] sugerują, że hormon tarczycy indukuje fizyczne połączenie między wewnętrzną i zewnętrzną błoną mitochondrialną poprzez wzmocnienie ekspresji nieokreślonych białek mitochondrialnych kodowanych jądrowo.

Ważnym składnikiem wewnętrznej błony mitochondrialnej jest kardiolipina. Fosfolipid ten odgrywa bardzo ważną rolę w utrzymaniu prawidłowej aktywności wielu ważnych dla funkcjonowania mitochondriów enzymów takich, jak translokaza nukleotydów adeninowych [43], fosfokinaza kreatyniny [44, 45], mitochondrialny transporter anionów fosforanowych [46] oraz I [47], III [47] i IV [48] kompleks łańcucha oddechowego. Aktywność syntazy kardio-

lipiny jest regulowana przez hormon tarczycy. Podawanie szczurom hormonu tarczycy powoduje wzrost aktywności syntazy kardiolipiny [49] i zawartości kardiolipiny w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [50]. Wykazano, że spadek aktywności oksydazy cytochromu *c* może być całkowicie zniesiony przez podanie egzogennej kardiolipiny [51]. Obserwacje te wskazują, że hormon tarczycy regulując skład lipidowy błon mitochondrialnych wpływa w sposób pośredni na aktywność wszystkich ważniejszych komponentów odpowiedzialnych za aktywność oddechową mitochondriów.

Oprócz stopnia różnicowania mitochondriów czynnikiem wpływającym na poziom fosforylacji oksydacyjnej w komórce jest liczba mitochondriów. Badania przeprowadzone na szczurach urodzonych przez samice z hipotyreozą, u których podtrzymywano ten stan do osiągnięcia wieku dojrzałego, wykazały, że obniżenie poziomu hormonu tarczycy powoduje zmniejszenie liczby mitochondriów. Jednocześnie wykazano, że w hepatocytach 1, 5, 9, 21-dniowych oraz dorosłych szczurów z obniżonym poziomem hormonu tarczycy poziom mRNA kodującego podjednostkę syntazy ATP jest o około 50% mniejszy w porównaniu z kontrolą, podczas gdy ilość białka była mniejsza co najwyżej o 30% [30]. U prawidłowo rozwijających się szczurów następuje stopniowy wzrost poziomu hormonu tarczycy aż do osiągnięcia wieku dojrzałego. Ze zmianami poziomu hormonu tarczycy skorelowane są zmiany w poziomie transkrypcji genu kodującego podjednostkę β syntazy ATP i wzrost liczby mitochondriów w hepatocytach szczura w trakcie rozwoju pozamacicznego.

IV-2. Regulacja ekspresji białek mitochondrialnych kodowanych jądrowo

Aktywność biologiczna hormonu tarczycy realizowana jest w głównej mierze przez regulację ekspresji genów jądrowych. Proces ten odbywa się za pośrednictwem wewnątrzkomórkowego receptora hormonu tarczycy (TR) zlokalizowanego w jądrze. Należy on do nadrodziny jądrowych receptorów hormonów, aktywujących transkrypcję po związaniu liganda (ang. *the nuclear hormone receptor superfamily of ligand-activated transcription factors*) [52].

U ssaków są dwa geny kodujące TR: *c-erbA α* i *c-erbA β* , które kodują kilka izoform TR. Gen *c-erbA α* koduje trzy izoformy ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$) powstające w wyniku alternatywnego składania RNA. Jedynie TR α_1 może wiązać hormon tarczycy i tym samym tylko ta izoforma jest aktywna biologicznie. Gen *c-erbA β* koduje dwie izoformy (TR β_1 i TR β_2) zdolne

do wiązania trijodotyroniny. Dotychczas nie wiadomo, jakie znaczenie funkcjonalne ma obecność kilku izoform jądrowego receptora hormonu tarczycy [38]. Receptor hormonu tarczycy reguluje ekspresję genu przez związanie się ze specyficznymi sekwencjami regulatorowymi DNA, określanymi jako sekwencje warunkujące odpowiedź na hormon tarczycy (TRE) [53]. W większości przypadków TR funkcjonuje jako heterodimer z receptorem kwasu retinowego

są regulowane przez hormon tarczycy w sposób bezpośredni. Drugi profil obejmuje geny, których wzrost ekspresji w ciągu pierwszych sześciu godzin jest nieznaczny (geny odpowiedzi późnej). Ta grupa genów jest prawdopodobnie regulowana przez hormon tarczycy w sposób pośredni. Do grupy genów odpowiedzi wczesnej należą NRF-1 i PGC-1. Ich produkty aktywują następnie geny odpowiedzi późnej, np. mtTFA [12] i cytochromu *c* [5]. Pomimo że

Tabela 2.

Jądrowe geny kodujące białka mitochondrialne regulowane przez hormon tarczycy w hepatocytach szczura oraz wzrost poziomu ich mRNA po podaniu szczurowi hormonu tarczycy. Dane pochodzą z [29, 36, 53, 59].

Białko	Wzrost poziomu mRNA (czas od iniekcji [godziny])
- cytochrom <i>c</i>	5-10 (24-48h)
- cytochrom <i>c</i> ₁	30-40 (12h)
- ANT2	5-10 (12-48h)
- podjednostka β syntazy ATP	2-3 (1h)
- podjednostka syntazy ATP wiążąca	
DCCD	3-4 (12h)
- białko Rieskego	10 (12h)
- podjednostka VIc oksydazy	
cytochromu <i>c</i>	2 (brak danych)
- mtTFA	2 (brak danych)

RXR. Receptor hormonu tarczycy może wzmacniać lub wyciszać ekspresję genu w zależności od rodzaju sekwencji, do której wiąże się TR, a także od białek, które są z nim związane. Oddziaływanie receptora hormonu tarczycy z koaktywatorami prowadzi do zróżnicowanej i zależnej od rodzaju tkanki ekspresji genów będących pod kontrolą sekwencji TRE [53].

Hormon tarczycy reguluje ekspresję szeregu genów (Tab. 2). Wiedzy na ten temat dostarczyły badania, w których u szczurów wywoływano stan hipotyreozy, a następnie dokonywano iniekcji hormonu tarczycy. Wykazano, że hormon tarczycy reguluje ekspresję tylko niektórych genów kodujących białka mitochondrialne. Poza tym wśród genów, których ekspresja regulowana jest przez hormon tarczycy, istnieją różnice dotyczące zarówno stopnia aktywacji ekspresji jak i czasu, po którym następuje wzrost transkrypcji.

Weitzel i wsp. [19] badając wpływ hormonu tarczycy na ekspresję genów jądrowych z zastosowaniem techniki chipów DNA odkryli dwa różne wzory ekspresji genów. Pierwszy profil ekspresji obejmuje geny, których wzrost mRNA obserwuje się już po sześciu godzinach od podania hormonu tarczycy szczurowi z niedoczynnością tarczycy (geny odpowiedzi wczesnej). Są to prawdopodobnie geny, które

geny te nie posiadają sekwencji TRE w obszarze promotorowym, są regulowane przez hormon tarczycy. Fakt, że PGC-1 jest koaktywatorem TR, wskazuje na istnienie sprzężenia dodatniego pomiędzy PGC-1 a TR. Prawdopodobnie mechanizm ten ma zapewnić szybką odpowiedź komórki na podwyższony poziom hormonu tarczycy.

Podanie trijodotyroniny zdrowemu szczurowi powoduje wzrost ilości białka Tom20 oraz mtHsp70 [54, 55]. Białka te odgrywają kluczową rolę w transporcie białek do mitochondriów. Zwłaszcza w przypadku mtHsp70 sugeruje się, że poziom tego białka odgrywa decydującą rolę w regulacji importu białek do mitochondriów. Dotychczas promotor szczurzego genu mtHsp70 nie został poznany. Przypuszcza się jednak, że hormon tarczycy reguluje transkrypcję genu kodującego mtHsp70 [55].

IV-3. Regulacja ekspresji genomu mitochondrialnego

W mitochondriach szczurów z hipotyreozą obserwuje się niższy poziom mitochondrialnego mRNA (mt-mRNA), natomiast poziom mt-rRNA nie ulega zmianie [36, 56]. Prowadzi to do zmniejszenia się stosunku mt-mRNA/mt-rRNA. Enriquez i wsp.

[56] wykazali *in vivo* oraz *in vitro*, że hormon tarczycy działając bezpośrednio na mitochondria powoduje zmiany w oddziaływaniu białek z mtDNA w obrębie miejsc rozpoczęcia transkrypcji IT_{H1}, IT_{H2}, IT_L a także w obrębie miejsca wiązania się mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego A (mtTFA). Prawdopodobnie hormon tarczycy reguluje oddziaływanie białek macierzy mitochondrialnej z mtDNA za pośrednictwem mitochondrialnego receptora hormonu tarczycy (p43). Białko p43 powstaje w wyniku translacji mRNA kodującego receptor TR α_1 , która rozpoczyna się od wewnętrznego kodonu AUG [57]. Analiza komputerowa pozwoliła na znalezienie w mtDNA czterech sekwencji podobnych do sekwencji TRE. Dwie z nich, DR2 i RSV-T3RE, znajdują się w obrębie regionu regulatorowego mtDNA. Wykazano również, że białko p43 wiąże się z tymi sekwencjami [58].

Podanie trijodotyroniny szczurowi z niedoczynnością tarczycy powoduje 2-8 krotny wzrost poziomu mitochondrialnego mRNA (mt-mRNA) w ciągu 1-3 dni. Wzrost poziomu mRNA poszczególnych genów mitochondrialnych jest różny. Prawdopodobnie wynika to z różnej stabilności poszczególnych rodzajów mt-mRNA [28]. Wykazano, że wzrost poziomu mt-mRNA spowodowany został wzrostem aktywności transkrypcyjnej genomu mitochondrialnego, a nie zwiększeniem stabilności poszczególnych rodzajów mitochondrialnego mRNA [57]. Wręcz przeciwnie, wykazano, że stabilność mt-mRNA w mitochondriach hepatocytów szczura z eutyreozą jest niższa niż u szczura z hipotyreozą [57]. Dodanie hormonu tarczycy do mitochondriów wyizolowanych z wątroby szczura z hipotyreozą powoduje przywrócenie w tych mitochondriach stosunku mt-mRNA/mt-rRNA obserwowanego w mitochondriach hepatocytów szczura z eutyreozą. Jednakże nie wiąże się to ze wzrostem poziomu transkrypcji [57].

Ze zgromadzonych danych doświadczalnych wyłania się obraz uproszczonego mechanizmu prowadzącego do wzrostu poziomu mt-mRNA w mitochondriach. Hormon tarczycy powoduje aktywację NRF-1. Ten aktywuje transkrypcję mtTFA, który powoduje wzrost ekspresji genomu mitochondrialnego prowadzący do wzrostu poziomu mt-mRNA.

Artykuł otrzymano 16 czerwca 2003

Zaakceptowano do druku 1 lipca 2004

Piśmiennictwo

1. Garesse R, Vallejo CG (2001) *Gene* 263: 1-16

2. Taanman JW (1999) *Biochim Biophys Acta* 1410: 103-123
3. Attardi G, Schatz G (1988) *Annu Rev Cell Biol* 4: 289-333
4. Scarpulla RC (1997) *J Bioenerg Biomembr* 29: 109-119
5. Nelson BD, Luciakova K, Li R, Betina S (1995) *Biochim Biophys Acta* 1271: 85-91
6. Hood DA, Zak R, Pette D (1989) *Eur J Biochem* 179: 275-280
7. Kim K, Lecordier A, Bowman LH (1995) *Biochem J* 306: 353-358
8. Marin-Garcia J, Ananthakrishnan R, Goldenenthal MJ (2000) *Mol Cell Biochem* 210: 47-52
9. Bonne G, Seibel P, Possekkel S, Marsac C, Kadenbach B (1993) *Eur J Biochem* 217: 1099-1107
10. Virbasius CA, Virbasius JV, Scarpulla RC (1993) *Genes Dev* 7: 2431-2445
11. Gugneja S, Scarpulla RC (1997) *J Biol Chem* 272: 18732-18739
12. Virbasius JV, Scarpulla RC (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1309-1313
13. Huo L, Scarpulla RC (2001) *Mol Cell Biol* 21: 644-654
14. Johnson DF, Hamon M, Fischel-Ghodsian N (1998) *Genomics* 52: 363-368
15. Hernandez JM, Giner P, Hernandez-Yago J (1999) *Gene* 239: 283-291
16. Xia Y, Buja LM, Scarpulla RC, McMillin JB (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11399-11404
17. Virbasius JV, Virbasius CA, Scarpulla RC (1993) *Genes Dev* 7: 380-392
18. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelman G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM (1999) *Cell* 98: 115-124
19. Weitzel JM, Radtke C, Seitz HJ (2001) *Nucleic Acids Res* 29: 5148-5155
20. Vallejo CG, Escriva H, Rodriguez-Pena A (2000) *Biochimie* 82: 1129-1133
21. Escriva H, Rodriguez-Pena A, Vallejo CG (1999) *Biochimie* 81: 965-971
22. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998) *Cell* 92: 829-839
23. Lowell BB, Spiegelman BM (2000) *Nature* 404: 652-660
24. Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP (2000) *J Clin Invest* 106: 847-856
25. Cuezva JM, Ostronoff LK, Ricart J, Lopez de Heredia M, Di Liegro CM, Izquierdo JM (1997) *J Bioenerg Biomembr* 29: 365-377
26. Valcarce C, Navarrete RM, Encabo P, Loeches E, Satrustegui J, Cuezva JM (1988) *J Biol Chem* 263: 7767-7775
27. Izquierdo JM, Luis AM, Cuezva JM (1990) *J Biol Chem* 265: 9090-9097
28. Izquierdo JM, Ricart J, Ostronoff LK, Egea G, Cuezva JM (1995) *J Biol Chem* 270: 10342-10350
29. Luis AM, Izquierdo JM, Ostronoff LK, Salinas M, Santaren JF, Cuezva JM (1993) *J Biol Chem* 268: 1868-1875
30. Izquierdo JM, Jimenez E, Cuezva JM (1995) *Eur J Biochem* 232: 344-350
31. Izquierdo JM, Cuezva JM (1997) *Mol Cell Biol* 17: 5255-5268
32. Rohr HP, Wirz A, Henning LC, Riede UN, Bianchi L (1971) *Lab Invest* 24: 128-139
33. Cantatore P, Polosa PL, Fracasso F, Flagella Z, Gadaleta MN (1986) *Cell Differ* 19: 125-132
34. Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rotig A, Rustin P, Tzagoloff A (2002) *Gene* 286: 53-63
35. Almeida A, Lopez-Mediavilla C, Medina JM (1997) *Endocrinology* 138: 764-770
36. Mutvei A, Kuzela S, Nelson BD (1989) *Eur J Biochem* 180: 235-240
37. Pillar TM, Seitz HJ (1997) *Eur J Endocrinol* 136: 231-239
38. Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G (2001) *J Mol Endocrinol* 26: 67-77

39. Izquierdo JM, Cuezva JM (1993) *FEBS Lett* **323**: 109-112
40. Stevens RJ, Nishio ML, Hood DA (1995) *Mol Cell Biochem* **143**: 119-127
41. Meehan J, Kennedy JM (1997) *Biochem J* **327**: 155-160
42. Hood DA, Simoneau JA, Kelly AM, Pette D (1992) *Am J Physiol* **263**: C788-C793
43. Beyer K, Klingenberg M (1985) *Biochemistry* **24**: 3821-3826
44. Muller M, Moser R, Cheneval D, Carafoli E (1985) *J Biol Chem* **260**: 3839-3843
45. Schlame M, Augustin W (1985) *Biomed Biochim Acta* **44**: 1083-1088
46. Mende P, Kolbe HV, Kadenbach B, Stipani I, Palmieri F (1982) *Eur J Biochem* **128**: 91-95
47. Fry M, Green DE (1981) *J Biol Chem* **256**: 1874-1880
48. Vik SB, Georgevich G, Capaldi RA (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 1456-1460
49. Hostetler KY (1991) *Biochim Biophys Acta* **1086**: 139-140
50. Ruggiero FM, Landriscina C, Gnoni GV, Quagliariello E (1984) *Lipids* **19**: 171-178
51. Paradies G, Petrosillo G, Ruggiero FM (1997) *Biochim Biophys Acta* **1319**: 5-8
52. Wu Y, Delerive P, Chin WW, Burris TP (2002) *J Biol Chem* **277**: 8898-8905
53. Konarska L (red) (1995) *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*. Wyd. I, PWN, Warszawa
54. Craig EE, Chesley A, Hood DA (1998) *Am J Physiol* **275**: C1508-1515
55. Schneider JJ, Hood DA (2000) *J Endocrinol* **165**: 9-17
56. Enriquez JA, Fernandez-Silva P, Garrido-Perez N, Lopez-Perez MJ, Perez-Martos A, Montoya J (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 657-670
57. Wrutniak C, Cassar-Malek I, Marchal S, Rascle A, Heusser S, Keller JM, Flechon J, Dauca M, Samarut J, Ghysdael J, et al (1995) *J Biol Chem* **270**: 16347-16354
58. Casas F, Rochard P, Rodier A, Cassar-Malek I, Marchal-Victorion S, Wiesner RJ, Cabello G, Wrutniak C (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 7913-7924
59. Goglia F, Moreno M, Lanni A (1999) *FEBS Lett* **452**: 115-120

Struktura i funkcja dynaminy oraz białek dynamino-podobnych

Structure and function of dynamin and dynamin-like proteins

JOLANTA WIEJAK¹, ELŻBIETA WYROBA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa domenowa dynaminy
 - II-1. Domena GTP-azowa — motywy wiążące GTP
 - II-2. Domena środkowa
 - II-3. Domena plekstrynowa (PH)
 - II-4. Domena efektorowa (GED) i jej rola w oligomeryzacji dynaminy
 - II-5. Domena PRD i jej oddziaływania z białkami zawierającymi domeny SH3
- III. Regulacja GTP-azowej aktywności dynaminy
- IV. Jak działa dynamina — mechanoenzym czy GTP-aza regulatorowa?
- V. Izoformy dynamin ssaczych oraz ich rola w komórce
- VI. Białka dynamino-podobne — różnorodność funkcji
 - VI-1. Od białek drożdżowych do ludzkich
 - VI-2. Białka roślinne
 - VI-3. Białka Mx i hGBP o własnościach antywirusowych
- VII. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Domain structure of dynamin
 - II-1. GTP-ase domain — GTP-binding motifs
 - II-2. Middle domain
 - II-3. Pleckstrin homology domain (PH)
 - II-4. Effector domain (GED) and its function in dynamin oligomerization
 - II-5. PRD domain and its interaction with SH3 domain-containing proteins
- III. Regulation of dynamin GTP-ase activity
- IV. How does dynamin work — as a mechanoenzyme or regulatory GTP-ase?
- V. Isoforms of mammalian dynamins and their role in the cell
- VI. Dynamin-like proteins — diversity of functions
 - VI-1. From yeast to human proteins
 - VI-2. Plant proteins
 - VI-3. Mx and hGBP proteins displaying antiviral activity
- VII. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: DOA — dominująca neuropatia wzrokowa; Dyn1, Dyn2, Dyn 3 — nazwy białek dynaminy; GAP — białko aktywujące GTP-azę (ang. *GTP-ase activating protein*); GED — domena efektorowa; Grb — białko wiążące receptor czynnika wzrostu; PH — domena plekstrynowa; *ParD1*, *ParD2*, *ADL*, *DLP1*, *Drp1*, *Mgm1*, *Vps1*, *VpsA*, *Dnm1*, *Mx*, *hGBP1*, *OPA* — nazwy białek dynamino-podobnych; PRD — domena bogata w prolinę i argininę; RME — endocytoza z udziałem receptorów; SH3 — domena homologiczna do białka Src (ang. *Src homology 3*); TGN — sieć aparatu Golgiego (ang. *trans-Golgi network*).

I. Wstęp

Dynamina została po raz pierwszy wyizolowana w 1989 roku z ekstraktów mózgu cielęcia jako białko

związane z mikrotubulami [1], natomiast w 1990 roku sklonowano i zsekwencjonowano pierwszy gen dynaminy, który pochodził z mózgu szczura [2].

Dynamina należy do nadrodziny dużych GTP-az o masie 70-120 kDa zaangażowanych w procesy zależne i niezależne od klatryny, związane z transportem błonowym zarówno na szlakach endocytotycznych, jak i sekrecyjnych [3, 4].

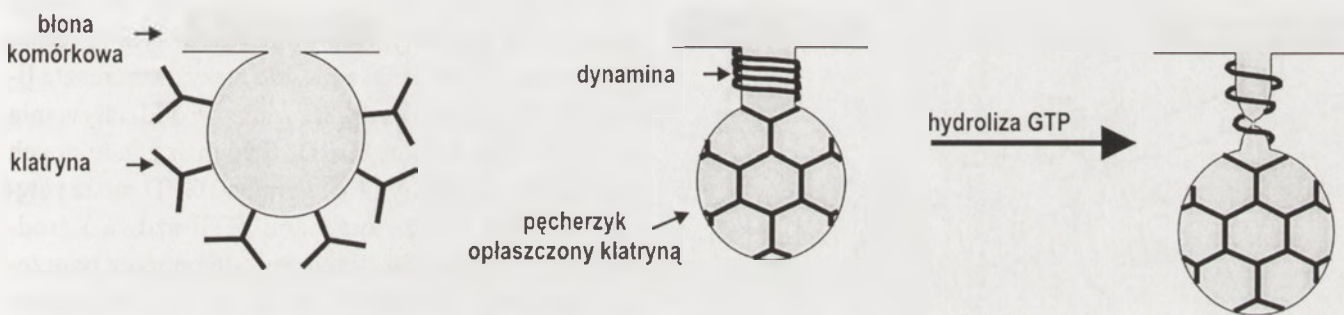
Najlepiej poznanym procesem, w którym uczestniczy dynamina, jest endocytoza z udziałem receptorów (RME, ang. *receptor-mediated endocytosis*) zachodząca za pośrednictwem pęcherzyków opłaszczonych klatryną (Ryc. 1). Pierwsze doniesienia na temat roli dynaminy w tym procesie pochodzą z badań na komórkach ssaków ze zmutowanym genem dynaminy. Zaobserwowano, że komórki te nie są zdolne do internalizacji transferyny — klasycznego liganda RME [5, 6].

Wiele związków dostaje się do komórek drogą RME, czyli na szlaku zależnym od dynaminy. Należą do nich między innymi związki odżywcze (żelazo —

¹Dr, ²prof. dr hab., Pracownia Fizjologii Błony Komórkowej, Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel. (22) 58 92 357, e-mail: e.wyroba@nencki.gov.pl

za pośrednictwem receptora transferyny, cholesterol — za pośrednictwem receptora LDL), hormony (hormon uwalniający tyreotropinę), wirusy (grypy, adenowirusy, Semlike F) i toksyny (dyfterytu) [7].

Dynamina odgrywa również istotną rolę w sekwestracji (endocytozie) receptorów związanej z procesem ich desensytyzacji po związaniu agonisty, co powoduje obniżenie odpowiedzi układu efektorowego na bodziec [8]. Pierwsze obserwacje poczynili Zhang i wsp. [9] analizując sekwestrację receptora β_2 -adrenergicznego w komórkach HEK 293 i COS-7. Stwierdzili oni, że ekspresja genu zmutowanej formy dynaminy (K44A), która powoduje zahamowanie RME, uniemożliwia również sekwestrację receptora β_2 -adrenergicznego związanego z agonistą. Późniejsze badania wykazały, że w podobny sposób internalizowane są receptory dopaminowe, glutaminianowe, opioidowe i bradykininowe [7, 10].



Ryc. 1. Udział dynaminy w odcinaniu pęcherzyków opłaszczonych klatryną [zmodyfikowane wg 46]. Dynamina tworzy pierścienie i spirale wokół szyjki pęcherzyka endocytotycznego. Hydroliza GTP wywołuje zmianę konformacyjną dynaminy powodującą rozciągnięcie się spirali i odcięcie pęcherzyka.

Najnowsze badania wskazują, że endocytoza może odgrywać istotną rolę w aktywacji szlaków sygnalizacyjnych w komórce [11]. Wśród „partnerów” dynaminy, oprócz białek cytoszkieletowych i endocytotycznych oraz lipidów, znaleziono wiele cząsteczek sygnalizacyjnych. Należą do nich m.in. kinazy białkowe, kinazy fosfolipidów, fosfolipaza C, białko Grb 2 (ang. *growth factor receptor binding protein 2*) i Src [3, 12].

W ciągu ostatnich kilku lat pojawiają się doniesienia o coraz bardziej zróżnicowanej roli dynaminy w komórkach, m.in. w fagocytozie [13, 14], internalizacji kaweoli [4] i apoptozie [15].

II. Budowa domenowa dynaminy

W cząsteczce dynaminy można wyróżnić pięć głównych domen (Ryc. 2A) [3, 16, 17]:
— N-końcową domenę wiążącą GTP;
— domenę środkową;

- domenę plekstrynową (PH);
- domenę efektorową (GED);
- C-końcową domenę bogatą w prolinę i argininę (PRD).

II-1. Domena GTP-azowa — motywy wiążące GTP

Domena GTP-azowa jest najbardziej konserwatywnym regionem w cząsteczce dynaminy. W obrębie tej domeny, podobnie jak w innych białkach z nadrodziny GTP-az, zidentyfikowano trzy motywy wiążące GTP (G1, G2, G3) oraz konserwatywną resztę treoniny [18].

Motyw G1 (QSAGKSS) wiąże fosforan nukleotydu. Motyw G2 (DLPG) zawiera dwie reszty aminokwasowe istotne dla prawidłowego funkcjonowania dynaminy: asparaginian, który odpowiada za wiązanie Mg^{2+} oraz glicynę, której azot z grupy amidowej

tworzy wiązanie wodorowe z γ -fosforanem nukleotydu. Motyw G3 (TKLD) jest zaangażowany w wiązanie nukleotydu za pośrednictwem guaniny. Natomiast stabilna ewolucyjnie treonina bierze udział w wiązaniu Mg^{2+} w stanie związanym z GTP. Jest ona częścią wysoce konserwatywnego regionu (LPRGKGIVTR), tzw. „znacznika rodziny dynamin” [19].

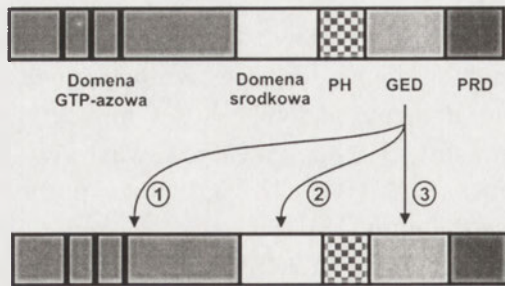
II-2. Domena środkowa

Domena środkowa jest najbardziej zmienna spośród wszystkich domen dynaminy. Wydaje się, że jest ona zaangażowana w proces oligomeryzacji i tworzenia struktur wyższego rzędu [7]. W trakcie wzajemnych oddziaływań pomiędzy trzema domenami dynaminy: GED, środkową i GTP-azową dimery dynaminy są połączone w ten sposób, że domena środkowa jednego dimeru wiąże się z domeną GED następnego (Ryc. 2A). Przesuwanie się pierścieni

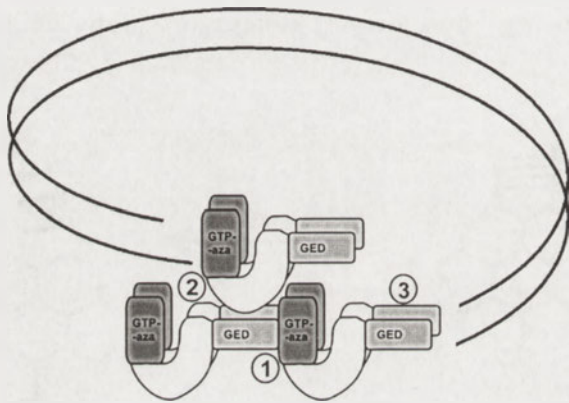
spirali wywołuje zaciskanie pęcherzyka endocytocznego i jego odcięcie (Ryc. 2B) [20].

Nie wyklucza się istotnej roli domeny środkowej w nieznanych jeszcze interakcjach z innymi białkami niezbędnymi do aktywności dynaminy [21].

A



B



Ryc. 2. Domeny dynaminy [zmod. wg. 3, 16] oraz wzajemne oddziaływania pomiędzy nimi [zmod. wg 20]. (A) Strzałki wskazują na możliwe interakcje domeny GED jednej cząsteczki dynaminy odpowiednio z domeną GTP-azową (1), środkową (2) oraz GED (3) sąsiadującej cząsteczki. (B) Oddziaływania te umożliwiają tworzenie łańcucha z dimerów dynaminy wokół szyjki nowo powstającego pęcherzyka endocytocznego. PH — domena plekstrynowa, GED — GTP-azowa domena efektorowa, PRD — C-końcowa domena bogata w prolinę i argininę.

II-3. Domena plekstrynowa (PH)

Domene plekstrynową (PH) wykryto już w ponad dziewięćdziesięciu białkach, wyizolowanych z różnych organizmów: od drożdży poprzez *Drosophila*, *C. elegans* aż do kręgowców, co wskazuje na jej wczesne pochodzenie oraz istotność w świecie eukariotycznym. Obejmuje ona region około 120 aminokwasów i we wszystkich białkach ma podobną strukturę trzeciorzędową pomimo niskiej homologii na poziomie sekwencji aminokwasowej [22].

Domena plekstrynowa dynaminy zaangażowana jest w oddziaływanie z fosfoinozylami (PIP_2), które jest niezbędne do RME [23, 24]. Istotną rolę w tym procesie odgrywa lizyna⁵³⁵. Wydaje się, że oddziaływanie to może być istotne w wiązaniu dynaminy z błoną komórkową [25].

Nie wyklucza się roli domeny PH w interakcjach z białkami, chociaż jedynym jak dotąd przykładem jest podjednostka β białek G, która hamuje aktywność GTP-azową dynaminy [26].

II-4. Domena efektorowa (GED) i jej rola w oligomeryzacji dynaminy

Domena GED (ang. *GTP-ase effector domain*) odpowiedzialna jest za proces oligomeryzacji i tworzenia struktur wielocząsteczkowych dynaminy oraz za stymulację jej aktywności GTP-azowej [20, 27-29].

W cytosolu dynamina występuje jako homotetramer. Natomiast w tworzeniu struktur wyższego rzędu: pierścieni i spiral wokół szyjki powstającego pęcherzyka biorą udział dimery dynaminy [28].

Zdolność dynaminy do oligomeryzacji bez udziału dodatkowych białek wskazuje, że wszystkie składniki niezbędne do utworzenia spirali wokół powstającego pęcherzyka znajdują się w samej cząsteczce dynaminy. Centralną rolę w tym procesie odgrywa domena GED, a przede wszystkim reszta lizyny⁶⁹⁴, która jest zaangażowana w oddziaływania pomiędzy domenami GED dwóch sąsiadujących cząsteczek dynaminy [30]. Domena GED może również oddziaływać z domenami GTP-azową i środkową (Ryc. 2), co stabilizuje spiralę poprzez tworzenie połączeń pomiędzy pierścieniami dynaminy. Wszystkie te oddziaływania odgrywają istotną rolę w procesie odcinania pęcherzyka [20].

II-5. Domena PRD i jej oddziaływanie z białkami zawierającymi domeny SH3

C-końcowa domena bogata w prolinę i argininę (PRD), obejmująca około stu reszt aminokwasowych, obecna jest tylko w dynaminie oraz w dwóch roślinnych białkach dynamino-podobnych. Odpowiedzialna jest za wiązanie białek zawierających domeny SH3 (ang. *Src homology 3*), które modulują aktywność GTP-azową dynaminy oraz kierują ją do błony komórkowej *in vivo* (np. amfifizyna, endofilina) w trakcie tworzenia pęcherzyków opłaszczonych klatryną.

Endofilina, poza domeną SH3 na C-końcu bezpośrednio oddziałującą z dynaminą, zawiera również domenę N-końcową o aktywności acylotransferazy kwasu lizofosfatydowego, która katalizuje przeniesienie reszty nienasyconego kwasu arachidonowego na kwas lizofosfatydowy (LPA) tworząc kwas fosfatydowy (PA). Ta modyfikacja zmienia skład lipidowy błony i jej geometrię (bo LPA tworzący odwrócony stożek zostaje zastąpiony PA — przyjmującym

formę stożka), co ułatwia zakrzywienie dwuwarstwy lipidowej umożliwiając wpuklenie błony i utworzenie pęcherzyka [29, 31, 32].

Domena PRD może być również zaangażowana w wiązanie dynaminy z anionowymi fosfolipidami i stymulację aktywności GTP-azowej zależną od lipidów. Z tego powodu białka zawierające domenę SH3 mogą regulować działanie dynaminy. Stwierdzono, że białka te wiążąc się z nią zwiększają jej aktywność GTP-azową *in vitro* [33-35].

Powstawanie pęcherzyków endocytotycznych i ich ruch w cytoplazmie wymaga współdziałania z cytoszkieletem aktynowym [36]. Do białek istotnych w dynamice aktynowej, z którymi oddziałuje dynamina poprzez swoją domenę PRD, należą między innymi: syndapina [37], kortaktyna [38] i Abp1 [39] wiążące się za pośrednictwem domeny SH3. Natomiast profilina wiąże się z dynaminą poprzez motyw ZPPX (Z = prolina, glicyna, alanina, X = aminokwas hydrofobowy) [40]. Ostatnio zidentyfikowano nowe białko cytoszkieletowe — Tuba — które występuje w synapsach mózgowych i specyficznie wiąże dynaminę poprzez swoje cztery N-końcowe domeny SH3 [41].

III. Regulacja GTP-azowej aktywności dynaminy

Aktywność GTP-azowa dynaminy jest stymulowana przez różne biocząsteczki, m. in. mikrotubule, ujemnie naładowane fosfolipidy, Grb2. Oddziaływanie z nimi prawdopodobnie przyczynia się do oligomeryzacji dynaminy i tworzenia struktur wielocząsteczkowych [29].

Biochemiczne własności dynaminy, a mianowicie: niskie powinowactwo do GTP, wysoka spoczynkowa i bardzo wysoka stymulowana szybkość hydrolizy GTP wyróżniają ją spośród innych członków nadrodziny GTP-az. Ponadto, szybkość wiązania i uwalniania nukleotydów guaninowych jest duża, dlatego hydroliza GTP jest etapem ograniczającym cykl GTP-azowy dynaminy trwający 0.5-2 min w porównaniu z 60 min dla białek ras [42].

Aktywność GTP-azowa dynaminy jest regulowana przez fosforylację. W nienaruszonych synaptosomach neuronalna dynamina 1 ulega fosforylacji przez kinazę białkową C na reszcie seryny w domenie PRD, co powoduje ponad 12-krotny wzrost aktywności GTP-azowej, wzrost wiązania wapnia i spadek wiązania fosfolipidów [12, 43]. Defosforylacja dynaminy 1 (przez kalcyneurynę) hamuje jej aktywność GTP-azową i skorelowana jest w czasie z depolaryzacją zakończeń nerwowych [35].

Natomiast dynamina 2 ulega fosforylacji na reszcie tyrozyny⁵⁹⁷ — przeprowadzanej przez kinazę tyrozynową c-Src — co wywołuje zmianę konformacyjną indukującą tworzenie struktur wielocząsteczkowych dynaminy. Stwierdzono, że fosforylacja ta jest niezbędna do endocytozy receptorów aktywowanych przez ligandy, natomiast nie jest wymagana do konstytutywnej endocytozy receptorów recykliczujących [12, 44].

IV. Jak działa dynamina — mechanoenzym czy GTP-aza regulatorowa?

Mechanizm działania dynaminy wzbudza kontrowersje: czy dynamina działa jak mechanoenzym, czy też jak GTP-aza regulatorowa aktywująca inne efekторы.

Zauważono, że dynamina wykazuje zdolność do oligomeryzacji i samoskładania (ang. *self-assembly*), co ponad 100-krotnie stymuluje jej aktywność GTP-azową. Pierwsze obserwacje dotyczące mechanizmu działania dynaminy poczyniono badając *Drosophila* (wywilżnię karłowkę), u której ulega ekspresji gen *shibire* — mutant dynaminy 1. U tego termowrażliwego mutantu w podwyższonej temperaturze następuje odwracalne zahamowanie endocytozy, co uniemożliwia „recycling” błon i tworzenie pęcherzyków synaptycznych, powodując przejściowy paraliż owadów. W zakończeniach nerwowych zaobserwowano nagromadzenie opłaszczonych klatryną zagłębień i nie w pełni dojrzałych pęcherzyków zawierających struktury przypominające pierścienie dynaminy [45]. Obserwacje te wykorzystano tworząc model działania dynaminy jako enzymu mechanochemicznego (Ryc. 2).

Według tej teorii dynamina (w stanie związanym z GDP) jest kierowana do miejsca, w którym powstaje nowy opłaszczony pęcherzyk. Istotną rolę w tym procesie odgrywają domeny PH i PRD [33, 34]. Po związaniu GTP dochodzi do oligomeryzacji dynaminy, w wyniku której jej dimery łączą się w łańcuch tworząc ściśle upakowane pierścienie i spirale wokół szyjki pęcherzyka [20, 46]. W powstawaniu dimerów istotną rolę odgrywają oddziaływania pomiędzy domenami GED sąsiadujących cząsteczek dynaminy. Natomiast, aby dimery dynaminy mogły utworzyć łańcuch, wymagane są dodatkowe interakcje pomiędzy domeną GED jednej cząsteczki dynaminy a domenami GTP-azową i środkową sąsiedniej (Ryc. 2).

Proces zaciskania spirali dynaminy i odcinania pęcherzyka wciąż pozostaje niejasny. Sugeruje się, że hydroliza GTP wywołuje zmianę konformacji dynaminy, która prowadzi albo do jej zaciśnięcia się

wokół szyjki nowo powstającego pęcherzyka endocytotycznego (ang. „*molecular garrot*” — molekularna obręcz), albo rozciągnięcia skoku spirali (ang. „*molecular spring*” — molekularna sprężyna), co w konsekwencji powoduje jego oderwanie się od błony komórkowej [3, 35, 42, 47].

Szczegółowa analiza aktywności GTP-azowej dynaminy stymulowanej przez jej oligomeryzację doprowadziła do odkrycia, że dynamina ma wewnętrzną zdolność do zwiększania swojej aktywności GTP-azowej: koduje własne białko GAP (ang. *GTP-ase activating protein*). Za tę właściwość odpowiedzialna jest domena GED [27, 28]. Drugi model sugeruje więc funkcję dynaminy jako GTP-azy regulatorowej, która „wyselekcjonowuje” inne białka efektorowe do miejsc zachodzenia endocytozy [28, 30, 42].

Na podstawie doświadczeń na liniach komórkowych HeLa, BHK i A431 z zastosowaniem mutantów dynaminy, zarówno w domenie GED, jak i GTP-azowej, stwierdzono, że hydroliza GTP powoduje inaktywację dynaminy i jej rozpad, co jest istotne dla procesu rozszczepienia błony. Z drugiej strony skuteczna oligomeryzacja dynaminy nie jest konieczna do powstania pęcherzyka. Możliwe więc, że istnieją inne białka regulujące cykl GTP-azowy dynaminy *in vivo* [28, 30, 42].

Natomiast Marks i wsp. [48] wykazali, że do prawidłowej funkcji dynaminy w endocytozie niezbędna jest zarówno hydroliza GTP, jak i zachodząca w jej wyniku zmiana konformacyjna.

V. Izoforny dynamin ssaków i ich rola w komórce

U ssaków zidentyfikowano do tej pory trzy izoforny dynaminy, charakteryzujące się odmienną lokalizacją oraz funkcją.

Dynamina 1 ulega najsilniejszej ekspresji w mózgu, gdzie bierze udział w „recydingu” pęcherzyków synaptycznych [49]. Dynamina 2 jest obecna w całym organizmie i odgrywa rolę w endocytozie zachodzącej za pośrednictwem pęcherzyków opłaszczonych klatryną zarówno na błonie komórkowej [18], jak i w aparacie Golgiego [50, 51]. Ponadto stwierdzono, że dynamina 2 prawdopodobnie uczestniczy w procesie fagocytozy w makrofagach na etapie „rozciągania” błony wokół fagocytowanej cząstki [13]. Najnowsze badania sugerują rolę dynaminy 2 jako cząsteczki biorącej udział w przekazywaniu sygnału w odpowiedzi na bodźce transkrypcyjne i apoptotyczne [52].

Dynamina 3, której funkcja nie jest jeszcze dokładnie poznana, została po raz pierwszy zidentyfikowana w jądrach szczura [53], gdzie prawdopodobnie odgrywa istotną rolę w spermatogenezie [54]. Dalsze badania pokazały, że występuje ona również w sercu, płucach oraz w mózgu [55], gdzie zlokalizowana jest w obszarze postsynaptycznym i może odgrywać istotną rolę w morfogenezie kolców dendrytycznych [56]. Ostatnio zidentyfikowano specyficzną dla mózgu izofornę dynaminy 3, której aktywność jest regulowana przez poziom hormonów tarczycy: zaobserwowano istotny wzrost poziomu mRNA dla tej izoforny w hypotyroidyzmie. Uważa się, że odgrywa ona istotną rolę w synaptogenezie w centralnym układzie nerwowym [57].

Wszystkie trzy geny kodujące konwencjonalne dynaminy (Dyn1, Dyn2, Dyn3) ulegają ekspresji w mózgu, gdzie wykryto obecność ponad 27 różnych białek dynaminowych powstających w wyniku alternatywnego cięcia i składania pierwotnych transkryptów. Stwierdzono ponadto, że Dyn1 i Dyn3 występują w odmiennych miejscach synapsy: Dyn1 przede wszystkim w przedziale presynaptycznym, natomiast Dyn3 — w zakończeniach kolców dendrytycznych. Sugeruje to, że Dyn3 jest białkiem postsynaptycznym i odgrywa rolę w morfogenezie oraz przebudowie kolców dendrytycznych [56].

Endocytotyczny szlak zależny od dynaminy jest wykorzystywany przez wiele wirusów (np. Hantaan, grypy) do inwazji komórek. Wirusy Hantaan wywołują niezwykle groźne choroby (gorączka krwotoczna). W Chinach liczba zachorowań w latach 1950-1997 wynosiła 1 256 431 (osiągając 115 985 przypadków w 1985 roku), z czego 44 304 osób zmarło. W doświadczeniach na komórkach HeLa udowodniono, że wirus ten dostaje się do komórek szlakiem zależnym od dynaminy i klatryny, ponieważ nadekspresja negatywnego mutantu dynaminy (K44A) powodowała zahamowanie internalizacji wirusa [58].

VI. Białka dynamino-podobne — różnorodność funkcji

VI-1. Od białek drożdżowych do ludzkich

U drożdży znaleziono białko dynamino-podobne Vps1 (ang. *vacuolar protein sorting*) odgrywające istotną rolę w powstawaniu pęcherzyków opłaszczonych klatryną w obrębie TGN (ang. *trans-Golgi network*) [58]. Homolog tego białka (VpsA) wykryto także u grzyba z gatunku *Asperillus nidulans* [60].

Ponadto u drożdży zidentyfikowano dwa białka: Mgm1 i Dnm1, zaangażowane w utrzymanie prawidłowej morfologii mitochondriów [61-63]. U ssaków oraz *C. elegans* wykryto homolog drożdżowego białka Dnm1 — Drp1 (ang. *dynamin-related protein*), które nie tylko występuje w mitochondriach [62], ale prawdopodobnie bierze również udział w transporcie pęcherzyków sekrecyjnych z aparatu Golgiego [64]. Innym białkiem dynamino-podobnym związanym również z błonowym przedziałem sekrecyjnym jest ssacz DLPI, które ulega ekspresji w sposób tkankowo-specyficzny i zawiera dwa regiony podlegające alternatywnemu składaniu [65].

U człowieka zidentyfikowano białko dynamino-podobne — OPA1 (homolog drożdżowego białka Mgm1), którego mutacje powodują wystąpienie neuropatii wzrokowej (DOA, ang. *dominant optic atrophy*) u człowieka. Jest to choroba dziedziczna objawiająca się między innymi stopniowym spadkiem ostrości widzenia prowadzącym aż do całkowitej utraty wzroku, spowodowanej degeneracją komórek zwojowych siatkówki (ich aksony tworzą nerw wzrokowy). Do tej pory wykryto już ponad 60 mutacji, z których większość występuje w domenie GTP-azowej białka OPA 1 [66]. OPA1 odgrywa istotną rolę w utrzymaniu prawidłowej struktury i morfologii mitochondriów. Podobnie jak większość białek dynamino-podobnych nie zawiera domeny PRD, GED i PH, ma natomiast domenę GTP-azową oraz około stu-aminokwasową sekwencję sygnałową odpowiedzialną za mitochondrialną lokalizację tego białka [66-67].

Ostatnio stwierdzono obecność dwóch białek należących do rodziny dynamin: *ParD1* (AY386320) i *ParD2* (AF351193) u jednokomórkowego orzęska *Paramecium* należącego do najstarszych komórek eukariotycznych, gdyż pojawił się około 1,5 miliarda lat temu [68-69]. Sklonowane fragmenty genów (1091 nukleotydów) stanowią fragment otwartej ramki odczytu dla 363 aminokwasów, który obejmuje region kodujący N-końcową domenę GTP-azową ze wszystkimi trzema motywami wiążącymi GTP (G1, G2 i G3), wykazującą bardzo wysoki stopień homologii (78%) do dynamin ssaków oraz domenę środkową. Sekwencje motywów G1 i G2 są identyczne w obu izoformach dynaminy, odpowiednio: ¹QSAGKSS⁷ i ¹⁰⁰DLPG¹⁰³. Natomiast trzeci motyw jest odmienny: ¹⁶⁹TQLD¹⁷² w *ParD1* i ¹⁶⁹TKLD¹⁷² w *ParD2*. Obecna jest również stabilna ewolucyjnie treonina²⁶ będąca częścią tzw. "znacznika rodziny dynamin" (¹⁸LPRGKGIVTR²⁷) [19].

Pierwszy sklonowany gen kodujący dynaminę u *Paramecium* (*ParD2*) wykazuje najwyższą homolo-

gię do dynaminy 2 ssaków, natomiast drugi (*ParD1*) — do dynaminy 1 ssaków. Sekwencje te wykazują 90.1% identyczności. Zidentyfikowano dwa immunoreaktywne polipeptydy o wielkości ~116 kDa i ~90 kDa reagujące ze specyficznym przeciwciałem anty-peptydowym skierowanym wobec sklonowanego fragmentu domeny GTP-azowej dynaminy *Paramecium* [68, 71].

Wykazano też, że dynamina *Paramecium* odgrywa istotną rolę w fagocytozie [68], desensytyzacji receptorów błonowych [69] oraz endocytozie zależnej od receptorów: zlokalizowano ją na obrzeżach nowo tworzonych endosomów zawierających transferynę [70-71].

VI-2. Białka roślinne

Białka dynamino-podobne występują również u roślin. Fragmoplastyna, znaleziona w ziarnach soi, bierze udział w transporcie pęcherzyków z aparatu Golgiego do miejsc powstawania ściany komórkowej podczas cytokinezy [72-74]. U *Arabidopsis* zidentyfikowano już co najmniej 6 białek dynamino-podobnych (ADL, ang. *Arabidopsis dynamin-like*). ADL1 zlokalizowany jest w chloroplastach i bierze udział w biogenezie błon tylakoidów [75-76]. Ostatnio wykryto dwie nowe izoformy tego białka: ADL1C i ADL1E, które odgrywają istotną rolę w morfogenezie mitochondriów [77]. Podobną funkcję spełniają dwie izoformy białka ADL2: ADL2a i ADL2b, które wykazują 76.7% identyczności i są zaangażowane w podział mitochondriów [78]. ADL3 wykazuje niski stopień homologii do innych roślinnych białek dynamino-podobnych oraz podobnie jak dynamina ssaków, zawiera domenę plekstrynową, lecz funkcja tego białka nie jest jeszcze znana [79]. ADL6 jest pierwszym roślinnym przedstawicielem tej dużej nadrodziny zaangażowanym w transport pęcherzyków opłaszczonych klatryną z aparatu Golgiego. Stwierdzono, że zawiera ono domenę plekstrynową oraz motyw bogaty w prolinę na C-końcu [80], a jego aktywność GTP-azowa jest regulowana przez wiązanie kwaśnych fosfolipidów i białek zawierających domenę SH3 [81-82].

VI-3. Białka Mx i hGBP o własnościach antywirusowych

Niektóre białka dynamino-podobne mają aktywność antywirusową i powodują zablokowanie replikacji wirusów lub też hamują proces ich wnikania do komórek.

Jest to między innymi rodzina białek Mx, odpowiedzialnych za odporność na infekcje wirusowe, których synteza indukowana jest przez interferon [67, 83]. Podobnie jak inne białka dynamino-podobne, zawierają one domenę GTP-azową oraz zmienny C-koniec, który określa ich funkcję i lokalizację, np. mysie białko Mx1 zlokalizowane jest w jądrze komórkowym, gdzie wpływa na transkrypcję RNA [84], podczas gdy ludzkie białko MxA występuje w cytoplazmie i zaangażowane jest prawdopodobnie w hamowanie transportu wirusów do jądra komórkowego [85].

Białka Mx mają zdolność do oligomeryzacji. Regionem odpowiedzialnym za ten proces okazał się obszar pomiędzy pierwszym a drugim motywem wiążącym GTP w N-końcowej domenie GTP-azowej [86] oraz motyw „palca cynkowego” w C-końcowej części białka, który funkcjonalnie odpowiada domenie GED dynaminy [87] oraz oddziałuje z nukleokapsydami wirusowymi [85, 88]. Wykrywanie infekcji wirusowej przez białka Mx polega na rozpoznawaniu nukleokapsydów. Przypuszcza się, że białka MxA owijając się wokół nich uniemożliwiają ekspozycję sekwencji lokalizacji jądrowej. Inny proponowany mechanizm działania MxA polega na tym, że nukleokapsydy są wychwytywane i kierowane do innych (niż docelowe) miejsc w komórce, gdzie są unieruchamiane, a następnie degradowane. Wykazano to w przypadku wirusa La Crosse (LACV), którego nukleokapsydy uległy przemieszczeniu z miejsc replikacyjnych w okolicy aparatu Golgiego do obszaru perinuklearnego. Uniemożliwia to transkrypcję genomu wirusowego [89].

Innym białkiem o działaniu antywirusowym jest hGBP1 (ang. *human guanylate-binding protein 1*). Jest to również pierwsze białko z nadrodziny GTP-az o znanej strukturze atomowej, poznanej z użyciem krystalografii rentgenowskiej [90]. Składa się ono z dwóch głównych domen: globularnej domeny wiążącej GTP oraz wydłużonej domeny o strukturze α -helisy. Unikalną cechą białka hGBP1 jest zdolność do przemiany GTP w GMP [91]. Wykryto również dwa inne białka z tej grupy: hGBP2 i hGBP3. Wszystkie one nie zawierają trzeciego motywu wiążącego GTP w domenie GTP-azowej [92]. Wydaje się, że ich działanie polega na zahamowaniu replikacji wirusa (np. zapalenia jamy ustnej) [93].

VII. Uwagi końcowe

Dynamina i białka dynamino-podobne są obiektem intensywnych badań ze względu na różnorodne funkcje, jakie odgrywają w wielu procesach istot-

nych dla życia komórki i całego organizmu. Szczególne zainteresowanie badaczy skupia się na poszukiwaniu mutacji w kodujących je genach, które są podłożem dziedzicznych chorób człowieka.

Wyniki badań z ostatnich kilku lat przyniosły wiele zaskakujących informacji zarówno na temat udziału szlaku zależnego od dynaminy we wnikaniu wirusów do komórek ssaków, jak i o antywirusowym działaniu niektórych białek dynamino-podobnych, które hamują replikację wirusów.

Artykuł otrzymano 5 kwietnia 2004

Zaakceptowano do druku 19 lipca 2004

Piśmiennictwo

1. Shpetner HS, Vallee RB (1989) *Cell* 59: 421-432
2. Obar RA, Collins CA, Hammarback JA, Shpetner HS, Vallee RB (1990) *Nature* 347: 256-261
3. McNiven MA, Cao H, Pitts KR, Yoon Y (2000) *Trends Biochem Sci* 25: 115-20
4. Oh P, McIntosh P, Schnitzer JE (1998) *J Cell Biol* 141: 101-114
5. Herskovits JS, Burgess CC, Obar RA, Vallee RB (1993) *J Cell Biol* 122: 565-578
6. Damke H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL (1994) *J Cell Biol* 127: 915-934
7. Hinshaw JE (2000) *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 483-519
8. Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Aber MJ, Giros B, Lefkowitz RJ, Caron MG (1997) *Receptors Channels* 5: 193-199
9. Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Menard L, Caron MG (1996) *J Biol Chem* 271: 18302-18305
10. Carroll RC, Beattie EC, Xia H, Luscher C, Altschuler Y, Nicoll RA, Malenka RC, von Zastrow M (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14112-14117
11. McPherson PS, Kay BK, Hussain NK (2001) *Traffic* 2: 375-384
12. Ahn S, Kim J, Lucaveche CL, Reedy MC, Luttrell LM, Lefkowitz RJ, Daaka Y (2002) *J Biol Chem* 277: 26642-26651
13. Gold ES, Underhill DM, Morrisette NS, Guo J, McNiven MA, Aderem A (1999) *J Exp Med* 190: 1849-1856
14. Tse SM, Furuya W, Gold E, Schreiber AD, Sandvig K, Inman RD, Grinstein S (2003) *J Biol Chem* 278: 3331-3338
15. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youlc RJ (2001) *Dev Cell* 1: 515-525
16. Kelly RB (1999) *Nat Cell Biol* 1: E8-E9
17. Muhlberg AB, Schmid SL (2000) *Methods* 20: 475-483
18. Van der Blik AM (1999) *Trends Cell Biol* 9: 96-102
19. Niemann HH, Knetsch ML, Scherer A, Manstein DJ, Kull FJ (2001) *EMBO J* 20: 5813-5821
20. Smirnova E, Shurland DL, Newman-Smith ED, Pishvae B, van der Blik AM (1999) *J Biol Chem* 274: 14942-14947
21. Granta D, Unadkat S, Katzenc A, Krishnanb KS, Ramaswamia M (1998) *Genetics* 149: 1019-1030
22. Shaw G (1996) *Bioessays* 18: 35-46
23. Jost M, Simpson F, Kavran JM, Lemmon MA, Schmid SL (1998) *Curr Biol* 8: 1399-1402
24. Vallis Y, Wigge P, Marks B, Evans PR, McMahon HT (1999) *Curr Biol* 9: 257-260

25. Achiriloaie M, Barylko B, Albanesi JP (1999) *Mol Cell Biol* 19: 1410-1415
26. Lin HC, Gilman AG (1996) *J Biol Chem* 271: 27979-27982
27. Muhlberg AB, Warnock DE, Schmid SL (1997) *EMBO J* 16: 6676-6683
28. Sever S, Muhlberg AB, Schmid SL (1999) *Nature* 398: 481-486
29. Binns DD, Helms MK, Barylko B, Davis CT, Jameson DM, Albanesi JP, Eccleston JF (2000) *Biochemistry* 39: 7188-7196
30. Sever S, Damke H, Schmid SL (2000) *J Cell Biol* 150: 1137-1148
31. Scales SJ, Scheller RH (1999) *Nature* 401: 123-124
32. Reutens AT, Begley CG (2002) *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1173-1177
33. Okamoto PM, Herskovits JS, Vallee RB (1997) *J Biol Chem* 272: 11629-11635
34. Shpetner HS, Herskovits JS, Vallee RB (1996) *J Biol Chem* 271: 13-16
35. Sweitzer SM, Hinshaw JE (1998) *Cell* 93: 1021-1029
36. Orth JD, Krueger EW, Cao H, McNiven MA (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 167-172
37. Qualmann B, Kelly RB (2000) *J Cell Biol* 148: 1047-1062
38. Cao H, Orth JD, Chen J, Weller SG, Heuser JE, McNiven MA (2003) *Mol Cell Biol* 23: 2162-2170
39. Olazabal IM, Machesky LM (2001) *J Cell Biol* 154: 679-682
40. Witke W, Podtelejnikov AV, Di Nardo A, Sutherland JD, Gurniak CB, Dotti C, Mann M (1998) *EMBO J* 17: 967-976
41. Salazar MA, Kwiatkowski AV, Pellegrini L, Cestra G, Butler MH, Rossman KL, Serna DM, Sonddek J, Gertler FB, De Camilli P (2003) *J Biol Chem* 278: 49031-49043
42. Sever S, Damke H, Schmid SL (2000) *Traffic* 1: 385-392
43. Robinson PJ, Sontag JM, Liu JP, Fykse EM, Slaughter C, McMahon H, Sudhof TC (1993) *Nature* 365: 163-166
44. Ahn S, Maudsley S, Luttrell LM, Lefkowitz RJ, Daaka Y (1999) *J Biol Chem* 274: 1185-1188
45. Song BD, Schmid SL (2003) *Biochemistry* 42: 1369-1376
46. Stowell MH, Marks B, Wigge P, McMahon HT (1999) *Nat Cell Biol* 1: 27-32
47. McNiven MA (1998) *Cell* 94: 151-154
48. Marks B, Stowell MH, Vallis Y, Mills IG, Gibson A, Hopkins CR, McMahon HT (2001) *Nature* 410: 231-235
49. De Camilli P, Takei K, McPherson PS (1995) *Curr Opin Neurobiol* 5: 559-565
50. Jones SM, Howell KE, Henley JR, Cao H, McNiven MA (1998) *Science* 279: 573-577
51. Cao H, Thompson HM, Krueger EW, McNiven MA (2000) *J Cell Sci* 113: 1993-2002
52. Fish KN, Schmid SL, Damke H (2000) *J Cell Biol* 150: 145-154
53. Nakata T, Takemura R, Hirokawa N (1993) *J Cell Sci* 105: 1-5
54. Kamitani A, Yamada H, Kinuta M, Watanabe M, Li SA, Matsukawa T, McNiven M, Kumon H, Takei K (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 294: 261-267
55. Cook T, Mesa K, Urrutia R (1996) *J Neurochem* 67: 927-931
56. Gray NW, Fourgeaud L, Huang B, Chen J, Cao H, Oswald BJ, Hemar A, McNiven MA (2003) *Curr Biol* 13: 510-515
57. Arnold AM, Anderson GW, McIver B, Eberhardt NL (2003) *Int J Dev Neurosci* 21: 267-275
58. Jin M, Park J, Lee S, Park B, Shin J, Song KJ, Ahn TI, Hwang SY, Ahn BY, Ahn K (2002) *Virology* 294: 60-69
59. Bensen ES, Costaguta G, Payne GS (2000) *Genetics* 154: 83-97
60. Tarutani Y, Ohsumi K, Arioka M, Nakajima H, Kitamoto K (2001) *Gene* 268: 23-30
61. Gammie AE, Kurihara LJ, Vallee RB, Rose MD (1995) *J Cell Biol* 130: 553-566
62. Otsuga D, Keegan BR, Brisch E, Thatcher JW, Hermann GJ, Bleazard W, Shaw JM (1998) *J Cell Biol* 143: 333-349
63. Shepard KA, Yaffe MP (1999) *J Cell Biol* 144: 711-720
64. Imoto M, Tachibana I, Urrutia R (1998) *J Cell Sci* 111: 1341-1349
65. Yoon Y, Pitts KR, Dahan S, McNiven MA (1998) *J Cell Biol* 140: 779-793
66. Delettre C, Lenaers G, Pelloquin L, Belenguer P, Hamel CP (2002) *Mol Genet Metab* 75: 97-107
67. Kierczak M, Surmacz L, Wiejak J, Wyroba E (2003) *Post Hig Med Dośw* 57: 727-737
68. Wiejak J, Surmacz L, Wyroba E (2003) *Eur J Protistol* 39: 416-422
69. Wiejak J, Surmacz L, Wyroba E (2004) *J Exp Biol* 207: 1625-1632
70. Surmacz L, Wiejak J, Wyroba E (2003) *Biol Cell* 95: 69-74
71. Wiejak J, Surmacz L, Wyroba E (2004) *Biochem Cell Biol* 82: 547-558
72. Gu X, Verma DP (1996) *EMBO J* 15: 695-704
73. Gu X, Verma DP (1997) *Plant Cell* 9: 157-169
74. Zhang Z, Hong Z, Verma DP (2000) *J Biol Chem* 275: 8779-8784
75. Park JM, Kang SG, Pih KT, Jang HJ, Piao HL et al. (1997) *Plant Physiol* 115: 763-771
76. Park JM, Cho JH, Kang SG, Jang HJ, Pih KT et al. (1998) *EMBO J* 17: 859-867
77. Jin JB, Bae H, Kim SJ, Jin YH, Goh CH, Kim DH, Lee YJ, Tse YC, Jiang L, Hwang I (2003) *Plant Cell* 15: 2357-2369
78. Arimura S, Aida GP, Fujimoto M, Nakazono M, Tsutsumi N (2004) *Plant Cell Physiol* 45: 236-242
79. Mikami K, Iuchi S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000) *J Exp Bot* 51: 317-318
80. Jin JB, Kim YA, Kim SJ, Lee SH, Kim DH, Cheong GW, Hwang I (2001) *Plant Cell* 13: 1511-1526
81. Lam BC, Sage TL, Bianchi F, Blumwald E (2002) *Plant J* 31: 565-576
82. Lee SH, Jin JB, Song J, Min MK, Park DS, Kim YW, Hwang I (2002) *J Biol Chem* 277: 31842-31849
83. Pavlovic J, Schroder A, Blank A, Pitossi F, Stachelin P (1993) *Ciba Found Symp* 176: 233-243
84. Krug RM, Shaw M, Broni B, Shapiro G, Haller O (1985) *J Virol* 56: 201-206
85. Kochs G, Haller O (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2082-2086
86. Nakayama M, Yazaki K, Kusano A, Nagata K, Hanai N, Ishihama A (1993) *J Biol Chem* 268: 15033-15038
87. Schwemmler M, Richter MF, Herrmann C, Nassar N, Stachelin P (1995) *J Biol Chem* 270: 13518-13523
88. Flohr F, Schneider-Schaulies S, Haller O, Kochs G (1999) *FEBS Lett* 463: 24-28
89. Haller O, Kochs G (2002) *Traffic* 3: 710-717
90. Prakash B, Praefcke GJ, Renault L, Wittinghofer A, Herrmann C (2000) *Nature* 403: 567-571
91. Praefcke GJ, Geyer M, Schwemmler M, Kalbitzer RH, Herrmann C (1999) *J Mol Biol* 292: 321-332
92. Luan Z, Zhang Y, Liu A, Man Y, Cheng L, Hu G (2002) *FEBS Lett* 530: 233-238
93. Anderson SL, Carton JM, Lou J, Xing L, Rubin BY (1999) *Virology* 256: 8-14

Układ fibrynolityczny w rozwoju miażdżycy

Fibrinolytic system in atherogenesis

JOANNA KOŁODZIEJCZYK¹, PAWEŁ NOWAK²

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Układ fibrynolityczny
 - II-1 Aktywatory plazminogenu
 - II-2. Inhibitory fibrynolizy
- III. Metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej
- IV. Metaloproteazy i układ fibrynolityczny
- V. Układ fibrynolityczny w miażdżycy
- VI. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Fibrinolytic system
 - II-1. Plasminogens' activators
 - II-2. Fibrinolysis inhibitors
- III. Metalloproteinases
- IV. Metalloproteinases and fibrinolytic system
- V. Fibrinolytic system in atherosclerosis
- VI. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: α_2 -AP — α_2 -antyplazmina; ECM — macierz zewnątrzkomórkowa; FDP — produkty degradacji fibryny (fibrynogenu); IL-1 — interleukina 1; MMPs — metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej; LBS — miejsca wiążące lizynę; MT-MMPs metaloproteazy błonowe; PAI-1, PAI-2 — inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, 2; Plg — plazminogen; TAFI — inhibitor fibrynolizy wrażliwy na trombinę; TIMPs — tkankowe inhibitory metaloproteaz; TNF- α — czynnik martwicy nowotworów; t-PA — aktywator plazminogenu typu tkankowego; sct-PA — jednołańcuchowa forma t-PA; tct-PA — dwułańcuchowa forma t-PA; u-PA — aktywator plazminogenu typu urokinazowego; u-PAR receptor aktywatora plazminogenu typu urokinazowego.

I. Wprowadzenie

Odpowiedzią organizmu na uszkodzenie ściany naczynia krwionośnego jest inicjacja procesu krzepnięcia krwi prowadząca do przekształcenia rozpuszczalnego fibrynogenu w nierozpuszczalną fibrynę (włóknik). Powstający skrzep hamuje krwawienie, a po spełnieniu swojej roli jest upłynniany na drodze fibrynolizy. Równowaga pomiędzy procesami krzepnięcia i fibrynolizy umożliwia utrzymanie płynności krwi. Układ fibrynolityczny składa się z czterech głównych elementów: aktywatorów plazminogenu, inhibitorów aktywatorów plazminogenu, plazminogenu i inhibitorów plazminy i jest zaangażowany nie

tylko w usuwanie skrzepliny, ale także w przebudowę tkanek, angiogenezę i gojenie ran. Uczestniczy również w procesach patologicznych, m.in. w patogenezie niedokrwienia mięśnia sercowego, powstawaniu tętniaków, progresji zmian nowotworowych, a także w rozwoju miażdżycy.

Podczas rozwoju zmian miażdżycowych, zachodzących przy udziale metaloproteaz macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *Matrix metalloproteinases*, MMPs), dochodzi do degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *Extracellular matrix*, ECM), migracji komórek i przebudowy tkanek. W aktywacji metaloproteaz uczestniczy układ fibrynolityczny. Wskazuje to na duże znaczenie układu fibrynolitycznego w progresji zmian miażdżycowych, nie tylko poprzez bezpośrednie działanie na powstającą skrzeplinę.

II. Układ fibrynolityczny

Charakterystykę składników układu fibrynolitycznego podano w tabeli I, a schemat aktywacji tego układu na rycinie 1.

Do głównych aktywatorów plazminogenu należą aktywator plazminogenu typu tkankowego (t-PA, ang. *tissue — type plasminogen activator*) oraz aktywator plazminogenu typu urokinazowego (u-PA, ang. *urokinase — type plasminogen activator*). W wyniku działania aktywatorów nieaktywny plazminogen jest przekształcany w aktywną plazminę. Do inhibitorów aktywatorów plazminogenu zaliczane są: inhibitor typu 1 (PAI-1, ang. *plasminogen activa-*

¹Mgr, ²dr, Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, tel./fax (042) 635-44-84, e-mail: joannak@biol.uni.lodz.pl.

tor inhibitor — 1) oraz inhibitor typu 2 (PAI-2, ang. *plasminogen activator inhibitor* — 2). Hamowania aktywnej plazminy dokonuje głównie α_2 -antyplazmina (α_2 -AP).

Plazminogen (Plg) jest jednołańcuchowym zymo-

krwionośnego może występować w formie jednołańcuchowej (sct-PA, ang. *single chain tissue plasminogen activator*) lub dwułańcuchowej (tct-PA, ang. *two chain tissue plasminogen activator*) [3]. Aktywacji fibrylizy wewnątrznaczyniowej dokonuje

Tabela 1.

Wybrane wartości charakteryzujące składniki układu fibrynolitycznego [wg. 1, 31, zmienione].

Białko	Masa	Liczba reszt	Miejsce	Stężenie w
	cząsteczkowa (kDa)	aminokwasowych	reaktywne/katalityczne	osoczu (mg/l)
Plazminogen	92	791	proenzym	200,0
Plazmina	85	715	His603, Asp646, Ser741	-
t-PA	68	527	His322, Asp371, Ser478	0,005
u-PA	54	411	His204, Asp255, Ser356	0,008
u-PAR	55-60	313	białko receptorowe	-
α_2 -antyplazmina	67	464	Arg376-Met377	70,0
PAI-1	52	379	Arg346-Met347	0,05
PAI-2	47	393	Arg358-Thr359	<0,005

genem, który na skutek rozerwania wiązania Arg561/Val562 przechodzi w dwułańcuchową aktywną formę — plazminę (Plm), należąca do proteaz serynowych. W cząsteczce plazminogenu wyróżnia się 7 domen: peptyd aktywacyjny, domenę proteazową oraz 5 tzw. struktur kringlowych, które zawierają miejsca wiążące lizynę (LBS, ang. *lysine binding sites*). Za ich pośrednictwem plazminogen wiąże się z powierzchnią włókniaka i oddziałuje z aktywatorami bądź inhibitorami fibrylizy oraz receptorami komórkowymi [1]. N-końcowy fragment natywnej cząsteczki plazminogenu (Glu-plazminogenu) stanowi peptyd aktywacyjny usuwany w wyniku hydrolizy wiązania Lys77/Val78, a powstająca w ten sposób cząsteczka Lys-plazminogenu jest bardziej wrażliwa na działanie aktywatorów [2].

II-1. Aktywatory plazminogenu

Aktywator plazminogenu typu tkankowego (t-PA) pochodzący głównie z komórek śródbłonna naczyń

głównie t-PA. Aktywator plazminogenu typu urokinazowego aktywuje ten zymogen w przestrzeniach pozanaczyniowych.

II-2. Inhibitory fibrylizy

Działanie aktywatorów plazminogenu i plazminy jest hamowane odpowiednio przez inhibitory PAI-1, PAI-2 oraz przez α_2 -antyplazminę. Należą one do inhibitorów proteaz serynowych (SERPINs, ang. *serine proteinase inhibitors*). Inhibitory te zawierają sekwencję aminokwasową rozpoznawaną przez miejsca wiążące odpowiednich proteaz jako substrat. Prowadzi to do powstania kowalencyjnego kompleksu enzym-inhibitor i zahamowania aktywności proteolitycznej enzymu [4].

PAI-1 jest syntetyzowany w komórkach śródbłonna, komórkach mięśni gładkich ściany naczyń i w komórkach wątroby. Jest on głównym fizjologicznym inhibitorem aktywatorów: t-PA i u-PA [5, 6]. Jednym z najczęstszych zaburzeń funkcji

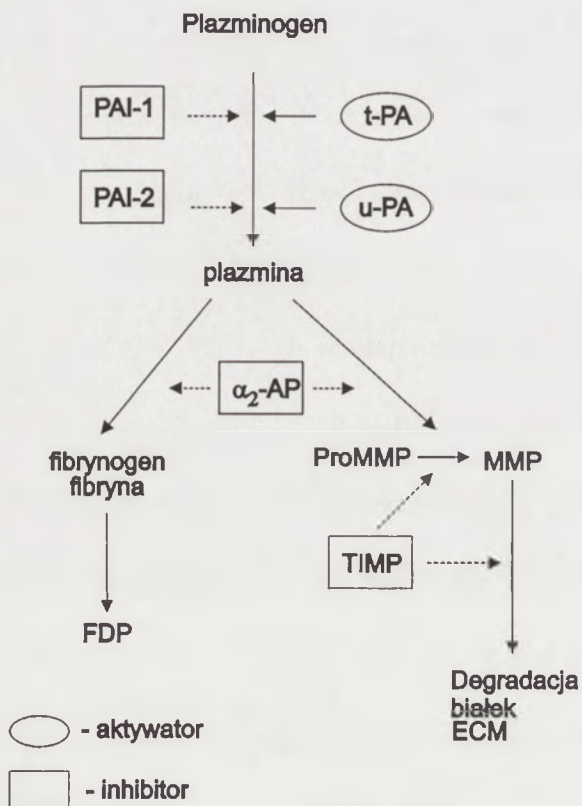
układu fibrynolitycznego jest zwiększone stężenie inhibitora PAI-1 przy jednoczesnym niedoborze t-PA. W osoczu kobiet ciężarnych pojawia się inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 2 (PAI-2), który syntetyzowany jest głównie przez monocyty [7]. Głównym osoczym inhibitorem plazminy jest α_2 -antyplazmina [8, 9].

Trombina odgrywa kluczową rolę w procesie krzepnięcia przekształcając fibrynogen w fibrynę (włóknik). Aktywuje ponadto prometaloproteazę 2 (proMMP-2) [10] i wpływa hamująco na fibrylizację dokonując aktywacji inhibitora fibrylizacji wrażliwego na trombinę (TAFI, ang. *thrombin-activatable*

III. Metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej

Metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej są endopeptydazami zależnymi od cynku. Dokonują one degradacji białek macierzy zewnątrzkomórkowej [13, 14]. Umożliwia to przebudowę tkanek i zachodzi zarówno w procesach fizjologicznych, jak i niektórych stanach chorobowych [15, 16].

W budowie metaloproteaz wyróżnia się trzy charakterystyczne domeny: domenę sygnałową (17-29 aa), domenę propeptydową (78-87 aa) i domenę katalityczną (ok. 170 aa), która zawiera jony cynku i jony wapnia [15, 17] (Ryc. 2). Domena propeptydowa zawiera konserwatywną sekwencję PRCG(V/N)PD, a obecna w niej cysteina, poprzez oddziaływanie z atomem cynku z domeny katalitycznej, utrzymuje metaloproteazy w formie nieaktywnej [18]. Do aktywacji dochodzi po usunięciu domeny propeptydowej [19, 20]. Dotychczas zidentyfikowano 23 metaloproteazy. Na podstawie różnic w ich budowie (obecność dodatkowych domen) oraz rodzaju substratów, na które działają, podzielono je na 5 klas: kolagenazy, żelatynazy, stromielizyny, metaloproteazy błonowe (MT-MMPs, ang. *membrane-type matrix metalloproteinases*) i matrylizyny [21]. Metaloproteazy są syntetyzowane przez fibroblasty, komórki mięśni gładkich i komórki śródbłonna w formie zymogenów [22, 23]. Opisane zostały trzy typy aktywacji zymogenów metaloproteaz: aktywacja stopniowa, aktywacja na powierzchni komórek przy udziale MT-MMPs oraz aktywacja wewnątrzkomórkowa. W aktywację stopniową zaangażowane są nie tylko liczne enzymy proteolityczne: trypsyna, elastaza, kalikreina, ale i również enzym fibrynolityczny — plazmina. Spośród tych proteaz plazmina uważana jest za główny fizjologiczny aktywator. Plazmina działa na wiązanie peptydowe w domenie propeptydowej metaloproteaz. Powoduje to zmianę konformacji proenzymu i odblokowanie miejsca aktywacji, które staje się dostępne dla innej proteazy, należącej zwykle do metaloproteaz. Aktywacja metaloproteaz na powierzchni błon komórkowych i degradacja białek ECM w najbliższym otoczeniu ma istotne znaczenie podczas migracji komórek. Niektóre MMPs mogą być aktywowane wewnątrzkomórkowo. Pro-stromielizyna-1 (proMMP-3) może być aktywowana przez zasocjowaną z aparatem Golgiego proteazę subtilizynopodobną (ang. *subtilisin-like proteinase furin*) i wydzielana z komórki już jako aktywny enzym [24]. Hamowanie aktywności enzymatycznej MMPs odbywa się przy udziale specyficznych tkankowych inhibitorów (TIMPs, ang. *tissue inhibitors of matrix*



Ryc. 1. Układ fibrynolityczny. Plazminogen jest aktywowany do plazminy przez aktywatory: t-PA i u-PA. Inhibicja aktywności fibrynolitycznej może zachodzić na dwóch poziomach: hamowania aktywacji plazminogenu (PAI-1, PAI-2) lub hamowania aktywności plazminy (α_2 -antyplazmina). Plazmina aktywuje prometaloproteazy, których aktywność jest regulowana przy udziale tkankowych inhibitorów metaloproteaz (TIMPs). W osoczu pod wpływem plazminy dochodzi do degradacji fibrynogenu oraz fibryny i powstania produktów degradacji fibrynogenu/fibryny (FDP).

fibrynolysis inhibitor). Działa on poprzez usuwanie reszt lizylowych z C-końcowych części łańcuchów polipeptydowych degradowanej fibryny [11]. Plazmina związana z resztami lizylowymi jest chroniona przed inaktywacją przez α_2 -antyplazminę. TAFI eliminuje reszty lizylowe, uniemożliwia przyłączenie plazminy do włóknika i w ten sposób ogranicza fibrylizację [12].

metalloproteinases) [25-28]. Inhibitory mogą łączyć się zarówno z aktywnymi jak i z nieaktywnymi metaloproteazami (proMMPs) uniemożliwiając w ten sposób ich aktywację. Aktywność metaloproteaz może być także regulowana na poziomie transkrypcyjnym poprzez działanie cytokin, hormonów i czynników wzrostu (np. TNF- α) [29].

IV. Metaloproteazy i układ fibrynolityczny

Proteazy układu fibrynolitycznego mają wpływ na aktywność różnorodnych metaloproteaz. W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że plazmina ma zdolność do bezpośredniej aktywacji: proMMP-1, proMMP-3, proMMP-9, proMMP-10 i proMMP-13 [8, 17]. Aktywacja proMMP-2 wymaga wcześniejszej hydrolizy określonych wiązań przez MT1-MMP i dopiero tak powstały produkt pośredni może być aktywowany przez plazminę. ProMMP-2 jest aktywowana także przez urokinazowy aktywator plazminogenu. MMP-3 i MMP-7 mogą usuwać z scu-PA domenę wiążącą receptor u-PAR i przekształcać scu-PA do formy o niższej masie cząsteczkowej [26]. Substratem dla metaloproteaz: MMP-3, MMP-7, MMP-9 i MMP-12 może być również cząsteczka plazminogenu. MMP-12 rozszczepia plazminogen powodując powstanie fragmentu peptydowego podobnego do angiostatyny, zawierającego domenę wiążącą receptor [30, 31]. Metaloproteazy MMP-3 i MMP-7 posiadają właściwości fibrynolityczne i fibrynogenolityczne, natomiast substratem dla MMP-11 może być tylko fibrynogen. Wykazano również, że proMMP-3 może wiązać t-PA i plazminogen. Prowadzi to do zwiększenia powinowactwa t-PA do plazminogenu i podniesienia efektywności aktywacji plazminogenu. ProMMP-3 może wiązać zarówno sct-PA jak i tct-PA [32].

V. Układ fibrynolityczny w miażdżycy

Istnieje kilka możliwych dróg bezpośredniego i pośredniego zaangażowania układu fibrynolitycznego w procesy miażdżycowe. Rozwój zmian miażdżycowych prowadzi do postępującej dysfunkcji śródbłonna i wytworzenia blaszki miażdżycowej, która zwęża światło naczyń i utrudnia w ten sposób przepływ krwi. Ukształtowana blaszka miażdżycowa zawiera silnie trombogenny rdzeń wypełniony makrofagami, limfocytami T, lipidami, cholesterolem i fragmentami obumarłych komórek, który pokryty jest włóknistą otoczką złożoną z komórek mięśni gładkich, kolagenu oraz proteoglikanów. Blaszki miażdżycowe, których pęknięcia prowadzą do incy-

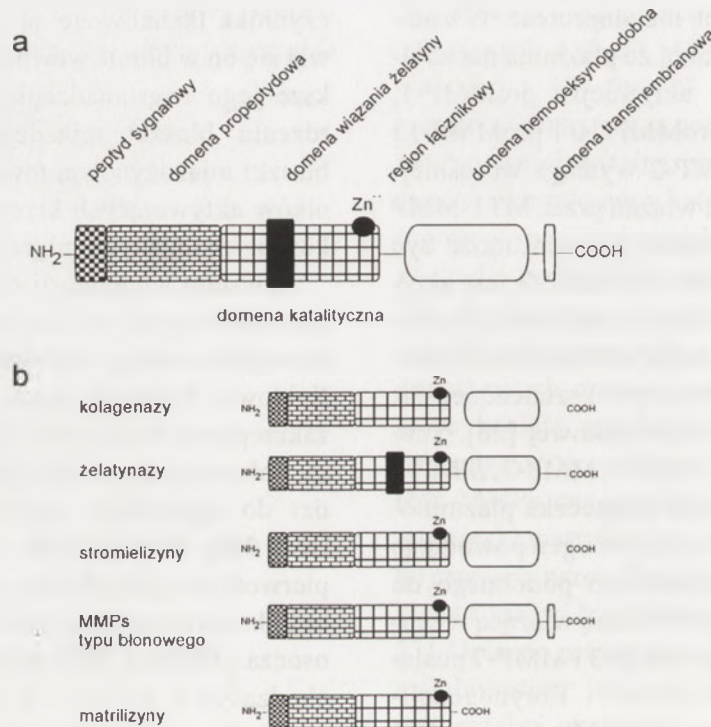
dentów wieńcowych cechują się zwykle dużą zawartością makrofagów. W miejscu pęknięcia blaszki są one aktywowane, wytwarzają metaloproteazy, degradują macierz zewnątrzkomórkową, fagocytują częściowo zdegradowane fragmenty ECM przez co osłabiają jej włóknistą otoczkę [33]. Aktywację krzepnięcia krwi zapoczątkowuje czynnik tkankowy. W nieuszkodzonych naczyniach czynnik tkankowy znajduje się jedynie w błonie zewnętrznej i aktywowany jest w odpowiedzi na uszkodzenie ściany naczynia. W zmianach miażdżycowych źródłem czynnika tkankowego są głównie makrofagi, pojawia się on w błonie wewnętrznej naczynia, a największe jego nagromadzenie następuje w lipidowym rdzeniu blaszki miażdżycowej [34]. Tworzeniu blaszki miażdżycowej towarzyszy uwalnianie czynników aktywujących krzepnięcie krwi oraz czynników stymulujących migrację komórek.

Powstało wiele teorii dotyczących genezy zmian miażdżycowych w ścianie tętnicy. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują hipotezy: zakrzepowa, lipidowa i lokalnego stanu zapalnego. Według teorii zakrzepowej Rokitansky'ego, nagromadzenie fibryny połączone ze zwiększoną ilością lipidów prowadzi do zgrubienia warstwy wewnętrznej tętnicy [wg. 35]. Według teorii lipidowej (infiltracyjnej) pierwotnym zjawiskiem w rozwoju miażdżycy jest nasiąkanie ściany naczynia lipidami pochodzącymi z osocza. Główną rolę przypisuje się lipidom pochodzącym z lipoprotein frakcji LDL (ang. *low density lipoproteins*), które łatwo ulegają modyfikacjom takim jak oksydacja czy glikozylacja [36]. Znaczącą rolę w rozwoju miażdżycy odgrywa apolipoproteina (a), dzięki zdolności wiązania się z różnymi białkami — w tym z fibrynogenem, fibronektyną, tetranektyną i glikozaminoglikanami oraz komórkami śródbłonna i makrofagami [37]. W cząsteczce apolipoproteiny (a) znajduje się łańcuch boczny wykazujący wysoką homologię do struktur kringlowych plazminogenu [38, 39]. Dzięki temu może ona hamować fibrynolizę poprzez współzawodnictwo z plazminogenem. Wykazuje także mitogenne właściwości w stosunku do komórek mięśni gładkich naczyń [40].

Niezależnie od tego, jaki czynnik jest odpowiedzialny za inicjowanie zmian w tętnicy, wspólnym elementem łączącym różnorodne teorie dotyczące genezy zmian miażdżycowych jest dysfunkcja śródbłonna [41]. W warunkach prawidłowych powierzchnia śródbłonna ściany naczyń krwionośnego ma właściwości przeciw płytkowe i przeciwzakrzepowe. W śródbłonku naczyń zachodzi synteza i są z niego uwalniane: tlenek azotu, prostacyklina,

czynniki mitogenne (m.in. EDGF) oraz czynniki regulujące krzepnięcie krwi (czynnik von Willebranda, aktywatory i inhibitory fibrynolizy). Występujące na powierzchni śródbłonna glikozaminoglikany tworzą glikokaliks i wykazują właściwości antykoagulacyjne. Komórki śródbłonna mają wpływ nie tylko na utrzymywanie płynności krwi, ale i także na właściwe napięcie ściany naczynia [42]. W wyniku działania czynników ryzyka i rozwoju zmian mia-

ściany naczynia z etapu wczesnych nacieków tłuszczowych do blaszki miażdżycowej. Ponieważ makrofagi są głównym źródłem metaloproteaz, uważa się, że ich obecność w makrofagach przyczynia się do migracji komórek mięśni gładkich, tworzenia warstwy *neointima* i pęknięcia blaszek miażdżycowych. Do rozwoju zmian w błonie wewnętrznej przyczynia się głównie MMP-9, poprzez stymulowanie migracji komórek mięśni gładkich [43].



Ryc. 2. Schemat struktury metaloproteaz. (a) Różnice w budowie metaloproteaz poszczególnych klas. (b) MMPs posiadają trzy domeny wspólne dla wszystkich klas: peptyd sygnałowy, domenę propeptydową i domenę katalityczną. Na podstawie obecności lub braku dodatkowych domen metaloproteazy podzielono na: żelatynazy (domena hemopeksynopodobna i domena wiązania żelatyny), metaloproteazy błonowe (domena transbłonowa w części C-terminalnej), kolagenazy i stromielizyny (posiadają część hemopeksynopodobną, nie zawierają jednak domeny wiązania żelatyny), oraz matrylizyny charakteryzujące się brakiem także domeny hemopeksynopodobnej.

żdżycowych ściana naczynia tętniczego zyskuje właściwości prozakrzepowe. Zmiany struktury glikozaminoglikanów, zmniejszona zawartość trombo moduliny i t-PA, jak i podwyższony poziom PAI-1 w śródbłonnku mogą przyczyniać się do zakrzepicy. Dysfunkcja śródbłonna i wzrost jego przepuszczalności ułatwiają przenikanie lipoprotein o niskiej gęstości do warstwy podśródbłonkowej. Powodują one powstawanie nacieków (smug tłuszczowych) między warstwami kolagenu. Zmiany w obrębie śródbłonna indukują także zwiększony napływ i adhezję monocytów-makrofagów oraz ich przenikanie do błony wewnętrznej naczynia. Makrofagi, które przeniknęły do błony wewnętrznej pochłaniają zmodyfikowane LDL, przekształcając się w komórki piankowe. Rezultatem tej akumulacji jest przejście

Pęknięte blaszki miażdżycowe i zakrzepica są najczęstszą przyczyną niedokrwienych incydentów wieńcowych. Ponieważ zakrzepy usuwane są w wyniku działania układu fibrynolitycznego, przypuszcza się, że osłabiona fibrynoliza może być czynnikiem ryzyka rozwoju choroby wieńcowej [44]. Nagromadzenie skrzepliny zależy nie tylko od aktywacji kaskady krzepnięcia, ale również od efektywności rozpuszczania skrzepu przez układ fibrynolityczny. Tkankowe i urokinazowe aktywatory plazminogenu są zależne w różny sposób od mediatorów odporności wrodzonej. Cytokiny (IL-1, TNF- α) mogą zmieniać zarówno aktywność t-PA, u-PA, jak i trombo moduliny. Cytokiny mogą również zwiększać ekspresję inhibitorów aktywatorów plazminogenu. O kruchości włóknistej otoczki blaszki miażdżycowej

decyduje dynamiczna równowaga między syntezą a usuwaniem kolagenu z warstwy podśródbłonkowej. Degradacja kolagenu, przy udziale metaloproteaz macierzy i katepsyn, może prowadzić do osłabienia otoczki włóknistej [45]. Głównym składnikiem otoczki są włókna kolagenu typu I, które są odporne na działanie większości proteaz. Spośród licznych metaloproteaz tylko kolagenazy: I (MMP-1), II (MMP-8), III (MMP-13) są zdolne do zainicjowania proteolizy nienaruszonej potrójnej helisy tego typu kolagenu [46].

Na rozwój zmian miażdżycowych ma wpływ skład krwi, zwłaszcza podwyższony poziom czynników ryzyka, m.in. cholesterolu, lipidów, homocysteiny i fibrynogenu. Podwyższony poziom glukozy w osoczu ma wpływ na zmiany ekspresji metaloproteaz, migrację monocytów oraz tworzenie i pękanie blaszek miażdżycowych. Wykorzystanie hodowli komórkowych w warunkach zwiększonego poziomu glukozy pozwoliło wykazać podwyższoną aktywność MMP-1, MMP-2 w komórkach śródbłonka i MMP-9 w makrofagach przy jednoczesnym obniżeniu aktywności MMP-3 w komórkach śródbłonka [47]. Szczególną rolę wydaje się odgrywać MMP-3. Substratami MMP-3 mogą być plazminogen, u-PA, jak również inhibitory fibrynolizy: α_2 -antyplazmina [48] oraz PAI-1 [49]. W wyniku interakcji czynnej formy PAI-1 z MMP-3 następuje inaktywacja inhibitora. PAI-1 zasocjowany z proMMP-3 może oddziaływać z t-PA, natomiast interakcja PAI-1 z aktywną MMP-3 uniemożliwia jego działanie na t-PA. Rozszczepienie i inaktywacja PAI-1 przez MMP-3 może stanowić mechanizm osłabiający aktywność inhibitora aktywatorów plazminogenu wpływając jednocześnie na wzrost aktywności fibrynolitycznej zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. W patogenezie zmian miażdżycowych, ze względu na szeroki zakres substratów, ważną rolę może odgrywać MMP-12 [50]. MMP-12 degraduje nie tylko składniki ściany naczynia (m.in. siarczan chondroityny, kolagen IV, fibronektynę), ale także białka osocza: α_1 — antytrypsynę oraz plazminogen, a ponadto aktywuje inne metaloproteazy — MMP-2 i MMP-3. Zaobserwowano, że hipercholesterolemia u królików na diecie bogatej w cholesterol indukują i zwiększa ekspresję MMP-12 w tętnicach zmienionych miażdżycowo. MMP-12 ulega ekspresji w komórkach mięśni gładkich warstwy wewnętrznej tętnic. W miejscach zmian miażdżycowych tętnic zaobserwowano także wzrost zawartości i podwyższoną aktywność t-PA [51]. Zwiększona ekspresja t-PA w miejscach zmian miażdżycowych może przyczyniać się do pęknięć blaszek miażdżycowych,

ale także może przeciwdziałać tworzeniu złogów fibryny wewnątrz ściany tętnicy.

Znaczenie układu fibrynolitycznego w rozwoju miażdżycy próbowano wyjaśnić w badaniach prowadzonych na myszach transgenicznym z niedoborem apolipoproteiny E (ApoE) lub złożonym niedoborem ApoE i t-PA (lub u-PA) [12]. Nie wykazano różnic w rozmiarze wczesnych smug tłuszczowych i blaszek miażdżycowych, zarówno u myszy z pojedynczym niedoborem ApoE (ApoE^{-/-}) jak i u myszy ze złożonym niedoborem ApoE i u-PA lub t-PA (ApoE^{-/-}:u-PA^{-/-} lub ApoE^{-/-}:t-PA^{-/-}), co może sugerować, że plazmina nie odgrywa kluczowej roli w migracji makrofagów do warstwy podśródbłonkowej. Późniejsze zmiany w naczyniu, owrzodzenia i nekroza były częstsze i ostrzejsze u myszy ApoE^{-/-} i ApoE^{-/-}:t-PA^{-/-} niż u myszy ApoE^{-/-} i ApoE^{-/-}:u-PA^{-/-}. Degradacja włókien elastyny, rozproszenie i dezorganizacja włókien kolagenu oraz macierzy zewnątrzkomórkowej bogatej w glikoproteiny występowały u myszy ApoE^{-/-} i ApoE^{-/-}:t-PA^{-/-}, natomiast u myszy ApoE^{-/-} i ApoE^{-/-}:u-PA^{-/-} nie zaobserwowano takich zmian. U myszy ApoE^{-/-} i ApoE^{-/-}:t-PA^{-/-} wykazano natomiast znaczny wzrost aktywności wolnego u-PA w makrofagach migrujących do blaszek miażdżycowych. Choć sama plazmina jest niezdolna do degradacji włókien elastyny i kolagenu, poprzez aktywację metaloproteaz może być pośrednio zaangażowana w ten proces. W makrofagach typu „dzikiego” i makrofagach typu t-PA^{-/-} wykazano w obecności plazminogenu aktywację uwalnianych prometaloproteaz (proMMP-3, proMMP-9, proMMP-12, proMMP-13), co wskazuje, że za aktywację proMMPs odpowiedzialna jest plazmina, powstająca w wyniku aktywacji plazminogenu przy udziale u-PA. W przypadku makrofagów typu u-PA^{-/-} nie zaobserwowano takiego efektu [12].

Udział układu fibrynolitycznego w procesach miażdżycowych potwierdzają także badania prowadzone na myszach z niedoborem ApoE (ApoE^{-/-}:MMP-3^{+/+}) lub złożonym niedoborem ApoE (ApoE^{-/-}:MMP-3^{-/-}) utrzymywanych na diecie z wysoką zawartością cholesterolu. Do większych zmian miażdżycowych dochodziło u myszy ApoE^{-/-}:MMP^{-/-} aniżeli u myszy ApoE:MMP^{+/+}, ale częstość występowania tętniaków była mniejsza u myszy ApoE^{-/-}:MMP^{-/-}. Wzrost liczby makrofagów i zwiększoną ekspresję u-PA oraz MMP-3 wykazano natomiast u myszy ApoE:MMP^{+/+}, co potwierdza, że zwiększona ekspresja u-PA przyczynia się do aktywacji proMMP-3 prawdopodobnie poprzez wytwarzanie plazminy. MMP-3 może przyczyniać się do destabilizacji blaszek miażdżycowych poprzez tra-

wienie macierzy zewnątrzkomórkowej i jednocześnie uczestniczyć w powstawaniu tętniaków poprzez proteolizę włókien sprężystych bezpośrednio lub pośrednio poprzez aktywację innych proMMPs [31, 52]. Carrel i wsp. [53] sugerują, że w rozwoju tętniaków w tętnicach dotkniętych miażdżycą może odgrywać rolę zaburzenie regulacji ekspresji stromielizyny-1 (MMP-3) i TIMP-3. W przypadku tętniaków znaczny wzrost ekspresji TIMP-3 wskazuje na silne hamowanie aktywności metaloproteazy. U zwierząt z niedoborem TIMP-1 dochodziło do zmniejszenia rozmiaru zmian miażdżycowych na skutek podwyższenia aktywności metaloproteazy, zwiększona była jednak częstość występowania tętniaków [54]. Wzrost ekspresji u-PA wykazano w śródbłonku królików, którym wprowadzono adenowirusowe wektory w celu zainicjowania podśródbłonkowego nagromadzenia makrofagów i migracji komórek mięśniowych [55]; prowadziło to do powstania zmian podobnych do obserwowanych we wczesnej miażdżycy u ludzi. W przypadku miażdżycy u człowieka dochodzi do wzrostu ekspresji u-PA głównie w makrofagach, co przyczynia się także do degradacji warstwy włókien sprężystych tętnicy. Zwiększona ekspresja u-PA, niezależnie od jej źródła, może wpływać na progresję miażdżycy, ponieważ u-PA jest wydzielana w formie nieaktywnej, a jego aktywność jest zależna głównie od liczby i lokalizacji receptorów u-PAR oraz receptorów plazminogenu.

Zaobserwowano, że niedobór tylko plazminogenu u myszy nie prowadził do istotnych zmian miażdżycowych, ale u myszy z niedoborem ApoE i plazminogenu dochodziło do przyspieszenia rozwoju zmian miażdżycowych [56]. Natomiast niedobór PAI-1 w tętnicach szyjnych myszy chronił tętnice przed miażdżycą [57].

VI. Uwagi końcowe

Układ fibrynolityczny jest złożonym systemem zaangażowanym w przebieg wielu procesów fizjologicznych i patologicznych, których rozwój wymaga migracji komórek i przebudowy tkanek. Do zmiany struktury wielu tkanek niezbędny jest udział licznych metaloproteaz macierzy zewnątrzkomórkowej, których aktywność zależy od proteaz układu fibrynolitycznego, przede wszystkim plazminy. W patogenezie miażdżycy układ fibrynolityczny może odgrywać istotną rolę nie tylko poprzez bezpośrednią fibrynolityczną aktywność plazminy, ale i poprzez regulację aktywności metaloproteaz macierzy zewnątrzkomórkowej. Współdziałanie metaloproteaz i układu fibrynolitycznego może mieć istotny

wpływ na rozwój zmian miażdżycowych zachodzących w tętnicach.

Podziękowania

Składamy serdeczne podziękowania Pani Prof. dr hab. Barbarze Wachowicz z Katedry Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego za cenne wskazówki, uwagi i pomoc w przygotowywaniu tej pracy.

Artykuł otrzymano 24 maja 2004
Zaakceptowano do druku 8 lipca 2004

Piśmiennictwo

1. Collen D (1999) *Thromb Haemost* 82: 259-270
2. Gong Y, Kim S, Felez J, Grella DK, Castellino, Miles LA (2001) *J Biol Chem* 276: 19078-19083
3. Dobrovolsky AB, Titaeva EV (2002) *Biochemistry (Moscow)* 67: 99-108
4. Booth NA (1999) *Baillieres Clin Hematol* 12: 423-433
5. Binder BR, Christ G, Gruber F, Grubic N, Hufnagl P, Krebs M, Mihaly J, Prager GW (2002) *News Physiol Sci* 17: 56-61
6. Gils A, Vleugels N, Tobbak K, Knockaert I, Declercq PJ (1998) *Biochim Biophys Acta* 1387: 291-297
7. Booth NA (2000) *Fibrinolysis & Proteolysis* 14: 206-213
8. Turner RB, Liu L, Sazonova IY, Reed GL (2002) *J Biol Chem* 277: 33068-33074
9. Lee KN, Jackson KW, McKee PA (2002) *Thromb Res* 105: 263-270
10. Lefleur Ma, Holenberg MD, Atkinson SJ, Knauer V, Murphy G, Edwards DR (2001) *Biochem J* 357: 105-115
11. Hall SW, Nagashima M, Zhao L, Morser, Leung LK (1999) *J Biol Chem* 274: 25510-25516
12. Rijken DC, Sakharov DV *Thromb Res* (2001) 103: 41-49
13. Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P (2004) *Crit Rev Oncol Hematol* 49: 179-186
14. Alexander JJ (2004) *J Surg Res* 117: 163-175
15. Galis ZS, Khatri JJ (2002) *Circ Res* 90: 251-262
16. Johnson LL, Dyer R, Hupe DJ (1998) *Curr Opin Chem Biol* 2: 466-471
17. Cox G, Steward WP, O'Byrne KJ (1999) *Thorax* 54: 169-179
18. Nagase H, Woessner JF (1999) *J Biol Chem* 274: 21491-21494
19. Netzel-Arnelt S, Mitola DJ, Yamada SS, Chrysovergist K, Holmbeck K, Birkendal-Hansen H, Bugge TH (2002) *J Biol Chem* 277: 45154-45161
20. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S (1998) *FASEB J* 12: 1075-1095
21. Ny T, Wahlberg P, Brändström IJ (2002) *Mol Cell Endocrinol* 187: 29-38
22. Hoit BD (2003) *JACC* 42: 345-347
23. Stetler-Stevenson WG (1999) *J Clin Invest* 103: 1237-1242
24. Creemers E, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen M (2001) *Circ Res* 89: 201-210
25. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H (2000) *Biochim Biophys Acta* 1477: 267-283
26. Arza B, De Maeyer M, Félez J, Collen D, Lijnen HR (2001) *Eur J Biochem* 268: 826-831
27. Morgunova E, Tuutilla A, Bergmann U, Tryggvason K (2002) *Proc Natl Acad Sci* 99: 7414-7419
28. Baker AH, Edwards DR, Murphy G (2002) *J Cell Sci* 115: 3719-3727

29. Li YY, Feng YQ, Kadokami T, McTieran CF, Draviam R, Watkins SC, Feldman AM (2000) *Proc Natl Acad Sci* **97**: 12746-12751
30. Raza SL, Nehring LC, Shapiro SD, Cornelius LA (2000) *J Biol Chem* **275**: 41243-41250
31. Lijnen HR (2001) *Thromb Haemost* **86**: 324-33
32. Arza B, Holyaerts MF, Felez J, Collen D, Lijnen HR (2000) *Eur J Biochem* **267**: 6378-6384
33. Lind L (2003) *Atherosclerosis* **169**: 203-214
34. Pasierski T (2002) *Postępy Nauk Medycznych*, 1-2002
35. Zaman AG, Helft G, Worthley SG, Badimon JJ (2000) *Atherosclerosis* **149**: 251-266
36. Libby P, Aikawa M, Schönbeck U (2000) *Biochim Biophys Acta* **1529**: 299-309
37. Lou XJ, Boonmark NW, Horrigan FT, Degen JL, Lawn RM (1998) *Proc Natl Acad Sci* **95**: 12591-12595
38. Vogel R (1999) *Am J Med* **107**: 479-487
39. Hancock MA, Boffa MB, Marcovina SM, Nesheim ME, Koschinsky ML (2003) *J Biol Chem* **278**: 23260-23269
40. Ishibashi S (2001) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**: 1-2
41. Matsuoka H (2001) *Diabetes Res Clin Pract* **54** Suppl: 65-72
42. Orford JL, Selwyn AP, Ganz P, Popma JJ, Rogers C (2000) *Am J Cardiol* **86**(suppl): 6H-10H
43. Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, Mangelsdorf DJ (2003) *J Biol Chem* **278**: 10443-10449
44. Folsom AR, Aleksic N, Park E, Salomaa V, Juneja H, Wu KK (2001) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**: 611-617
45. Hansson G, Libby P, Schönbeck U, Yan Z-Q (2002) *Circ Res* **91**: 281-291
46. Fricker J (2002) *DDT* **7**: 86-88
47. Death AK, Fisher EJ, McGrath KCY, Yue DK (2003) *Atherosclerosis* **168**: 263-269
48. Lijnen HR, Van Hoef B, Collen D (2001) *Biochim Biophys Acta* **1547**: 206-213
49. Lijnen HR, Arza B, Van Hoef B, Collen D, Declerck PJ (2000) *J Biol Chem* **275**: 37645-37650
50. Wu L, Tanimoto A, Murata Y, Sasaguri T, Fan J, Sasaguri Y, Watanabe T (2003) *Genes Cells* **8**: 225-234
51. Steins MB, Padró T, Li CH-X, Mesters RM, Ostermann H, Hammel D, Scheld HH, Berdel WE, Kienast J (1999) *Atherosclerosis* **145**: 173-180
52. Silence J, Lupu F, Collen D, Lijnen HR (2001) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**: 1440-1445
53. Carrell TW, Burnand KG, Wells GM, Clements JM, Smith A (2002) *Circulation* **105**: 477-482
54. Silence J, Collen D, Lijnen HR (2002) *Circ Res* **90**: 897-903
55. Falkenberg M, Tom C, DeYoung MB, Wen S, Linnemann R, Dichek DA (2002) *Proc Natl Acad Sci* **66**: 10665-10670
56. Xiao Ch, Danton Mary Jo S, Kowaqla MC, Valentine MT, Bugge TH, Degen JL (1997) *Proc Natl Acad Sci* **94**: 10335-10340
57. Eitzman DT, Westrick RJ, Xu Z, Tyson J, Ginsburg D (2000) *Blood* **96**: 4212-4215

Wydzielnicza funkcja tkanki tłuszczowej

Secretory function of adipose tissue

ZDZISŁAW KOCHAN, JOANNA KARBOWSKA

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Białka o działaniu endokrynnym lub parakrynnym
 - II-1. Adiponektyna
 - II-2. Leptyna
 - II-3. Rezystyna
 - II-4. Białko sygnałowe agouti
 - II-5. Czynniki tkankowy indukowany głodem
 - II-6. Oreksyny
 - II-7. Galanina
- III. Cytokiny prozapalne i czynniki wzrostu
 - III-1. Czynniki martwicy nowotworu α
 - III-2. Interleukina 6
 - III-3. Transformujący czynnik wzrostu β
 - III-4. Czynniki wzrostu śródbłonna naczyń
- IV. Białka związane z przemianami lipidów i lipoprotein
 - IV-1. Lipaza lipoproteinowa
 - IV-2. Apolipoproteina E
 - IV-3. Białko przenoszące estry cholesterolu
 - IV-4. Białko przenoszące fosfolipidy
- V. Białka związane z funkcjonowaniem układu krążenia
 - V-1. Angiotensynogen
 - V-2. Inhibitor aktywatora plazminogenu 1
- VI. Składniki dopelniacza
 - VI-1. Adypsina
 - VI-2. Białko stymulujące acylację
- VII. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: apoE — apolipoproteina E; ASIP — białko sygnałowe agouti; ASP — białko stymulujące acylację; BMI — wskaźnik masy ciała; cAMP — cykliczny AMP; CETP — białko przenoszące estry cholesterolu; CRH — kortykoliberyna; FIAF — czynnik tkankowy indukowany głodem; IL-6 — interleukina 6; JAK — kinaza janusowa; LPL — lipaza lipoproteinowa; MCH — ang. *melanin-concentrating hormone*; NPY — neuropeptyd Y; PAI-1 — inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1; PLTP — białko przenoszące fosfolipidy; PPAR — receptor aktywowany przez proliferatory peroksyosomów; TGF- β — transformujący czynnik wzrostu β ; TNF- α — czynnik martwicy nowotworu α ; VEGF — czynnik wzrostu śródbłonna naczyń.

Dr n. med., Katedra Biochemii, Akademia Medyczna w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk,
e-mail: kochanz@amg.gda.pl

Contents:

- I. Introduction
- II. Endocrine and paracrine factors
 - II-1. Adiponectin
 - II-2. Leptin
 - II-3. Resistin
 - II-4. Agouti signal protein
 - II-5. Fasting-induced adipose factor
 - II-6. Orexins
 - II-7. Galanin
- III. Pro-inflammatory cytokines and growth factors
 - III-1. Tumour necrosis factor α
 - III-2. Interleukin 6
 - III-3. Transforming growth factor β
 - III-4. Vascular endothelial growth factor
- IV. Proteins of lipid and lipoprotein metabolism
 - IV-1. Lipoprotein lipase
 - IV-2. Apolipoprotein E
 - IV-3. Cholesteryl ester transfer protein
 - IV-4. Phospholipid transfer protein
- V. Proteins involved in cardiovascular regulation
 - V-1. Angiotensinogen
 - V-2. Plasminogen activator inhibitor 1
- VI. Complement pathway components
 - VI-1. Adipsin
 - VI-2. Acylation-stimulating protein
- VII. Conclusions

I. Wstęp

W tradycyjnym ujęciu za główną funkcję tkanki tłuszczowej uważano magazynowanie zapasów energetycznych organizmu w postaci lipidów. W stanie resorpcyjnym komórki tkanki tłuszczowej — adipocyty pobierają z krwi duże ilości glukozy i kwasów tłuszczowych, a następnie z tych substratów syntetyzują triacyloglicerole. Gdy spada podaż substratów energetycznych, np. w okresie głodu, zasoby magazynowane w tkance tłuszczowej są uwalniane do krwi w postaci kwasów tłuszczowych, które następnie mogą być wykorzystywane przez inne tkanki. Tkanka tłuszczowa pełni w rzeczywistości znacznie bardziej złożone funkcje fizjologiczne niż pierwotnie zakładano: bierze udział w regulacji przemian energetycznych organizmu, jest niezbędna dla normalnej homeostazy glukozy i regulacji wrażliwości na insulinę, ma również wpływ na regulację sytości. U kobiet odpowiednia ilość tkanki tłuszczowej wa-

runkuje zachowanie płodności, z kolei nadmiar tej tkanki obserwowany w otyłości może prowadzić do powikłań metabolicznych. Zmiany morfologiczne i metaboliczne zachodzące w tkance tłuszczowej osób otyłych wiążą się ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na cukrzycę typu 2, nadciśnienie i choroby krążenia.

Odkrycie w 1994 roku leptyny, hormonu regulującego przemianę materii i apetyt, syntetyzowanego i wydzielanego głównie przez adipocyty, wywołało zainteresowanie wydzielniczą funkcją tkanki tłuszczowej [1]. Dzięki intensywnie prowadzonym badaniom leptyna okazała się wkrótce jednym z wielu wydzielanych przez adipocyty białek, określanych wspólną nazwą „adipocytokiny” [2-10]. Poznane dotychczas białka wydzielane przez tkankę tłuszczową można podzielić na pięć głównych grup (Ryc. 1):

- białka o działaniu endokrynnym lub parakrynnym, takie jak adiponektyna, leptyna, rezystyna, białko sygnałowe agouti (ASIP), czynnik tkankowy indukowany głodem (FIAF), oreksyny i galanina;
- cytokiny prozapalne i czynniki wzrostu, np. czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α), interleuki-

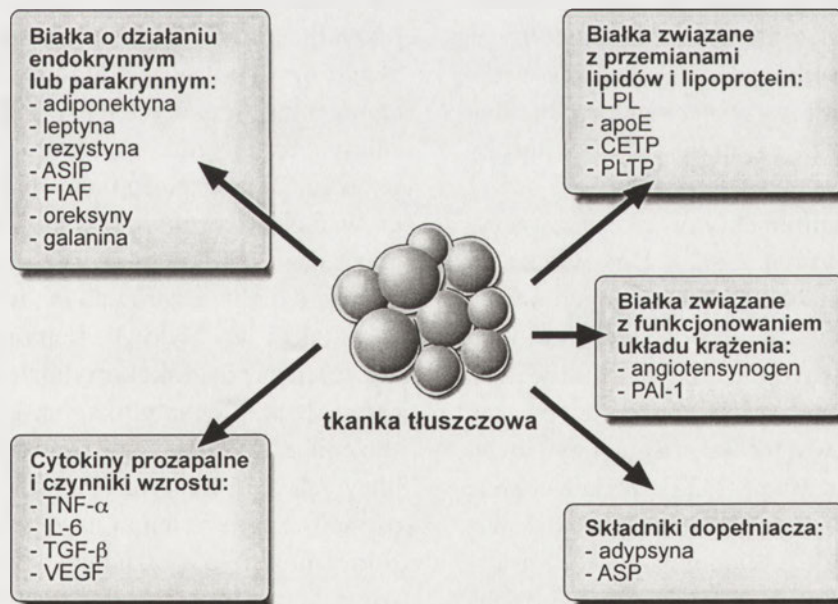
rolu (CETP), białko przenoszące fosfolipidy (PLTP);

- białka związane z funkcjonowaniem układu krążenia: angiotensynogen, inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1);
- składniki dopełniacza, takie jak adypsyna i białko stymulujące acylację (ASP).

II. Białka o działaniu endokrynnym lub parakrynnym

II-1. Adiponektyna

W świetle ostatnich badań adiponektynę można uznać za najważniejsze białko wydzielane przez tkankę tłuszczową [11-13]. Nazywana także Acrp30, AdipoQ lub GBP28, kodowana przez gen *APM1* adiponektyna jest białkiem o masie 30 kDa (244 aminokwasy) (Tab. 1), zbudowanym z dwóch domen o różnej strukturze: włóknistej domeny podobnej do kolagenu, o wysokiej homologii do kolagenu typu VIII i X, oraz specyficznej domeny globularnej, wykazującej strukturalną homologię z czynnikiem dopełniacza C1q [2, 11, 14]. Synteza adiponektyny zachodzi wyłącznie w tkance tłuszczowej, a mRNA



Ryc. 1. Białka wydzielane przez tkankę tłuszczową. Objaśnienia: apoE — apolipoproteina E, ASIP — białko sygnałowe agouti, ASP — białko stymulujące acylację, CETP — białko przenoszące estry cholesterolu, FIAF — czynnik tkankowy indukowany głodem, IL-6 — interleukina 6, LPL — lipaza lipoproteinowa, PAI-1 — inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1, PLTP — białko przenoszące fosfolipidy, TGF- β — transformujący czynnik wzrostu β , TNF- α — czynnik martwicy nowotworu α , VEGF — czynnik wzrostu śródbłonnka naczyń.

na 6 (IL-6), transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β), czynnik wzrostu śródbłonnka naczyń (VEGF);

- białka związane z przemianami lipidów i lipoprotein, jak lipaza lipoproteinowa (LPL), apolipoproteina E (apoE), białko przenoszące estry choleste-

kodujące to białko jest transkrypcyjnym w największej ilości kopii w adipocytach [2, 9, 11, 14]. Adiponektyna wydzielana przez tkankę tłuszczową występuje obficie w osoczu człowieka; jej fizjologiczne stężenie wynosi około 10 $\mu\text{g/ml}$, co stanowi 0.01% wszystkich białek osocza [15, 16].

Mimo, że adiponektyna powstaje tylko w tkance tłuszczowej, poziom tego białka w osoczu osób otyłych jest znacznie niższy niż u osób szczupłych. Zaobserwowano, że w odróżnieniu od innych białek wydzielanych przez tkankę tłuszczową, biosynteza adiponektyny w adipocytach oraz jej stężenie w krwi ulega obniżeniu wraz z rozwojem otyłości [15]. Sugeruje to, że zaburzona synteza i wydzielanie adiponektyny mogą być bezpośrednio związane ze schorzeniami towarzyszącymi otyłości, takimi jak miażdżyca i cukrzyca typu 2.

Stężenie adiponektyny w osoczu pacjentów z chorobą wieńcową, włączając zawał mięśnia sercowego, jest dwukrotnie niższe niż u osób zdrowych w tym samym wieku i o tym samym BMI; i to zarówno w przypadku mężczyzn, jak i kobiet [17]. Wykazano, że adiponektyna gromadzi się w przestrzeni podśródbłonkowej uszkodzonych tętnic, hamuje ekspresję cząsteczek adhezyjnych w komórkach śródbłonka naczyń i powstrzymuje rozwój odczynu zapalnego [17-19]. Gdy bariera, jaką stanowi śródbłonek, zostanie uszkodzona, adiponektyna działa jak endogenny modulator odpowiedzi komórek śródbłonka na bodźce prozapalne [18]. Adiponektyna hamuje także akumulację lipidów w makrofagach oraz transformację makrofagów w komórki piankowate [19]. Spadek stężenia adiponektyny w osoczu może więc mieć bezpośredni związek z rozwojem schorzeń naczyniowych i w świetle ostatnich badań został uznany za czynnik ryzyka choroby wieńcowej [16].

Obniżone stężenie adiponektyny w krwi towarzyszy również cukrzycy typu 2 [12]. Doświadczenia przeprowadzone na myszach pozbawionych adiponektyny (*Adipo^{-/-}*) ujawniły, że brak tego hormonu jest związany z rozwojem oporności na insulinę [20]. Podanie adiponektyny powoduje obniżenie poziomu glukozy w krwi, poprawia tolerancję glukozy i zwiększa wrażliwość na insulinę [21-24]. Wykazano też, że mutacje w genie *APM1* są związane z występowaniem cukrzycy typu 2 [25]. Wiadomo, że leki z grupy tiazolidinedionów zwiększają wrażliwość komórek na insulinę oraz obniżają poziom glukozy i lipidów u pacjentów z cukrzycą typu 2 poprzez związanie i aktywację jądrowego receptora hormonów aktywowanego przez proliferatory peroksysomów- γ (PPAR γ) [26, 27]. Receptor ten odgrywa kluczową rolę w regulacji ekspresji genu *APM1* w tkance tłuszczowej, a po podaniu tiazolidinedionów obserwuje się wzrost stężenia adiponektyny w osoczu [27].

Szlak sygnałowy adiponektyny nie został jeszcze w pełni poznany. Ostatnio wykazano, że adiponektyna łączy się ze swoistym receptorem błonowym i opi-

sano dwie izoformy receptora adiponektyny: AdipoR1 i AdipoR2, występujące głównie w mięśniach szkieletowych i w wątrobie [28]. Wewnątrz komórki w ścieżce sygnałowej adiponektyny uczestniczy najprawdopodobniej jądrowy receptor PPAR α , aktywowany przez adiponektynę, i kinaza zależna od AMP, która ulega fosforylacji pod wpływem adiponektyny [28].

II-2. Leptyna

Leptyna jest jednym z ważniejszych i jednocześnie najlepiej poznanych białkiem wydzielanym przez adipocyty. Białko to jest produktem genu *LEP*, ma masę 16 kDa i składa się ze 167 aminokwasów (21 z nich stanowi sekwencję sygnałową, która jest odcinana przed wydzieleniem cząsteczki poza adipocyt) [1]. U człowieka, tak jak u innych ssaków, leptyna powstaje głównie w dojrzałych adipocytach tkanki tłuszczowej [1, 29, 30]. Mniejsze ilości tego białka są syntetyzowane także w innych narządach lub tkankach, np. w łożysku, mózgu, żołądku i gruczole mlekowym [31-34]. Wyjątkowo u ptaków głównym miejscem powstawania leptyny jest wątroba [35].

Biosynteza leptyny w tkance tłuszczowej zależy od wielkości adipocytów i jest regulowana głównie przez insulinę [36]. Insulina indukuje transkrypcję genu *LEP* i kontroluje długotrwałe zmiany ekspresji tego genu w adipocytach [37-39]. Niezależnie od insuliny działa glukoza, która w krótkim czasie wywołuje wzrost stężenia mRNA leptyny i może odgrywać główną rolę w szybkiej regulacji zmian ekspresji genu *LEP* [40, 41]. Wzrost ekspresji genu kodującego leptynę, zarówno *in vivo* w tkance tłuszczowej, jak i w hodowli komórkowej adipocytów, wywołują także glukokortykosteroidy [42, 43]. Przeciwnie działanie ma glukagon, który poprzez wzrost stężenia cAMP obniża poziom mRNA leptyny w adipocytach [43]. Leptyna jest prawdopodobnie gromadzona w adipocytach, a następnie pod wpływem insuliny może być wydzielana poza komórkę [42]. Pod kontrolą insuliny jest więc nie tylko synteza leptyny w adipocytach, lecz również jej uwalnianie przez komórki tkanki tłuszczowej. Glukagon natomiast obniża wydzielanie leptyny przez adipocyty [43].

Działanie leptyny jest najczęściej bezpośrednio lub pośrednio związane z metabolizmem energetycznym organizmu. Ilość wydzielanej przez adipocyty leptyny zależy od masy tkanki tłuszczowej i odzwierciedla ilość zasobów energetycznych przechowywanych w tej tkance [36, 44]. Wydzielana do krwi leptyna dociera do mózgu i wiąże się ze swoimi receptorami w podwzgórzu, zmniejszając spożycie po-

karmu i przyczyniając się do spadku masy ciała [29, 45]. Receptory leptyny przekazują sygnał poprzez aktywację kinaz janusowych (JAK) i białek STAT. Pod wpływem leptyny dochodzi między innymi do supresji genów kodujących neuropeptyd Y (NPY), MCH i galaninę oraz do indukcji genu kortykoliberyny (CRH) w podwzgórzu, co prowadzi do obniżenia łaknienia [29, 45-48]. Podanie rekombinowanej leptyny powoduje zmniejszenie ilości pobieranego pokarmu, obniżenie masy tkanki tłuszczowej i zwiększenie ilości wydatkowanej energii [29, 47]. Jednak leptyna działa nie tylko na podwzgórze. Odnotowano obecność receptora leptyny i działanie tego hormonu na trzustkę, wątrobę, mięśnie szkieletowe, jelito i komórki β trzustki [49-52]. Receptor leptyny występuje także w adipocytach, dzięki czemu leptyna może wykazywać działanie auto- lub parakryne [53]. Zablokowanie drogi sygnałowej leptyny może być skutkiem syntezy niefunkcjonalnej leptyny lub braku jej receptora (np. u myszy *ob/ob* lub *db/db* i u szczurów *fa/fa*), jak również nabytej oporności na leptynę u osób otyłych.

Rola leptyny w regulacji ilości tkanki tłuszczowej i utrzymywaniu równowagi energetycznej u ludzi nie jest jednoznacznie określona. U ludzi o takiej samej masie tkanki tłuszczowej stwierdzono wielokrotne różnice stężenia tego hormonu w surowicy krwi i często brak reakcji na podaną egzogennie rekombinowaną leptynę [54]. Niewątpliwie leptyna uczestniczy nie tylko w regulacji pobierania pokarmu i tempa podstawowej przemiany materii, lecz także w regulacji funkcjonowania systemu immunologicznego, układu krwionośnego i płodności [55-57].

II-3. Rezystyna

Rezystyna to niskocząsteczkowe, zbudowane ze 108 aminokwasów, bogate w cysteinę białko, które jest produktem genu *RETN* [3]. Ekspresja tego genu jest tkankowo-specyficzna i zachodzi głównie w tkance tłuszczowej. Początkowo ekspresję genu kodującego rezystynę wykazano tylko w pierwotnych hodowlach ludzkich adipocytów i preadipocytów oraz w tkance tłuszczowej człowieka [58-60]. Obecnie wiadomo, że synteza rezystyny u człowieka zachodzi także w monocytach i w łożysku [58, 61]. U myszy rezystynę wykryto również w mózgu (podwzgórze i kora), a w okresie dojrzewania dodatkowo w przysadce mózgowej [62]. Ostatnio wykazano obecność mRNA rezystyny, poza białą i brunatną tkanką tłuszczową, w żołądku, jelicie, nadnerczach i w mięśniach szkieletowych szczura [63].

Regulacja ekspresji genu rezystyny nie została jeszcze w pełni poznana. Poziom mRNA rezystyny w skrawkach tkanki tłuszczowej pobranych od ludzi otyłych był znacznie wyższy w porównaniu z oznaczonym w skrawkach tkanki tłuszczowej pochodzących od osób szczupłych [58]. Zaobserwowano, że głodzenie hamuje, natomiast następujące po nim karmienie indukuje ekspresję genu rezystyny w tkance tłuszczowej [3, 64]. Niewątpliwie kluczową rolę w takiej regulacji odgrywa insulina, jednak jej wpływ na syntezę rezystyny nie jest jeszcze dobrze poznany. Jak dotąd wykazano jedynie wzrost poziomu mRNA rezystyny w tkance tłuszczowej myszy z cukrzycą, którym podano insulinę [64]. Ekspresja genu *RETN* w tkance tłuszczowej oraz w izolowanych adipocytach jest regulowana przez jądrowe receptory typu PPAR. Traktowanie adipocytów farmakologicznymi ligandami receptora PPAR γ , takimi jak rosiglitazon i inne glitazony z grupy tiazolidinodionów, znacznie obniżało ekspresję genu rezystyny i ilość wydzielanego białka [3, 65]. Podanie rosiglitazonu myszom z cukrzycą spowodowało zmniejszenie ilości mRNA rezystyny w tkance tłuszczowej [66]. Ostatnio wykazano, że receptor PPAR α może brać udział w indukcji genu rezystyny w tkance tłuszczowej [44, 67].

Wyniki pierwszych badań sugerowały, że rezystyna jest wydzielanym przez adipocyty do krwi гормо- nem, którego nadekspresja prowadzi do oporności na insulinę i w związku z tym przypuszczano, że rezystyna mogłaby pełnić rolę czynnika łączącego otyłość z patogenezą cukrzycy typu 2 [3, 68]. S t e p a n i i wsp. wykazali, że poziom rezystyny w surowicy wzrasta podczas wywołanej dietą otyłości oraz w genetycznych modelach otyłości i oporności na insulinę [3]. U otyłych myszy, wykazujących oporność na działanie insuliny, neutralizacja rezystyny za pomocą przeciwciał zmniejszała hiperglikemię, między innymi dzięki poprawieniu wrażliwości na insulinę, a w hodowli adipocytów powodowała zwiększenie stymulowanego przez insulinę pobierania glukozy [3]. Natomiast podawanie rekombinowanej rezystyny, mimo że nie miało wpływu na poziom insuliny, zaburzało tolerancję glukozy i obniżało wrażliwość na działanie insuliny *in vivo* u myszy oraz *ex vivo* w linii komórkowej adipocytów [3]. Późniejsze doniesienia nie potwierdziły jednak działania rezystyny jako molekularnego łącznika pomiędzy otyłością a cukrzycą typu 2. Nowsze badania dowodzą, że rezystyna może być inhibitorem różnicowania adipocytów regulowanym przez zasoby energetyczne organizmu i przeciwdziałającym rozrosto-

wi tkanki tłuszczowej [44, 64, 69]. Nie poznano jeszcze receptora rezystyny, ani narządów i tkanek docelowych tego hormonu. Właściwa rola rezystyny w organizmie jest nadal niejasna, a jej poznanie wymaga dalszych badań.

II-4. Białko sygnałowe agouti

Białko sygnałowe agouti (ASIP, ang. *agouti signal protein*), zbudowane ze 132 aminokwasów, jest ludzkim homologiem mysiego białka agouti. Ludzki

ulega ekspresji w melanocytach, *MC2R* — w nadnerczach i tkance tłuszczowej, *MC3R* — w mózgu, łożysku i trzustce, *MC4R* — w mózgu, mięśniach i tkance tłuszczowej, natomiast *MC5R* — w większości tkanek [73]. Ludzkie białko ASIP działa w podobny sposób, jak mysie białko agouti, obniżając syntezę eumelaniny w melanocytach [74]. Ponieważ u ludzi ASIP hamuje działanie wszystkich receptorów melanokortyny, białko to może wpływać nie tylko na pigmentację, lecz również na szereg funkcji fizjologicznych, jak spożycie pokarmu, funkcje ruchowe, zachowania seksualne, pamięć, termogeneza i lipoliza

Tabela 1.

Geny kodujące białka syntetyzowane i wydzielane przez ludzką tkankę tłuszczową.

Białko	Gen	Lokalizacja
Adiponektyna	<i>APM1</i>	3q27.3
Leptyna	<i>LEP</i>	7q32.1
Rezystyna	<i>RETN</i>	19p13.2
Białko sygnałowe agouti	<i>ASIP</i>	20q11.22
Czynnik tkankowy indukowany głodzeniem	<i>ANGPTL4</i>	19p13.2
Oreksyny	<i>HCRT</i>	17q21.2
Galanina	<i>GAL</i>	11q13.2
Czynnik martwicy nowotworu α	<i>TNF</i>	6p21.33
Interleukina 6	<i>IL6</i>	7p15.3
Transformujący czynnik wzrostu β	<i>TGFB1</i>	19q13.2
	<i>TGFB2</i>	1q41
	<i>TGFB3</i>	14q24.3
Czynnik wzrostu śródbłonna naczyń	<i>VEGF</i>	6p21.1
Lipaza lipoproteinowa	<i>LPL</i>	8p21.3
Apolipoproteina E	<i>APOE</i>	19q13.32
Białko przenoszące estry cholesterolu	<i>CETP</i>	16q13
Białko przenoszące fosfolipidy	<i>PLTP</i>	20q13.12
Angiotensynogen	<i>AGT</i>	1q42.2
Inhibitor aktywatora plazminogenu 1	<i>SERPINE1</i>	7q22.1
Adypsylna	<i>DF</i>	19p13.3
Białko stymulujące acylację	<i>C3</i>	19p13.3

gen *ASIP*, kodujący to białko jest zlokalizowany na 20 chromosomie [70, 71]. U człowieka, gen *ASIP* ulega ekspresji przede wszystkim w tkance tłuszczowej oraz na niższym poziomie m.in. w jądrach, jajnikach, mięśniu sercowym, trzustce i w komórkach skóry [70-72].

Białko ASIP jest antagonistą receptorów melanokortyny *MC1R*-*MC5R* [73]. U człowieka gen *MC1R*

[75]. Prawdopodobnie ASIP bierze udział w regulacji równowagi energetycznej organizmu poprzez antagonizowanie działania receptora *MC4R*, który odgrywa główną rolę w regulacji spożycia pokarmu. Mutacje powodujące utratę funkcji tego receptora zostały wykryte u otyłych pacjentów [76]. Polimorfizm genu kodującego *MC4R* opisano jako najczęstszą przyczynę dziedzicznej otyłości u ludzi [76].

Ekspresja genu *ASIP* w tkance tłuszczowej i trzustce sugeruje, że białko ASIP może, współdziałając z insuliną i leptyną, regulować ilość tkanki tłuszczowej u człowieka. ASIP hamuje lipolizę w ludzkich adipocytach [72], w związku z czym może mieć wpływ na wielkość adipocytów. W tkance tłuszczowej człowieka poziom mRNA ASIP jest dodatnio skorelowany z ilością mRNA syntazy kwasów tłuszczowych [77]. Wykazano ponadto, że białko to wraz z insuliną zwiększa ekspresję genu syntazy kwasów tłuszczowych, a obecność obu hormonów, ASIP i insuliny, jest niezbędna do pełnej indukcji tego genu w hodowli ludzkich adipocytów [78]. W komórkach β trzustki ASIP zwiększa poziom wapnia i sekrecję insuliny, co sugeruje, że białko to może brać udział w regulacji działania insuliny u ludzi [79].

II-5. Czynniki tkankowy indukowany głodem

Czynnik tkankowy indukowany głodem (FIAF, ang. *fasting-induced adipose factor*), znany także jako HFARP, PGAR i ANGPTL4, jest syntetyzowany przede wszystkim w tkance tłuszczowej, w mniejszych ilościach w wątrobie i łożysku [80-82]. Białko to, kodowane przez gen *ANGPTL4*, jest oligomerem o strukturze podobnej do angiopoetyny-1 [83].

Ekspresja genu kodującego FIAF w tkance tłuszczowej i w wątrobie znacznie wzrasta pod wpływem głodzenia [80]. W regulacji ekspresji genu *ANGPTL4* ważną rolę odgrywają receptory PPAR; w tkance tłuszczowej ekspresja tego genu jest stymulowana przez PPAR γ , natomiast w wątrobie przez PPAR α [80, 82]. Białko FIAF jest wykrywane w różnych tkankach, a jego największe stężenie wykazano w wątrobie i nerce, mimo, że głównym miejscem biosyntezy tego białka jest tkanka tłuszczowa. Wydaje się, że FIAF jest natychmiast po syntezie wydzielany przez adipocyty, dostaje się do innych tkanek/narządów, jak wątroba i nerka, i tam jest przechowywany [80]. Obserwowane wysokie stężenie FIAF w tych tkankach odzwierciedla więc jego intensywne pobieranie, nie intensywną syntezę. Stężenie FIAF w osoczu wzrasta w wyniku głodzenia i ulega obniżeniu po długotrwałym karmieniu dietą wysokotłuszczową, wraz ze wzrostem masy tkanki tłuszczowej [80]. Karmienie dietą wysokotłuszczową nie wywołuje jednak zmian ekspresji genu *ANGPTL4* w tkance tłuszczowej ani w wątrobie.

Obecność FIAF w różnych tkankach i w osoczu sugeruje, że białko to może wykazywać działanie en-

dokrynne. Wraz z jego wysoką ekspresją w tkance tłuszczowej i stymulacją biosyntezy w czasie głodu, zmiany zachodzące w osoczu sugerują, że FIAF jest nową cząsteczką sygnałową, która bierze udział w regulacji metabolicznej odpowiedzi na głodzenie. Jak dotąd nie poznano jednak receptorów FIAF ani ich lokalizacji, nieznane są także tkanki docelowe tego białka.

II-6. Oreksyny

Mianem „oreksyny” określa się dwa peptydy (oreksyna A i B) powstające w wyniku proteolizy wspólnego 130-aminokwasowego prekursora (prepro-oreksyny), którego biosynteza zachodzi głównie w podwzgórzu [84, 85]. Poza centralnym układem nerwowym prepro-oreksyna występuje również w tkance tłuszczowej, w jelicie oraz w jądrach [8, 85, 86]. Oreksyna A jest 33-aminokwasowym peptydem, natomiast oreksyna B składa się z 28 aminokwasów. Oba peptydy, podobnie jak inne znane neuroprzekazniki, działają na receptory błonowe i mogą odgrywać znaczącą rolę w regulacji apetytu [84, 85, 87, 88]. Oreksyny zwiększają zużycie energii stymulując aktywność ruchową i termogenezę, wpływają na cykl snu i czuwania oraz mogą modulować funkcje neuroendokrynologiczne [87, 88]. Synteza oreksyn zależy od metabolizmu energetycznego i stanu odżywienia organizmu [88]. U otyłych pacjentów stężenie oreksyny A w surowicy rośnie w czasie tygodniowego głodzenia i wraca do poziomu podstawowego po powrocie do normalnego odżywiania [89].

Opisano dwa receptory oreksyn, OX1R i OX2R [85]. Preferowanym ligandem receptora OX1R jest oreksyna A, natomiast receptor OX2R wykazuje porównywalne powinowactwo do obu oreksyn [85]. Receptory oreksyn występują w różnych regionach mózgu, znaleziono je także w tkance tłuszczowej, w jelicie i w przysadce [8, 86, 90].

Rozmieszczenie oreksyn i ich receptorów wskazuje, że peptydy te (przynajmniej oreksyna A i receptor OX1R) odgrywają istotną rolę w regulacji równowagi energetycznej organizmu oraz w regulacji apetytu [85, 91]. Oreksyny zwiększają ilość pobieranego pokarmu, jednak ich wpływ na apetyt jest słabszy niż wpływ neuropeptydu Y, ponadto działanie oreksyn jest niezależne od działania leptyny [88]. Obecność oreksyn w adipocytach, w jelicie i w komórkach wydzielniczych jelita wskazuje, że oreksyny regulujące apetyt pochodzą nie tylko z podwzgórza, ale także z tkanek obwodowych [8, 86, 89].

II-7. Galanina

Galanina jest neuropeptydem zbudowanym z 30 aminokwasów [92]. 15 pierwszych aminokwasów od końca aminowego odpowiada za aktywność biologiczną tego peptydu [92]. Kodujący galaninę gen *GAL* ulega ekspresji w wielu typach neuronów i w różnych regionach mózgu [93]. Galanina jest szeroko rozpowszechniona, występuje nie tylko w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym, ale także w jelicie i tkance tłuszczowej [8, 92, 93]. Ostatnio wykazano obecność mRNA galaniny i jej receptorów w ludzkich adipocytach [8].

Obserwacje dotyczące ekspresji genu *GAL* pochodzą z badań nad podwzgórzem. Wykazano, że synteza galaniny jest hamowana przez leptynę [46]. Towarzyszy temu obniżone spożycie pokarmu, obserwuje się też mniejszy przyrost masy ciała szczurów. Zaobserwowano również, że insulina obniża poziom mRNA galaniny i ilość tego peptydu w podwzgórzu, co sugeruje, że ekspresja galaniny może być również regulowana przez zmiany stężenia insuliny i glukozy [94]. Jednak karmienie otyłych szczurów rasy Zucker dietą wysokotłuszczową powoduje spadek ekspresji genu kodującego galaninę przy obniżonym stężeniu insuliny w osoczu [95]. Regulacja ekspresji genu *GAL* w adipocytach nie została jeszcze zbadana.

Jak dotąd poznano trzy receptory błonowe galaniny: GalR1, GalR2 i GalR3 [96, 97]. GalR1 jest dominującą formą receptora galaniny w mózgu [98]. Receptory GalR2 i GalR3 występują bardziej powszechnie, ich obecność wykazano w mózgu, móżdżku, pniu mózgu, rdzeniu kręgowym; a także w przysadce mózgowej, przewodzie pokarmowym, mięśniach szkieletowych, mięśniu sercowym, nerkach, macicy, jajnikach i jądrach [96, 98].

Galanina bierze udział w regulacji ciśnienia krwi, kontroli uwalniania hormonów takich jak hormon wzrostu i insulina oraz w regulacji skurczu mięśni gładkich [99]. Ponadto, podobnie jak neuropeptyd Y i MCH, galanina działając na podwzgórze zwiększa spożycie pokarmu [46, 100].

III. Cytokiny prozapalne i czynniki wzrostu

III-1. Czynniki martwicy nowotworu α

Czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α), kodowany przez gen *TNF*, powstaje w wielu typach komórek, w tym także w adipocytach, i jest jedną z najlepiej poznanych cytokin wydzielanych przez tkankę

tłuszczową [4, 10, 101]. TNF- α jest wydzielany jako forma błonowa, która następnie ulega hydrolizie pod wpływem zewnątrzkomórkowej metaloproteiny. W ten sposób dochodzi do uwolnienia aktywnej formy TNF- α o długości 157 aminokwasów, która funkcjonuje w krwi jako dimer [102]. Zarówno błonowa, jak i rozpuszczalna forma TNF- α może wiązać się ze swoistymi receptorami TNFR-1 i TNFR-2. W ludzkiej tkance tłuszczowej zachodzi synteza obydwu form receptora [103].

Ekspresja genu *TNF* w tkance tłuszczowej i ilość wydzielanego przez tę tkankę białka zależy od wielkości adipocytów [104]. W tkance tłuszczowej osób otyłych obserwuje się zwiększoną syntezę TNF- α , a adipocyty wyizolowane z takiej tkanki wydzielają dwukrotnie więcej TNF- α niż adipocyty pochodzące od osób szczupłych [103]. Jednak ilość mRNA TNF- α powstającego w ludzkiej tkance tłuszczowej jest niewielka, również wydzielanie tego białka zachodzi na niskim poziomie; w związku z tym przypuszcza się, że TNF- α raczej nie jest przez tę tkankę uwalniany do krwi [105, 106]. Mimo to uważa się, że podwyższony poziom TNF- α , działającego autokrynnie lub parakrynnie, może brać udział w rozwoju miażdżycy poprzez indukowanie procesu zapalnego oraz w powstawaniu oporności na insulinę towarzyszącej otyłości [4, 103, 107, 108].

III-2. Interleukina 6

Interleukina 6 (IL-6) jest cytokiną prozapalną regulującą funkcjonowanie układu immunologicznego, wzrost i różnicowanie komórek oraz wpływającą na masę ciała [109]. IL-6 powstaje w centralnym układzie nerwowym, przede wszystkim w podwzgórzcu, a także w astrocytach, komórkach mikrogleju i w komórkach śródbłonki [109, 110]. Synteza IL-6 zachodzi również w tkance tłuszczowej [105, 111]. W wymienionych typach komórek wykrywa się także obecność receptora interleukiny 6 [110, 111].

Wydzielanie IL-6 przez adipocyty ulega obniżeniu pod wpływem glukokortykosteroidów [109]. IL-6 wydzielona przez tkankę tłuszczową wykazuje zarówno działanie parakrynnie, jak i endokrynnie [105, 112].

Stężenie IL-6 w surowicy jest dodatnio skorelowane z BMI (rośnie wraz ze wzrostem masy ciała) oraz wykazuje ujemną korelację z wrażliwością na insulinę [109, 113]. Brak IL-6 wywołuje szereg zmian w metabolizmie węglowodanów i lipidów. Myszy pozbawione IL-6 (*Il6^{-/-}*) są otyłe, mają podwyższony poziom leptyny w krwi i wykazują oporność na leptynę [112]. Podanie IL-6 myszom *Il6^{-/-}*

powoduje spadek masy ciała i spadek stężenia leptyny w krwi [112]. IL-6 może działać podobnie jak leptyna, tzn. wpływać na masę ciała poprzez aktywację odpowiednich receptorów w podwzgórzu [47, 112].

III-3. Transformujący czynnik wzrostu β

Transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β) należy do rodziny cytokin. U człowieka występuje w trzech formach kodowanych przez różne geny (*TGFB1*, *TGFB2* i *TGFB3*) i syntetyzowanych w wielu typach komórek, w których zachodzi także synteza receptorów TGF- β [114]. Wykazano, że transformujący czynnik wzrostu β jest syntetyzowany w wisceralnej i podskórnej tkance tłuszczowej człowieka, a ilość powstającego TGF- β jest wprost proporcjonalna do stopnia otyłości [115]. Podwyższony poziom TGF- β w surowicy zaobserwowano również w cukrzycy typu 2 [116].

Ekspresja genu TGF- β jest regulowana głównie przez TNF- α . Podanie TNF- α indukuje ekspresję genu TGF- β w tkance tłuszczowej otyłych myszy [117]. U ludzi zaobserwowano silną korelację pomiędzy ilością mRNA TNF- α i TGF- β w wisceralnej tkance tłuszczowej, co sugeruje udział TNF- α w regulacji syntezy TGF- β również w tkance tłuszczowej człowieka [115].

TGF- β może wpływać na ekspresję niektórych genów w tkance tłuszczowej, między innymi jest silnym induktorem ekspresji genu kodującego PAI-1. Wykazano, że w hodowli ludzkich preadipocytów pochodzących z podskórnej tkanki tłuszczowej otyłych pacjentów TGF- β 1 indukuje syntezę PAI-1 [118]. Ponadto TGF- β hamuje różnicowanie ludzkich adipocytów w hodowli pierwotnej [119].

III-4. Czynnik wzrostu śródbłonna naczyń

Czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) jest glikoproteiną występującą w postaci kilku izoform, które powstają w wyniku alternatywnego składowania eksonów genu *VEGF* i zbudowane są ze 121, 145, 165, 183, 189 i 206 aminokwasów, przy czym VEGF₁₆₅ jest formą dominującą [120, 121]. Aktywny czynnik wzrostu śródbłonna naczyń jest homodimerem o masie od 34 do 46 kDa [120].

VEGF powstaje w różnych tkankach, między innymi w tkance tłuszczowej [120, 122]. W regulacji ekspresji genu *VEGF* bierze udział wiele czynników. Jednym z najważniejszych jest niedotlenienie, które prowadzi do aktywacji transkrypcji genu i zwiększenia stabilizacji mRNA tego czynnika wzrostu [120, 122]. Do indukcji ekspresji i wzmożonego wydziela-

nia VEGF dochodzi także pod wpływem TGF- β i innych czynników wzrostu, jak IGF-1 czy EGF [120]. Ekspresja genu *VEGF* jest regulowana również przez interleukiny, m.in. IL-6. Gen kodujący VEGF ulega wzmożonej ekspresji podczas różnicowania komórek, np. preadipocytów w adipocyty, czemu towarzyszy zwiększone wydzielanie VEGF [123]. Wykazano ponadto, że ekspresja genu *VEGF* w adipocytach jest pod kontrolą insuliny, która w fizjologicznym stężeniu stymuluje syntezę i wydzielanie VEGF [124].

Receptory VEGF, VEGFR-1 i VEGFR-2, występują głównie na powierzchni komórek śródbłonna i komórek szpiku kostnego [120]. Jednak miejscem działania tego powstającego w wielu typach komórek czynnika wzrostu są przede wszystkim komórki śródbłonna, w których aktywacja receptora VEGFR-2 prowadzi do stymulacji wzrostu i podziałów.

VEGF należy do najważniejszych czynników angiogennych — działających parakrynnie cytokin, które stymulują proces angiogenezy, czyli powstawania nowych naczyń krwionośnych (np. podczas rozwoju zarodka i tworzenia kości) [120]. VEGF bierze również udział w patologicznej angiogenezie związanej z różnymi schorzeniami, m.in. z rozwojem nowotworów. Uważa się, że VEGF może także pełnić rolę parakrynnego przekaźnika dla działających pośrednio czynników angiogennych, takich jak TGF- β .

IV. Białka związane z przemianami lipidów i lipoprotein

IV-1. Lipaza lipoproteinowa

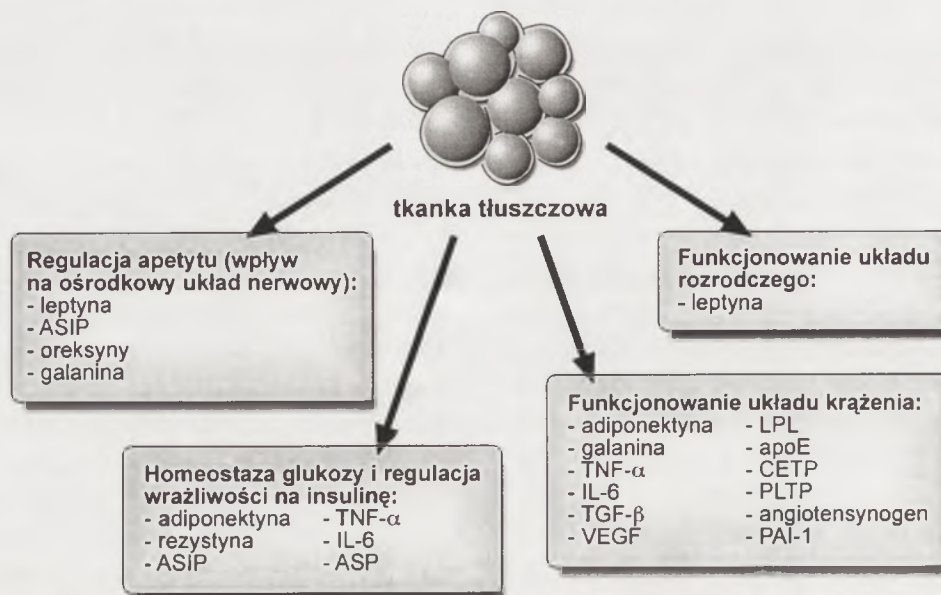
Lipaza lipoproteinowa (LPL) została poznana jako jedno z pierwszych białek wydzielanych przez adipocyty [125]. Komórki tkanki tłuszczowej są głównym miejscem powstawania LPL. Poza tkanką tłuszczową znaczące ilości tego enzymu są syntetyzowane w mięśniach. Lipaza lipoproteinowa, produkt genu *LPL*, składa się z 475 aminokwasów, z których 27 to sekwencja sygnałowa, nie występująca w dojrzałym białku [126].

Ekspresja genu *LPL* jest regulowana na wielu etapach, począwszy od transkrypcji genu, poprzez modyfikacje mRNA i translację oraz szereg zmian posttranslacyjnych, takich jak glikozylacja i dimeryzacja, koniecznych do pełnej aktywacji enzymu [127, 128]. Aktywność LPL w tkance tłuszczowej zmienia się w zależności od stanu odżywienia organizmu i wzrasta po posiłku, przy czym zmiany te nie są

związane ze wzrostem ekspresji genu *LPL* [129]. Ponadto, podwyższoną aktywność LPL obserwuje się w tkance tłuszczowej osób otyłych [129]. Dużą rolę w regulacji aktywności enzymatycznej LPL odgrywają apolipoproteiny. Apolipoproteina C II (apoC II) jest aktywatorem LPL — defekt apoC II prowadzi do hiperchylomikronemii, natomiast apoC III, apoE i apoA I hamują aktywność LPL [130].

W ludzkim genie *LPL* opisano niemal 100 naturalnie występujących mutacji [131, 132]. Większość z nich prowadzi do obniżenia aktywności enzymu, co z kolei często wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na miażdżycę. Jedynie mutacja

protein krwi, głównie chylomikronów, VLDL i HDL, i może przemieszczać się pomiędzy tymi lipoproteinami. W odróżnieniu od większości apolipoprotein, które powstają przede wszystkim w wątrobie i w jelicie, apoE jest syntetyzowana i wydzielana także przez inne tkanki czy narządy, w tym przez tkankę tłuszczową [133, 134]. Ekspresja genu *APOE* zachodzi zarówno w ludzkiej tkance tłuszczowej, jak i w adipocytach 3T3-L1 i jest regulowana przez stężenie wewnątrzkomórkowego cholesterolu [134]. ApoE z kolei może wpływać na wewnątrzkomórkowy metabolizm cholesterolu poprzez ułatwianie wypływu cholesterolu z komórki.



Ryc. 2. Funkcje fizjologiczne białek wydzielanych przez tkankę tłuszczową. Objasnienia skrótów jak przy Ryc. 1.

Ser447-stop, której częstotliwość w Europie wynosi prawie 20%, jest związana z podwyższoną aktywnością LPL i obniżonym stężeniem triacylogliceroli w krwi, a jej występowanie może chronić przed miażdżycą i chorobą wieńcową [131].

LPL odgrywa dużą rolę w metabolizmie lipidów i lipoprotein. Enzym ten znajduje się na powierzchni śródbłonna naczyń włosowatych i odpowiada za hydrolizę triacylogliceroli w chylomikronach i VLDL, podczas której uwalniane są z tych lipoprotein kwasy tłuszczowe. Pobrane kwasy tłuszczowe służą do resyntezy triacylogliceroli w adipocytach, natomiast w mięśniach szkieletowych i w mięśniu sercowym są wykorzystywane jako substraty energetyczne. Uważa się, że podwyższona aktywność LPL w tkance tłuszczowej może być jedną z przyczyn otyłości.

IV-2. Apolipoproteina E

Apolipoproteina E (apoE) jest ważnym składnikiem białkowym występującym na powierzchni lipo-

Ludzka apoE, zbudowana z jednego łańcucha polipeptydowego liczącego 299 aminokwasów, jest ligandem rozpoznawanym przez wiele receptorów lipoprotein [134]. Obecność apoE na powierzchni lipoprotein umożliwia ich pobieranie przez komórki różnych tkanek [134]. ApoE pośredniczy między innymi w pobieraniu remnantów chylomikronów, VLDL i HDL przez wątrobę [135]. O tym, jak ważną rolę pełni apoE w przemianach lipoprotein, świadczy fakt, że brak białka apoE lub jego nieprawidłowa budowa prowadzi do nagromadzenia w krwi lipoprotein bogatych w cholesterol i do rozwoju miażdżycy [135]. W wyniku polimorfizmu ludzkiego genu *APOE* powstaje 30 wariantów białka apoE, w tym trzy główne izoformy (E2, E3 i E4), z których apoE3 jest najbardziej powszechna [136]. Występowanie apoE2 i apoE4 wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na choroby układu krążenia [137, 138]. ApoE2 z powodu zamiany jednego z aminokwasów ma mniejsze powinowactwo do receptorów lipoprotein [137]. U osób, u których występuje tylko

forma apoE2, obserwuje się nagromadzenie IDL i remnantów chylomikronów, co może prowadzić do hiperlipoproteinemii typu III (dysbetalipoproteinemii) i przedwczesnej miażdżycy [137]. Obecność niektórych wariantów apoE4 wiąże się z obniżonym poziomem apoE w krwi oraz podwyższonym poziomem cholesterolu, LDL i lipoproteiny (a), które są czynnikami ryzyka w chorobie wieńcowej [138].

IV-3. Białko przenoszące estry cholesterolu

Kodowane przez gen *CETP* białko przenoszące estry cholesterolu (CETP) jest hydrofobową glikoproteiną wydzielaną głównie przez wątrobę, śledzionę i tkankę tłuszczową [139, 140]. Białko CETP składa się z 476 aminokwasów i krąży w krwi w połączeniu z HDL.

Ekspresja genu kodującego CETP jest wyższa w podskórnej tkance tłuszczowej w porównaniu z wisceralną [10]. Dieta bogata w cholesterol wywołuje zwiększoną ekspresję genu *CETP* [141, 142]. Wykazano, że istnieje zależność między ilością mRNA CETP a zawartością cholesterolu w błonie komórkowej adipocyta — poziom tego mRNA jest wyższy w komórkach, których błony zawierają więcej cholesterolu [139]. Stężenie białka CETP i jego aktywność w krwi są podwyższone u otyłych pacjentów [143]. Zaobserwowano także dodatnią korelację aktywności CETP z BMI oraz spadek aktywności tego białka i jego stężenia w krwi towarzyszący obniżeniu masy ciała [143].

Białko CETP uczestniczy w przenoszeniu estrów cholesterolu, triacylogliceroli i, w mniejszym stopniu, fosfolipidów między lipoproteinami krwi; jednak główną jego funkcją jest przenoszenie estrów cholesterolu z HDL do lipoprotein takich jak VLDL, IDL i LDL. Uważa się, że CETP odgrywa kluczową rolę w zwrotnym transporcie cholesterolu, procesie bardzo istotnym w zapobieganiu miażdżycy naczyń. CETP bierze również udział w katabolizmie HDL, aktywowanym w obecności apolipoprotein apoA I i apoC III [141, 143, 144]. Mutacje w genie *CETP*, prowadzące do niedoboru białka przenoszącego estry cholesterolu, wiążą się z podwyższonym poziomem HDL i obniżonym poziomem LDL w krwi [140, 145]. W zależności od rodzaju mutacji w wyniku niedoboru CETP powstają różne populacje HDL, między innymi obserwuje się nagromadzenie bardzo dużych, nieprawidłowo zbudowanych HDL, zawierających większość znanych apolipoprotein [145]. Mimo to uważa się, że mutacje w genie *CETP*, szczególnie te prowadzące do zwiększenia ilości prawidłowo zbudowanych HDL, są w większości przy-

padków związane z obniżonym ryzykiem zachorowania na chorobę wieńcową [145].

IV-4. Białko przenoszące fosfolipidy

Białko przenoszące fosfolipidy (PLTP) jest produktem genu *PLTP* i powstaje w wielu typach komórek, jednak gdy uwzględnimy masę tkanki czy narządu, ważnymi miejscami syntezy PLTP okazują się wątroba i tkanka tłuszczowa [10, 146]. Wydzielane białko jest glikoproteiną o masie ok. 80 kDa [147]. Aktywność PLTP jest dodatnio skorelowana z BMI (jest wyższa u osób otyłych), całkowitym stężeniem cholesterolu i triacylogliceroli w krwi oraz z opornością na insulinę [10, 148]. Dieta bogata w cholesterol zwiększa stężenie i aktywność PLTP w krwi [140].

Główną funkcją PLTP jest przenoszenie lipidów, przede wszystkim fosfolipidów i diacylogliceroli, pomiędzy lipoproteinami bogatymi w triacyloglicerole a HDL [149]. PLTP odgrywa również istotną rolę w metabolizmie HDL, uczestnicząc we wzajemnych przemianach różnych frakcji HDL (HDL3, HDL2 i pre β -HDL). Zaobserwowano, że PLTP bierze udział w powstawaniu HDL2 i pre β -HDL z HDL3, co może stymulować zwrotny transport cholesterolu [150].

V. Białka związane z funkcjonowaniem układu krążenia

V-1. Angiotensynogen

Angiotensynogen, produkt genu *AGT* i prekursor angiotensyn, jest jednym ze składników układu renina-angiotensyna (RAS), który odgrywa istotną rolę w regulacji ciśnienia tętniczego krwi i poprzez działanie angiotensyny II wpływa na układ sercowo-naczyniowy oraz gospodarkę wodno-elektrolitową organizmu [151]. Niezależnie od systemowego układu renina-angiotensyna w wielu tkankach i narządach, w tym w tkance tłuszczowej, działają lokalne układy renina-angiotensyna, regulujące funkcjonowanie tych tkanek czy narządów.

W tkance tłuszczowej człowieka powstaje angiotensynogen, a wraz z nim syntetyzowane są enzymy niezbędne do jego przemian (renina, konwertaza angiotensyny, katepsyna D i G) oraz oba typy receptorów angiotensyny (AT 1 i AT 2) [5, 151, 152]. Ekspresja genu *AGT* wzrasta podczas różnicowania adipocytów i utrzymuje się na podwyższonym poziomie w dojrzałych adipocytach [153]. Zmiany hormonalne i metaboliczne towarzyszące otyłości i oporności

na insulinę zwiększając syntezę i wydzielanie angiotensynogenu przez adipocyty. Ekspresja genu *AGT* w tkance tłuszczowej jest dodatnio skorelowana z BMI i wzrasta wraz ze wzrostem otyłości [154]; ponadto jest aktywowana przez wolne kwasy tłuszczowe, glukokortykosteroidy, a także przez czynniki obniżające wrażliwość komórek na insulinę, jak TNF- α [153, 155]. Ilość powstającego w tkance tłuszczowej angiotensynogenu zależy również od diety, spada podczas głodzenia i rośnie po spożyciu pokarmu, co sugeruje istotną rolę insuliny w regulacji ekspresji genu *AGT* [156]. Stymulujący wpływ insuliny na syntezę angiotensynogenu został rzeczywiście wykazany w izolowanych ludzkich adipocytach [157]. Synteza angiotensynogenu zachodzi z różną wydajnością w poszczególnych rodzajach tkanki tłuszczowej, jego stężenie jest wyższe w wisceralnej niż w podskórnej tkance tłuszczowej [10, 152].

Produkty hydrolizy angiotensynogenu, jak angiotensyna II, działają miejscowo, w sposób autokryny i parakryny modulując wzrost tkanki tłuszczowej. Angiotensyna II stymuluje przekształcenie preadipocytów w adipocyty i zwiększa syntezę lipidów w adipocytach poprzez indukcję genów enzymów lipogennych, takich jak syntaza kwasów tłuszczowych i dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa [5, 158]. Sugeruje to, że tkanka tłuszczowa poprzez wytwarzanie angiotensynogenu może w pewnym stopniu regulować swój wzrost i metabolizm. Prawdopodobnie zwiększona synteza angiotensynogenu w tkance tłuszczowej odgrywa rolę w rozwoju otyłości u ludzi. Rosnące wraz ze wzrostem ilości tkanki tłuszczowej stężenie pochodzącego z tej tkanki angiotensynogenu (i angiotensyny II) w krwi może być przyczyną nadciśnienia u otyłych pacjentów.

V-2. Inhibitor aktywatora plazminogenu 1

Inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1), kodowany przez gen *SERPINE1* i należący do rodziny inhibitorów proteaz serynowych (serpin), jest białkiem związanym z fibrynolizą [6]. Białko to hamuje aktywację plazminogenu, prekursora hydrolizującej fibryny plazminy [159]. PAI-1 powstaje w tkance tłuszczowej, hepatocytach, komórkach mięśni gładkich, komórkach śródbłonna i fibroblastach, a następnie jest wydzielany do krwi jako białko zbudowane z 379 aminokwasów [159-161].

Ekspresja genu kodującego PAI-1 jest indukowana przez wiele czynników, m.in. insulinę, angiotensynę II, TGF- β i TNF- α [159, 161-163]. Niektóre z tych czynników są, podobnie jak PAI-1, wydzielane przez tkankę tłuszczową. Wykazano, że stężenie

PAI-1 w krwi osób otyłych jest podwyższone [115, 160, 161]. Ponieważ tkanka tłuszczowa odgrywa znaczącą rolę w syntezie PAI-1, wzmożona synteza i wydzielanie PAI-1 przez tkankę tłuszczową jest najprawdopodobniej główną przyczyną wzrostu stężenia tego białka w krwi osób otyłych [115]. Otyłości i cukrzycy typu 2 towarzyszy zwiększona częstotliwość występowania chorób układu krążenia. Wydaje się, że może to być związane ze wzrostem poziomu PAI-1 w krwi [115].

VI. Składniki dopełniacza

VI-1. Adypsyna

Adypsyna, określana mianem składnika D dopełniacza, jest proteazą serynową uczestniczącą w alternatywnej ścieżce dopełniacza [7, 164].

Głównym miejscem syntezy adypsyny u człowieka jest tkanka tłuszczowa [164, 165]. Rozwój stopnia otyłości wiąże się ze zwiększoną ekspresją kodującego adypsynę genu *DF* w ludzkiej wisceralnej i podskórnej tkance tłuszczowej [165]. Wzrost masy ciała prowadzi jednak do większych zmian ekspresji genu *DF* w wisceralnej tkance tłuszczowej w porównaniu z podskórną [165]. Ponadto, ekspresja genu kodującego adypsynę jest wrażliwa na zmiany diety — poziom mRNA adypsyny rośnie podczas głodzenia i spada po posiłku [166]. Stężenie adypsyny w krwi odzwierciedla zmiany ekspresji genu *DF* w tkance tłuszczowej i jest dodatnio skorelowane z BMI oraz ze stężeniem insuliny [167, 168]. U osób otyłych i w cukrzycy typu 2 obserwuje się podwyższone stężenie adypsyny w krwi [167, 168]. Stężenie to spada wraz ze spadkiem masy ciała [168].

Adypsyna, wraz z pochodzącym z adipocytów czynnikiem B, bierze udział w procesie hydrolizy składnika C3 dopełniacza, prowadzącej do uwolnienia C3a, prekursora białka stymulującego acylację [7].

VI-2. Białko stymulujące acylację

Białko stymulujące acylację (ASP), nazywane także C3ades-Arg, powstaje z kodowanego przez gen *C3* składnika C3 dopełniacza [7]. Składnik C3 dopełniacza oraz białka niezbędne do jego przemian, adypsyna i czynnik B, są syntetyzowane w dojrziałych adipocytach [7, 10, 169]. Podobnie jak w przypadku adypsyny, poziom mRNA C3 jest wyższy w wisceralnej tkance tłuszczowej w porównaniu z podskórną [10]. Proces powstawania ASP z C3 zachodzi na zewnątrz komórki. C3, adypsyna i czyn-

nik B są wydzielane poza komórkę, a następnie C3 jest hydrolizowany przez adypsynę w obecności czynnika B. W wyniku hydrolizy uwalniany jest 77-aminokwasowy N-końcowy fragment nazywany C3a [7]. Znajdująca się w krwi karboksypeptydaza odcina końcową argininę tworząc ASP o masie około 8,9 kDa [169]. Ponieważ stężenie ASP jest niższe od stężenia jego prekursora, C3, wydaje się, że może być regulowane przez zmiany ilości lub aktywności białek uczestniczących w hydrolizie C3, np. czynnika B i adypsyny [165]. Stężenie ASP w krwi, dodatkowo skorelowane z BMI, poziomem insuliny i ze stężeniem triacylogliceroli, wzrasta wraz z rozwojem otyłości, cukrzycy, hiperlipidemii i u pacjentów z chorobą wieńcową [167, 170, 171].

ASP pełni prawdopodobnie wiele funkcji w metabolizmie tkanki tłuszczowej, między innymi bierze udział w regulacji syntezy triacylogliceroli [172, 173]. ASP, aktywując ścieżkę sygnałową kinazy białkowej C, stymuluje przemieszczanie się transporterów glukozy na powierzchnię komórki [174, 175]. Opisane działanie ASP wiąże się ze zwiększonym transportem glukozy do adipocytów i zwiększoną syntezą glicerolo-3-fosforanu niezbędnego do syntezy triacylogliceroli. Ponadto ASP może stymulować pobieranie kwasów tłuszczowych z chylomikronów przez adipocyty [172]. ASP stymuluje syntezę triacylogliceroli poprzez zwiększenie ilości niezbędnych substratów (glicerolo-3-fosforanu i kwasów tłuszczowych) oraz przez aktywację acylotransferazy diacyloglicerolowej [173]. ASP może także, poprzez wpływ na aktywność fosfodiesterazy, hamować aktywność lipazy zależnej od hormonów [176].

ASP wiąże się z powierzchnią adipocytów, jednak receptor ASP nie został jeszcze poznany [177]. Ponadto ASP może wpływać na funkcjonowanie różnych komórek, znajdujących się poza tkanką tłuszczową, co sugeruje działanie endokryne tego białka. Między innymi ASP działa bezpośrednio na komórki β trzustki i stymuluje uwalnianie insuliny [178].

VII. Podsumowanie

Tkanka tłuszczowa człowieka jest miejscem biosyntezy wielu aktywnych biologicznie białek i peptydów, które po wydzieleniu przez adipocyty działają poza obrębem tej tkanki. Uwalniane do krwi białka, dzięki obecności swoistych receptorów na powierzchni komórek innych tkanek, działają jak klasyczne hormony wpływając na metabolizm docelowych tkanek i narządów. Za pośrednictwem tych hormonów tkanka tłuszczowa komunikuje się z inny-

mi tkankami i narządami, a zmiany metabolizmu i masy tkanki tłuszczowej znajdują odbicie w zmianach metabolicznych całego organizmu. Dzięki adipocytokinom tkanka tłuszczowa odgrywa istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych (Ryc. 2). Bierze udział w regulacji przemian energetycznych organizmu — poprzez adiponektynę, rezystynę, ASIP, TNF- α , interleukinę 6 i ASP uczestniczy w homeostazie glukozy i regulacji wrażliwości na insulinę. Działanie leptyny, ASIP, oreksyn i galaniny na ośrodkowy układ nerwowy pozwala tkance tłuszczowej na udział w regulacji sytości. Tkanka tłuszczowa przez adiponektynę, galaninę, TNF- α , interleukinę 6, TGF- β , VEGF, lipazę lipoproteinową, apoE, CETP, PLTP, angiotensynogen i PAI-1 wywiera wpływ na funkcjonowanie układu krążenia. Ponadto leptyna wydzielana przez tkankę tłuszczową może uczestniczyć w regulacji funkcjonowania układu rozrodczego. Adipocytokiny wydzielane przez tkankę tłuszczową działają także w obrębie tej tkanki, w sposób auto- i parakryny regulując takie procesy, jak podziały komórkowe i różnicowanie adipocytów oraz dopasowując metabolizm tkanki tłuszczowej do aktualnych potrzeb energetycznych organizmu.

Mimo że nie wszystkie funkcje fizjologiczne omawianych adipocytokin zostały poznane, można zauważyć, że większość z nich uczestniczy w regulacji równowagi energetycznej organizmu, zaś zmiany metaboliczne wywołane wzrostem lub spadkiem aktywności wydzielniczej tkanki tłuszczowej mogą prowadzić do tak zwanych chorób metabolicznych: nadciśnienia, miażdżycy i cukrzycy typu 2. Wydaje się w związku z tym, że białka wydzielane przez tkankę tłuszczową lub ich geny mogą stanowić cel działania farmakologicznego w terapii otyłości i innych schorzeń metabolicznych.

Podziękowania

Praca była finansowana w ramach projektu KBN 3 P05A 098 23.

Artykuł otrzymano 26 kwietnia 2004

Zaakceptowano do druku 1 lipca 2004

Piśmiennictwo

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J M (1994) *Nature* 372: 425-432
2. Scherer P E, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish H F (1995) *J Biol Chem* 270: 26746-26749
3. Stepan C M, Bailey S T, Bhat S, Brown E J, Banerjee R, Wright C M, Patel H R, Ahima R S, Lazar M A (2001) *Nature* 409: 307-312

4. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) *Science* **259**: 87-91
5. Jones BH, Standridge MK, Moustaid N (1997) *Endocrinology* **138**: 1512-1519
6. Shimomura I, Funahashi I, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, Yamashita S, Miura M, Fukuda Y, Takemura K, Tokunaga K, Matsuzawa Y (1996) *Nat Med* **2**: 800-802
7. Choy LN, Rosen BS, Spiegelman BM (1992) *J Biol Chem* **267**: 12736-12741
8. Yang YS, Song HD, Li RY, Zhou LB, Zhu ZD, Hu RM, Han ZG, Chen JL (2003) *Biochem Biophys Res Commun* **300**: 839-846
9. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Mizuno K, Matsuzawa Y, Matsubara K (1997) *Gene* **190**: 227-235
10. Dusserre E, Moulin P, Vidal H (2000) *Biochim Biophys Acta* **1500**: 88-96
11. Hu E, Liang P, Spiegelman BM (1996) *J Biol Chem* **271**: 10697-10703
12. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y (2000) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**: 1595-1599
13. Karbowska J, Brzeziński M, Kochan Z (2003) *Postępy Hig Med Dośw* **57**: 579-591
14. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **221**: 286-289
15. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **257**: 79-83
16. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**: 85-89
17. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999) *Circulation* **100**: 2473-2476
18. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y (2000) *Circulation* **102**: 1296-1301
19. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y (2001) *Circulation* **103**: 1057-1063
20. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yanow N, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T (2002) *J Biol Chem* **277**: 25863-25866
21. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE (2001) *Nat Med* **7**: 947-953
22. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L (2001) *J Clin Invest* **108**: 1875-1881
23. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 2005-2010
24. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T (2001) *Nat Med* **7**: 941-946
25. Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S, Boutin P, Vaxillaire M, Lepretre F, Dupont S, Hara K, Clement K, Bihain B, Kadowaki T, Froguel P (2002) *Hum Mol Genet* **11**: 2607-2614
26. Spiegelman BM (1998) *Diabetes* **47**: 507-514
27. Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M, Olefsky JM (2002) *Diabetes* **51**: 2968-2974
28. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T (2003) *Nature* **423**: 762-769
29. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait B T, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM (1995) *Science* **269**: 543-546
30. Kochan Z, Karbowska J, Swierczynski J (1999) *Horm Metab Res* **31**: 538-542
31. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K (1997) *Nat Med* **3**: 1029-1033
32. Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ure (1999) *Endocrinology* **140**: 5995-5998
33. Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, Buyse M, Kermorgant S, Laigneau JP, Attoub S, Lehy T, Henin D, Mignon M, Lewin MJ (2000) *Gut* **47**: 178-183
34. Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, DeJohnston J, Lancy ED, Hassink SG, Funanage VL (1998) *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 1810-1813
35. Taouis M, Chen JW, Daviaud C, Dupont J, Derouet M, Simon J (1998) *Gene* **208**: 239-242
36. Zhang Y, Guo KY, Diaz PA, Heo M, Leibel RL (2002) *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**: R226-R234
37. Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J (1995) *Nature* **377**: 527-529
38. Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Friedman JM, Ailhaud G, Dani C (1996) *J Biol Chem* **271**: 2365-2368
39. Pratley RE, Ren K, Milner MR, Sell SM (2000) *Mol Genet Metab* **70**: 19-26
40. Mizuno TM, Bergen H, Funabashi T, Kleopoulos SP, Z hong Y G, Bauman WA, Mobbs CV (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3434-3438
41. Mueller WM, Gregoire FM, Stanhope KL, Mobbs CV, Mizuno TM, Warden CH, Stern JS, Havel PJ (1998) *Endocrinology* **139**: 551-558
42. Bradley RL, Cheatham B (1999) *Diabetes* **48**: 272-278
43. Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J, Stephens TW (1996) *J Biol Chem* **271**: 5301-5304
44. Kochan Z, Karbowska J (2004) *Mol Cell Endocrinol* **218**: 57-64
45. Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ Jr, Seeley RJ, Baskin DG (2000) *Nature* **404**: 661-671
46. Sahu A (1998) *Endocrinology* **139**: 4739-4742
47. Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidruscin N, Denton DA, Friedman JM (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 8878-8883
48. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, MacKellar W, Rosteck PR Jr, Schoner B, Smith D, Tinsley FC, Zhang XY, Heiman M (1995) *Nature* **377**: 530-532
49. Wang Y, Kuropatwinski KK, White DW, Hawley TS, Hawley RG, Tartaglia LA, Baumann H (1997) *J Biol Chem* **272**: 16216-16223
50. Lostao MP, Urdaneta E, Martinez-Anso E, Barber A, Martinez JA (1998) *FEBS Lett* **423**: 302-306
51. Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L (1998) *Nature* **393**: 684-688
52. Seuffer T, Kieffer T, Habener JF (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 674-679
53. Bornstein SR, Abu-Asab M, Glasow A, Path G, Hauner H, Tsokos M, Chrousos GP, Scherbaum WA (2000) *Diabetes* **49**: 532-538

54. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, O pentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV (1996) *Lancet* **348**: 159-161
55. Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, Snodgrass HR (1996) *Nat Med* **2**: 585-589
56. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI (1998) *Nature* **394**: 897-901
57. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR (1998) *Science* **281**: 1683-1686
58. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S (2001) *Diabetes* **50**: 2199-2202
59. Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM (2002) *Obes Res* **10**: 1-5
60. McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, Levick PL, Barnett AH, Kumar S (2002) *Lancet* **359**: 46-47
61. Yura S, Sagawa N, Itoh H, Kakui K, Nuamah MA, Koritad A, Takemura M, Fujii S (2003) *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 1394-1397
62. Morash BA, Willkinson D, Ur E, Wilkinson M (2002) *FEBS Lett* **526**: 26-30
63. Nogueiras R, Gallego R, Gualillo O, Caminos JE, Garcia-Caballero T, Casanueva FF, Dieguez C (2003) *FEBS Lett* **548**: 21-27
64. Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS (2001) *J Biol Chem* **276**: 11252-11256
65. Hartman HB, Hu X, Tyler KX, Dalal CK, Lazar MA (2002) *J Biol Chem* **277**: 19754-19756
66. Moore GB, Chapman H, Holder JC, Lister CA, Piercey V, Smith SA, Clapham JC (2001) *Biochem Biophys Res Commun* **286**: 735-741
67. Fukui Y, Motojima K (2002) *Diabetes Obes Metab* **4**: 342-345
68. Kochan Z, Karbowska J (2003) *Przegl Lek* **60**: 40-42
69. Villena JA, Kim KH, Sul HS (2002) *Horm Metab Res* **34**: 664-670
70. Wilson BD, Ollmann MM, Kang L, Stoffel M, Bell GI, Barsh GS (1995) *Hum Mol Genet* **4**: 223-230
71. Kwon HY, Bultman SJ, Loffler C, Chen WJ, Furdon PJ, Powell JG, Usala AL, Wilkison W, Hansmann I, Woychik RP (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9760-9764
72. Xue B, Moustaid-Moussa N, Wilkison WO, Zemel MB (1998) *FASEB J* **12**: 1391-1396
73. Abdel-Malek ZA (2001) *Cell Mol Life Sci* **58**: 434-441
74. Suzuki I, Tada A, Ollmann MM, Barsh GS, Ims S, Lamoreux ML, Hearing VJ, Nordlund JJ, Abdel-Malek ZA (1997) *J Invest Dermatol* **108**: 838-842
75. Wikberg JE (1999) *Eur J Pharmacol* **375**: 295-310
76. Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P (2000) *J Clin Invest* **106**: 253-262
77. Xue B, Zemel MB (2000) *J Nutr* **130**: 2478-2481
78. Claycombe KJ, Wang Y, Jones BH, Kims S, Wilkison WO, Zemel MB, Chun J, Moustaid-Moussa N (2000) *Physiol Genomics* **3**: 157-162
79. Xue BZ, Wilkison WO, Mynatt RL, Moustaid N, Goldman M, Zemel MB (1999) *Physiol Genomics* **1**: 11-19
80. Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D, Chambon P, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W (2000) *J Biol Chem* **275**: 28488-28493
81. Kim I, Kim HG, Kim H, Kim HH, Park SK, Uhm CS, Lee ZH, Koh GY (2000) *Biochem J* **346**: 603-610
82. Yoon JC, Chickering TW, Rosen ED, Dussault B, Qin Y, Soukas A, Friedman JM, Holmes WE, Spiegelman B (2000) *Mol Cell Biol* **20**: 5343-5349
83. Ge H, Yang G, Huang L, Motola DL, Pourbahrami T, Li C (2004) *J Biol Chem* **279**: 2038-2045
84. DeLecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao XB, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg ELF, Gautvik V T, Bartlett FS, Frankel WN, vanden Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 322-327
85. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JRS, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) *Cell* **92**: 573-585
86. Kirchgessner A L, Liu M T (1999) *Neuron* **24**: 941-951
87. Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routhledge C, Hemmati P, Muntton RP, Ashmeade TE, Shah AJ, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 10911-10916
88. Mieda M, Yanagisawa M (2002) *Curr Opin Neurobiol* **12**: 339-346
89. Komaki G, Matsumoto Y, Nishikata H, Kawai K, Nozaki T, Takii M, Sogawa H, Kubo C (2001) *Eur J Endocrinol* **144**: 645-651
90. Blanco M, Lopez M, Garcia-Caballero T, Gallego R, Vazquez-Boquete A, Morel G, Senaris R, Casanueva F, Dieguez C, Beiras A (2001) *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 1616-1619
91. Sweet DC, Levine AS, Billington CJ, Kotz CM (1999) *Brain Res* **821**: 535-538
92. Bersani M, Johnsen AH, Hojrup P, Dunning BE, Andreasen JJ, Holst JJ (1991) *FEBS Lett* **283**: 189-194
93. Ryan MC, Gundlach AL (1996) *Neuroscience* **70**: 709-728
94. Wang J, Leibowitz KL (1997) *Brain Res* **777**: 231-236
95. Mercer JG, Lawrence CB, Atkinson T (1996) *Brain Res Mol Brain Res* **43**: 202-208
96. Kolakowski LF Jr, O'Neill GP, Howard AD, Broussard SR, Sullivan KA, Feighner SD, Sawzdargo M, Nguyen T, Kargman S, Shiao LL, Hreniuk DL, Tan CP, Evans J, Abramovitz M, Chateaufaufa, Coulombe N, Ng G, Johnson MP, Tharian A, Khoshbouei H, George S R, Smith RG, O'Dowd BF (1998) *J Neurochem* **71**: 2239-2251
97. Habert-Ortoli E, Amiranoff B, Loquet I, Laburthe M, Mayaux JF (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9780-9783
98. Waters SM, Krause JE (2000) *Neuroscience* **95**: 265-271
99. Bauer FE, Ginsberg L, Venetidou M, MacKay DJ, Burrin JM, Bloom SR (1986) *Lancet* **2**: 192-195
100. Kyrkouli SE, Stanley BG, Hutchinson R, Seirafi RD, Leibowitz SF (1990) *Brain Res* **521**: 185-191
101. Montague CT, Prins JB, Sanders L, Zhang J, Sewter CP, Digby J, Byrne CD, O'Rahilly S (1998) *Diabetes* **47**: 1384-1391
102. Gearing A, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Gallo way WA, Gilbert R, Gordon JL, Leber TM, Mangan M, Miller K, Nayeep, Owen K, Patel S, Thomas W, Wells G, Wood LM, Woolley K (1994) *Nature* **370**: 555-557
103. Hotamisligil GS, Arner P, Atkinson RL, Spiegelman B M (1997) *Diabetes* **46**: 451-455
104. Morin C, Pagliassoni M, Windmiller D, Eckel R (1997) *J Gerontol* **52A**: B190-B195
105. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW (1997) *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 4196-4200
106. Crawford EK, Ensor JE, Kalvakolanu I, Hasday JD (1997) *J Biol Chem* **272**: 21120-21127
107. Hotamisligil GS (2000) *Int J Obes* **24**: S23-S27
108. Liu L S, Spelleken M, Rohrig K, Hauner H, Eckel J (1998) *Diabetes* **47**: 515-522
109. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS (1998) *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 847-850
110. Shizuya K, Komori T, Fujiwara R, Miyahara S, Ohmori M, Nomura J (1998) *Life Sci* **62**: 2315-2320
111. Path G, Bornstein SR, Gurniak M, Chrousos GP, Scherbaum WA, Hauner H (2001) *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 2281-2288
112. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson S L, Ohlsson C, Jansson JO (2002) *Nat Med* **8**: 75-79

113. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B (2000) *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 3338-3342
114. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK (1986) *Science* **233**: 532-534
115. Alessi MC, Bastelica D, Morange P, Berthet B, Leduc J, Verdier M, Geel O, Juhan-Vague I (2000) *Diabetes* **49**: 1374-1380
116. Pfeiffer A, Middelberg-Bispin K, Drewes C, Schatz H (1996) *Diabetes Care* **19**: 1113-1117
117. Samad F, Yamamoto K, Pandey M, Loskutoff DJ (1997) *Mol Med* **3**: 37-48
118. Crandal DL, Quinet EM, Morgan GA, Busler DE, McHendry-Rinde B, Kral JG (1999) *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 3222-3227
119. Petruschke T, Rohrig K, Hauner H (1994) *Int J Obes Relat Metab Disord* **18**: 532-536
120. Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J (2003) *Nat Med* **9**: 669-676
121. Tisher E, Mitchell R, Hartmann T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes J, Abraham J (1991) *J Biol Chem* **266**: 11947-11954
122. Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA, Budenbender K T, Ko W, Rosengart TK (1997) *J Surg Res* **67**: 147-154
123. Claffey KP, Wilkison WO, Spiegelman BM (1992) *J Biol Chem* **267**: 16317-16322
124. Mick GJ, Wang X, McCormick K (2002) *Endocrinology* **143**: 948-953
125. Fried SK, DiGirolamo M (1986) *Life Sci* **39**: 2111-2119
126. Kirchgessner TG, Chuat JC, Heinzmann C, Etienne J, Guilhot S, Svenson K, Ameis D, Pilon C, d'Auriol L, Andalibi A, Schotz MC, Galibert F, Lusis AJ (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9647-9651
127. Ben-Zeev O, Doolittle MH, Davis RC, Elovson J, Schotz MC (1992) *J Biol Chem* **267**: 6219-6227
128. Vannier C, Ailhaud G (1989) *J Biol Chem* **264**: 13206-13216
129. Ong JM, Kern PA (1989) *J Clin Invest* **84**: 305-311
130. Yamamoto M, Morita SY, Kumon M, Kawabe M, Nishitsuji K, Saito H, Vertut-Doi A, Nakano M, Handa T (2003) *Biochim Biophys Acta* **1632**: 31-39
131. Humphries SE, Nicaud V, Margalef J, Tiret L, Talmud PJ (1998) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**: 526-534
132. Nickerson DA, Taylor SL, Weiss KM, Clark AG, Hutchinson RG, Stengard J, Salomaa V, Vartiainen E, Boerwinkle E, Sing CF (1998) *Nat Genet* **19**: 233-240
133. Kraft HG, Menzel HJ, Hoppichler F, Vogel W, Utermann G (1989) *J Clin Invest* **83**: 137-142
134. Zechner R, Moser R, Newman TC, Fried SK, Breslow JL (1991) *J Biol Chem* **266**: 10583-10588
135. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992) *Science* **258**: 468-471
136. deKnijff P, vandenMaagdenberg AM, Frants RR, Havkes LM (1994) *Hum Mutat* **4**: 178-194
137. Rall SC Jr, Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 4696-4700
138. Lahoz C, Schaefer EJ, Cupples LA, Wilson PW, Levy D, Osgood D, Parpos S, Pedro-Botet J, Daly JA, Ordovas JM (2001) *Atherosclerosis* **154**: 529-537
139. Radeau T, Lau P, Robb M, McDonnell M, Ailhaud G, McPherson R (1995) *J Lipid Res* **36**: 2552-2561
140. Bruce C, Chouinard RA Jr, Tall AR (1998) *Annu Rev Nutr* **18**: 297-330
141. Jiang XC, Agellon LB, Walsh A, Breslow JL, Tall A (1992) *J Clin Invest* **90**: 1290-1295
142. Martin LJ, Connelly PW, Nancoo D, Wood N, Zhang J, Maguire G, Quinet E, Tall AR, Marcel YL, McPherson R (1993) *J Lipid Res* **34**: 437-446
143. Arai T, Yamashita S, Hirano K, Sakai N, Kotani K, Fujioka S, Nozaki S, Keno Y, Yamane M, Shinohara E, Islam AHMW, Ishigami M, Nakamura T, Kameda-Takemura K, Tokunaga K, Matsuzawa Y (1994) *Arterioscler Thromb* **14**: 1129-1136
144. Hayek T, Azrolan N, Verdery RB, Walsh A, Chajek-Shaul T, Agellon LB, Tall AR, Breslow JL (1993) *J Clin Invest* **92**: 1143-1152
145. Asztalos BF, Horvath KV, Kajinami K, Nartsupha C, Cox CE, Batista M, Schaefer EJ, Inazu A, Mabuchi H (2004) *J Lipid Res* **45**: 448-455
146. Jiang XC, Bruce C (1995) *J Biol Chem* **270**: 17133-17138
147. Huuskonen J, Jauhiainen M, Ehnholm C, Olkkonen VM (1998) *J Lipid Res* **39**: 2021-2030
148. Riemens SC, van Tol A, Sluiter WJ, Dullaart RP (1998) *Diabetologia* **41**: 929-934
149. Rao R, Albers JJ, Wolfbauer G, Pownall HJ (1997) *Biochemistry* **36**: 3645-3653
150. von Eckardstein A, Jauhiainen M, Huang Y, Metso J, Langer C, Pussinen P, Wu S, Ehnholm C, Assmann G (1996) *Biochim Biophys Acta* **1301**: 255-262
151. Karlsson C, Lindell K, Ottosson M, Sjostrom L, Carlsson B, Carlsson LM (1998) *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 3925-3929
152. Giacchetti G, Faloia E, Mariniello B, Sardu C, Gatti C, Camilloni MA, Guerrieri M, Mantero F (2002) *Am J Hypertens* **15**: 381-388
153. Safonova I, Aubert J, Negrel R, Ailhaud G (1997) *Biochem J* **322**: 235-239
154. Van Harmelen V, Ariapart P, Hoffstedt J, Lundkvist I, Bringham S, Arner P (2000) *Obes Res* **8**: 337-341
155. Aubert J, Darimont C, Safonova I, Ailhaud G, Negrel R (1997) *Biochem J* **328**: 701-706
156. Frederich RC (1992) *Hypertension* **19**: 339-344
157. Harte AL, McTernan PG, McTernan CL, Crocker J, Starcynski J, Barnett AH, Matyka K, Kumar S (2003) *Diabetes Obes Metab* **5**: 462-467
158. Kim S, Dugail I, Standridge M, Claycombe K, Chun J, Moustaid-Moussa N (2001) *Biochem J* **357**: 899-904
159. Simpson AJ, Booth NA, Moore NR, Bennett B (1991) *J Clin Pathol* **44**: 139-143
160. Eriksson P, Reynisdottir S, Lonqvist F, Stemme V, Hamsten A, Arner P (1998) *Diabetologia* **41**: 65-71
161. Cigolini M, Tonoli M, Borgato L, Frigotto L, Manzato F, Zeminian S, Cardinale C, Camin M, Chiaramonte E, De Sandre G, Lunardi C (1999) *Atherosclerosis* **143**: 81-90
162. Sakamoto T, Woodcock-Mitchell J, Marutsuka K, Mitchell JJ, Sobel BE, Fujii S (1999) *Am J Physiol* **276**: C1391-C1397
163. Birgel M, Gottschling-Zeller H, Rohrig K, Hauner H (2000) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**: 1682-1687
164. White RT, Damm D, Hancock N, Rosen BS, Lowell BB, Usher P, Flier JS, Spiegelman BM (1992) *J Biol Chem* **267**: 9210-9213
165. Xia Z, Cianflone K (2003) *Metabolism* **52**: 1360-1366
166. Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM (1987) *Science* **237**: 405-408
167. Maslowska M, Vu H, Phelis S, Sniderman AD, Rhode BM, Blank D, Cianflone K (1999) *Eur J Clin Invest* **29**: 679-686
168. Napolitano A, Lowell BB, Damm D, Leibel RL, Ravussin E, Jimerson DJ, Lesem MD, Van Dyke DC, Daly P A, Chatis P, White RT, Spiegelman BM, Flier JS (1994) *Int J Obes Relat Metab Disord* **18**: 213-218
169. Cianflone K, Maslowska M (1995) *Eur J Clin Invest* **25**: 817-825
170. Koistinen HA, Vidal H, Karonen SL, Dusserre E, Vallier P, Koivisto VA, Ebeling P (2001) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**: 1034-1039
171. Cianflone K, Zhang XJ, Genest J Jr, Sniderman A (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 1239-1244
172. Cianflone KM, Sniderman AD, Dallongeville J, Bertrand M, Raffai E, Davignon J (1992) *Clin Invest Med* **15**: 132-140
173. Cianflone K, Roncari DAK, Maslowska M, Baldo A, Forden J, Sniderman A D (1994) *Biochemistry* **33**: 9489-9495

174. Geminario R, Sniderman AD, Manuel S, Lefebvre S P, Baldo A, Cianflone K (1993) *Metabolism* 42: 574-580
175. Baldo A, Sniderman AD, StLuce S, Zhang XJ, Cianflone K (1995) *J Lipid Res* 36: 1415-1426

176. Van Harmelen V, Reynisdottir S, Cianflone K, Dege rman E, Hoffstedt J, Nilsson K, Sniderman A, Arner P (1999) *J Biol Chem* 274: 18243-18251
177. Saleh J, Christou N, Cianflone K (1999) *Am J Physiol* 276: E815-E821
178. Ahren B, Havel PJ, Pacini G, Cianflone K (2003) *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 1037-1043

Rola kaweoli śródbłonna w endocytozie późnych produktów glikacji

Role of endothelial caveolae in the endocytosis of advanced glycation endproducts

JOLANTA ZUWAŁA-JAGIEŁŁO

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Budowa kaweoli
 - II-1. Białko kaweoli-kaweolina
 - II-2. Lipidy kaweoli
- III. Mechanizm endocytozy z udziałem kaweoli
- IV. Interakcje receptora późnych produktów glikacji z kaweolami śródbłonna
- V. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure of caveolae
 - II-1. Caveolar protein — caveolin
 - II-2. Caveolar lipids
- III. Mechanism of the endocytosis mediated caveolae
- IV. Interaction of advanced glycation endproduct receptor with endothelial caveolae
- V. Conclusion

Wykaz stosowanych skrótów: AGE — późne produkty glikacji (ang. *advanced glycosylation endproducts*); AGE-BSA — albumina zmodyfikowana AGE; AGE-R1/R2/R3 — złożony receptor późnych produktów glikacji; AGR-R1, AGR-R2, AGR-R3 — podjednostki złożonego receptora późnych produktów glikacji; apo A-1 — apolipoproteina A-1; c-Src — rodzina cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych; EGFR — receptor naskórkowego czynnika wzrostu; eNOS — śródbłonkowa syntaza tlenu azotu; HDL — lipoproteina o dużej gęstości (ang. *high density lipoprotein*); HUVEC — linia komórek śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej; IP₃ — 1, 4, 5 trifosforan inozytolu; LDL — lipoproteina o małej gęstości (ang. *low density lipoprotein*); MAP — kinaza białkowa aktywowana mitogenem (ang. *mitogen activated protein*); MSR-A receptor zmiatający typu I klasy A (ang. *macrophage scavenger receptor*); NEM — N-metylomaleimid; NSF — białko fuzujące wrażliwe na N-metylomaleimid; PDGFR — receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu; PV-1 — glikoproteina błonowa i antygen przeciwciał monoklonalnych przeciwko kaweolom komórek śródbłonna; Rab — rodzina białek biorących udział w docelowym kierowaniu i fuzji błon; RAGE — receptor wiążący późne produkty glikacji (ang. *receptor for advanced glycosylation end products*); Ras — rodzina białek onkogennych; SNAP — rozpuszczalne białko wiążące NSF (ang. *soluble NSF attachment protein*); SR-BI — receptor zmiatający typu I klasy B (ang. *scavenger receptor class*

B type I); VVOs — organelle pęcherzykowo-wodniczkowe (ang. *vesiculo-vacuolar organelles*).

I. Wprowadzenie

W komórkach ssaków ma miejsce szereg procesów ułatwiających internalizację określonych cząsteczek i ich transport do poszczególnych obszarów cytoplazmy. Procesy te, nazwane endocytozą, obejmują endocytozę przy udziale lub bez udziału klatryny. Proces endocytozy zachodzący za pośrednictwem dołków i pęcherzyków opłaszczonych klatryną stanowi drogę dostarczania ze środowiska zewnętrznego substancji niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórek ssaków. Dzięki rozwojowi nowych technik analitycznych bada się szlaki endocytarne przebiegające bez udziału klatryny, które nie wykorzystują dołków i pęcherzyków opłaszczonych klatryną, czy innymi elementami opłaszczenia, do internalizacji białek wbudowanych w plazmolemę oraz do kierowania cząsteczek do endosomów lub lizosomów. Do selektywnego transportu cząsteczek wykorzystują natomiast niejednorodność w białkowo-lipidowej budowie plazmolemy oraz strukturalne składniki dynamicznych mikrodomen błony, wpuklających się do komórki [1, 2]. Różnorodność szlaków endocytarnych, w których nie jest wykorzystywana klatryna, związana jest z wychwytem zarówno dużych, jak i małych cząsteczek roz-

Dr, Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej, ul. Szewska 38, 50-139 Wrocław,
e-mail: jagiellodr@interia.pl

puszczalnych w płynie międzykomórkowym. Odkryto różne mechanizmy wychwytu zachodzące bez udziału klatryny przez nieopłaszczone dołki (kaweole), makropinosomy i przez mało poznane drogi konstytutywne przy wpuklaniu plazmolemy. Markery endocytozy niezależnej od klatryny, umiejscowione w błonie plazmatycznej, obejmują dynamiczne regiony tej błony odporne na działanie detergentów oraz bogate w cholesterol, glikosfingolipidy, glikozofosfatydyloinozitol — kotwiczący białka oraz inne nieliczne białka transportowe [1].

Kaweole są to kolbkowate wgłębienia plazmolemy do cytoplazmy. Struktury tworzące i utrzymujące te wgłębienia plazmolemy, tworzą cząsteczki kaweoliny, białka należącego do rodziny białek wiążących cholesterol. Kaweole obecne w wielu typach komórek są szczególnie liczne w komórkach śródbłonna [1]. Kilkadziesiąt receptorów błonowych, cząsteczek sygnałowych i nośników błonowych umiejscawia się w kaweolach. Dlatego uważa się, że kaweole związane są z endocytozą czy transcytozą makrocząsteczek oraz z transdukcją sygnału w obrębie komórki [2].

W warunkach fizjologicznych grupa ketonowa łańcuchowej formy cukrów redukujących reaguje z wolną grupą aminową białek tworząc związek typu zasady Schiffa (aldoimina). Aldoiminy podlegają powolnej przebudowie tzw. przegrupowaniu Amadori, do formy ketoaminowej, zwanej produktem wczesnego stadium reakcji Maillarda. Ketozyloaminy podlegają dalszej przemianie pod wpływem różnych procesów, które trwają od kilku miesięcy do kilkunastu lat i prowadzą do formowania późnych produktów glikacji (ang. *advanced glycosylation endproducts*, AGE). Zwolniony obrót metaboliczny białek oraz podniesiony poziom cukru przyspieszają proces nieenzymatycznej glikacji. Takie warunki pojawiają się m.in. w cukrzycy, podczas długotrwałej dializy oraz w procesach starzenia [3]. AGE modyfikują zarówno strukturę białek, jak i funkcje komórek, przez oddziaływanie za specyficznymi receptorami powierzchniowymi: receptorem wiążącym późne produkty glikacji (ang. *receptor for advanced glycosylation endproducts*, RAGE); receptorem zmiatającym typu I klasy A (ang. *macrophage scavenger receptor A*, MSR-A); receptorem zmiatającym typu I klasy B (ang. *scavenger receptor class B type I*, SR-BI); z glikoproteiną CD36 oraz z receptorem złożonym AGE-R1/R2/R3 [3-6].

Obecność receptorów AGE w kaweolach komórek śródbłonna świadczy o złożoności prawdopodobnych kaskad sygnalizacyjnych, które mogą być związane bezpośrednio lub pośrednio z patologicz-

nymi zmianami w układzie naczyniowym w przebiegu cukrzycy. Praca podsumowuje poznane oraz wciąż wyłaniające się własności kaweoli oraz dyskutuje ich przypuszczalną rolę w interakcji późnych produktów glikacji ze specyficznymi receptorami AGE.

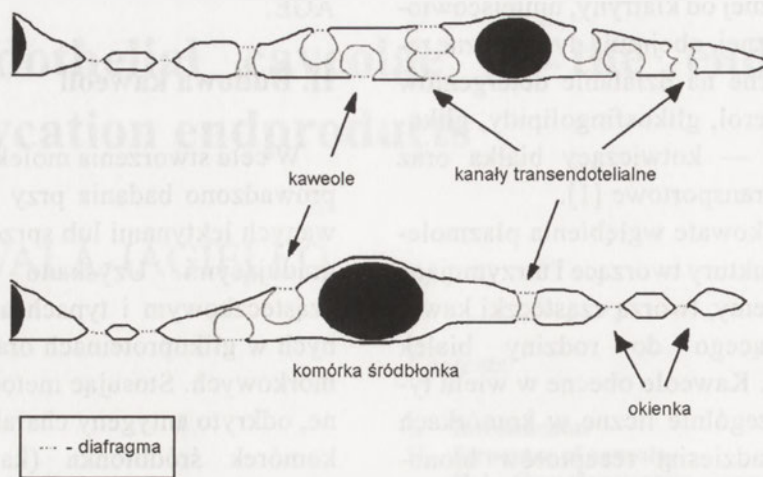
II. Budowa kaweoli

W celu stworzenia molekularnej definicji kaweoli prowadzono badania przy użyciu ligandów znakowanych lektynami lub sprzężonych z enzymami degradującymi. Uzyskano informacje o ciężarze cząsteczkowym i typach anten glikanowych obecnych w glikoproteinach oraz glikolipidach błon komórkowych. Stosując metody immunocytochemiczne, odkryto antygeny charakterystyczne dla kaweoli komórek śródbłonna (kaweolinę, białko PV-1, błonową ATP-azę wapniową) oraz częściowo tylko obecne w kaweolach (trombomodulinę, receptor trombinowy, glikoproteinę 85/115, białka G, syntazę tlenu azotu eNOS, dynaminę). Z kolei zastosowanie kaweoliny-1, jako markera „opłaszczenia” kaweoli, umożliwiło identyfikację kaweoli w różnych typach komórek [8, 9]. Kaweole uznano za kuliste lub kolbkowate wgłębienia błony komórkowej oraz związane z nią pęcherzyki o średnicy ok. 70 nm. Pochodzące z przeciwległych biegunów komórki pojedyncze kaweole lub ich skupiska mogą ulegać fuzji i tworzyć organelle pęcherzykowo-wodniczkowe (ang. *vesiculo-vacuolar organelles*, VVOs), które występują zarówno w aktywnym śródbłonku, jak i w śródbłonku guzów litych. W miejscach o silnie spłaszczonych obszarach brzeżnych plazmolemy pojedyncze kaweole mogą łączyć się z obu przeciwległymi błonami, tworząc transendotelialne kanały [10, 11].

Charakterystyczną cechą kaweoli komórek śródbłonna są cienkie (~5-6 nm), białkowe błony zakotwiczone na brzegach utworzonego zagłębienia, zwane diafragmami (przesłonami) porów (Ryc. 1) [12]. Poza pojedynczymi kaweolami, diafragmy występują w transendotelialnych kanałach, a także między kaweolami formującymi organelle pęcherzykowo — wodniczkowe (VVOs) w naczyniowym śródbłonku guzów litych i w aktywnym śródbłonku [11]. Przez połączenie przeciwległych błon w silnie spłaszczonych częściach komórki śródbłonna powstają tzw. okienka o średnicy około 62-85 nm. W miejscach tych dochodzi do wytworzenia diafragm okienek, które stanowią przedłużenie zewnętrznej warstwy błony [13]. Pomędzy diafragmami porów i okienek występują istotne różnice [11]. Uważa się, że średnica diafragm porów jest zmienna i zwykle

mniejsza od średnicy ich odpowiedników w okienkach (40 nm vs. 60 nm), które mają stosunkowo stały rozmiar. Właściwości chemiczne obu typów diafragm są także odmienne.

nowa wnikała bezpośrednio do światła pęcherzyków płuc [12]. Diafragmy kawolei prawdopodobnie pełnią rolę sita molekularnego dla różnych składników osocza podobnie jak diafragmy okienek. Do-



Ryc. 1. Schemat przedstawiający udział diafragm (prześłon) w strukturze kawolei, kanałów transendotelialnych i okienek komórek śródbłonka. Dokładny opis w tekście (wg [11, 12, 13] zmodyfikowany).

Porowe diafragmy kawolei i kanałów transendotelialnych wiążą lektyny, ale nie wiążą kationów. Z kolei diafragmy okienek nie wiążą lektyn wcale lub bardzo słabo, ale wykazują obecność ujemnie naładowanych cząsteczek np. heparyny i siarczanu heparanu. Diafragmy okienek mają kształt ośmiokątny, a ich szkielet tworzą promieniste włókienka przeplatające się w miejscu zgrubienia. Ponadto, diafragmy w centralnej części mają charakterystyczne zgrubienia w kształcie sęka i pozbawione są lipidów. Struktura porowych diafragm kawolei i kanałów transendotelialnych nie może być poddana szczegółowym badaniom z powodu ich małych rozmiarów i słabej wytrzymałości [12]. Stan i wsp. [14] wykazali obecność białka PV-1 w obu typach diafragm. Białko to jest glikoproteiną błonową i antygenem dla monoklonalnych przeciwciał przeciwko kawolom komórek śródbłonka. Domena zewnątrzkomórkowa białka PV-1 zawiera fragmenty w kształcie zwiniętych spiral, które mogą prawdopodobnie uczestniczyć w tworzeniu włókienek zakotwiczonych w obręczy okienka. Badania prowadzone na myszach i szczurach potwierdziły obecność diafragm porów kawolei i białka PV-1 w ciągłym śródbłonku naczyń płucnych i języka oraz we wszystkich śródbłonkach z okienkami [15]. Na podstawie obecności diafragm porów kawolei w łożysku naczyń włosowatych, można przypuszczać, że są one modulatorami endocytozy lub transcytozy. Wykazano m.in., że wychwyt przez kawolele cząsteczek ferrytyny był ograniczony przez diafragmy kawolei, podczas gdy peroksydaza chra-

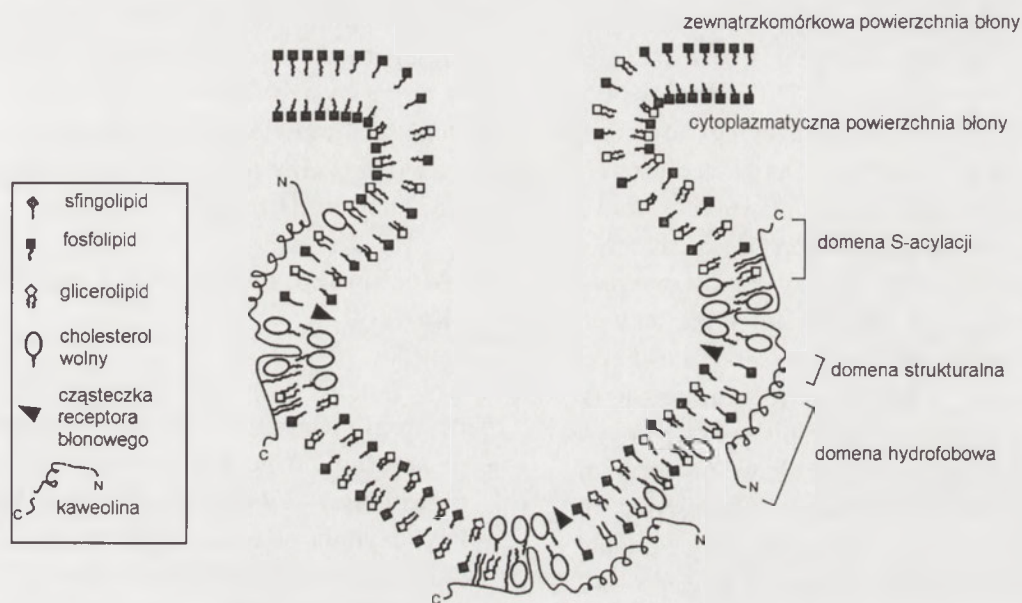
tychczas nie wiadomo, jaką rolę mogą odgrywać inne właściwości transportowanych ligandów (np. ładunek, budowa chemiczna).

II-1. Białko kawolei — kawolina

Kaweole uporządkowane są w liniowym szyku na obszarze całej błony. Bezpośrednim wynikiem liniowego rozmieszczenia tych organelli jest wzrost liczby filamentów aktynowych w komórce, co stanowi dowód na powiązania kawolei z cytoszkieletem komórki [16, 17]. Od strony cytosolu komórek śródbłonka i fibroblastów zewnętrzną warstwę kawolei stanowi specyficzny „płaszcz” (odmienny od „płaszczki” klatrynowego) odporny na działanie wysokiego pH, ekstrakcję niejonowymi detergentami ale ulegający demontażowi pod wpływem leków wiążących cholesterol [18]. Głównym składnikiem opłaszczenia jest fosfoproteina — kawolina (obecnie kawolina-1) (Ryc. 2). Po raz pierwszy została zidentyfikowana jako substrat fosforylacji cytoplazmatycznej kinazy tyrozynowej (v-Src) w fibroblastach, które uległy transformacji nowotworowej przez wirus mięsaka Rousa. Kawolina-1 wchodzi także w skład pęcherzyków pochodzących z sieci *trans* aparatu Golgiego [18, 19]. Kawolina-1 tworzy na terenie cytoplazmy komórek śródbłonka kompleksy z tzw. białkami opiekuńczymi, które biorą udział w procesie transportu cholesterolu z siateczki śródplazmatycznej do błony komórkowej [20]. W połączeniu z wieloma innymi białkami (NSF,

SNAPs, dynamina, Rab 5) oraz lipidami (np. gangliozyd GM1) kaweolina-1 bierze także udział w fuzji pęcherzyka transportującego z właściwą błoną docelową w procesie endocytozy w komórkach śródbłonna [21]. W komórkach innych tkanek kaweolina-1 występuje w pęcherzykach wydzielniczych (wchodzi w skład lipoprotein), w mitochondriach oraz w cytosolu [22].

dowej błony mają budowę spirali. Koniec aminowy białka kaweoliny (N-koniec) i koniec karboksylowy (C-koniec) są zwrócone do cytoplazmy. Kaweolina-1 i kaweolina-3 łączą się ze swoimi N- i C-końcami, tworząc 18 członowe homooligomery [27]. Powstałe cząsteczki pełnią funkcję strukturalną w tworzeniu opłaszczenia kaweoli. W przypadku komórek bez ekspresji kaweoliny czy kaweoli, transfekcja ge-



Ryc. 2. Zarys budowy kaweoli. Na rycinie zaznaczono budowę domenową białka — kaweoliny i niektóre składniki lipidowe kaweoli w plazmolemie. Dokładny opis w tekście (wg [8] zmodyfikowany).

Znane są dwie izoformy kaweoliny-1: kaweolina-1 α zawierająca 178 reszt aminokwasowych (24 kDa) i kaweolina-1 β o 147 resztach aminokwasowych (21 kDa). Fosforylacja kaweoliny-1 zachodzi na resztach serynowych i treoninowych pod wpływem białkowej kinazy C α . W fosforylacji reszt tyrozynowych w kaweolinie-1 α bierze udział cytoplazmatyczna kinaza tyrozynowa i przypuszczalnie inne niereceptorowe kinazy tyrozynowe [23]. W kaweolach o małym stopniu wgłębienia błony obecna jest tylko kaweolina-1 β , natomiast w innych fenotypach wgłębien występują obie izoformy — α i β — kaweoliny-1 [24].

Kaweolina-1 jest częścią rodziny, do której należą także kaweolina-2 (20 kDa; 149 reszt aminokwasowych) i kaweolina-3 (17,2 kDa; 151 reszt aminokwasowych). Kaweolina-3 występuje głównie w komórkach mięśni poprzecznie prążkowanych, podczas gdy w komórkach śródbłonna, pneumocytach typu I, fibroblastach oraz adipocytach obecne są tylko kaweolina-1 i -2 [25, 26].

Wszystkie typy kaweolin zawierają domenę hydrofobową która składa się z 33 reszt aminokwasowych (Ryc. 2). Odcinki zanurzone w warstwie lipi-

dem kaweoliny-1 pozwala na odtworzenie wgłębien i opłaszczenia kaweoli [28]. Obydwie izoformy kaweoliny-1 zdolne są do tworzenia kaweoli *de novo*, natomiast transfekcja komórek samym genem kaweoliny-2 nie generuje tych struktur [29]. Reakcja palmitylacji reguluje proces asocjacji kaweoliny z kaweolami w komórkach śródbłonna. Palmitylacja reszt cysteinowych kaweoliny-1 i -3 w rejonie C-końca jest procesem potranslacyjnym i nieodwracalnym. Proces acylacji stabilizuje oligomery kaweoliny, przez co odgrywa ważną rolę we wzmocnieniu połączeń między domenami hydrofobowymi cząsteczek kaweoliny [27, 30]. W sąsiedztwie domeny hydrofobowej znajduje się domena strukturalna odpowiedzialna za interakcje z cząsteczkami sygnałowymi. W obrębie kaweoliny zidentyfikowano także domeny odpowiedzialne za transport cząsteczek do kaweoli i do aparatu Golgiego [17, 31].

II-2. Lipidy kaweoli

W kaweolach różnych typów komórek stwierdzono obecność składników lipidowych (Ryc. 2). Kaweolina-1 silnie wiąże wolny cholesterol komórkowy

oraz sztuczne liposomy fosfolipidowe. Częsteczki cholesterolu stabilizują oligomery kaweoliny. W zewnątrzplazmatycznej warstwie kaweoli występują także sfingolipidy (sfingomielina, ceramidy, gangliozydy), glikosfingolipidy (gangliozyd GM1) i kwasy tłuszczowe [32]. W komórkach śródbłonna, mięśni gładkich i fibroblastów skóry zaobserwowano związek między wysokim stężeniem wolnego cholesterolu komórkowego i zwiększeniem ilości kaweoli lub kaweoliny a wzrostem zewnątrzkomórkowego stężenia lipoprotein o małej gęstości (ang. *low density lipoprotein*, LDL) [32]. Z kolei, wpływ głównej frakcji lipoprotein o dużej gęstości (ang. *high density lipoprotein*, α -HDL) na kaweole zależy od występowania białek transportowych w kaweolach oraz od zawartości cholesterolu i estru cholesterolu w cząsteczce HDL. W kaweolach makrofagów występuje receptor SR-B1, który nie zawiera domeny strukturalnej charakterystycznej dla innych białek wiążących się z kaweoliną. Receptor SR-B1 pośredniczy w selektywnej internalizacji estrów cholesterolu pochodzących z HDL oraz w dwukierunkowej wymianie wolnego cholesterolu pomiędzy komórką a środowiskiem zewnętrznym [33]. Ponadto, HDL i ich główna apolipoproteina A-1 (apo A-1) prawdopodobnie modyfikują transdukcję sygnału z powierzchni komórki przez szlak kinazy białkowej C, której pewne fragmenty związane są z kaweoliną. Procesom tym może towarzyszyć częściowa internalizacja apo A-1 [34].

Uważa się, że lipidowy skład kaweoli (np. sfingomielina, glikosfingolipidy, wolny cholesterol i kwasy tłuszczowe) jest podobny do składu tratw lipidowych — mikrodomen występujących we wszystkich typach komórek [35, 36]. Zaproponowana przez Simonsa i wsp. [35] hipoteza tratw lipidowych jest przeciwstawna do modelu tzw. „płynnej mozaiki” wg Singera i Nicholsona [37]. Zakłada ona, że w żywych komórkach istnieją boczne (lateralne) połączenia sfingolipidów i cholesterolu, które łączą się ze specyficznymi białkami błony. Interakcje między lipidami prowadzące do powstania tych połączeń zależą od biofizycznych właściwości składników lipidowych [35]. Tratwy lipidowe są widoczne jako platformy skupiające cząsteczki sygnałowe lub inne cząsteczki o tym samym miejscu przeznaczenia w komórce. W komórkach, w których faza płynna nie jest dominująca, rozmiary tratw nie przekraczają 50 nm i mogą przyłączać różne grupy białek. Opierając się na podobnym składzie lipidowym, uznano kaweole za specyficzny podtyp tratw lipidowych, które dzięki obecności kaweoliny mogą

pełnić odmienne funkcje [35, 36]. Niektórzy badacze nadal jednak uznają kaweole i tratwy lipidowe za dwie odrębne jednostki o różnej budowie i odmiennych funkcjach [38].

Tratwy lipidowe i wgłębione kaweole mają podobny skład lipidowy. Tratwy (płynne uporządkowane domeny błonowe) występują we wszystkich typach komórek, podczas gdy kaweole (zróznicowane na podstawie fenotypu wgłębień lub ekspresji kaweoliny) występują tylko w określonej grupie komórek. Z drugiej strony, zarówno kaweole, jak i tratwy lipidowe mogą występować w tych samych komórkach. Dotychczas nie stwierdzono jednoznacznie, na jakiej podstawie możemy rozróżnić obie jednostki i jakie pełnią specyficzne funkcje.

III. Mechanizm endocytozy z udziałem kaweoli

Proces endocytozy z udziałem kaweoli obejmuje różne drogi metabolizmu ligandu i receptora [2, 8]:

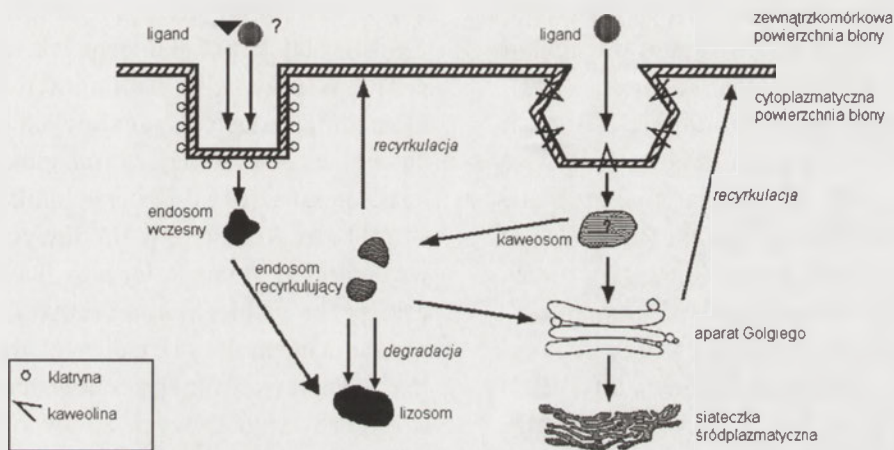
- ligand (np. późne produkty glikacji, cholesterol, *Simian Virus*-SV40, podjednostka B toksyny cholery, czynnik wzrostu fibroblastów — FGF, hormon wzrostu — GH) jest uwalniany do siateczki śródplazmatycznej lub innych organelli, a receptor powraca do błony;
- receptor i ligand (np. albumina, trombomodulina, białka cytosolu) transportowane są do przeciwległej powierzchni komórki;
- receptor i ligand (interleukina-2, endotelina, glikoproteina gp114, bradykinina, toksyna błonicy) po internalizacji ulegają degradacji lub recyrkulacji do powierzchni błony komórkowej (Ryc. 3).

Stopień zaangażowania oraz mechanizm, za pośrednictwem którego kaweole biorą udział w endocytozie cząsteczek do komórki, pozostaje kontrowersyjny. Proces endocytozy może zachodzić z udziałem pojedynczych kaweoli czy grup kaweoli lub przejściowych kanałów transendotelialnych utworzonych w wyniku fuzji kaweoli [39]. Ponadto, różny stopień otwarcia wnętrza kaweoli prawdopodobnie pełni rolę sita molekularnego w zależności od wielkości i rodzaju ligandu [40]. Przyłączanie i fuzję pęcherzyków transportujących z błoną docelową ogranicza N-metylomaleimid — NEM. Filipina, lek wiążący cholesterol i niszczący strukturę kaweoli, także hamuje endocytozę [41]. Oprócz tego, w procesie endocytozy z udziałem kaweoli bierze udział dynamina o charakterze GTP-azy. Dynamina asocjuje z błoną komórkową w przewężeniach tworzonego pęcherzyka, a jej aktywność GTP-azowa jest niezbędna

do jego odcięcia [8, 42]. Uważa się, że kaweole komórek śródbłonna mogą ulegać internalizacji, która zależy od wiązania albuminy do glikoproteiny gp60. Glikoproteina gp60 aktywuje następnie szlak sygnalizacyjny (zapoczątkowany przez reakcję podjednostki α białka G_i z kinazą tyrozynową c-Src), który prowadzi do formowania i ruchu pęcherzyków transportujących. W procesie tym ma miejsce fosforylacja reszty tyrozynowej kaweoliny-1 w komórkach śródbłonna ciągłego [43]. Ponadto, regularna internalizacja kaweoli została także opisana w innych typach komórek [44]. Badania P e l k m a n s a i wsp. [45] pozwoliły na opisanie procesu internalizacji na

zmołemą i przypuszczalnie stanowią pierwszy z przykładów specyficznego wewnątrzkomórkowego transportu celowanego za pośrednictwem endocytozy z udziałem kaweoli. Kaweosomy są stabilnymi tworami, które mogą trwać bez zauważalnego ruchu przez wiele godzin, przeciwnie do dynamicznej natury wczesnych endosomów. Natomiast nie stwierdzono, czy składniki błony, w tym kaweolina, są wymieniane pomiędzy plazmołemą a kaweosomami [45].

Endocytoza z udziałem kaweoli, jest ogólnie akceptowana, natomiast rozważa się, czy proces ten przebiega z udziałem pojedynczych kaweoli czy ich grup. Biorąc po uwagę fakt, że przepuszczalność na-



Ryc. 3. Ogólny zarys endocytozy ligandów przy udziale kaweoli w zestawieniu z endocytozą zależną od klatryny. Endocytoza przy udziale klatryny wykorzystuje dołki i pęcherzyki opłaszczone klatryną, i innymi elementami opłaszczenia, do internalizacji białek wbudowanych w plazmołemę oraz do kierowania makrocząsteczek (ligandów) do endosomów lub lizosomów. Endocytoza przy udziale kaweoli, do selektywnego transportu cząsteczek wykorzystuje natomiast niejednorodność w białkowo-lipidowej budowie plazmołemy oraz strukturalny składnik błony (białko — kaweolinę) wpuklającej się do komórki. Ligand związany z kaweolą jest dostarczany do organelli wewnątrzkomórkowych odmiennych od endosomów (obecność kaweoliny w tych organellach sugeruje nazwę „kaweosomu”). W „kaweosomie”, nie zespolonym z plazmołemą, ligand po odłączeniu od kaweoliny jest sortowany do siateczki śródplazmatycznej.

przykładzie wirusa SV40. Wirus SV40 wykorzystuje kaweole aby wniknąć do komórki, gdzie ostatecznie jest dostarczany do siateczki śródplazmatycznej. Natomiast niejasne jest w jakich etapach przebiega przemieszczanie SV40 z kaweoliną. Początkowe wiązanie SV40 z plazmołemą przedstawiono jako dwuetapowy proces, w którym najpierw wirus łączy się z antygenem głównego układu zgodności tkankowej klasy I, przed związaniem ze stosunkowo nieruchomą kaweolą, połączoną z dynaminą. Następnie wirus SV40 jest dostarczany do organelli wewnątrzkomórkowych odmiennych od endosomów. Obecność kaweoliny w tych organellach sugeruje nazwę „kaweosomu” (Ryc. 3). Wirus SV40 po odłączeniu od kaweoliny jest sortowany do siateczki śródplazmatycznej [45]. Kaweosomy nie są zespolone z pla-

czynń włosowatych zależy od zaopatrzenia w tlen oraz składniki odżywcze, możliwe jest, że wychwytywanie cząsteczek zachodzi na podstawowym poziomie na drodze endocytozy z udziałem pojedynczych kaweoli, natomiast gdy wzrasta zapotrzebowanie na dany składnik, tempo transportu rośnie, co może prowadzić do tworzenia kanałów transendotelialnych.

IV. Interakcje receptora późnych produktów glikacji z kaweolami śródbłonna

Usuwanie z krwiobiegu zmodyfikowanych białek za pośrednictwem receptorów jest ważną funkcją wielu komórek i tkanek, w tym także śródbłonna naczyń. Uważa się, że rozwój systemu receptorów późnych produktów glikacji miał służyć wytwor-

zeniu specyficznych szlaków usuwania tych cząstek na drodze degradacji lizosomalnej. Bardzo wysokie stężenie AGE w cukrzycy ulega obniżeniu dzięki obecności, zależnych od receptorów, systemów degradujących nadmiar cząsteczek AGE w obrębie przedziału wewnątrzkomórkowego. W śródbłonku naczyń krwionośnych wykazano obecność wszystkich typów receptorów AGE: receptora RAGE, MSR, receptora złożonego AGE-R1/R2/R3 oraz receptora SR-BI i glikoproteiny CD36 [5, 6, 46, 47]. Receptory AGE, oprócz roli wyłącznie w procesie internalizacji i degradacji AGE, odgrywają bardzo istotną rolę w transdukcji sygnału w obrębie komórki. Jest to tym bardziej interesujące, że te niedawno poznane dane o sygnalizacyjnej funkcji receptora AGE są zbieżne z informacjami o mechanizmie endocytozy AGE z udziałem kaweoli.

Zwiększony wychwyty przez śródbłonek aorty glikowanej albuminy zaobserwowano po raz pierwszy u myszy z cukrzycą [48]. W wyniku analizy białek pochodzących z wyizolowanych frakcji błon śródbłonka, zawierających kaweolinę, stwierdzono obecność receptora złożonego AGE [7]. Dwa rodzaje białek wiążących AGE wyizolowano z błon komórek śródbłonka ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC). Jedno z nich mające ciężar 60 kDa, drugie — 90 kDa, określa się odpowiednio jako p60 i p90. W śródbłonku tworzą one razem z białkiem o masie 32 kDa receptor złożony AGE-R1/R2/R3 [49]. Organizacja przestrzenna i interakcje molekularne między trzema składnikami (podjednostkami) receptora złożonego AGE w obrębie kaweoli prawdopodobnie mają wpływ na późniejsze wiązanie i wychwyty liganda oraz transdukcję sygnału.

Podjednostka receptora AGE-R1 (p60) jest białkiem homologicznym do OST-48 składnika kompleksu ryboforyny I i II związanego z przeniesieniem oligosacharydów wielomannozowych na akceptor asparaginowy szorstkiej siateczki śródplazmatycznej [50, 51]. Ze względu na tę homologię przypuszcza się, że podjednostka AGE-R1 jest zaangażowana w międzykomórkowym przejściu AGE do głębszych warstw naczyń krwionośnych [46].

Podjednostka AGE-R2 (p90) jest białkiem homologicznym do 80K-H- białka cytosolowego związanego z aktywacją kinazy białkowej C [52]. AGE-R2 może ulegać fosforylacji w obecności AGE i prawdopodobnie bierze udział w transdukcji sygnału poprzez mechanizm zależny od kaweoli [7]. Kaweole zbudowane głównie z glikosfingolipidów, cholesterolu i integralnego białka błonowego — kaweoliny służą jednocześnie kompartmentalizacji wielu cząsteczek sygnałowych takich jak: glikozylofosfa-

tydyloinozytol (GPI) — kotwiczący białka; cytoplazmatyczne kinazy tyrozynowe (np. h-Ras, Fyn, c-Src) pobudzające drogę sygnałową c-Ras; zewnątrzkomórkowe receptory (m.in. receptory naskórkowego czynnika wzrostu — EGFR; receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu — PDGFR); kinaza białkowa C i A oraz śródbłonkowa syntaza tlenu azotu e-NOS [53]. Wiele wyizolowanych z kaweoliną cząsteczek białek łączy zgodna sekwencja: $\phi XXXX\phi XX\phi$, gdzie ϕ jest resztą aminokwasu aromatycznego, a X to cząsteczka niebędąca aminokwasem. Cząsteczki te występują również w połączeniu z kaweoliną w tratwach lipidowych oraz w komórkach pozbawionych kaweoli [8, 54]. Wiązaniu z kaweoliną ulegają tylko nieaktywne formy („off”) białek pośredniczących w transdukcji sygnału. W przypadku nadmiernej ekspresji kaweoliny, nadmiar cząstek sygnałowych jest „zatapiany” w kaweolach, co zmniejsza transdukcję sygnału przez kaskadę kinaz MAP i kinazę białkową A [8]. Cholesterol kaweoli czy tratw lipidowych błony komórkowej stanowi pomost łączący kaweolinę z innymi cząsteczkami błony komórkowej, dzięki zdolności wiązania kaweoliny i cząsteczek transdukcji sygnału [54]. Wpływ wolnego cholesterolu na wiązanie cząsteczek sygnałowych z kaweoliną może zależeć od rodzaju wiązanego białka lub typu komórki, w której zachodzi reakcja. Pike i Miller [55] ustalili, że przeniesienie sygnału z receptora EGF jest hamowane przez zmniejszenie ilości wolnego cholesterolu. Jednocześnie wykazano, że w adipocytach wiązanie wolnego cholesterolu z kaweoliną aktywuje sygnalizację z receptora insulinowego [56, 57]. Fosforylacja receptora FcεRI immunoglobuliny E jest aktywowana przez interakcję z tratwami lipidowymi, natomiast hamowana przez ubytek wolnego cholesterolu [58]. Istnieją także doniesienia o podobnych reakcjach dla interakcji między receptorem y komórek T a ich kinazą Fyn [59]. Jak dotąd wiadomo, że w odpowiedzi na fizjologiczne bodźce kaweolina wchodzi w interakcje z AGE-R2, ale mechanizm wpływu wolnego cholesterolu na powinowactwo AGE-R2 do specyficznego miejsca w błonie nie został poznany.

Podjednostka AGE-R3 (galektyna 3) jest galektyną typu S zbudowaną z 262 reszt aminokwasowych o masie cząsteczkowej 32 kDa. Łańcuch polipeptydowy tworzy dwie domeny. Domena zlokalizowana w okolicy C-końca łańcucha wykazuje daleko idącą homologię sekwencji aminokwasowej z domeną immunoglobulinopodobną łańcucha receptorów immunoglobuliny G. Domena N-końcowa składa się z 10 homologicznych powtórzeń reszt aminokwaso-

wych. AGE-R3 nie zawiera domeny transbłonowej, natomiast w kompleksie z AGE-R2 jest podjednostką wiążącą AGE [60]. Oddziaływanie galektyny 3 z białkami błonowymi jest możliwe dzięki obecności krótkiej domeny przy N-końcu łańcucha polipeptydowego [60]. Co więcej, galektyna 3 wykazuje dużą swoistość w stosunku do cząsteczek β -galaktozy powierzchni różnych komórek oraz do glikoprotein macierzy zewnątrzkomórkowej [61]. Uważa się, że związanie późnych produktów glikacji przez AGE-R3 stanowi warunek tworzenia kompleksu receptora złożonego AGE [62]. Lokalizacja AGE-R3 w obrębie kaweoli może znacząco poprawiać tworzenie kompleksu receptora, podobnie jak w przypadku receptorów np. insulinowego czy α_{1B} adrenergicznego wyizolowanych z kaweoliną [63, 64]. Z drugiej strony, AGE-R3 może wpływać na ekspresję innych białek wiążących późne produkty glikacji — RAGE i MSR. W badaniach *in vitro* ustalono, że kaweole uczestniczą w wiązaniu AGE z RAGE i MSR [4]. Istnieją również dane doświadczalne, które wskazują na bezpośredni udział AGE-R3 w regulacji ekspresji receptorów RAGE i MSR oraz podjednostek AGE-R1 i AGE-R2 [65]. Badania prowadzone na genetycznie zmodyfikowanych myszach wykazały, że brak podjednostki AGE-R3 powoduje zwiększoną ekspresję RAGE i podjednostki AGE-R2 przy jednocześnie zmniejszonej ekspresji receptora MSR i podjednostki AGE-R1 w komórkach kanalików nerkowych [65]. W odróżnieniu od AGE-R1 i AGE-R2, które są białkami stale obecnymi w błonie, AGE-R3 jest białkiem indukowalnym, zależnym od stężenia późnych produktów glikacji [60]. W warunkach zwiększonej ilości krążących i tkankowych AGE (długotrwała hiperglikemia), nie można wykluczyć, że AGE-R3 interferuje ze szlakiem internalizacji i degradacji AGE innym niż szlak przekazu sygnału uruchamiany przez aktywację receptora RAGE lub MSR.

Warte podkreślenia jest to, że w kaweolach znaleziono inne białka wiążące AGE, lecz ich funkcja nie została dotychczas wyjaśniona. Dwa spośród nich, opisane jako glikoproteina CD36 i SR-BI, znaleziono w wielu typach komórek, ale tylko w śródbłonku wykazano, że uczestniczą w wiązaniu AGE-BSA (albumina zmodyfikowana AGE) [5, 6]. Co więcej, internalizacja AGE-BSA z udziałem CD36 jest blokowana przez oksydowane LDL [5]. Receptor SR-BI wiąże zarówno HDL, jak i AGE-BSA oraz uczestniczy w ich internalizacji i degradacji. Wiązanie HDL z receptorem SR-BI zwiększa się, gdy komórki są wypełnione cholesterolem oraz wtedy, gdy ich wzrost jest zahamowany [66]. Natomiast AGE-BSA

po wychwycie przez SR-BI zapobiegają wypływowi cholesterolu z komórki z udziałem HDL [66]. Kaweole biorą udział w wiązaniu oksydowanych LDL z CD36 oraz w wychwycie HDL przez receptor SR-BI [30]. Konsekwencją tych procesów może być lokalna zmiana składu lipidowego kaweoli z jednoczesną modulacją aktywności syntazy tlenu azotu w komórce śródbłonka [67]. Stitt i wsp. [7] ustalili, że receptor złożony AGE-R1/R2/R3 wyizolowany z kaweoliną śródbłonka naczyń siatkówki, odpowiada nie tylko za wiązanie AGE-BSA, ale jest niezbędny do dalszej internalizacji. Wydaje się, że interakcje AGE-BSA z receptorem CD36 i SR-BI w obrębie kaweoli (poprzez mało jeszcze poznane mechanizmy) mogą wobec tego mieć znaczenie dla modulacji aktywności syntazy tlenu azotu czy bezpośrednio produkcji tlenu azotu.

V. Podsumowanie

Usuwanie z krwiobiegu za pośrednictwem receptorów cząsteczek zmodyfikowanych późnymi produktami glikacji jest ważną funkcją wielu komórek i tkanek, w tym także śródbłonka naczyń krwionośnych. Uważa się, że rozwój systemu receptorów AGE miał służyć wytworzeniu specyficznych szlaków usuwania tych cząsteczek na drodze degradacji lizosomalnej. Późne produkty glikacji stymulują odpowiedź komórkową poprzez specyficzne receptory AGE: receptor złożony AGE-R1/R2/R3, receptor wiążący późne produkty glikacji — RAGE, receptor zmiatający typu I klasy A — MSR-A, receptor zmiatający typu I klasy B — SR-BI oraz glikoproteinę CD36. Ponadto wiadomo, że w cukrzycy AGE gromadzą się w komórkach naczyń krwionośnych. Redukcja nadwyżki tych wysoce reaktywnych cząsteczek może wobec tego mieć olbrzymie znaczenie w hamowaniu rozwoju angiopatii cukrzycowej.

Kaweole są zbudowane głównie z glikosfingolipidów, cholesterolu i integralnego białka błonowego kaweoliny-1. Składniki te służą jednocześnie kompartmentalizacji wielu cząsteczek biorących udział w transdukcji sygnału. Obecnie nie ulega wątpliwości, że podjednostka AGE-R2 może ulegać fosforylacji w obecności AGE i przypuszczalnie uczestniczy w przeniesieniu sygnału. Przestrzenna organizacja i molekularne interakcje między składnikami złożonego receptora AGE-R1/R2/R3 występują prawdopodobnie w obrębie kaweoli. AGE-R3 (znana także jako galektyna-3) nie zawiera domeny transbłonowej, natomiast łączy się z pozostałymi składnikami złożonego receptora na błonie komórkowej i odgrywa niezbędną rolę w integracji kom-

pleksu. Lokalizacja tych składników w obrębie kaweoli może znacząco poprawiać tworzenie kompleksu receptora. Interakcje AGE lub podjednostek receptora AGE-R1/R2/R3 z innymi receptorami (receptorem CD36, SR-BI, RAGE, MSR-A) w obrębie kaweoli mogą mieć znaczenie dla modulacji aktywności cząsteczek sygnałowych.

Rola kaweoli w endocytozie czy transcytozie oraz obecność w ich obrębie różnych białek receptorowych i cząsteczek sygnałowych, czyni je ważnym tematem badań. W patologicznych zmianach w układzie naczyniowym w przebiegu cukrzycy oraz gromadzeniu AGE w głębszych warstwach ścian naczyń krwionośnych, kaweole mogą odgrywać wcześniej nieznaną rolę.

Znajomość lokalizacji w wyspecjalizowanych domenach błonowych receptorów AGE w połączeniu z kaweoliną uzasadnia dalsze badania kaweoli w kontekście angiopatii cukrzycowej. Interesujący jest także aspekt terapeutyczny obecności w kaweolach receptorów AGE, które najprawdopodobniej mogą być wykorzystane jako środek w terapii powikłań naczyniowych w cukrzycy.

Artykuł otrzymano 18 marca 2004

Zaakceptowano do druku 14 czerwca 2004

Piśmiennictwo

- Schnitzer JE (2001) *Adv Drug Deliv Rev* **49**: 265-280
- Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**: 1161-1168
- Vlassara H, Bucala R (1996) *Diabetes* **45**: S65-66
- Thornalley PJ (1998) *Cell Mol Biol* **44**: 1013-1923
- Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, Ikemoto M, Arai H, Horiuchi S, Nakayama H (2001) *J Biol Chem* **276**: 13348-13355
- Miyazaki A, Nakayama H, Horiuchi S (2002) *Trends Cardiovasc Med* **12**: 258-262
- Stitt AW, Burke GA, Chen F, McMullen CB, Vlassara H (2000) *FASEB J* **14**: 2390-2392
- Razani B, Woodman SE, Lisanti PM (2002) *Pharm Rev* **54**: 431-467
- Zuwała-Jagiello J (2003) *Post Hig Med Dośw* **57**: 275-291
- Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J (2001) *Trends Cell Biol* **11**: 406-412
- Dvorak AM, Feng D (2001) *J Histochem Cytochem* **49**: 419-432
- Roberts WG, Palade GE (2000) W: Rissau W, Rubanyi GM (red) *Morphogenesis of endothelium*, Hardwood Academic Publishers, Amsterdam, s. 23-41
- Simionescu N, Simionescu M, Palade GE (1982) *J Cell Biol* **95**: 425-434
- Stan RV, Kubitzka M, Palade GE (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 13203-13207
- Stan RV, Arden KC, Palade GE (2001) *Genomics* **72**: 304-313
- Stahlhut M, Van Deurs B (2000) *Mol Biol Cell* **11**: 325-337
- Schlegel A, Lisanti MP (2001) *J Cell Physiol* **186**: 329-337
- Kurzchalia TV, Parton RG (1999) *Curr Opin Cell Biol* **11**: 424-431
- Glenney JR, Soppet D (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10517-10521
- Uittenbogaard A, Smart EJ (2000) *J Biol Chem* **275**: 25595-25599
- Predescu SA, Predescu DN, Palade GE (2001) *Mol Biol Cell* **12**: 1019-1033
- Li WP, Liu P, Pilcher BK, Anderson RG (2001) *J Cell Sci* **114**: 1397-1408
- Aoki T, Nomura R, Fujimoto T (1999) *Exp Cell Res* **253**: 629-636
- Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T (2000) *J Cell Sci* **113 Pt 19**: 3509-3517
- Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 131-135
- Way M, Parton RG (1995) *FEBS Lett* **376**: 108-112
- Monier S, Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM, Kurzchalia TV (1996) *FEBS Lett* **88**: 143-149
- Chung KN, Elwood PC, Heuser JE (1996) *Mol Biol Cell* **7**: 276a
- Mora R, Bonihla VL, Marmorstein A, Scherer PE, Brown D, Lisanti MP, Rodriguez-Boulan E (1999) *J Biol Chem* **274**: 25708-25717
- Parat MO, Fox PL (2001) *J Biol Chem* **276**: 115776-115782
- Luetterforst R, Stang E, Zorzi N, Carozzi A, Wang M, Parton RG (1999) *J Cell Biol* **145**: 1443-1459
- Zhu Y, Liao HL, Wang NP, Yuan X, Ma KS, Verma T, Stemberman MB (2000) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**: 2465-2470
- Uittenbogaard A, Shaul PW, Yukanna IS, Blair A, Smart EJ (2000) *J Biol Chem* **275**: 11278-11283
- Sviridov D, Fidge NH, Fielding CJ, Beaumier-Gallon G (2001) *Biochem J* **358**: 79-86
- Simons K, Toomre D (2000) *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-39
- Mukherjee S, Maxfield FR (2000) *Traffic* **1**: 203-211
- Singer SJ, Nicholson GL (1972) *Science* **175**: 720-731
- Nabi IR, Le PU (2003) *J Cell Biol* **161**: 673-677
- Michel CC, Curry FE (1999) *Physiol Rev* **79**: 703-761
- Palade GE (1999) W: Crystal RG, West JB (red) *The lung: scientific foundations*, Raven Press Ltd, New York, s. 359-367
- Schnitzer JE, Allard J, Oh P (1995) *Am J Physiol* **268**: H 48-55
- McNiven MA, Cao H, Pitts KR, Yoon Y (2000) *Trends Biochem Sci* **25**: 115-120
- John T, Vogel S, Minshall R, Ridge K, Tirupathi C, Malik AB (2001) *J Physiol* **533**: 547-559
- Parton RG, Joggerst B, Simons K (1994) *Cell Biol* **127**: 1199-1215
- Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A (2001) *Nat Cell Biol* **3**: 473-483
- Schmidt AM, Yan SF, Stern DM (2000) *Biochim Biophys Acta* **1498**: 99-111
- Zuwała-Jagiello J, Osada J (1998) *Post Biol Kom* **25**: 591-612
- Vlassara H, Fuh H, Makita Z, Krungkroi S, Cerami A, Bucala R (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 12043-12047
- Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Banerjee D, Vlassara H (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11047-11052
- Silberstein S, Kelleher DJ, Glimore R (1992) *J Biol Chem* **267**: 23658-23663
- Kelleher DJ, Glimore R (1992) *J Biol Chem* **269**: 12908-12917
- Hirai M, Shimizu N (1990) *Biochem J* **270**: 583-589
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 7289-7304
- Couet J, Li SW, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP (1997) *J Biol Chem* **272**: 6525-6533
- Pike LJ, Miller JM (1998) *J Biol Chem* **273**: 22298-22304

56. Yamamoto M, Toya Y, Schwenke C, Lisanti MP, Myers MG, Ishikawa Y (1998) *J Biol Chem* **273**: 26962-26968
57. Gustavsson J, Parpal S, Karlsson M, Ramsing C, Thorn H, Borg H, Lindro M, Peterson KH, Magnusson KE, Stralfors P (1999) *FASEB J* **13**: 1961-1971
58. Sheets ED, Holowka D, Baird B (1999) *J Cell Biol* **145**: 877-887
59. van't Hof W, Resh MD (1999) *J Cell Biol* **145**: 377-389
60. Vlassara H, Li YM, Imani Y, Wojciechowicz D, Yang A, Liu FT, Cerami A (1995) *Mol Med* **1**: 634-649
61. Pricci F, Leto G, Amadio L, Iacobini C, Romeo G, Pugliese G (2000) *Kidney Int* **58**: S31-S39
62. Zhu W, Sano H, Nagai R, Fukuhara K, Mijazaki A, Horiuchi S (2001) *Biochem Biophys Res Commun* **280**: 1193-1188
63. Cohen AW, Combs TP, Scherer PE, Lisanti MP (2003) *Am J Physiol Endocrinol Met* **285**: E1151-E1160
64. Toews ML, Prinster SC, Schulte NA (2003) *Life Sci* **74**: 379-389
65. Pugliese G, Pricci F, Iacobini C, Leto G, Amadio L, Barssotti P, Frigeri L, Hsu DK, Vlassara H, Lim FT, Di Mario U (2001) *FASEB J* **15**: 2471-2479
66. Ohgami N, Miyazaki A, Sakai M, Kuniyasu A, Nakayama H, Horiuchi S (2003) *J Atheroscler Thromb* **10**: 1-6
67. Kincer JF, Uittenbogaard A, Dressman J, Guerin TM, Febbraio M, Guo L, Smart EJ (2002) *J Biol Chem* **277**: 23225-23533

Białko zielonej fluorescencji (GFP) — struktura, własności i zastosowanie w biologii molekularnej roślin

Green fluorescent protein (GFP) — structure, features and applications in molecular biology of plants

MATEUSZ WYDRO¹, PRZEMYSŁAW LEHMANN²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Odkrycie, własności i struktura białka GFP
 - II-1. Identyfikacja białka GFP
 - II-2. Własności białka GFP
 - II-3. Struktura białka GFP
 - II-4. Tworzenie chromoforu
- III. Modyfikacje genu *gfp* ułatwiające jego wykorzystanie w komórkach roślinnych
- IV. Wykorzystanie genu *gfp* jako genu reporterowego
- V. Zastosowanie białka GFP w biologii komórki
 - V-1. Uwidacznianie organelli komórkowych
 - V-2. Uwidacznianie wirusów i białek w komórkach roślinnych
 - V-3. Badanie mobilności i interakcji białek w komórkach roślinnych
 - V-3.1 Technika oparta o pomiar spadku poziomu fluorescencji wygaszonej pulsem światła
 - V-3.2. Technika oparta o pomiar poziomu odzyskanej fluorescencji wygaszonej pulsem światła
 - V-3.3. Technika oparta o fluorescencyjny rezonansowy transfer energii
- VI. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: BFP — białko niebieskiej fluorescencji (ang. *blue fluorescent protein*); CaM — kalmodulina; CFP — białko zielono-niebieskiej fluorescencji (ang. *cyan fluorescent protein*); EGFP — białko zielonej fluorescencji (firmy CLONTECH); FLIP — utrata fluorescencji wygaszonej pulsem światła (ang. *Fluorescence Loss In Photobleaching*); FRAP — odzyskanie fluorescencji wygaszonej pulsem światła (ang. *Fluorescence Recovery After Photobleaching*); FRET — fluorescencyjny rezonansowy transfer energii (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*); GFP — białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*); GUS — β -glukuronidaza; HDEL — peptyd (histydyna-asparagina-glutamina-leucyna); mGFP4, mGFP5-ER, PGFP, SGFP, SGFP-S65T, smGFP, smRS-GFP — zmodyfikowane białka zielonej fluorescencji; RFP — białko czerwonej fluorescencji (ang. *red fluorescent pro-*

Contents:

- I. Introduction
- II. Identification, features and structure of GFP
 - II-1. Identification of GFP
 - II-2. Features of GFP
 - II-3. Structure of GFP
 - II-4. Chromophore formation
- III. Modifications of *gfp* gene for use in plant cells
- IV. Gene *gfp* as a reporter gene
- V. Applications of *gfp* gene in cell biology
 - V-1. Visualization of cell organelles
 - V-2. Visualization of virus and proteins in plant cells
 - V-3. Mobility and interactions of proteins in plant cells
 - V-3.1. Fluorescence loss in photobleaching; FLIP
 - V-3.2. Fluorescence recovery after photobleaching; FRAP
 - V-3.3. Fluorescence resonance energy transfer; FRET
- VI. Conclusions

tein); YFP — białko żółtej fluorescencji (ang. *yellow fluorescent protein*).

I. Wstęp

Białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP) należy do grupy białek mających zdolność emisji światła widzialnego pod wpływem wzbudzenia światłem o innej, właściwej dla danego białka długości fali. Białka fluorescencyjne występują naturalnie w wielu organizmach zamieszkujących różne środowiska, głównie u stawonogów, mięczaków i ryb. Przypuszcza się, że białka fluorescencyjne uczestniczą w procesach obronnych oraz w komunikowaniu się organizmów. Szczegółowa rola tych białek w organizmach żywych nie została jednak dotychczas wyczerpująco wyjaśniona. W ciągu ostatnich 10-ciu lat białko zielonej fluorescencji zidentyfikowane w komórkach meduzy (*Aequora*

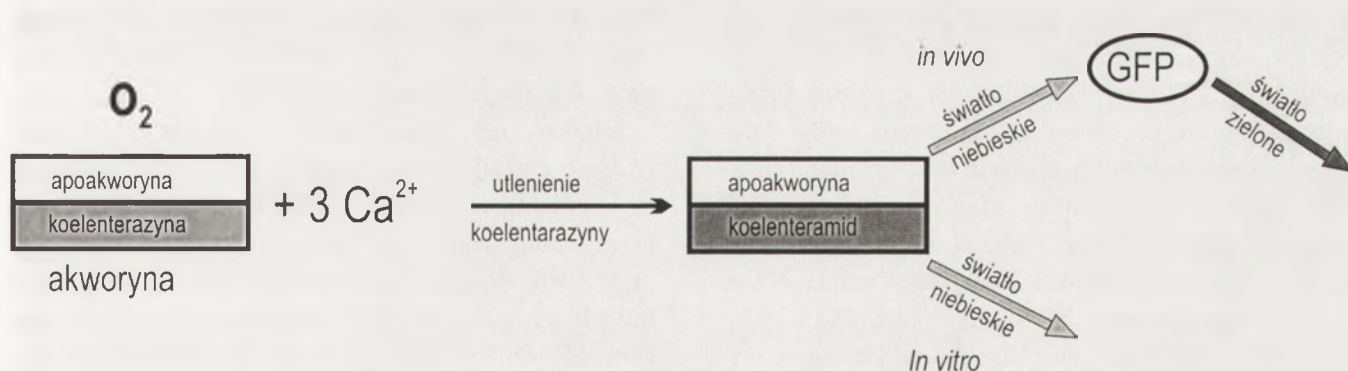
¹Mgr, ²dr, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, e-mail: pleh@igr.poznan.pl

victoria), z prawie nieznanego białka stało się jednym z najważniejszych narzędzi w biologii molekularnej i medycynie. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie stanu wiedzy (zgrupowanej do końca 2003 roku) na temat budowy, własności i modyfikacji struktury białka GFP pod kątem transformacji komórek roślinnych. W dalszej części pracy zostały przedstawione najważniejsze możliwości jego wykorzystania w biologii komórki i biologii molekularnej roślin.

II. Odkrycie, własności i struktura białka GFP

II-1. Identyfikacja białka GFP

Najlepiej dotychczas poznane białko zielonej fluorescencji (GFP) zostało zidentyfikowane w komórkach meduzy (*Aequora victoria*) [1]. Ze zjawiskiem bioluminescencji u meduzy, obok białka GFP, są związane jeszcze trzy inne białka: apoakworyna (ang. *apoaequorin*), która jest pojedynczym polipeptydem o ciężarze cząsteczkowym 22 kDa, koelenterazyna (ang. *coelenterazine*), która w obecności tlenu wiąże się z apoakworyną i tworzy funkcjonalne białko akworynę (ang. *aequorin*) (Ryc. 1). Akworyna zawiera trzy miejsca wiązania jonów wapnia i jed-



Ryc 1. Schemat mechanizmu powstawania bioluminescencji w komórkach meduzy (*Aequora victoria*). Szczegółowy opis procesu został zawarty w tekście pracy w rozdz. II-1.

no miejsce wiązania tlenu. W momencie przyłączenia się jonów wapnia do akworyny, koelenterazyna zostaje utleniona do koelenteramidu (ang. *coelenteramide*), a cały kompleks białkowy przechodzi zmiany konformacyjne z równoczesnym uwolnieniem jednej cząsteczki dwutlenku węgla i emisją światła niebieskiego o długości 462 nm (w warunkach *in vitro*) [2, 3]. W warunkach *in vivo* (w komórkach meduzy) energia emitowana przez kompleks akworyny jest przenoszona na białko GFP, gdzie wzbudza emisję światła zielonego o długości fali 510 nm [4, 5].

Gen białka GFP został wyizolowany z komórek meduzy (*Aequora victoria*) i sklonowany w 1992 r. [6]. Od tego czasu gen *gfp* został znacznie zmodyfikowany i dostosowany do warunków ekspresji w komórkach roślinnych, do których został wprowadzony na drodze transformacji.

II-2. Własności białka GFP

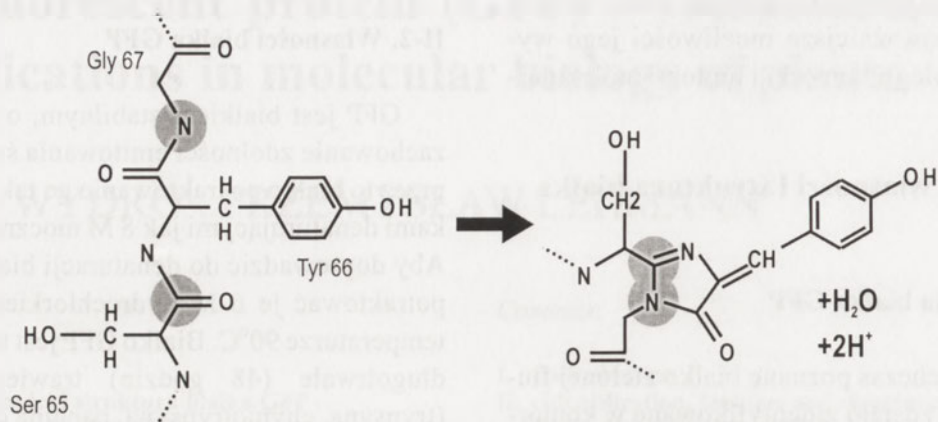
GFP jest białkiem stabilnym, o czym świadczy zachowanie zdolności emitowania światła zielonego przez to białko po traktowaniu go tak silnymi czynnikami denaturującymi jak 8 M mocznik czy 1 % SDS. Aby doprowadzić do denaturacji białka GFP, należy potraktować je 6 M hydrochlorkiem guanidyny w temperaturze 90°C. Białko GFP jest także odporne na długotrwałe (48 godzin) trawienie proteazami (trypsyną, chymotrypsyną, papainą czy pankretyną), co przejawia się brakiem zmian intensywności fluorescencji po działaniu tymi enzymami [7]. Białko GFP wykazuje stabilność w temperaturze 65°C, a także nie traci swoich funkcji w zakresie pH od 5 do 12. Dopiero obniżenie pH poniżej 4 lub podwyższenie ponad 12 powoduje denaturację białka GFP [8]. Podniesienie pH ponad 12 prowadzi do redukcji fluorescencji wzbudzonej przez promieniowanie o długości fali 395 nm, a wzrost fluorescencji wzbud-

zanej przez światło o długości fali 475 nm [9]. Obserwowano prawie całkowitą renaturację białka GFP w ciągu kilku minut po przywróceniu normalnych warunków pH (tj. pH 5-7), na przykład poprzez dializę lub neutralizację [8].

II-3. Struktura białka GFP

Wyizolowane z meduzy białko GFP składa się z 238 aminokwasów i ma masę cząsteczkową 27 kDa [6]. [Pierwszorzędową strukturę białka GFP może

czytelnik odnaleźć w Internecie, na przykład na stronie EXPASY MOLECULAR BIOLOGY SERVER]. Jak dowodzą badania krystalograficzne, białko GFP ma kształt cylindra (ang. β -can) o średnicy 24 Å i długości 42 Å, składającego się z 11 łańcuchów β -harmonijek tworzących ściany cylindra oraz krót-



Ryc. 2. Mechanizm formowania chromoforu GFP (wg. [6], zmieniono). Opis procesu został zawarty w tekście pracy w rozdz. II-4.

kich α -helis nakrywających cylinder z góry i z dołu. Łańcuchy α -helis tworzą także umocowanie dla chromoforu, który ulokowany jest wewnątrz cylindra nieomal w jego geometrycznym centrum [10] (fotografię struktury kryształu białka GFP czytelnik znajdzie w Internecie na stronie PROTEIN DATA BANK). Takie umiejscowienie chromoforu chroni go od wpływu środowiska, ograniczając dostęp cząsteczek tlenu, które mogłyby prowadzić do kolizyjnego wygaszania fluorescencji (ang. *collisional quenching*) [11]. Umiejscowienie chromoforu wewnątrz cylindra ogranicza także możliwość fotochemicznych zniszczeń powodowanych przez reaktywne formy tlenu, które mogą powstawać pod wpływem fluorescencji. Tlen, który jest niezbędny do prawidłowego formowania chromoforu, musi być następnie pozbawiony możliwości kontaktu z chromoforem, ponieważ może powodować kolizyjne wygaszanie fluorescencji lub negatywne dla komórki reakcje fotochemiczne [10].

II-4. Tworzenie chromoforu

Analiza heksapeptydów otrzymanych na drodze proteolizy oczyszczonego białka GFP wskazuje, że chromofor powstaje na drodze potranskrypcyjnych modyfikacji trzech kolejnych aminokwasów w łańcuchu białkowym: seryny w pozycji 65, tyrozyny-66 i glicyny-67 [12]. Badania nad ekspresją zrekombinowanego białka GFP w komórkach *E. coli* sugerują stopniowy mechanizm autokatalitycznego formowania chromoforu obejmujący: szybką cyklizację pomiędzy seryną-65, a glicyną-67, zakończoną

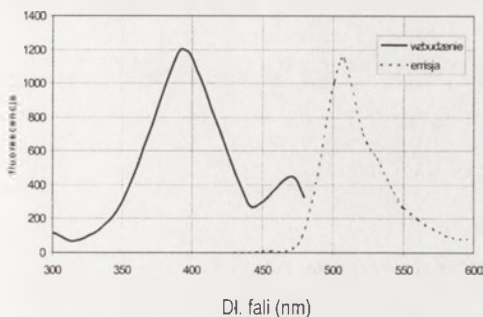
dużo wolniejszym etapem utlenienia tyrozyny-66 [13] (Ryc. 2). Szczegółowy mechanizm tworzenia się chromoforu nie został dotychczas wyjaśniony. Na formowanie się chromoforu duży wpływ mają grupy funkcyjne aminokwasów otaczających go w strukturze trzeciorzędowej białka. Mutacje treoni-

ny-62, argininy-96 oraz kwasu glutaminowego-222 poważnie opóźniały formowanie się chromoforu, co sugeruje istotny wpływ tych aminokwasów na proces jego powstawania [14]. Temperatura powyżej 30°C wywiera negatywny wpływ na proces formowania prawidłowej struktury białka GFP, co nie powinno dziwić zważywszy, że obszar występowania meduzy *Aequorea victoria* to zimne wody północnych rejonów Oceanu Spokojnego. Uformowane już jednak białko charakteryzuje się stabilnością w temperaturach sięgających nawet 65°C [15].

Białko GFP pochodzące z meduzy *Aequorea victoria* emituje światło zielone (510 nm) osiągając maksymalną emisję przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 398 nm [16] oraz słabszą emisję przy fali o długości 475 nm [8] (Ryc. 3). Istnienie dwóch długości fali światła wzbudzającego ma związek ze zmianą uprotonowania chromoforu. Chromofor w stanie neutralnym wykazuje maksymalną absorpcję przy fali o długości 398 nm, forma anionowa chromoforu natomiast absorbuje światło o długości fali 475 nm [17]. Proporcje występowania obu stanów uprotonowania chromoforu mogą być zmienione poprzez mutacje lub ekstremalne pH [9].

Prowadzona na szeroką skalę mutacyjna analiza białka GFP pozwoliła ustalić szereg kluczowych zmian wpływających na funkcjonowanie białka. Białko GFP pozbawione więcej niż siedmiu C-końcowych aminokwasów czy metioniny z N-końca, nie wykazywało fluorescencji. Mutanty te nie wykazywały również spektrum absorpcji charakterystycznego dla uformowanego chromoforu, co sugeruje negatywny wpływ tych zmian na potranskrypcyjne for-

mowanie się funkcjonalnego białka z aktywnym chromoforem [18]. Na drodze ukierunkowanej mutagenyzy powstało kilka mutantów o zmienionych właściwościach fluorescencji. Na przykład substytucja tyrozyny-66 na histydynę zmienia maksimum wzbudzenia na promieniowanie UV o długości fali 383 nm i emisję światła na kolor niebieski (448 nm). Mutant ten zwany BFP (ang. *blue fluorescent protein*) znalazł szerokie zastosowanie w biologii molekularnej [19].



Ryc. 3. Przebieg wykresu wzbudzenia i emisji światła przez białko GFP. Pomiaru emisji dokonano w zakresie długości fali 450-600 nm, przy promieniowaniu wzbudzenia o długości fali 398 nm. Światło o długości fali 510 nm było emitowane z maksymalnym natężeniem. Pomiaru wzbudzenia dokonano w zakresie długości fali 300-480 nm, przy emisji o długości fali 510 nm. Forma dzika białka GFP posiada dwie optymalne długości fali promieniowania wzbudzenia: 398 i 475 nm, z tym, że ta druga długość fali daje znacznie niższe natężenie światła emitowanego [8, 16].

lonej [19]. Z kolei mutacja w pozycji 65 zmieniająca serynę na treoninę, alaninę lub cysteinę uniemożliwia wzbudzenie promieniowaniem o długości fali 398 nm, lecz zwiększa intensywność fluorescencji wzbudzonej światłem niebieskim (460 nm) [20]. Okazało się, że również mutacje aminokwasów znacznie oddalonych od chromoforu mogą mieć wpływ na fluorescencję GFP. Substytucja seryny-202 na fenyloalaninę i treoniny-203 na izoleucynę przejawia się utratą możliwości wzbudzenia promieniowaniem o długości fali 475 nm, przy zachowaniu wzbudzenia przy 398 nm [13, 21]. Zamiana glutaminy-222 na glicynę powoduje utratę zdolności wzbudzenia promieniowaniem o długości fali 398 nm [21]. Przedstawione powyżej dane z analizy mutantów GFP zostały wykorzystane w dostosowaniu tego białka jako narzędzia o szerokim spektrum zastosowań w biologii molekularnej i medycynie.

III. Modyfikacje genu *gfp* ułatwiające jego wykorzystanie w komórkach roślinnych

Pierwsze doniesienia o udanej transformacji roślin genem *gfp* dotyczyły przejściowej ekspresji w protoplastach pomarańczy (*Citrus sinensis*) [22] i

ekspresji białka GFP po transformacji liści *Nicotiana benthamiana* i *Nicotiana clevelandii* wirusowymi wektorami RNA [23]. Próby otrzymania transgenicznych roślin charakteryzujących się stabilną ekspresją funkcjonalnego białka GFP kończyły się niepowodzeniem. To skłoniło liczne zespoły badawcze do podjęcia prac nad modyfikacjami genu *gfp*, aby umożliwić syntezę białka GFP o silnej fluorescencji w komórkach roślinnych po ich transformacji tym genem.

W 1997 r. po transformacji *Arabidopsis thaliana* konstruktem zawierającym dziką formę genu *gfp* doniesiono o istnieniu ukrytego intronu (ang. *cryptic intron*) między 380 i 463 nukleotydem genu *gfp*. Okazało się, że w komórkach roślinnych ukryty intron był wycinany, co w konsekwencji uniemożliwiało uformowanie się funkcjonalnego białka GFP. Pierwsza chronologicznie wprowadzona modyfikacja genu *gfp*, mająca na celu usunięcie tego problemu, polegała na zmianie użytych kodonów i prowadziła do zmniejszenia zawartości par AU w tym obszarze genu, co doprowadziło do uzyskania zmienionej formy genu tj. genu *mgfp4* (ang. *modified gfp4*), kodującego białko o niezmienionej strukturze pierwszorzędowej [24] (Ryc. 4). Po transformacji roślin przy wykorzystaniu tak zmienionego genu, kilku badaczy stwierdziło, że uzyskane białko (mGFP4) nie wykazuje stabilnej fluorescencji, zwłaszcza w warunkach polowych. Zjawisko takie występowało, pomimo że równocześnie obserwowano ekspresję białka na poziomie, który powinien gwarantować wysoki poziom zielonej fluorescencji [25, 26]. W odpowiedzi na te doniesienia, wprowadzono następne zmiany w genie *mgfp4* mające zagwarantować stabilną fluorescencję. Substytucja waliny-163 alaniną oraz seryny-175 glicyną zniósł negatywny wpływ temperatury na białko mGFP4 [27]. W połączeniu z tymi zmianami dodatkowa mutacja (substytucja izoleucyny-167 na treoninę) pozwoliła na wyrównanie poziomu intensywności emisji światła zielonego o długości fali 509 nm wzbudzonej falami o długości 395 nm i 475 nm. To umożliwiło wykrywanie tego białka zarówno przy pomocy lampy UV jak i mikroskopu fluorescencyjnego, czyniąc ten wariant białka GFP bardziej przydatnym [13]. Kolejną modyfikacją było dodanie na C-końcu peptydu HDEL (histydyna-asparagina-glutamina-leucyna), a na N-końcu sekwencji odcinka sygnałowego chitynazy. To zagwarantowało umiejscowienie białka w retikulum endoplazmatycznym i jego oddzielenie od jądra. Wcześniejsze badania sugerowały, że dzika forma GFP gromadzi się w obrębie nukleoplazmy, co może mieć negatywny wpływ na rozwój komórki roślinnej (flu-

orescencja może być źródłem wolnych rodników, czy reaktywnych form tlenu). Tak zmienione białko nazwane mGFP5-ER jest szeroko stosowane w transformacji roślin [24].

Opisane wyżej warianty białka GFP (Ryc. 5) stały się punktem wyjścia do dalszych modyfikacji eliminujących kolejne niedogodności obserwowane podczas transformacji roślin genem *gfp*. W odpowiedzi na doniesienia o tworzeniu się w komórkach *E. coli* i komórkach linii CHO (linia komórkowa jajnika chomika chińskiego, ang. *Chinese hamster ovary cell*)

Po wprowadzeniu mutacji zmieniających serynę-65 na treoninę, białko zwane SGFP- S65T charakteryzuje się pojedynczym pasmem wzbudzenia (światło niebieskie 489 nm) i emisją światła o długości fali 511 nm [30]. Kolejnym wariantem genu *gfp* przystosowanym do ekspresji u roślin jest zmodyfikowany gen o nazwie *pgfp*. Gen ten charakteryzuje się wprowadzonym pomiędzy nukleotydy 398 i 399 intronem II pochodzącym z genu ST-LS1 ziemniaka oraz mutacją seryny-65 zmieniającą ją na treoninę. Zmiany te znacznie zwiększyły wydajność fluore-

```

gfp      380 GGT ATT GAT TTT AAA GAA GAT GGA AAC ATT CTT GGA CAC AAA
mgfp4   GGA ATC GAT TTC AAG GAG GAC GGA AAC ATC CTC GGC CAC AAG
          Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys

gfp      TTG GAA TAC AAC TAT AAC TCA CAC AAT GTA TAC ATC ATG GCA GAC
mgfp4   TTG GAA TAC AAC TAC AAC TCC CAC AAC GTA TAC ATC ATG GCA GAC464
          Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp

```

Ryc. 4. Sekwencja nukleotydowa ukrytego intronu genu *gfp* (forma dzika) i genu *mgfp4*. Zmutowane nukleotydy w genie *mgfp4* zostały podkreślone.

nierozpuszczalnych agregatów GFP, mających negatywny wpływ na fluorescencję, jak również wykazujących cytotoksyczność [28], Davis i Viersstra [29] na bazie sekwencji mGFP4 wprowadzili szereg mutacji mających poprawić rozpuszczalność białka. Zmiany te dotyczyły wprowadzenia do sekwencji mGFP4 mutacji oznaczonych symbolem „Cycle3” i polegały na wymianie aminokwasów w trzech pozycjach: fenyloalaniny-99 na serynę, metioniny-153 na treoninę oraz waliny-163 na alaninę [28]. Tak przygotowane zmodyfikowane białko nazwano smGFP (ang. *soluble modified GFP*). Białko to charakteryzowało się tymi samymi własnościami fluorescencji co dzika forma białka GFP [28]. Wprowadzenie kolejnej mutacji w tym białku, polegającej na wymianie seryny-65 na treoninę, spowodowało przesunięcie optimum długości fali światła wzbudzonego w stronę czerwieni (490 nm), przy niezmiętej emisji światła zielonego (510 nm) [30]. Wariant tego białka został nazwany smRS-GFP (ang. *soluble modified red-shifted GFP*) [29].

Kolejny wariant białka GFP — białko SGFP — jest kodowane przez syntetyczny gen zawierający kodony preferencyjnie wykorzystywane podczas ekspresji w komórkach człowieka [31] i kukurydzy [32]. Gen *sgfp* wykazuje u większości gatunków roślin wysoki poziom ekspresji oraz właściwy przebieg splicingu RNA, a otrzymane białko wykazuje niezmienną emisję światła zielonego [32].

scencji w porównaniu do białka dzikiego [33] (Ryc.6). Stosowane ostatnio często białko EGFP to komercyjnie dostępny syntetyczny wariant białka GFP charakteryzujący się zoptymalizowanym użyciem kodonów w genie jak i szeregiem mutacji obejmujących wymianę następujących aminokwasów: seryny-65 na treoninę, fenyloalaniny-64 na leucynę oraz tyrozyny-145 na fenyloalaninę [34].

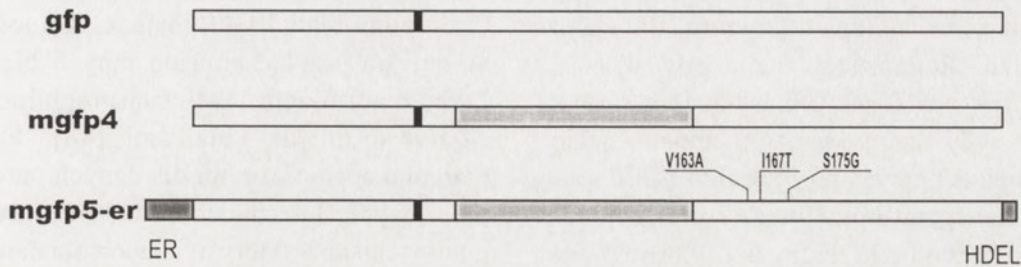
Dostępność wielu wariantów białka GFP (Tabela 1) o różnych własnościach nasuwa pytanie, który z nich wybrać do danego rodzaju badań. Jeśli przyjmiemy za kryterium sposób wykrywania białka GFP, warianty z mutacją seryny-65 na treoninę będą idealne podczas wykrywania przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (wzbudzenie światłem niebieskim 480 nm, brak wzbudzenia przy 380 nm). Wariant mGFP5-ER będzie wariantem uniwersalnym umożliwiającym uwidocznienie białka GFP w całej roślinie (przy użyciu lamp emitujących promieniowanie UV o długości fali ponad 380 nm) jak i wykryciu go przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (wzbudzenie światłem niebieskim o 480 nm).

IV. Wykorzystanie genu *gfp* jako genu reporterowego

Białko GFP stało się w ostatnich latach szeroko stosowanym, uniwersalnym narzędziem w biologii molekularnej i biotechnologii roślin. Potwierdza to

liczba i różnorodność opisanych zastosowań, w jakich użyto tego białka. Gen *gfp* jako gen reporterowy kodujący białko niewymagające substratów czy ko-faktorów wypiera stopniowo z użycia gen β -glukuronidazy (GUS) używany dotąd powszechnie w tym celu. Stosowanie genu *gfp* pozwala na oszacowanie poziomu ekspresji transgenu *in vivo*, bez konieczności interwencji w badane tkanki, co daje możliwość prowadzenia pomiaru poziomu ekspresji genu *gfp* w

terowy może być wykorzystany do usprawnienia selekcji transformantów opartej o antybiotyki. Ma to zastosowanie szczególnie w przypadku gatunków trudno regenerujących i sprawiających trudności przy transformacji. Przykładem może być tu użycie białka SGFP S65T przy transformacji roślin cytrusowych [39]. Wszystkie przypadki pozornych transformantów tej rośliny wynikające z niedoskonałości selekcji opartej o antybiotyk, które nie wykazywały

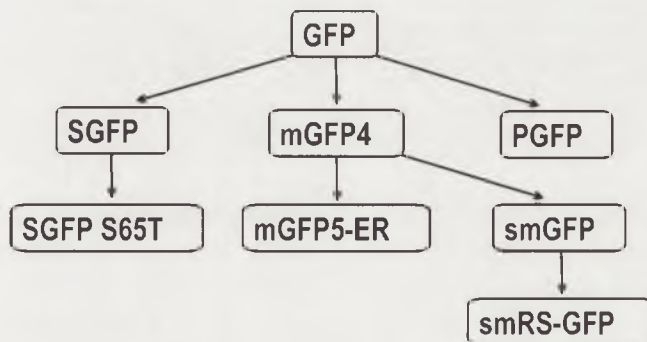


Ryc. 5. Porównanie genów kodujących białka: GFP, mGFP4 oraz mGFP5-ER. Kolorem czarnym na schemacie zaznaczono obszar kodujący aminokwasy związane z formowaniem chromoforu, kolorem jasnoszarym oznaczono zmodyfikowany obszar ukrytego intronu. Kolor ciemnoszary oznacza sekwencje kodującą odcinek sygnałowy chitynazy oraz sekwencję kodującą peptyd HDEL. Na schemacie zaznaczono również umiejscowienie wprowadzonych mutacji powodujących zmiany aminokwasów (V163A, I167T, S175G).

czasie rozwoju rośliny. Dodatkowym atutem stosowania genu *gfp* jako genu reporterowego, jest brak doniesień na temat toksycznego wpływu zmodyfikowanych wariantów białka GFP na komórki roślinne. Podczas dwuletnich doświadczeń z transgenicznym tytoniem i rzepakiem stwierdzono, że synteza i fluorescencja białka GFP (warianty: SGFP, mGFP4 i mGFP5-ER) w komórkach tych roślin nie ma negatywnego wpływu na plon nasion i wydajność bioma-

fluorescencji charakterystycznej dla transformantów z genem *gfp* zostały w ten sposób wyeliminowane [39].

Białko GFP może być również uzupełnieniem selekcji przeprowadzanej przy użyciu herbicydu lub częściowo zastąpić ten czynnik selekcyjny. Przykładem może być transformacja trzciny cukrowej z użyciem białka SGFP S65T, gdzie pierwsze etapy selekcji prowadzono na pożywkach z dodat-



Ryc. 6. Schemat przebiegu modyfikacji białka GFP. Szczegółowy opis modyfikacji białka GFP przedstawiono w tekście pracy w rozdziale III. Użyte skróty: GFP — białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*); mGFP4, mGFP5-ER, PGFP, SGFP, SGFP-S65T, smGFP, smRS-GFP — zmodyfikowane białka zielonej fluorescencji.

sy [25]. Ten wynik potwierdza, że obecność białka GFP w komórkach nie zakłóca normalnego rozwoju badanych roślin.

Gen *gfp* jako gen reporterowy dobrze sprawdza się również przy optymalizacji warunków transformacji roślin, o czym świadczyć mogą liczne prace opisujące metody transformacji wielu gatunków z użyciem tego genu [35-38]. Gen *gfp* jako gen repor-

kiem herbicydu. Do dalszych etapów kwalifikowano jedynie te kalusy, które wykazywały fluorescencję. Dalsza ich hodowla prowadzona była bez dodatku herbicydu [40]. Podobną metodę zastosowano także przy transformacji innych gatunków roślin [41]. Istnieją także doniesienia o możliwości całkowitego zastąpienia tradycyjnych czynników selekcyjnych przez białko GFP. Jako przykład może tu posłużyć

transformacja ryżu przeprowadzona metodą mikrowstrzeliwania z użyciem mGFP4 jako czynnika selekcyjnego [42].

Białko GFP wydaje się być idealnym markerem przy transformacjach mikrospor czy protoplastów, dając możliwość sortowania transformantów przy użyciu cytometru przepływowego [43]. GFP znalazło również zastosowanie jako marker podczas transformacji plastydów. Transformowana komórka roślinna powinna zawierać wyłącznie plastydy transformowane, by uniknąć powrotu do stanu wyjściowego tzn. nietransgenicznego. Aby ułatwić selekcję komórek posiadających wyłącznie transformowane plastydy, przeprowadzono transformację plastydów ziemniaka genem *pgfp*. Białko PGFP syntetyzowane z transgenu umożliwiło wyselekcjonowanie tylko tych komórek ziemniaka, które zawierały transformowane wszystkie plastydy [44].

Tabela 1.

Modyfikacje białka GFP najczęściej stosowane podczas transformacji roślin. Użyte skróty: EI — eliminacja ukrytego intronu, S-ER — sekwencja sygnałowa gwarantująca położenie w retikulum endoplazmatycznym, intron — do genu kodującego białko wprowadzono intron II pochodzący z genu ST-LS1 ziemniaka, * — zaznaczono długość fali wzbudzenia przy której następuje maksymalna emisja światła

Wariant	Wprowadzone modyfikacje	Długość fali wzbudzenia/emisji (nm)
GFP (<i>A.victoria</i>)	-	398*, 475/510
mGFP4	EI	398*, 475/510
mGFP5-ER	EI, V163A, I167T, S175G, S-ER	398, 475/510
SGFP (S65T)	syntetyczny, S65T	489/511
PGFP (S65T)	syntetyczny, S65T, intron	489/511
smGFP	EI, F99S, M153T, V163A	398*, 475/510

Użycie genu *gfp* jako genu reporterowego daje ponadto możliwość nieskomplikowanego monitorowania obecności i ekspresji transgenu w warunkach polowych, szczególnie w aspekcie transferu genów (ang. *flow gene*), gdy zachodzi obawa rozprzestrzenienia się transgenu do środowiska poprzez przekrzyżowania z dzikimi pokrewnymi gatunkami [26]. Innym interesującym zastosowaniem białka GFP jest metoda określania zygocytowości roślin transgeniczných na podstawie ilościowej analizy fluorescencji wynikającej z ekspresji genu *gfp*. W przypadku transgenicznego rzepaku rośliny homozygotyczne charakteryzowały się około dwukrotnie większą fluorescencją w stosunku do hemizygot [45]. Białko GFP może być także stosowane do analizy promotorów użytych do transformacji jądrowych [46], bądź

plastydów, czego przykładem może być jego użycie przy porównaniu poziomu ekspresji pod kontrolą trzech różnych promotorów w transformowanych chloroplastach tytoniu [47].

V. Zastosowanie białka GFP w biologii komórki

V-1. Uwidacznianie organelli komórkowych

Stabilne białko GFP mające zdolność do fluorescencji po przyłączeniu do innych białek, jest dobrym znacznikiem lokalizacji, mobilności oraz oddziaływań między białkami [48]. Fuzje GFP z białkami specyficznymi dla danych przedziałów komórkowych lub dodanie do GFP peptydów sygnałowych charakterystycznych dla danych organelli, pozwoliło na ich obserwację i śledzenie dyna-

micznych procesów dotyczących zmiany ich wielkości, kształtu oraz ich położenia w komórce podczas rozwoju czy odpowiedzi na zmiany środowiska. Przykładem takiego podejścia może być fuzja białka GFP z akwaporyną γ -TIP (białko specyficzne dla wakuoli litycznych, wchodzące w skład integralnych białek tonoplastowych), dzięki czemu możliwa była obserwacja dynamicznej struktury błon wakuoli w komórkach młodych liścieni *Arabidopsis thaliana* [49]. Przy użyciu tej metody zlokalizowano i obserwowano większość organelli komórkowych u roślin (jądra komórkowe [50], mitochondria [51], czy plastydy [52]). Jednym z zastosowań wykorzystujących białko GFP do znaczenia organelli jest ułatwienie ich izolacji poprzez oddzielenie znaczonej fluorescencyjnie jąder komórkowych od innych składników ko-

mórki przy pomocy sortowania przepływowego [53].

V-2. Uwidacznianie wirusów i białek w komórkach roślinnych

Białko GFP jest również użytecznym narzędziem w śledzeniu przebiegu infekcji wirusowych u roślin. Przykładem tego może być wykorzystanie konstruktów zawierających gen kodujący białko przemieszczania się wirusa CPMV z przyłączonym genem *gfp*. Produkt ekspresji genu *gfp* umożliwi śledzenie przemieszczania się wirusa CPMV w liściach wspięgi chińskiej za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego [54].

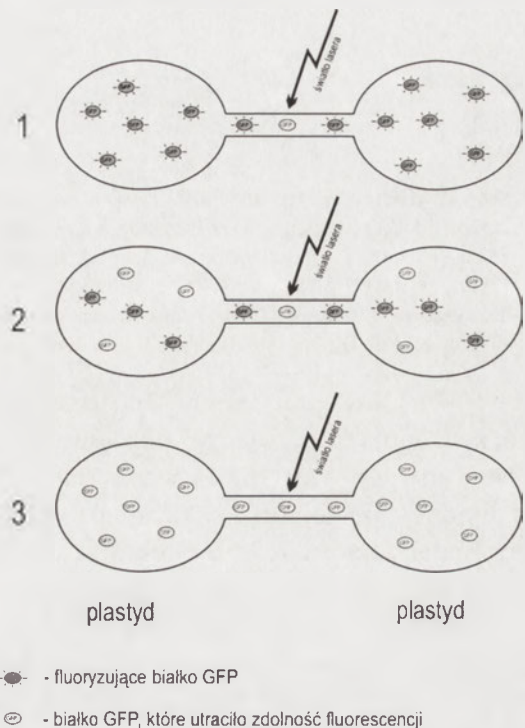
Użycie białka GFP może także w znacznym stopniu ułatwić ustalenie lokalizacji badanego białka w komórce roślinnej. Dołączenie sekwencji genu *gfp* do badanego genu pozwala na określenie lokalizacji kodowanego przez ten gen białka. W ten sposób potwierdzono między innymi lokalizację kodowanej przez różne klony cDNA acetylasy serynowej, w trzech różnych przedziałach komórkowych (cytoplazma, chloroplasty, mitochondria) *Arabidopsis thaliana* [55].

V-3. Badanie mobilności i interakcji białek w komórkach roślinnych

V-3.1 Technika oparta o pomiar spadku poziomu fluorescencji wygaszonej pulsem światła

Do badań nad ciągłością błon przedziałów komórkowych i transportu białek w ich obrębie, została wykorzystana technika oparta o pomiar spadku poziomu fluorescencji wygaszonej pulsem światła (ang. *Fluorescence Loss In Photobleaching*, FLIP). Białka fuzyjne związane z białkiem GFP są idealne do wykorzystania w technikach związanych z wygaszaniem fluorescencji pulsem światła, gdyż struktura III-rzędowa tego białka chroni przed powstawaniem wolnych rodników w czasie tego procesu. Technika FLIP, którą opisujemy w tym rozdziale, polega na ocenie spadku poziomu fluorescencji emitowanej przez białko GFP połączone z badanym białkiem, kiedy znajdzie się w obszarze naświetlania silną wiązką światła. Jeśli cząsteczki wykazujące fluorescencję zlokalizowane w innym rejonie komórki będą zdolne do przemieszczenia się przez obszar poddawany naświetlaniu, ich fluorescencja ulegnie wygaszeniu i zanik fluorescencji będzie widoczny w obu rejonach komórki, co świadczy o połączeniu obu rejonów i możliwości migracji białek

między nimi [56]. Techniki tej użyto do potwierdzenia hipotezy swobodnej wymiany białek między plastydami poprzez struktury łączące (ang. *stromule*) (Ryc. 7). Struktury łączące oba plastydy naświetlano

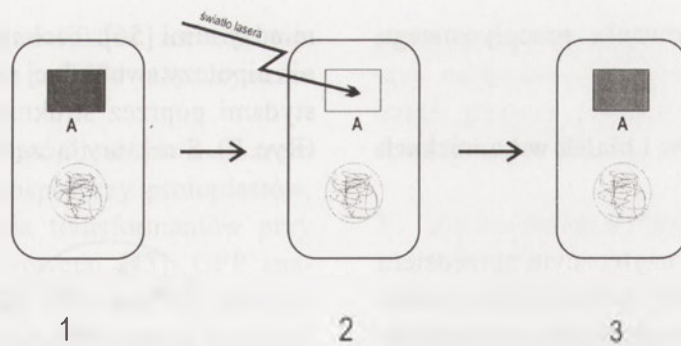


Ryc. 7. Schemat wykorzystania techniki FLIP do potwierdzenia wymiany białek pomiędzy plastydami. (1) W stromie obu plastydów znajdują się wykazujące fluorescencję białko GFP. Naświetlanie silnym światłem lasera struktur łączących te plastydy, powoduje stopniowe wygaszenie fluorescencji białek GFP, które przechodzą przez te struktury. (2) Dalsze naświetlanie struktur łączących powoduje utratę fluorescencji przez kolejne białka GFP. (3) Długotrwałe naświetlanie struktur łączących spowoduje ostatecznie całkowitą eliminację fluorescencji obserwowanej początkowo w obu plastydach.

światłem lasera, co powodowało wygaszenie fluorescencji białek, które przypuszczalnie przez nie przechodziły. Po kilku cyklach naświetlania w obu plastydach zaobserwowano całkowitą utratę fluorescencji, co potwierdziło hipotezę o możliwości wymiany białek między plastydami poprzez łączące je struktury [57].

V-3.2. Technika oparta o pomiar poziomu odzyskanej fluorescencji wygaszonej pulsem światła

Kolejną techniką badawczą opartą o zjawisko fotowygaszania fluorescencji jest technika oparta o pomiar fluorescencji odzyskanej po wygaszeniu jej pulsem światła (ang. *Fluorescence Recovery After Photobleaching*, FRAP), która pozwala na oszacowanie mobilności białek z dodanym białkiem GFP. W technice tej wybrany rejon komórki poddawany jest naświetlaniu silną wiązką światła lasera, co powoduje nieodwracalne wygaszenie fluorescencji znajdujących się tam białek fuzyjnych (białko badane +



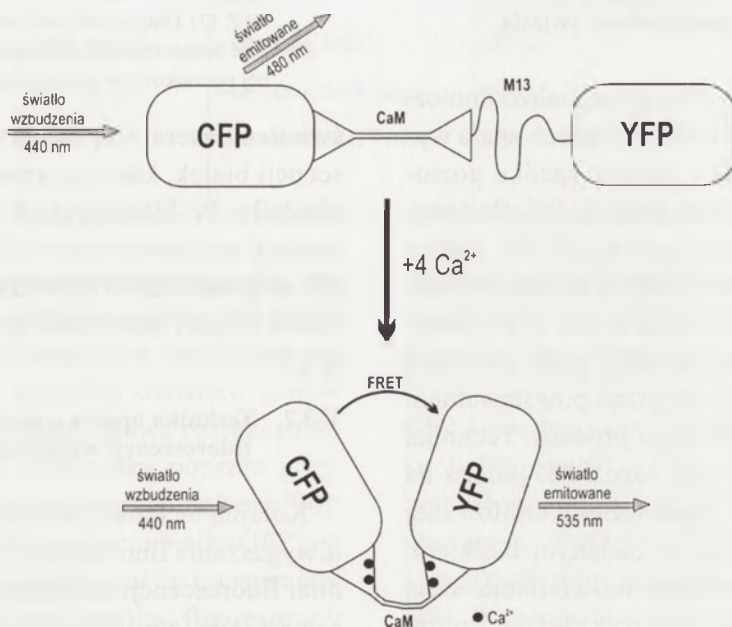
Ryc. 8. Schemat zastosowania techniki FRAP do badań nad przemieszczaniem się białek pomiędzy rejonami komórki. (1) Oświetlenie wybranego rejonu komórki (A) światłem o właściwej długości wywołuje fluorescencję badanych białek połączonych z białkiem GFP znajdujących się w tym rejonie komórki. (2) Naświetlenie badanego rejonu silnym światłem lasera powoduje utratę zdolności fluorescencji zgromadzonych tam białek GFP. (3) Napływ białek fuzyjnych z obszarów sąsiadujących badanym rejonem nie poddanych naświetlaniu światłem lasera, powoduje powrót fluorescencji w badanym obszarze. Obserwowane odzyskanie fluorescencji w badanym rejonie komórki wskazuje, że badane białka mają zdolność do przemieszczania się z jednego rejonu komórki do innego.

białko GFP). Następnie rejon ten naświetla się słabym światłem wzbudzającym fluorescencję GFP. Obserwowane przywrócenie zjawiska fluorescencji w badanym rejonie komórki wskazuje na napływ fuzyjnych białek z innych rejonów komórki, co jest dowodem mobilności badanych białek lub struktur, w które te białka są wbudowane (Ryc. 8) [58]. Przy użyciu techniki FRAP Brandiz i wsp. [59] po raz pierwszy udowodnili przemieszczanie się białek błonowych (fuzja GFP z błonowym receptorem sekwencji H/KDEL-Erd2) między retikulum endoplazmatycznym a aparatem Golgiego *in vivo* w komórkach liścia tytoniu. Autorzy ci podają również, że odzyskiwanie poziomu fluorescencji uprzednio wygaszonego rejonu aparatu Golgiego jest zależne od

energii metabolicznej, co sugeruje, iż transport z retikulum do aparatu Golgiego nie może odbywać się na zasadzie dyfuzji. Po użyciu czynników depolimeryzujących cytoszkielet i zaobserwowaniu powrotu fluorescencji w uprzednio wygaszonych częściach aparatu Golgiego, stwierdzono również, że w komórkach roślinnych cytoszkielet wydaje się nie być niezbędnym przy transporcie białek do aparatu Golgiego [59].

V-3.3. Technika oparta o fluorescencyjny rezonansowy transfer energii

Technika oparta o fluorescencyjny rezonansowy transfer energii (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET) pozwala na badanie interakcji



Ryc. 9. Schemat działania systemu CAMELEON (wg. [60], zmieniono). Wzbudzenie białka CFP światłem o długości fali 440 nm powoduje emisję światła o długości fali 480 nm przez to białko. Ponieważ chromofory białek fluorescencyjnych: CFP i YFP znajdują się w zbyt dużej odległości od siebie, nie może dojść do wzbudzenia emisji światła przez białko YFP. Po związaniu przez kalmodulinę czterech jonów wapnia, białko zmienia konformację (i swoje ułożenie w stosunku do peptydu M13), powodując zbliżenie białek fluorescencyjnych na odległość, która pozwala na fluorescencyjny rezonansowy transfer energii pomiędzy białkiem CFP i YFP, co przejawia się emisją światła przez białko YFP (535 nm). Użyte skróty: CaM — kalmodulina, CFP — białko zielono-niebieskiej fluorescencji, M13 — peptyd docelowy kalmoduliny, FRET — fluorescencyjny rezonansowy transfer energii, YFP — białko żółtej fluorescencji.

białek pozostających w bliskiej odległości w komórce. Technika ta wykorzystuje mechanizm, w którym chromofor jednego białka (donor) emituje światło, które następnie wzbudza emisję światła chromoforu drugiego białka (akceptor). Do transferu energii dochodzi w sytuacji, gdy odległość między chromoforem donora, a akceptora nie przekracza 100Å. Do techniki tej doskonale nadają się pary mutantów białka zielonej fluorescencji (BFP-GFP i CFP-GFP) o zmienionych właściwościach fluorescencji. Długość fali światła emitowana przez BFP (po naświetleniu), odpowiada długości fali światła wzbudzenia dla GFP. Dzięki temu w sytuacji, gdy białka znajdują się odpowiednio blisko, po wzbudzeniu białka BFP następuje fluorescencyjny rezonansowy transfer energii (FRET) na GFP i emisja światła przez to białko. Podobna sytuacja zachodzi pomiędzy parą CFP (chromofor donorowy) i białkiem YFP (chromofor akceptorowy) [58].

Technikę FRET zastosowano do wykrywania jonów Ca^{2+} i wykorzystano w tym celu konstrukt CAMELEON (Ryc. 9). W tym konstrukcie białka CFP i YFP połączone są poprzez kalmodulinę zdolną do wiązania jonów Ca^{2+} oraz peptyd M13. W obecności jonów wapnia kalmodulina zmienia konformację powodując zmniejszenie odległości między parą chromoforów, co prowadzi do transferu energii i związanej z tym zmiany barwy emitowanego światła [59]. Konstrukt CAMELEON użyto między innymi do badań zmian poziomu jonów Ca^{2+} w komórkach szparkowych *Arabidopsis thaliana* [60].

VI. Podsumowanie

Białko zielonej fluorescencji (GFP) odkryte u meduzy stało się w ostatnich latach jednym z najważniejszych narzędzi w biologii molekularnej i medycynie. Tak ważna rola białka GFP wynika głównie z możliwości formowania przez nie chromoforu i wynikających stąd zdolności fluorescencyjnych. Przedstawione w niniejszej pracy główne kierunki badawcze, w których białko zielonej fluorescencji (lub gen *gfp*) jest wykorzystywane (jako gen reporterowy podczas transformacji, w lokalizacji organelli komórkowych i wirusów, w badaniach mobilności i interakcji białek) dotyczą wyłącznie badań z wykorzystaniem materiału roślinnego. Badania te do końca lat dziewięćdziesiątych były opóźnione w stosunku do prac prowadzonych na zwierzętach, co wynikało głównie z początkowych trudności z uzyskaniem ekspresji genu białka GFP w komórkach roślinnych. Pokonanie tych trudności, poprzez wprowadzenie opisanych w tej pracy modyfikacji genu *gfp*, pozwo-

liło na stosowanie wyszukanych technik wykorzystujących GFP i jego pochodnych także w biologii molekularnej roślin. Wydaje się, że wraz z upływem czasu jeszcze więcej mechanizmów funkcjonowania i rozwoju komórki roślinnej znajdzie wyjaśnienie dzięki zastosowaniu technik związanych z wykorzystaniem białka zielonej fluorescencji.

Artykuł otrzymano 26 stycznia 2004

Zaakceptowano do druku 5 lipca 2004

Piśmiennictwo

1. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239
2. Shimomura O, Musicki B, Kishi Y (1988) *Biochem J* 251: 405-410
3. Shimomura O (1995) *Biol Bull -US* 189: 1-5
4. Morin JG, Hastings J (1971) *J Cell Physiol* 77: 313-318
5. Kendall JM, Badminton MN (1998) *Trends Biotechnol* 16: 216-224
6. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier M J (1992) *Gene* 111: 229-233
7. Bokman SH, Ward WW (1981) *Biochem Bioph Res Co* 101: 1372-1380
8. Ward WW (1982) *Biochemistry* 21: 4535-4540
9. Ward WW, Prentice HJ, Roth AF, Cody CW, Reeves SC (1982) *Photochem Photobiol* 35: 803-808
10. Yang F, Moss LG, Phillips GN (1996) *Nat Biotechnol* 14: 1246-1251
11. Rao B, Kemple M, Prendergast F (1980) *Biophys J* 32: 630-632
12. Cody CW, Prasher DC, Wester WM, Prendergast FG, Ward WW (1993) *Biochemistry* 32: 1212-1218
13. Heim R, Prasher DC, Tsien RY (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12501-12504
14. Barondeau DP, Putnam CD, Kassmann CJ, Tainer JA, Getzoff ED (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12111-12116
15. Lim C, Klimata K, Oka M, Nomaguchi K, Kohno K (1995) *J Biochem* 118: 13-17
16. Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J (1974) *Biochemistry* 13: 2656-2662
17. Niwa H, Inouye S, Hirano T, Matsuno T, Kojima M, Kubota M, Ohashi M, Tsuji FI (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13617-13622
18. Dopf J, Horiagan T (1996) *Gene* 173: 39-44
19. Heim R, Tsien RY (1996) *Curr Biol* 6: 178-182
20. Delagrave S, Hawtin R, Silva C, Yang M, Youvan D (1995) *Bio/Technology* 13: 151-154
21. Ehrig T, O' Kane D, Prendergast F (1995) *FEBS Lett* 367: 163-166
22. Niedz RP, Sussman MR, Satterlee JS (1995) *Plant Cell Rep* 14: 403-406
23. Baulcombe DC, Chapman S, Santa Cruz S (1995) *Plant J* 7: 1045-1053
24. Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2122-2127
25. Harper BK, Mabon SA, Leffel SM, Halfhill MD, Richards HA, Moyer KA, Stewart CN Jr. (1999) *Nat Biotechnol* 17: 1125-1129
26. Leffel SM, Mabon SA, Stewart CN Jr. (1997) *Biotechniques* 23: 912-918
27. Siemering KR, Golbik R, Sever R, Haseloff J (1996) *Curr Biol* 6: 1653-1663
28. Cramer A, Whitehorn EA, Tate E, Stemmer WPC (1996) *Nat Biotechnol* 14: 315-319
29. Davis SJ, Vierstra RD (1998) *Plant Mol Biol* 36: 521-528

30. Heim R, Cubitt AB, Tsien RY (1995) *Nature* **373**: 663-664
31. Haas J, Park E-C, Seed B (1996) *Curr Biol* **6**: 315-324
32. Chiu WL, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J (1996) *Curr Biol* **6**: 325-330
33. Pang S-Z, DeBoer DL, Wan Y, Ye G, Layton JG, Neher MK, Armstrong CL, Fry JE, Hinshee MA, Fromm ME (1996) *Plant Physiol* **112**: 893-900
34. Yang T-T, Cheng L, Kain SR (1996) *Nucleic Acids Res* **24**: 4592-4593
35. Cardoza V, Stewart CN Jr. (2003) *Plant Cell Rep* **21**: 599-604
36. Tamura M, Togami J, Ishiguro K, Nakamura N, Katsumoto Y, Suzuki K, Kusumi T, Tanaka Y (2003) *Plant Cell Rep* **21**: 459-466
37. Wahlroos T, Susi P, Tylkina L, Malysenko S, Zvereva S, Korpela T (2003) *Plant Physiol Bioch* **41**: 773-778
38. Weber S, Friedt W, Landes N, Molinier J, Humber C, Rousselin P, Hahne G, Horn R (2003) *Plant Cell Rep* **21**: 475-482
39. Ghrobel R, Juarez J, Navarro L, Pena L (1999) *Theor Appl Genet* **99**: 350-359
40. Elliot AR, Campbell JA, Brettell IS, Grof PL (1998) *Aust J Plant Physiol* **25**: 739-743
41. Elliot AR, Campbell JA, Dugdale B, Brettell RIS, Grof CPL (1999) *Plant Cell Rep* **18**: 707-714
42. Vain P, Worland B, Kohli A, Snape J, Christou P (2000) *Theor Appl Genet* **96**: 164-169
43. Nehlin L, Möllers C, Bergman P, Glimmerlius K (2000) *J Plant Physiol* **156**: 175-183
44. Sidorov VA, Kasten D, Pang S-Z, Hajdukiewicz PTJ, Staub JM, Nehra NS (1999) *Plant J* **19**: 209-216
45. Richards HA, Halfhill MD, Millwood RJ, Stewart CN Jr. (2003) *Plant Cell Rep* **22**: 117-121
46. Tee CS, Marziah M, Tan CS, Abdullah MP (2003) *Plant Cell Rep* **21**: 452-458
47. Newell CA, Birch-Machin I, Hibberd JM, Gray JC (2003) *Transgenic Res* **12**: 631-634
48. Misteli T, Spector DL (1997) *Nat Biotechnol* **15**: 961-964
49. Saito C, Ueda T, Abe H, Wada Y, Kuroiwa T, Hisada A, Furuya M, Nakano A (2002) *Plant J* **29**: 245-255
50. Chytilova E, Macas J, Galbraith DW (1999) *Ann Bot-London* **83**: 645-654
51. Logan DC, Leaver CJ (2000) *J Exp Bot* **51**: 865-871
52. Jang IC, Nahm BH, Kim JK (1999) *Mol Breed* **5**: 453-461
53. Galbraith DW, Herzenberg LA, Anderson MT (1999) *Method Enzymol* **302**: 296-315
54. Gopinath K, Bertens P, Pouwels J, Marks H, Van Lent J, Wellink J, Van Kammen A (2003) *Arch Virol* **148**: 2099-2114
55. Noji M, Inoue K, Kimura N, Gouda A, Saito K (1998) *J Biol Chem* **273**: 32739-32745
56. Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kenworthy A (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 444-456
57. Köhler RH, Cao J, Zipfer WR, Webb WW, Hanson MR (1997) *Science* **276**: 2039-2042
58. Zimmer M (2002) *Chem Rev* **102**: 759-781
59. Brandizzi F, Snapp EL, Roberts AG, Lippincott-Schwartz J, Hawes C (2002) *Plant Cell* **14**: 1293-1309
60. Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) *Nature* **388**: 882-887
61. Allen GJ, Kwak JM, Chu SP, Llopis J, Tsien RY, Harper JF, Schroeder JI (1999) *Plant J* **19**: 727-734

Wskazówki dla Autorów

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

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

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

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

Strona informacyjna jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) Autora (ów), nazwy, adresy, telefony, adresy e-mail zakładów, w których pracują Autorzy, adres do korespondencji,

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

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

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

PIŚMIENNICTWO: Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3, 7, 9-26]. Odnosiniki bibliograficzne powinny mieć nową, uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez tych samych redaktorów (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady.

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

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

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

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

KOMUNIKAT ZARZĄDU GŁÓWNEGO POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

dotyczący składek członkowskich i prenumeraty "Postępów Biochemii"
w roku 2004

Składka członkowska w 2004 roku wynosi:

dla Członków rzeczywistych	80.- zł.
dla Członków studentów	40.- zł
w tym roczna prenumerata "Postępów Biochemii" .	

Małżeństwa mogą opłacać składki w wysokości 80.- + 40.- = 120.- zł.

Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską do 30 czerwca 2004 , mają zapewnioną bezpłatną prenumeratę kwartalnika „Postępy Biochemii”. Członkowie, którzy opłacą składkę po tym terminie, będą otrzymywać kwartalnik do czasu wyczerpania się zapasów magazynowych.

Powyższe zmiany nie dotyczą Członków Honorowych Towarzystwa. Natomiast Członkowie-Emeryci – nadal zwolnieni z opłacania składki członkowskiej – płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” 30.- zł.

Osoby niebędące członkami Towarzystwa mogą być prenumeratorem "Postępów Biochemii". Koszt w 2004 roku - 80.- zł.

Biblioteki płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” w roku 2004 120.- zł.

UWAGA: ZMIANA NUMERÓW KONT POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

**Składki członkowskie i prenumerata Kwartalnika
"Postępy Biochemii"**

**BPH PBK S.A. Oddział w Warszawie, ul. Krucza 24-26
95 1060 0076 0000 4110 5000 0371**

**Prenumerata Kwartalnika "Acta Biochimica Polonica"
BPH PBK S.A. Oddział w Warszawie, ul. Krucza 24-26
35 1060 0076 0000 4110 5000 0384**