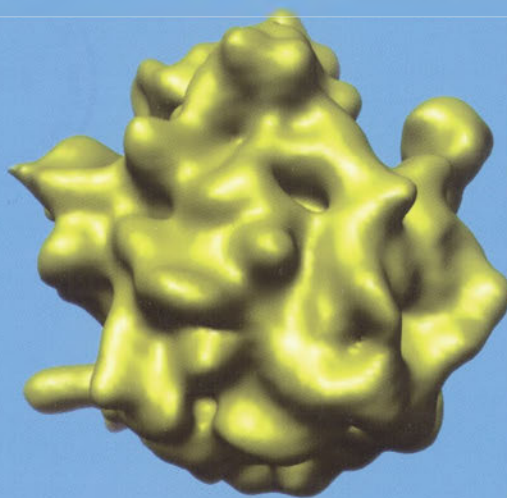


# POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
WARSZAWA 2008  
TOM 54  
NUMER 3

Transportery ABC w nerce  
Układ renin-angiotensyna w kancerogenezie  
Cholesterol i miażdżyca



5  LAT

PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

[www.postepybiochemii.pl](http://www.postepybiochemii.pl)

<http://icm.org.pl>

**Calbiochem®**  
**Novagen®**  
**Novabiochem®**

## Dostępne formaty:

- Liofilizowany proszek
- Roztwór gotowy do użycia

**The master  
protease  
designed by  
nature**

Merck Sp. z o.o.  
Aleje Jerozolimskie 178  
02-486 Warszawa  
tel.: 022 53 59 770  
fax: 022 53 59 945/703  
dzial.handlowy@merck.pl  
www.merck.pl

# PROTEINAZA K

Proteinaza K degradowuje prawie każde białko oraz szybko inaktywuje aktywność takich enzymów jak nukleazy. Działa w szerokim zakresie warunków np.: w obecności SDS, mocznika oraz przy ekstremalnych wartościach pH.

Enzym ten z powodu swojej niespecyficznego proteolitycznej aktywności jest używany w laboratoriach biochemicznych jako standardowa proteaza.

Od ponad 25 lat firma Merck KGaA produkuje duże ilości proteiny K o wysokiej jakości z *Tritirachium album*. Merck KGaA jako głównym światowym producentem tego enzymu. Cały czas ulepsza proces produkcji i dzięki temu redukuje koszty jego powstawania. Ma to wpływ na obniżenie ceny proteiny K i oszczędności, z których również Państwo mogą skorzystać.

Proteinaza K, roztwór w buforze Tris/HCl pH 7,5;

0,01 mol/l; 600 mAnson-U/ml; dla biologii molekularnej

Nr kat.	Opk.	Ilość U w opak.	Cena*	Cena za 1U*
107393.0010	10 ml	6 000 U	491 zł	0,081 zł

Proteinaza K oczyszczana chromatograficznie, liofilizowana,  
30 mAnson-U/mg; dla biologii molekularnej

Nr kat.	Opk.	Ilość U w opak.	Cena*	Cena za 1U*
124568.0100	100 mg	3 000 U	252 zł	0,084 zł
124568.0500	500 mg	15 000 U	649 zł	0,043 zł
124568.0010	10 g	300 000 U	9 124 zł	0,030 zł

**Zapraszamy do sklepu internetowego**

**<https://mecommm.merck.pl>**

\* Cena nie zawiera podatku VAT (7%) i jest ważna do 31 grudnia 2008 r.



<http://rcin.org.pl>



Liliana Konarska (1944–2008)

## PROFESOR LILIANA KONARSKA NIE ŻYJE

Z głębokim żalem i poczuciem niepowetowanej straty informujemy Państwa, że 17 sierpnia 2008 roku w Warszawie, po heroicznej walce z nieuleczalną chorobą, odeszła od nas na zawsze profesor Liliana Konarska. Profesor Konarska była przez dwie kadencje, w latach 1992–1998, Prezesem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, a następnie, od 1998, jego vice-Prezesem. Była również Redaktorem Naczelnym „Acta Biochimica Polonica” i wieloletnim redaktorem „Postępów Biochemii”. Jej odejście jest ogromną stratą dla naszego Towarzystwa i polskiej biochemii.

Profesor Liliana Konarska była absolwentką Uniwersytetu Warszawskiego, gdzie w 1966 roku uzyskała stopień magistra w zakresie biochemii na podstawie pracy pod tytułem „Wpływ eteru etylowego na kompleks dehydrogenazy NADH preparatu Keilina-Hartree”. Po ukończeniu pracy magisterskiej przez sześć miesięcy pracowała w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie,

w Zakładzie Biochemii Mięśni, pod kierunkiem profesora Witolda Drabikowskiego. Jednak całe swoje aktywne życie zawodowe (od listopada 1966 roku) poświęciła Akademii Medycznej w Warszawie (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny), gdzie pracowała początkowo w Zakładzie Chemii Ogólnej I Wydziału Lekarskiego (w latach 1966–1973), a następnie w Zakładzie Analityki Klinicznej Wydziału Farmaceutycznego (w latach 1974–1989) przekształconym w Katedrę i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej (od 1989 do chwili swojej śmierci). Na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (WUM) przeszła wszystkie szczeble kariery naukowej, od stanowiska asystenta do profesora nadzwyczajnego. Stopień doktora nauk przyrodniczych uzyskała w 1974 roku na Wydziale Lekarskim WUM (rozprawa doktorska „Badania nad arginazą jelitową i jej znaczeniem w ustroju”), a doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych w zakresie biochemii klinicznej na Wydziale Farmaceutycznym WUM w 1987 roku (rozprawa habilitacyjna „Izoenzymy arginazy – właściwości, zmienność w ontogenezie i znaczenie kliniczne”). Profesor Liliana Konarska była od 1998 roku profesorem nadzwyczajnym w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Chemii Klinicznej Wydziału Farmaceutycznego WUM.

Jej zainteresowania naukowe obejmowały biochemię ściany jelita u dorosłych i rozwijających się ssaków, enzymologię kliniczną, ze szczególnym uwzględnieniem wrodzonych wad metabolicznych i metod ich wykrywania oraz enzymów o spodziewanym znaczeniu diagnostycznym, molekularne mechanizmy sygnalizacji komórkowej i ich zaburzenia w niektórych stanach chorobowych, a także zastosowanie metod biologii molekularnej w diagnostyce.

Profesor Liliana Konarska odbyła szereg staży naukowych, między innymi w 1978 roku w Department of Biochemistry, Medical School, Debrecen (Węgry), w latach 1979–1980 w Department of Clinical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Bern (Szwajcaria; praca pod kierunkiem profesora J. P. Colombo, współpraca z prof. U. Wiesmannem, Department of Pediatrics, University of Bern i z profesorem R. V. Fellenbergiem, Department of Veterinary Physiology, University of Zurich) oraz w 1983 roku w Department of Clinical Chemistry, University of Bern (profesorowie J. P. Colombo i U. Wiesmann).

W naszej pamięci pozostanie przede wszystkim jako wybitny działacz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, redaktor i wydawca polskich czasopism naukowych oraz nieustrudzony organizator zjazdów i konferencji naukowych. Profesor Konarska była pomysłodawcą i organizatorem Pierwszej Polsko-Ukraińskiej Konferencji Biochemicznej im. Jakuba Karola Parnasa we Lwowie (1996 r.) oraz członkiem komitetów organizacyjnych następnych konferencji w Gdańsku (1998 r.), we Lwowie (2000 r.), we Wrocławiu (2002 r.), w Kijowie (2005 r.) i w Krakowie (2007 r.). Była vice-Przewodniczącą komitetu organizacyjnego Kongresu FEBS w Warszawie (2004 r.). Brała także czynny udział w pracach komitetów organizacyjnych dorocznych zjazdów Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (1993–2008) i w organizacji sesji na tych zjazdach: w Lublinie (2005 r.), w Białymstoku (2006 r.), w Szczecinie (2007 r.) i w Olsztynie (2008 r.). Ponadto uczestniczyła w organizacji i prowadzeniu sesji podczas Zjazdu Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego (Warszawa, 1995 r.), Ogólnopolskiej Konferencji Biologii Komórki (Kraków, 1999 r.) i Konferencji na temat „Przekazywania sygnałów w komórce” (Warszawa, 1993 r.).

W Jej Osobie żegnamy wybitnego działacza Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, badacza, nauczyciela akademickiego, wspaniałą koleżankę, przyjaciela, Człowieka.

Cześć Jej Pamięci!!!

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”



## W NASTĘPNYM NUMERZE:

**Błędy w odszyfrowywaniu informacji genetycznej**

Kamilla Bąkowska-Żywicka, Marta Sikora, Tomasz Twardowski

**siRNA skierowane przeciwko telomerazie**

Błażej Rubiś, Anna Półrończak, Maria Rybczyńska

**Metabolizm siarki w roślinach i jego regulacja**

Grzegorz Moniuszko, Agnieszka Sirko

**Rycina na okładce:**

„The endosomal-associate protein, Hrs” by Paweł Penczek (Pawel.A.Penczek@uth.tmc.edu), Department of Biochemistry and Molecular Biology, The University of Texas Health Science Center at Houston, 6431 Fannin St, Houston, TX 77030, USA, with permission.

**O Autorze:** Dr Paweł A. Penczek, jest absolwentem Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego (Pracowni Fizyki Medycznej), a obecnie profesorem Wydziału Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Teksaskiego w Houston, Teksas, USA. Zajmuje się określaniem struktury przestrzennej białek z zastosowaniem mikroskopii elektronowej i wykorzystaniem metody rekonstrukcji tomograficznej. Dr Penczek jest współautorem ponad 70 publikacji naukowych opublikowanych m.in. w Journal of Structural Biology, Nature Structural and Molecular Biology i Biophysical Journal.

## WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

Wiadomości krajowe  
pod red. Teresy Wesołowskiej 225

Wspomnienie o prof. dr hab. n. med. Agnieszce Lachowicz-Ochędalskiej  
Jacek Kuźnicki 233

## ARTYKUŁY PRZEGLADOWE

Rola modyfikacji SUMO w utrzymaniu stabilności genomowej  
Ewelina Synowiec, Dominika Książek, Janusz Błasiak, Katarzyna Woźniak 234

Regulacja transkrypcji genów przez długołańcuchowe kwasy tłuszczowe  
Magdalena Jazurek, Paweł Dobrzyń, Agnieszka Dobrzyń 242

Struktura i funkcjonowanie rybosomu eukariotycznego  
Kamilla Bąkowska-Żywicka, Tomasz Twardowski 251

Receptory pomocnicze w sygnalizacji TGFβ  
Jacek Mokrosiński, Wanda M. Krajewska 264

Izoenzymy kinazy kreatynowej – charakterystyka i funkcje w komórce  
Katarzyna Grzyb, Edward F. Skorkowski 274

Rola transporterów ABC w nerkowym wydalaniu organicznych anionów i leków  
Agnieszka Piwkowska 284

Zaangażowanie układu renina-angiotensyna (RAS) w proces kancerogenezy  
Kamila Domińska, Agnieszka Lachowicz-Ochędalska 294

Procesy transportu zwrotnego cholesterolu i ich rola w regresji miażdżycy  
Angelika Chachaj, Katarzyna Drożdż, Andrzej Szuba 301

Biogeneza roślinnych mikro RNA  
Łukasz Sobkowiak, Bogna Szarzyńska, Zofia Szweykowska-Kulińska 308

Pozacytoplazmatyczny system kontroli jakości u bakterii *Escherichia coli* – rola proteaz i czynników wspomagających zwijanie białek  
Joanna Skórko-Glonek, Anna Sobiecka-Szkatuła 317

The endosomal-associate protein, Hrs, embedded into the membrane of an early endosome. Two functional domains have been docked into the cryo-EM density map of hexameric Hrs, determined to 16Å resolution [1]. Structure of the VHS and FYVE domains have been determined crystallographically [2] and are docked into the EM density map of the Hrs. The knowledge of the location of the FYVE and VHS domains, which are reported to bind to phosphatidylinositol 3-phosphate molecules found within the endosomal membrane, has guided the hypothetical placement of Hrs within the endosomal membrane. The immersion of the end caps of Hrs into the endosomal membrane demonstrates an ‘end-on’ binding model of the Hrs particles with the membrane. According to this model, either end cap can embed into the membrane, allowing the other end cap to carry out other essential protein trafficking functions, or to embed into another membrane, thus preventing fusion of membranes during early endosomal fusion.

1. Pullan L, Mullapudi S, Huang Z, Baldwin PR, Chin C, Sun W, Tsujimoto S, Kolodziej SJ, Stoops JK, Lee JC, Waxham MN, Bean AJ, Penczek PA (2006) The endosome-associated protein Hrs is hexameric and controls cargo sorting as a „master molecule”. Structure 14: 661-671

2. Mao Y, Nickitenko A, Duan X, Lloyd TE, Wu MN, Bellen H, Quijcho FA (2000) Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved in membrane trafficking and signal transduction. Cell 100: 447-456

3. Kutateladze TG, Ogburn KD, Watson WT, de Beer T, Emr SD, Burd CG, Overduin M. (1999) Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition by the FYVE domain. Mol Cell 3: 805-811

Events/Opinions/Comments	225
<b>REVIEWS</b>	
Role of SUMO modification in the maintenance of genome stability	234
Regulation of gene expression by long-chain fatty acids	242
Structure and function of the eukaryotic ribosome	251
TGF $\beta$ signalling accessory receptors	264
Creatine kinase isoenzymes – characterization and functions in cell	274
The role of ABC transporters in the renal elimination of organic anions and drugs	284
The involvement of the renin-angiotensin system (RAS) in cancerogenesis	294
Reverse cholesterol transport processes and their role in atherosclerosis regression	301
Plant micro RNA biogenesis	308
The extracytoplasmic protein quality control in bacterium <i>Escherichia coli</i> - the role of proteases and the folding factors	317

## IV edycja konkursu na najlepszą pracę doktorską z biochemii w 2008 roku

Polskie Towarzystwo Biochemiczne i firma Merck Sp. z o.o. ogłasza trzecią edycję konkursu na najlepszą pracę doktorską z biochemii wykonaną w polskiej instytucji naukowej. Warunkiem uczestnictwa jest przyznanie autorowi pracy tytułu doktora przez właściwą radę naukową lub radę wydziału w **2008** roku. Nagroda obejmuje premię pieniężną dla autora w wysokości 4 500 zł, ufundowaną przez firmę Merck, oraz opublikowanie też doktoratu w 4 numerze kwartalnika „Postępy Biochemii” w 2009 roku. Nagrodę przyznaje Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w porozumieniu w firmą Merck. Zgłoszenia kandydatów do Nagrody mogą dokonywać pracownicy naukowci ze stopniem doktora habilitowanego lub tytułem profesora.

Zgłoszenia w formie listu przewodniego wraz z pracą doktorską w formacie pdf należy przesłać w nieprzekraczalnym terminie do **31 maja 2009 roku** tylko drogą elektroniczną na adres:

**s.pikula@nencki.gov.pl**

Roźstrzygnięcie konkursu nastąpi do 31 sierpnia 2009 roku, a uroczyste wręczenie Nagrody odbędzie się na dorocznym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego we wrześniu 2009 roku.

Patronat medialny nad konkursem sprawuje redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”. Informacje dotyczące konkursu można uzyskać kierując pytania pod następujący adres poczty elektronicznej: s.pikula@nencki.gov.pl.

profesor Sławomir Pikula  
Sekretarz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego  
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

### PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII

**OLYMPUS**  
Your Vision, Our Future

**MERCK**

**Polska Sieć Mitochondrialna**  
www.mitonet.pl

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

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

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

Sekretarz redakcji: Hanna Laskowska; e-mail: h.laskowska@nencki.gov.pl, tel. (022) 5892441

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

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

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

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

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

# NEW Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X)

## High specificity



### All the advantages at a glance

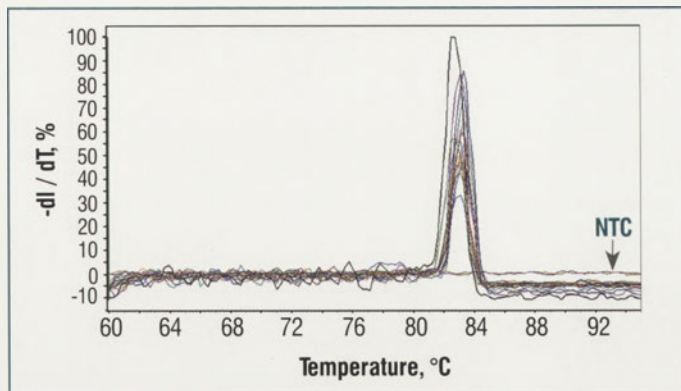
- **Specificity** – Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase and the optimized buffer eliminate non-specific amplification and formation of primer dimers.
- **Sensitivity** – detects low copy number targets.
- **Wide linear range** – accurate quantification across 9 orders of magnitude.
- **Universal** – can be used on most real-time thermal cyclers.
- **Reproducibility and convenience** – ready-to-use 2X master mix minimizes pipetting error and reduces set-up time.

### Applications

- Real-time PCR using SYBR Green dye.
- Real-time RT-PCR using SYBR Green dye.

### Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X)

Cat. No.	Appl.
K0221	2x1.25 ml (for 200 reactions of 25 µl)
K0222	10x1.25 ml (for 1000 reactions of 25 µl)



### Melting curve analysis confirms high qPCR specificity.

Amplification of 10-fold dilutions of supercoiled plasmid DNA, starting from 10 ng down to 0.1 fg, using the Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X) in duplicate reactions. Reactions were performed on the Eppendorf Mastercycler® ep realplex instrument. NTC is the non-template control.

# NEW Maxima™ Probe qPCR Master Mix (2X)

## High sensitivity



### All the advantages at a glance

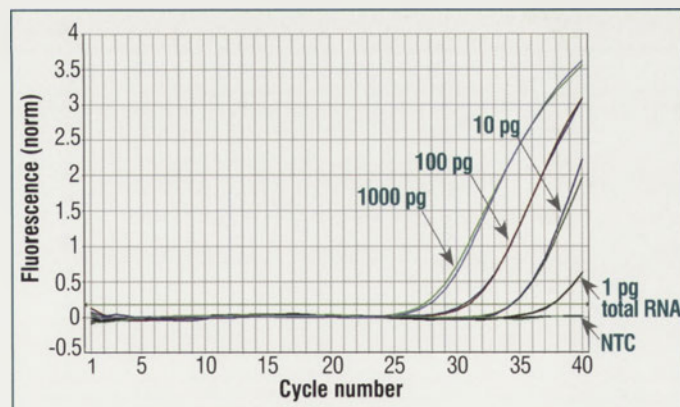
- **Sensitivity** – detects low copy number targets.
- **Specificity** – Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase and the optimized buffer eliminate non-specific amplification and formation of primer dimers.
- **Wide linear range** – accurate quantification across 9 orders of magnitude.
- **Universal** – can be used with sequence-specific probes on most real-time thermal cyclers.
- **Reproducibility and convenience** – ready-to-use 2X master mix minimizes pipetting error and reduces set-up time.

### Applications

- Real-time PCR using sequence-specific probes.
- Real-time RT-PCR using sequence-specific probes

### Maxima™ Probe qPCR Master Mix (2X)

Cat. No.	Appl.
K0231	2x1.25 ml (for 200 reactions of 25 µl)
K0232	10x1.25 ml (for 1000 reactions of 25 µl)



### Highly sensitive two step qRT-PCR.

Amplification of human PPP1CA gene was performed on serial 10-fold dilutions of Jurkat cell total RNA (from 1 ng to 1 pg). First strand cDNA was generated with the RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1621). cDNA was amplified with the Maxima™ Probe qPCR Master Mix (2X) using the TaqMan® assay specific for PPP1CA. Reactions were performed on an ABI PRISM® 7000 instrument. 1 pg of total RNA was successfully detected. NTC is the non-template control.



DYSTRYBUTOR: abo Grażyna Boreysza  
 ul. Podleśna 6a, 80-255 Gdańsk  
 Biuro: ul. Małachowskiego 1, 80-262 Gdańsk  
 tel.: (58) 341 21 43; fax: (58) 520 33 80  
 e-mail: abo@abo.com.pl; www.abo.com.pl

<http://rcin.org.pl>



**Fermentas**  
 LIFE SCIENCES

# EBEC2010

**16<sup>th</sup> European Bioenergetic Conference**

**Warsaw, 17-22 July 2010**

**WWW.EBEC2010.PL**



**Organized by:**  
**Polish Biochemical Society - Bioenergetic Section**  
**Polish Mitochondrial Network**  
**Nencki Institute of Experimental Biology**



<http://rcin.org.pl>



**Konkurs „SUPERHELISA 2008”.** Szymon Nowakowski, student II roku Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Gdańsku został laureatem V edycji ogólnopolskiego konkursu wiedzy biochemicznej „SUPERHELISA 2008” (Fot. 1-3), który odbył się

Polski. Otrzymał 130,1 punkty, na 155 możliwych do zdobycia. Drugie miejsce zajęła Daria Świecka, studentka II roku Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Gdańsku (129,5 punktów). Miejsce III przypadło Joannie Przybek, studentce I Wydziału

się Akademii Medycznej w Gdańsku. Wyprzedziła Warszawski Uniwersytet Medyczny (357,3 punkty) i Collegium Medicum w Bydgoszczy (filia Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, 348,8 punktów).

V edycję konkursu „SUPERHELISA 2008” zorganizowali pracownicy Katedry i Zakładu Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku, kierowanych przez prof. dr hab. Juliana Świerczyńskiego. Do tegorocznego konkursu indywidualnego i zespołowego przystąpiło 11 trzyosobowych ekip z uczelni medycznych całej Polski. Komisja konkursowa składała się z opiekunów dydaktycznych ekip studenckich uczestniczących w konkursie. Uczestnicy konkursu odpowiadali na 100 pytań testowych (pojedynczego wyboru z pięciu możliwych odpowiedzi). Uzyskanie przez uczestnika minimum 60 punktów umożliwiło przejście do II etapu konkursu, podczas którego studenci odpowiadali na pięć pytań opisowych w czasie 50 minut. Pytania dotyczyły przebiegu podstawowych procesów biochemicznych i wzorów metabolitów. Poziom wiedzy studentów był tak duży, że do drugiego etapu zakwalifikowali się wszyscy startujący w konkursie. Czas do ogłoszenia wyników studenci spędzali na spacerach wokół jeziora i dyskusjach, a wieczorem zostały ogłoszone wyniki drugiego etapu konkursu: podano sumę punktów uzyskanych w trakcie I i II etapu konkursu przez każdego uczestnika. W ten sposób wyłoniono 10 studentów z najwyższą łączną punktacją. Do trzeciego etapu konkursu zakwalifikowali się: Szymon Nowakowski z Akademii Medycznej w Gdańsku (111 punktów), Wojciech Guenter z Collegium Medicum w Bydgoszczy (107 punktów), Joanna Przybek z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (107 punktów), Szymon Czarkowski z Akademii Medycznej w Gdańsku (106 punktów), Dariusz Wojciechowski z Collegium Medicum w Bydgoszczy (106 punktów), Daniel Kuczyński z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (104 punkty), Daria Świecka z Akademii Medycznej w Gdańsku (104 punkty),



Fotografia 1. Konkurs „Superhelisa 2008”, oczekiwanie na wyniki Konkursu.

16-18 maja, w malowniczo położonym Ośrodku Wypoczynkowo-Szkoleniowym „Dorota” w Łapinie koło Kolbud. Szymon Nowakowski pokonał trzydziestu dwóch konkurentów z jedenastu uczelni medycznych z całej

Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (129,3 punktów). W klasyfikacji zespołowej uczelni medycznych w konkursie „SUPERHELISA 2008”, na pierwszym miejscu z dorobkiem punktowym 385,2 znalazła



Fotografia 2. Organizatorzy i laureaci Konkursu; drugi od lewej Szymon Nowakowski, Daria Świecka.



Fotografia 3. Uczestnicy Konkursu w czasie wolnym w Łąpinie.

Magdalena Uzar z Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (104 punkty), Aleksandra Rumianowska z II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (103 punkty) i Rafał Wolny z I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (103 punkty). Wszyscy finaliści odpowiadali anonimowo na ten sam, losowo wybrany przez pierwszego odpowiadającego, zestaw trzech pytań przekrojowych wymagających umiejętności analizowania wiedzy. Na tym etapie opiekun osoby odpowiadającej nie miał prawa oceniać własnego podopiecznego. Suma punktów uzyskana przez zawodnika we wszystkich trzech etapach decydowała o miejscu, które student zajął w indywidualnej klasyfikacji końcowej. Zdaniem oceniających poziom konkursu był bardzo wysoki, a różnice punktowe pomiędzy finalistami bardzo niewielkie. O kolejności na podium w rozgrywkach indywidualnych zdecydowały różnice dziesiątych punktu. Suma punktów uzyskanych we wszystkich trzech etapach przez studentów z tej samej ekipy, decydowała o miejscu w klasyfikacji zespołowej. W sobotnie popołudnie ogłoszono wyniki rozgrywek indywidualnych i zespołowych i uroczystie zakończono konkurs. Nagrody i wyróżnienia najlepszym uczestnikom konkursu wręczali prof. dr hab. Jacek Bigda, prorektor ds. rozwoju i współpracy międzynarodowej AMG oraz prof. dr hab. Julian Świerczyński, kierownik Katedry i Zakładu Biochemii AMG. Następane godziny spotkania, już pozbawione stresu, minęły bardzo szybko przy ognisku i grillu. Był to dobry czas na rozmowy,

wymianę doświadczeń oraz nawiązanie nowych znajomości.

Tą drogą organizatorzy konkursu dziękują tym wszystkim, którzy przyczynili się do realizacji konkursu w Gdańsku, a szczególnie sponsorom:

Ikamed, Sigma-Aldrich i Ziąja. Dzięki ich wsparciu najlepsi studenci otrzymali atrakcyjne nagrody i upominki (relacja przygotowana przez dr Ewę Kossowską).

**System Life Tracker uznano za najlepszy projekt oprogramowania zgłoszony do polskiej edycji Microsoft Imagine Cup 2008 (konkurs przeprowadzony w Polsce po raz szósty). System Life Tracker jest nowatorskim rozwiązaniem umożliwiającym śledzenie w czasie rzeczywistym gatunków zwierząt zagrożonych wyginięciem. System samodzielnie gromadzi dane o stanie wybranych osobników, na ich podstawie pomaga przewidywać zachowanie zwierząt i pozwala interweniować w krytycznych sytuacjach. Przyczynia się on do sukcesu reintrodukcji, czyli prób ponownego wprowadzenia na stare miejsca bytowania, rodzimych gatunków zwierząt niegdyś tam żyjących, lecz wytępionych. Program stworzyli członkowie zespołu Demoscene Spirit z Uniwersytetu Adama Mickiewicza w**

Poznaniu (Fot. 4). Agata Czapracka oraz Wiktoria Szydło, studentki Wydziału Biologii UAM, przedstawiły i dokładnie zdefiniowały problem. To one właśnie określiły jakiego systemu i jakich funkcji im trzeba. One formowały Life Tracker'a przez cały czas kiedy powstawał. Agata Majewska z Akademii Sztuk Pięknych była odpowiedzialna za komunikację wizualną; zaprojektowała logo, plakaty, ulotki, całą oprawę graficzną oraz wystrój stoiska na konkursie. Łukasz Michniewicz oraz Szymon Majewski z wydziału Matematyki i Informatyki UAM, byli odpowiedzialni za kod aplikacji. Program powstał w języku C#, a wizualizację wsparła biblioteka Direct3D. Tomasz Gdala, jako mentor zespołu, czuwał nad całością prac i perfekcyjnością prezentacji. Reintrodukcja daje szansę na uratowanie gatunku, lecz rozwiązania stosowane w telemetrii drobnych zwierząt są mało efektywne, ponieważ pozwalają na monitorowanie niewielkiej liczby osobników, wymagają pracy wielu osób w terenie, a uzyskane dane nie dają pełnego obrazu dynamiki populacji. System Life Tracker eliminuje te problemy. Narzędzie składa się z wyposażonych w aparaturę pomiarową obrożi zakładanych zwierzętom, rozmieszczonych w terenie centralnie zbierających radiowo informacje o zwierzętach i wysyłających dane do serwera za pomocą GSM, serwera oraz podłączonych do niego klientów, za pomocą których użytkownik dodaje i kontroluje istniejące badania. Life Tracker ma realistyczny system wizualizacji. Jego użytkownik porusza się w wirtualnym świecie zgodnym topograficznie z rzeczywistym obszarem badań (las, łąka). Według ekspertów jest łatwo integrowany z istniejącymi



Fotografia 4. Demoscene Spirit, od lewej: Wiktoria Szydło, Agata Majewska, Łukasz Michniewicz, Szymon Majewski, mgr Tomasz Gdala.

systemami telemetrycznymi jak i obliczeniowymi. Udostępnione interfejsy pozwalają wykorzystać już istniejące dane i urządzenia pomiarowe. System będzie testowany na popielicach, które od kilku lat są obiektem działań reintrodukcyjnych. Technologiczny konkurs dla studentów Microsoft Imagine Cup 2008 został rozstrzygnięty w maju b.r. w Instytucie Wzornictwa Przemysłowego w Warszawie. Nagrodzony zespół będzie reprezentował Polskę w finałach światowych, które odbędą się we Francji. Drugie miejsce w konkursie zajął zespół Incognitos z Politechniki Poznańskiej w składzie: Michał Mačkowiak, Miłosz Kadziński, Sylwia Kopczyńska, Wojciech Kokot z projektem ThumbRider. Trzecie miejsce przypadło zespołowi FTeamS z Politechniki Łódzkiej w składzie: Dariusz Krukowski, Grzegorz Glonek, Jacek Pintera, Jarosław Andrzejczak, Krzysztof Szokal-Egird z opiekunem Jarosławem Koszukiem. Zespół przedstawił projekt o nazwie eTrip. Microsoft prowadzi na świecie, w tym w Polsce, liczne programy, w ramach których młodzi ludzie uczą się tworzyć innowacyjne rozwiązania technologiczne oraz poznają otoczkę biznesową konieczną do odniesienia sukcesu na rynku; konkurs Imagine Cup jest jednym z nich.

**Sukces zespołu prof. Lubińskiego w walce z rakiem piersi.** Zdaniem naukowców ze Szczecina podawanie w chemioterapii leku cis-platyny jest przełomem w leczeniu raka piersi u kobiet. U nosicieli zmutowanego genu, u których rozwinęła się choroba, leczenie prowadzi często do częściowej lub całkowitej remisji. U pacjentek, które nie były poddane wcześniej chemioterapii, cis-platyna powoduje zanikanie guzów lub ich częściowe zmniejszanie. Jednak w każdym przypadku, wprawdzie w różnej skali, efekt jest pozytywny. Prof. Jan Lubiński z Międzynarodowego Centrum Nowotworów Dziedzicznych Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie otworzył w 1992 roku, pierwszą w naszym kraju genetyczną poradnię onkologiczną i odkrył, że najważniejszym czynnikiem powstawania nowotworu są wrodzone predyspozycje genetyczne.

**Badania nad właściwościami białek tworzących soczewkę oka mogą**

doprowadzić do przełomu w leczeniu zaćmy – jednej z najczęstszych chorób grozących utratą wzroku. Zaćma pojawiająca się w jednym lub obu oczach u 40 procent osób po 75 roku życia, najpierw utrudnia, a później uniemożliwia widzenie. Obecnie leczenie polega na operacyjnym usunięciu soczewki i zastąpieniu jej sztuczną, zrobioną z odpowiedniego tworzywa sztucznego. Alternatywnym dla operacji rozwiązaniem mogłoby być odbudowanie prawidłowej struktury molekularnej soczewki za pomocą nanotechnologii. Nad zagadnieniem nieoperacyjnego leczenia zaćmy pracuje prof. Barbara Krystyna Pierscionek (Fot. 5) z Uniwersytetu w Ulsterze (po studiach i doktoracie na wydziale lekarskim w Melbourne). Badania nad zaćmą były do tej pory utrudnione, ponieważ badania nad jej biochemią wymagały dostępu do wnętrza soczewki, co sprawiało, że nie można było określić struktury białek przed i po powstaniu zaćmy. Prof. Pierscionek współpracuje z prof. Wei Chenem, nanotechnologiem z University of Texas w Arlington oraz prof. Ronem Schacharem, okulistą i fizykiem.

**Geny głównego układu zgodności tkankowej (MHC) wytwarzają białka o kluczowym znaczeniu w zwalczaniu infekcji.** Dr Wiesław Babik z Uniwersytetu Jagiellońskiego i dr Walter Durka z Centrum Badań Środowiskowych Helmholtza (UFZ) scharakteryzowali zmienność genetyczną i wykryli więcej niż jeden gen MHC klasy II u płaza ogoniastego. Populacje płazów zanikają gwałtownie na całym świecie, a jedną z najważniejszych przyczyn jest pewien gatunek grzyba. Dlatego informacje o funkcjonowaniu układu

odpornościowego są istotne dla ochrony płazów. Badacze przeanalizowali populację traszki górskiej (*Mesotriton alpestris* z Polski), na północo-wschodnim skraju zasięgu gatunku. Jest ona pierwszym europejskim i trzecim w skali światowej płazem ogoniastym, którego MHC zbadano oraz pierwszym, u którego stwierdzono więcej niż jeden gen MHC II. To odkrycie wskazuje, że zmienność genetyczna MHC jest istotna również w tej grupie. Badacze wykazali, że u traszki działa dobór pozytywny, co oznacza, że geny MHC odgrywają ważną rolę w układzie odpornościowym, który rozpoznaje i zwalcza infekcje. Dr Wiesław Babik przeprowadził badania w ramach współpracy pomiędzy Uniwersytetem Jagiellońskim i UFZ w Halle, finansowanej przez Fundację Aleksandra von Humboldta.

We wcześniejszych badaniach naukowcy stwierdzili, że w ciągu ostatnich 10 tys. lat polskie populacje traszki górskiej stosunkowo szybko osiągnęły wysoki poziom zmienności genetycznej. Trzy obecnie

izolowane populacje w Sudetach, Karpatach i Górach Świętokrzyskich najprawdopodobniej wywodzą się z jednego obszaru, gdzie traszki przeżyły ostatnią epokę lodowcową. Wyniki swoich badań naukowcy opublikowali w czasopiśmie *Molecular Ecology* (wg strony www UJ).

Fizyk prof. Andrzej Sobolewski (Fot. 6) i chemik prof. Wolfgang Domcke (Fot. 7) odebrali w Warszawie nagrodę Copernicus, przyznaną wspólnie przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej (FNP) i niemiecką Deutsche Forschungsgemeinschaft. Profesorowie Sobolewski i Domcke zostali wyróżnieni za osią-



Fotografia 5. Profesor Barbara Krystyna Pierscionek.



Fotografia 6. Profesor Andrzej Sobolewski.



Fotografia 7. Profesor Wolfgang Domcke.

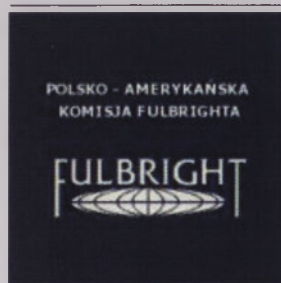
gnięcia naukowe z zakresu fotochemii będące rezultatem trwającej od ponad dwudziestu lat współpracy. Wspólne badania laureatów doprowadziły do zidentyfikowania i scharakteryzowania mechanizmu, zwanego obecnie scenariuszem Sobolewskiego-Domcke, odpowiedzialnego za odporność na promieniowane nadfioletowe (UV) podstawowych struktur biologicznych, takich jak DNA i białka. Odkrycie to ma przełomowe znaczenie dla dalszych badań nad początkami życia na Ziemi. Nagroda została przyznana także za wspólne działania laureatów wspierające młodych naukowców z Polski i Niemiec. Prof. Wolfgang Domcke studiował fizykę na Politechnice Monachijskiej. Po uzyskaniu stopnia doktora habilitował się w 1979 roku na Uniwersytecie we Freiburgu. Pracował naukowo na Uniwersytetach w Heidelbergu i Düsseldorfie. Od wielu lat związany jest z Politechniką Monachijską, gdzie od 1999 roku kieruje Katedrą Chemii Teoretycznej. Prof. Andrzej Sobolewski zajmuje się teoretyczną fizyką cząsteczek. Studiował fizykę na Uniwersytecie Warszawskim. Doktorat i habilitację uzyskał w Instytucie Fizyki PAN w Warszawie, gdzie od 1991 roku jest profesorem. Uczony jest laureatem wielu krajowych i międzynarodowych nagród naukowych, w tym nagrody Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (2007), nazywanej polskim Noblem.

Nagroda Copernicus jest wspólnym przedsięwzięciem FNP i niemieckiej organizacji pozarządowej wspierającej naukę, Deutsche Forschungsgemeinschaft. Celem nagrody jest wyróżnienie najbardziej aktywnych uczestników polsko-niemieckiej współpracy naukowej, którzy mogą się wykazać wyróżniającym się dorobkiem badawczym, będącym rezultatem tej współpracy, jak również sukcesami w promowaniu młodej kadry badawczej. Nagroda przyznawana jest raz na dwa lata (po raz pierwszy w 2006 roku) w drodze konkursu dwóm uczonym, zajmującym się dowolną dziedziną nauki – jednemu z Polski i jednemu z Niemiec. Nagroda wynosi 50 tys. euro (po 25 tys. euro dla każdego z dwóch laureatów) i wręczana jest w Berlinie. Do tegorocznej edycji nagrody Copernicus zgłoszonych zostało 29 wniosków.

Pod koniec lipca FNP wyłoniła laureatów pierwszej edycji konkursu w

programie Międzynarodowe Projekty Doktoranckie. Finansowanie otrzymają trzy projekty, ocenione najwyżej w procedurze konkursowej. Laureatami zostały: **Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego** – projekt z zakresu nauk chemicznych (International Scholarship Program for Graduate Studies in Faculty of Chemistry); koordynator konsorcjum **prof. Renata Bilewicz; Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk** – projekt z zakresu biologii strukturalnej (Structural biology of plants), koordynator konsorcjum **prof. Mariusz Jaskólski; Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej** – projekt z zakresu nanonauki (Interdisciplinary PhD-Project in Nanoscience and Advanced Nanostructures); koordynator konsorcjum **dr hab. Bartłomiej Szafran**. Łączna wartość przyznanego finansowania dla wszystkich trzech projektów wynosi do **13 910 800 złotych**. Program „Międzynarodowe Projekty Doktoranckie” realizowany jest dzięki pozyskaniu przez Fundację środków z funduszy europejskich w ramach Działania 1.2 „Wzmocnienie potencjału kadrowego nauki” Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013. Najbliższy termin składania wniosków w kolejnych edycjach programu to 15 marca 2009 r., a następny termin to 15 marca 2010 r. **Szczegółowych informacji o programie udziela Zespół ds. Programów Finansowanych z Funduszy Strukturalnych**; tel. (022) 4240226, (022) 4240225, (022) 4240306, (022) 4240252; e-mail: fundusze@fnp.org.pl.

**Polska i Niemcy podpisały umowę o powołaniu Fundacji na Rzecz Nauki.** Umowę sygnowały w Warszawie minister nauki i szkolnictwa wyższego Barbara Kudrycka i jej odpowiedniczka w niemieckim rządzie, Annette Schavan. Polska nie będzie w miała w fundacji ograniczonych praw, chociaż jej wkład finansowy jest mniejszy. Decyzje w fundacji będą podejmowane na zasadzie porozumienia. Umowa przewiduje, że Niemcy wpłacą 50 mln euro na konto fundacji, Polska dołoży 5 mln euro. Pieniądze wpłacone przez oba kraje będą stanowiły kapitał, którym fundacja będzie obracała.



Fotografia 8. Godło Programu Fulbrighta.

Według szacunków, fundacja co roku przekaże na badania 2,2 mln euro.

**Prawie miliard euro Polska będzie mogła wykorzystać na kształcenie kadr w instytucjach naukowych oraz na poprawę szkolnictwa wyższego z programu operacyjnego Kapitał Ludzki.** W czerwcu w Warszawie zainaugurowano uroczyste części Programu, z którego pieniądze będą przeznaczone na naukę i szkolnictwo wyższe. Z około 1 mld euro przeznaczonego na ten cel na lata 2007–2013 finansowane będą np. szkolenia dla naukowców, którzy chcieliby rozpocząć współpracę z przedsiębiorstwami, studia w dziedzinach ważnych dla gospodarki, studia podyplomowe, itp. Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego pragnie przede wszystkim działać na rzecz zwiększenia zainteresowania młodzieży studiami w dziedzinach ścisłych i technicznych. Jak informuje resort, z danych GUS wynika, że w połowie 2007 r. w Polsce było około 30 tys. wakatów na stanowiskach pracowników technicznych średniego szczebla. Wg informacji wiceminister nauki, prof. Marii Orłowskiej, brakuje przede wszystkim inżynierów mechaników, inżynierów budownictwa i inżynierii środowiska oraz inżynierów elektryków, a studia na tych kierunkach cieszą się o wiele mniejszym zainteresowaniem niż studia humanistyczne. Jednym z pomysłów, aby uatrakcyjnić kształcenie techniczne, są stypendia dla najlepszych studentów. Ministerstwo uważa, że uzasadnione byłyby stypendia (powyżej 1 tysiąca złotych) dla studentów osiągających doskonale wyniki od drugiego semestru lub drugiego roku studiów. Oprócz tego na dofinansowanie mogą liczyć uczelnie, które przedstawią najlepsze pomysły na promocję studiów ścisłych i technicznych. W tym samym czasie zainaugurowano konkursy na projekty związane z doksztalaniem kadr w instytucjach naukowych, tak aby pomóc uczonym nawiązywać współpracę z biznesem (wg informacji MNiSW).

**Więcej osób będzie mogło wziąć udział w programach wymiany studentów, naukowców i nauczycieli**

między Polską i USA w ramach Programu Fulbrighta (Fot. 8). Przedstawiciele wszystkich klubów parlamentarnych zapowiedzieli poparcie dla rządowego projektu ustawy o ratyfikacji umowy między rządami RP i USA na temat współpracy w ramach Polsko-Amerykańskiej Komisji Fulbrighta. Ustawa upoważni prezydenta do ratyfikacji nowej umowy, której skutkiem ma być zwiększenie finansowego wkładu Polaków we współpracę w ramach Polsko-Amerykańskiej Komisji Fulbrighta. Zwiększenie polskiego wkładu do budżetu fundacji pozwoli większej liczbie osób wziąć udział w programach wymiany studentów, naukowców i nauczycieli pomiędzy Polską i USA. Umowa jest zgodna z prawem UE. Program Fulbrighta został opracowany przez amerykańskiego prawnika, profesora akademickiego i polityka, senatora Jamesa Williama Fulbrighta (1905–1995). Uzyskał podstawy prawne w 1946 r. na mocy ustawy zatwierdzonej przez Kongres USA i podpisanej przez prezydenta Harry'ego Trumana. Główne cele Programu to inicjowanie, wspieranie i prowadzenie działalności w zakresie studiów, badań naukowych, szkoleń i innych przedsięwzięć z dziedziny nauki, szkolnictwa wyższego, oświaty, kultury i sztuki, realizowanych przez lub dla obywateli amerykańskich poprzez wizyty i wymiany studentów, stażystów, wykładowców, artystów, dziennikarzy, nauczycieli, naukowców oraz innych osób ze środowisk nauki, kultury i sztuki. Obecnie działania związane z Programem Fulbrighta realizowane są w ponad 150 krajach. Fundusze na Program są zatwierdzane przez Kongres USA. W różnych krajach działa 51 Komisji Fulbrighta, które w imieniu rządu amerykańskiego i rządów miejscowych sprawują bezpośrednią pieczę nad realizacją Programu. W Polsce realizacja Programu Fulbrighta trwa od 1959 r. Od lat dziewięćdziesiątych pieczę nad tym sprawuje Polsko-Amerykańska Komisja Fulbrighta (jej wcześniejsza nazwa to Biuro Amerykańsko-Polskiej Wymiany Naukowej).

**Uproszczenie procedur dla młodych Polaków, chcących kształcić się i pracować w Kanadzie oraz dla kanadyjskiej młodzieży przyjeżdżającej do Polski przewiduje podpisanie 14 lipca umowa między Polską a**

**Kanadą.** Kanadyjsko-polska umowa „o wspieraniu mobilności młodych obywateli” zakłada, że osoby w wieku 18–35 lat będą mogły na rok wyjechać do kraju partnerskiego i uczyć się tam, pracować lub odbywać staże lub szkolenia. Nie będzie do tego potrzebne specjalne pozwolenie na pracę. Umowę podpisały w Warszawie minister nauki i szkolnictwa wyższego Barbara Kudrycka i kanadyjska minister obywatelstwa i imigracji Diane Finley. Dotychczas Kanada podpisała podobne umowy z 40 krajami. Kanadyjczycy mogą podejmować w Polsce studia medyczne, charakteryzujące się wysokim poziomem kształcenia. Umowa ma obowiązywać od nowego roku akademickiego (wg MNiSW).

Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego zawarło z **Fundacją AlphaGalileo** umowę dotyczącą rocznej subskrypcji, która umożliwi wszystkim instytucjom naukowym w Polsce, prowadzącym działalność badawczą, bezpłatny dostęp do serwisu internetowego AlphaGalileo. Serwis ten gromadzi informacje o badaniach i osiągnięciach naukowych pochodzące od ponad 1700 instytucji. Serwis oferuje szybki i rzetelny przekaz informacji o badaniach naukowych, wydarzeniach ze świata nauki, nowych publikacjach we wszystkich językach europejskich. Obejmuje dziedziny nauk technicznych oraz medycynę, sztukę, nauki humanistyczne i społeczne. Z serwisu korzystać mogą zarówno środowiska badawcze, jak i przedstawiciele mediów po uprzednim zarejestrowaniu się. Serwis dostępny jest na stronie [www.alphagalileo.org](http://www.alphagalileo.org). Więcej informacji na stronie Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (wg informacji MNiSW).

Pierwszy w Polsce **mikrofalowy syntezytor peptydów** trafi wkrótce do Katedry Chemii Nieorganicznej Akademii Medycznej w Gdańsku. Dotację na ten cel w wysokości 380 tys. zł przyznało Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Dzięki syntezytorowi proces syntezy chemicznej peptydów można przyspieszyć dziesięciokrotnie, przy jednoczesnym zmniejszeniu zużycia odczynników chemicznych.

27 maja 2008 roku w Bibliotece Collegium Maius odbyła się uroczyność

podpisania **deklaracji woli współpracy w zakresie wspierania rozwoju sektora IT** (Information Technology) w Krakowie oraz w województwie małopolskim pomiędzy Województwem Małopolskim, Gminą Kraków, Akademią Górniczo-Hutniczą, Politechniką Krakowską, Uniwersytetem Jagiellońskim i Cisco Systems. Akt ten tworzy formalne podstawy wspólnych działań w obszarze rozwoju branży nowoczesnych technologii w regionie. W szczególności współpraca będzie dotyczyła wymiany doświadczeń w zakresie transferu wiedzy z uczelni do biznesu, edukacji dla przedsiębiorców oraz zintegrowania działań partnerów. To wszystko pozwoli wykorzystać duży potencjał województwa w zakresie IT, wzmocni innowacyjność regionu oraz konkurencyjność Małopolski na międzynarodowych rynkach. Prezydent Krakowa, prof. Jacek Majchrowski, zaznaczył, że Małopolska jest otwarta na współpracę i dobrze wykorzystuje pojawiające się możliwości rozwoju gospodarczego regionu. Wiceprezydent CISCO, Kaan Terzioglu, w swoim wystąpieniu określił podstawy przyszłej współpracy, które zostaną oparte na działaniach doradczych i szkoleniowo-edukacyjnych Cisco's Internet Business Solutions Group (IBSG), a także na „identyfikacji potencjalnych dziedzin współpracy technologicznej, wspólnych projektach badawczych i badaniach”. Obszarami działań partnerów będą obok rozwoju infrastruktury na rzecz społeczeństwa informacyjnego, szkolenia kadr dla nowoczesnej gospodarki, promocja przedsiębiorczości, rozwój elektronicznych usług publicznych, rozwój innowacji i zaawansowanej technologii, planowanie strategiczne z wykorzystaniem technologii i informatyki do wspierania rozwoju społeczno-gospodarczego.

W lipcu b.r. prof. Roman Kalisz, urzędujący rektor AMG, podpisał umowę pomiędzy Urzędem Marszałkowskim Województwa Pomorskiego, Akademią Medyczną w Gdańsku, Politechniką Gdańską oraz Uniwersytetem Gdańskim powołującą **Bałtyckie Centrum Biotechnologii i Diagnostyki Innowacyjnej (BCBiDI)** jako spółkę prowadzącą działalność badawczo-rozwojową. BCBiDI ubiega się o sfinansowanie

wyposażenia nowoczesnych laboratoriów badawczych w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. Planowaną siedzibą Centrum jest Gdański Park Naukowo-Technologiczny (GPNT), zlokalizowany w Gdańsku przy ulicy Trzy Lipy 3, na terenie dawnych zakładów graficznych. Działalność Centrum będzie obejmowała prowadzenie badań ukierunkowanych na bezpośrednie praktyczne zastosowanie w zakresie diagnostyki molekularnej, analityki farmaceutycznej i technologii postaci leku (wg informacji zamieszczonej na stronie www AMG).

Na początku lipca wykładem prof. Magdaleny Fikus z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN na temat osiągnięć współczesnej biotechnologii już po raz szósty został zainaugurowany coroczny cykl sobotnich „Letnich Spotkań z Nauką”, organizowanych na Pojezierzu Kaszubskim nad Jeziorem Wdzydze koło Kościerzyny przez Instytut Budownictwa Wodnego Polskiej Akademii Nauk w Gdańsku oraz Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie. W tym roku w jego ramach przewidziano 8 popularnonaukowych wykładów z różnych dziedzin, m.in. na temat początków turystyki na polskim wybrzeżu morskim, historii i dnia dzisiejszego Kościoła, roślin leczniczych i ich stosowaniu w zwalczaniu chorób, zalecanych diet i pozyskiwania biopaliw. „Letnie Spotkania z Nauką” odbywają się od 2003 roku w ramach Bałtyckiego Festiwalu Nauki i stanowią przedłużenie popularnonaukowej imprezy w województwie pomorskim.

Nagrodę im. Artura Rojszczaka w 2008 roku zdobyła dr Elżbieta Masiak (Fot. 9), psycholog z Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego i absolwentka Krakowskiej Szkoły Jazzu i Muzyki Rozrywkowej. Dr Masiak zajmuje się muzykoterapią, założyła estradowy muzyczny zespół integracyjny, w którym uczestniczą osoby po leczeniu psychiatrycznym, wolontariusz i terapeuci. Zespół muzykuje, występując nawet publicznie. Liderka uważa, że dopiero wówczas muzyka staje



Fotografia 9. Doktor Elżbieta Masiak.

się sposobem na rehabilitację, a nie jest sposobem na izolację i stygmatyzację chorych. Wyłonienie zwycięzcy tegorocznej edycji nagrody im. Artura Rojszczaka odbyło się w Iławie 31 maja. Nagroda Rojszczaka jest przyznawana młodemu badaczom, którzy cechują się szczególnie humanistyczną postawą, szerokimi horyzontami zainteresowań i umiejętnością wychodzenia poza ramy specjalizacji zawodowej.

Swoje zdolności matematyczne i logiczne weryfikowało w maju na Politechnice Wrocławskiej aż 290 osób. W finale VI Mistrzostw Polski w Grach Matematycznych i Logicznych w grupie studentów zwyciężył Gabriel Listowski (Fot. 10) z Zabrza, natomiast w grupie osób zawodowo zajmujących się matematyką i informatyką wygrał Eryk Kopczyński (Fot. 11) z Warszawy. 25 zwycięzców krajowego konkursu (po 3 osoby z klas III, IV, V i VI szkół podstawowych, gimnazjów i liceów, z grupy studentów i uczniów szkół pomaturalnych oraz spośród osób zawodowo zajmujących się matematyką i informatyką) reprezentowało Polskę na międzynarodowym finale w Paryżu, w końcu sierpnia b.r.

Klinika Psychiatrii Dorosłych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Zakład Neuropsychologii Klinicznej UMK Collegium Medicum w Bydgoszczy, Sekcja Psychofarmakologii Polskiego Towarzystwa Psychiatrycznego oraz Wydawnictwo *Termedia*, wydawca pisma Neuropsychiatria i Neuropsychologia, zapraszają zainteresowanych tematyką integracji tych nauk w ramach tzw.

Neuroscienze do uczestnictwa w konferencji naukowej pt. **Postępy**

**Neuropsychiatrii i Neuropsychologii**, zaplanowanej na 27–28 listopada w Poznaniu. Tematyka konferencji dotyczyć będzie najnowszych dokonań z zakresu neuropsychiatrii i neuropsychologii, w tym etiopatogenezy, diagnostyki i leczenia cho-



Fotografia 10. Gabriel Listowski.



Fotografia 11. Eryk Kopczyński.

rób ośrodkowego układu nerwowego, a wykładowcami będą wybitni przedstawiciele psychiatrii, neurologii, neuropsychologii i neurobiologii, zarówno krajowi, jak i zagraniczni. W sesji „Genetyka molekularna” wykładowcami

będą prof. John Mann (Columbia University, New York) z prezentacją „The impact of genes and childhood adversity on brain biology, function

and adulthood depression”, prof. Joanna Hauser (Poznań) z wykładem „Badania genomu w zaburzeniach psychicznych”, dr hab. med. Filip Rybakowski (Poznań) z prezentacją „Genetyczne i osobowościowe podłoże jądłowstrętu psychicznego”. W Sesji „Neurobiologia” prof. Anna Grabowska (Warszawa) przedstawi wykład „Współczesne poglądy na temat lateralizacji mózgowej”, prof. Leszek Kaczmarek (Warszawa) „Neurobiologiczne mechanizmy plastyczności neuronalnej”, a prof. Jerzy Vetulani z Krakowa „Neurobiologia moralności”. Pracami organizacyjnymi kieruje prof. Janusz Rybakowski.

Symposium „Wyzwania współczesnej biologii komórki roślinnej” zaplanowane na 20–21 września 2009 roku w Łodzi, organizowane jest dla uhonorowania prof. dr hab. Marii J. Olszewskiej, wieloletniego Profesora Uniwersytetu Łódzkiego, Kierownika Katedry Cytologii i Cytochemii Roślin, członka rzeczywistego Polskiej Akademii Nauk, wybitnego nauczyciela akademickiego, naukowca i animatora nauki w Polsce. W programie konferencji zostaną przedstawione przez zaproszonych naukowców, profesorów Jolantę Małuszyńską, Zofię Szwey-

kowską-Kulińską, Andrzeja Legockiego, Andrzeja Jerzmanowskiego i Przemysława Wojtaszka, najważniejsze zagadnienia współczesnej biologii komórki roślinnej: od cytogenetyki, przez biologię i genetykę molekularną, genomikę i biotechnologię, po biologię systemów i syntetyczne organizmy. Organizatorzy planują organizację sesji plakatowej, podczas której możliwość przedstawienia wyników swoich badań dotyczących szeroko rozumianej biologii komórki roślinnej będą mieli młodzi adepci nauki. Organizatorzy nie wykluczają udziału w konferencji gości ze Stanów Zjednoczonych: profesorów Andrzeja W. Vorbrodta i Zenona Stęplewskiego, wybitnych polskich naukowców pracujących na stałe w USA. Organizatorami Sympozjum są Instytut Fizjologii, Cytologii i Cytogenetyki UŁ, Łódzki Oddział PAN i Komitet Biologii Komórki PAN. Adres kontaktowy: prof. dr hab. Andrzej K. Kononowicz, ul. Banacha 121/16, 90-237 Łódź, tel.: (42) 635 44 25 fax: (42) 635 44 23, e-mail: akononow@biol.uni.lodz.pl.

**22 czerwca 2008 r. w wieku 77 lat zmarł w Warszawie wybitny neurofizjolog, pierwszy przewodniczący Komitetu Badań Naukowych, prof. Witold Karczewski.** Prof. Witold Karczewski urodził się 30 sierpnia 1930 r. we Lwowie. Był absolwentem warszawskiej Akademii Medycznej. Tytuł profesora nadzwyczajnego otrzymał w 1971 r., a po ośmiu latach – profesora zwyczajnego. Prof. Karczewski w 1989 r. został członkiem Komitetu Nauki i Postępu Technicznego przy Radzie Ministrów, a w roku 1990 został wybrany na przewodniczącego Komisji Badań Podstawowych Komitetu. W latach 1991–1995 był przewodniczącym powstałego w jego miejsce Komitetu Badań Naukowych – członkiem Rady Ministrów. Pełnił tę funkcję w składzie 4 kolejnych rządów: premierów Jana Krzysztofa Bieleckiego, Jana Olszewskiego, Hanny Suchockiej i Waldemara Pawlaka. Pełnił wiele innych funkcji, m.in. był przewodniczącym Rady Polskiej Fundacji Upowszechniania Nauki, członkiem Komitetu Etyki w Nauce PAN, przez wiele lat pracował w Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicz-

nej PAN, gdzie kierował Zakładem Neurofizjologii. Prof. Karczewski współtworzył w 1980 r. Towarzystwo Popierania i Krzewienia Nauk; po reaktywowaniu Towarzystwa, zawieszono go w stanie wojennym, wybrany został na jego prezesa. W okresie 1982–1989 działał w Tajnym Społecznym Komitecie Nauki, który m.in. w 1985 r. opracował raport „Polska w 5 lat po Sierpniu”; był jego współautorem. Prof. Witold Karczewski przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej (FNP) został wyróżniony Honorowym Odznaczeniem. Sprawując przez dwie kadencje funkcję przewodniczącego KBN w zasadniczy sposób przyczynił się do przekształcenia FNP w niezależną apolityczną instytucję, popierając działania zmierzające do zlikwidowania jej formalnych związków z KBN, istniejących w czasach jej powstawania. Otworzyło to możliwości rozwoju samodzielnej organizacji, koncentrującej się na działaniach odmiennych od tych, które należą do kompetencji państwa. Dzięki dalekowzroczności oraz politycznej determinacji prof. Karczewskiego Fundacja zawdzięcza to, że zdołała przetrwać pierwsze burzliwe lata swojego istnienia (wg PAP, Nauka w Polsce i FNP).

**Rektor Uniwersytetu Warszawskiego prof. Katarzyna Chałasińska-Macukow (Fot. 12)** została wybrana na nowego przewodniczącego Konferencji Rektorów Akademickich Szkół Polskich (KRASP). Wiceprzewodniczącymi zostali prof. Adam Hamol, rektor Politechniki Poznańskiej i prof. Janusz Żmija, rektor Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Nowy zarząd KRASP będzie pełnił swoje obowiązki do 2012 r. W kadencji 2005–2008 zarządowi KRASP przewodniczył prof. Tadeusz Luty, rektor Politechniki Wrocławskiej; wiceprzewodniczącymi byli prof. Tomasz Borecki, rektor Szkoły Głównej Gospodarstwa

Wiejskiego w Warszawie i prof. Karol Musioł, rektor Uniwersytetu Jagiellońskiego. Ustępujący z funkcji prof. Luty, podsumowując kadencję 2005–2008 powiedział, że w jego opinii zostawia KRASP w dobrej kondycji. Wyraził też nadzieję, że

organizacja nadal będzie „lekarstwem na samotność rektora, który decyduje zawsze podejmuje w samotności”. Prof. Katarzyna Chałasińska-Macukow po wyborach stwierdziła, że zamierza kontynuować tę linię działania.

KRASP jest dobrowolnym zrzeszeniem rektorów wyższych uczelni posiadających uprawnienia do nadawania stopnia naukowego doktora. Organizacja została

utworzona 7 czerwca 1997 r. przez rektorów 73 uczelni. Obecnie organizacja zrzesza 146 polskich uczelni. 107 z nich ma status członka KRASP; 4 szkoły wyższe mają status uczelni stowarzyszonej; 35 szkół jest zbiorowo reprezentowanych w KRASP za pośrednictwem wchodzącej w jego skład Konferencji Rektorów Publicznych Szkół Zawodowych. Statutowym celem KRASP jest inspirowanie i koordynowanie współdziałania uczelni członkowskich, a także reprezentowanie wspólnych interesów

uczelni akademickich na zewnątrz. KRASP jest również ciałem opiniodawczym wobec rządu w sprawach dotyczących nauki i szkolnictwa wyższego. W kadencji 2005–2008 organizacja opiniowała 106 aktów legislacyjnych. (wg PAP, Nauka w Polsce).

W maju dwie uczelnie uhonorowały **prof. Ryszarda Tadeusiewicza (Fot. 13)** z Akademii Górniczo-Hutniczej **tytułem doktora honoris causa**. Akademia Pedagogiczna w Krakowie uczyniła to 9 maja, a Politechnika Lubelska 13 maja b.r. Prof. Tadeusiewicz jest absolwentem studiów inżynierskich, ekonomicznych i medycznych. Zaj-



Fotografia 12. Profesor Katarzyna Chałasińska-Macukow, przewodnicząca KRASP.



Fotografia 13. Profesor Ryszard Tadeusiewicz.

muje się biocybernetyką, automatyką i informatyką. Prof. Tadeusiewicz jest twórcą szkoły naukowej w dziedzinie biocybernetyki, automatyki i robotyki, a przede wszystkim informatyki. Pełnił funkcję rektora AGH i przewodniczącego KRPUT. Jest członkiem korespondentem Polskiej Akademii Umiejętności i Polskiej Akademii Nauk oraz członkiem zagranicznym Rosyjskiej Akademii Nauk Przyrodniczych i członkiem tytularnym Europejskiej Akademii Nauki, Sztuki i Literatury. Wcześniej doktoraty honorowe nadały mu Międzynarodowy Uniwersytet ANSTED (z siedzibą w Wielkiej Brytanii), Politechniki Częstochowska i Wrocławska oraz Uniwersytet Techniczny w Iwano-Frankowsku (Ukraina). Ponadto, Narodowy Instytut Górniczy Ukrainy (z siedzibą w Dniepropietrowsku) nadał prof. Tadeusiewiczowi godność honorowego profesora.

**Poznański Uniwersytet Medyczny wręczył 23 czerwca b.r. dyplom doktora honoris causa profesorowi Jerzemu W. Kawiakowi z Warszawy (Fot. 14).** Laureat jest zasłużonym dla polskiej nauki uczonym w zakresie cytofizjologii. Wspiera również rozwój biologii komórki i biologii molekularnej. Tytuł został przyznany w uznaniu nieprzeciętnego wkładu prof. Kawiaka w rozwój nauki w wymiarze międzynarodowym, animację środowiska morfologów i biologów komórkowych. Laureat jest założycielem fundacji wspierającej rozwój polskiej biologii komórki i biologii molekularnej. Przez wiele lat redagował specjalistyczne czasopismo naukowe. Poznańscy naukowcy zwrócili uwagę na dorobek naukowy



Fotografia 14. Profesor Jerzy Kawiak.

prof. Kawiaka obejmujący 113 prac oryginalnych, 23 artykuły przeglądowe i 41 redakcji prac zbiorowych oraz współautorstwa podręczników, skryptów i monografii. **W 2006 roku nadała doktorowi honoris causa profesora Jerzemu W. Kawiakowi godność doktora honoris causa nadana Profesorowi Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie.**

**Prof. Jerzy Hołowiecki (Fot. 15),** wybitny hematolog i transplantolog szpiku kostnego oraz specjalista chorób wewnętrznych, **otrzymał tytuł doktora honoris causa Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM).** Wygłaszając laudację prof.

Wiesław Jędrzejczak z WUM stwierdził, że najważniejszą najprawdopodobniej decyzją jaką podjął prof. Hołowiecki po ukończeniu studiów medycznych w 1961 roku, była decyzja o tym, że poświęci swój talent hematologii. Prof. Hołowiecki zorganizował Klinikę Hematologii i Transplantacji Szpiku Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. Jego prace pozwoliły wpro-

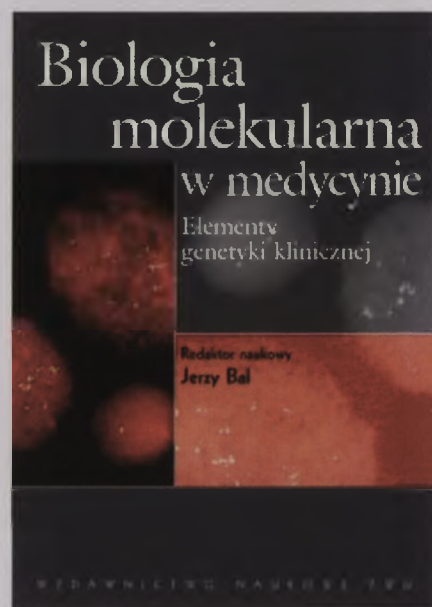
wadzić oryginalne i skuteczne metody leczenia ostrych białaczek. Jako pierwszy w Polsce przeprowadził przeszczep szpiku od dawcy niespokrewnionego, co stworzyło nową szansę dla chorych na nowotwory krwi. Zorganizował też Polską Grupę Białaczkową, która zajmuje się wdrażaniem najnowocześniejszych metod leczenia białaczek. Dzięki



Fotografia 15. Profesor Jerzy Hołowiecki.

niej skuteczność leczenia tych nowotworów w Polsce wzrosła ponad dwukrotnie. W wykładzie wygłoszonym z okazji nadania wyróżnienia prof. Hołowiecki podkreślił, że wielki postęp w zakresie nowych leków nie zahamował rozwoju przeszczepów szpiku. Prof. dr hab. Jerzy Hołowiecki urodził się 8 maja 1937 r. w

Warszawie. Dyplom lekarza zdobył w 1962 r. na Wydziale Lekarskim Śląskiej Akademii Medycznej. Specjalizację z hematologii uzyskał w 1977 r. W 1993 r. został profesorem zwyczajnym. Utworzył i prowadził od 1996 r. Polską Szkołę Hematologii, zorganizował też największy w kraju ośrodek transplantacji szpiku. Zasiada w wielu radach naukowych. Jest autorem ponad 450 publikacji naukowych, w tym oryginalnych programów leczenia białaczek oraz nowych metod transplantacji szpiku. Prof. Hołowiecki interesuje się fotografią, filmem amatorskim, tenisem oraz majsterkowaniem. (wg



Fotografia 16. Okładka podręcznika, którego redaktorem naukowym jest profesor Jerzy Bal.

PAP, Nauka w Polsce)

PWN wydał drugą, poprawioną, edycję książki pod redakcją profesora Jerzego Bala „**Biologia molekularna w medycynie**” (Fot. 16). Podręcznik został uzupełniony o takie zagadnienia, jak genetyczna różnorodność populacji, choroby kompleksowe, leczenie wybranych chorób dziedzicznych. W książce znajduje się wiele przykładów praktycznych zastosowań biologii molekularnej w medycynie, w szczególności w diagnostyce molekularnej i przygotowaniu testów genetycznych. Uwzględniono również najnowocześniejsze osiągnięcia z zakresu cytogenetyki molekularnej.

**Dział pod redakcją**



**Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Lachowicz-Ochędalska**  
**10 listopada 1961 r. – 27 maja 2008 r.**



Po raz pierwszy spotkałem Agnieszkę Lachowicz-Ochędalską w połowie lat dziewięćdziesiątych na Jej stażu podoktorskim w USA. Była szczęśliwa, mogąc rozwijać swoje zainteresowania naukowe w tak idealnych warunkach, jakie stwarzają laboratoria Narodowych Instytutów Zdrowia (NIH) w Bethesda. Wierzyła, że będzie mogła się wiele nauczyć, co przyda się Jej po powrocie do Polski. Był to ważny element Jej myślenia o karierze naukowej, w którym Polska była dla Niej miejscem docelowym, a kształcenie za granicą jedynie epizodem. Staż w USA trwał 3 lata, w czasie których i my, i nasze rodziny często się spotykaliśmy. Agnieszka dzieliła się z nami swoimi radościami z sukcesów i frustracjami w pracy zawodowej, dzieliła też z nami swoją radość z życia rodzinnego. Problemy pracy uczonego zmagającego się z trudnymi projektami badawczymi i warunkami pracy pokonywała z uśmiechem, przede wszystkim dzięki wsparciu swojego męża, dr Tomasza Ochędalskiego, i satysfakcji z rozwoju ukochanej córki. Taką ją zapamiętałem: żywiołową, bezkompromisową, rzetelną, oddaną pracy i rodzinie, a jednocześnie człowieką, na którym można było polegać.

Od powrotu z USA spotykaliśmy się rzadko – Łódź i Warszawa to jeszcze ciągle odległe od siebie miasta, a praca naukowa nie daje wiele wolnego czasu na towarzyskie wizyty. Przy każdym takim spotkaniu, najczęściej na krajowych konferencjach, obiecywaliśmy sobie, że znajdziemy czas na odwiedzenie się, porozmawianie o bieżącej pracy naukowej, o dzieciach i na wspomnianie szczęśliwych

dni w NIH. Nigdy nam się to nie udało. Kilka lat temu Agnieszka zadzwoniła do mnie prosząc o radę w związku z Jej pracą, którą wykonywała dla Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Jak zwykle była pełna entuzjazmu i determinacji, by jak najlepiej pracę wykonać i dotrzymać terminu. Między kolejnymi pytaniami i informacjami co robi rzuciła, "aha i jeszcze jedno, mam nowotwór, ale wierzę, że kuracja będzie skuteczna". Niestety, mimo wykorzystania wszystkich możliwości, nawet najnowocześniejsze kuracje nie uratowały Agnieszki. Odeszła od nas 27 maja 2008 roku.

Agnieszka Lachowicz-Ochędalska urodziła się 10 listopada 1961 roku w Łodzi, gdzie w 1980 roku rozpoczęła studia na Wydziale Lekarskim ówczesnej Akademii Medycznej. Dyplom lekarza medycyny uzyskała w 1986 roku, a następnie pracowała jako asystent w Instytucie Endokrynologii, początkowo w Klinice Endokrynologii, a następnie w Zakładzie Endokrynologii. Równocześnie rozpoczęła specjalizację w zakresie położnictwa i ginekologii, idąc tym samym w ślady swego ojca. To prawdopodobnie praca naukowo-dydaktyczna Jej matki w Zakładzie Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej w Łodzi wpłynęła decydująco na Jej późniejsze zainteresowania pracą naukową z pogranicza biochemii i endokrynologii. W 1990 roku uzyskała tytuł doktora nauk medycznych. Poszerzała swoje umiejętności naukowe i zawodowe uczestnicząc w licznych kursach i szkoleniach w Polsce i za granicą. W 1995 roku uzyskała 3-letnie stypendium Fogarty Fellowship umożliwiające Jej pracę w Laboratorium dr Kevina Catta (Endocrinology and Reproductive Research Branch, NICHD, NIH, Bethesda, MD, USA). Przedmiotem Jej badań były wewnątrzkomórkowe mechanizmy przekazywania charakterystyczne dla receptorów endotelinowych i angiotensynowych w przednim płacie przysadki szczura.

Po powrocie do Kraju skupiła się głównie na badaniach nad udziałem angiotensyny, jej fragmentów i ich inhibitorów w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych. Ostatnio, badała wpływ

tych hormonów i niektórych hormonów steroidowych na wybrane linie komórek nowotworowych. Jej badania nad angiotensynami i ich receptorami zaliczono do prekursorowych, czego dowodem były publikacje w prestiżowych czasopismach międzynarodowych. W 2003 roku za cykl tych prac uzyskała stopień doktora habilitowanego medycyny. Za działalność naukową otrzymała liczne nagrody i wyróżnienia: Nagrodę Zbiorową Ministra Zdrowia (prace stanowiące podstawę przewodu doktorskiego – 1992 r.); Travel Award of American Society of Endocrinology, San Francisco (1996 r.) i Nagrodę Zbiorową Ministra Zdrowia (część prac stanowiących podstawę przewodu habilitacyjnego – 2002 r.).

W 2005 roku, po uzyskaniu stanowiska profesora nadzwyczajnego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, została kierownikiem Zakładu Endokrynologii Porównawczej Katedry Endokrynologii Ogólnej. Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Lachowicz-Ochędalska była sekretarzem Komisji Endokrynologii i Metabolizmu Komitetu Nauk Fizjologicznych Polskiej Akademii Nauk, a w latach 2004-2008 Prodziekanem ds. Kształcenia Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Była członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Polskiego Towarzystwa Neuroendokrynologii; pracowała w Zarządzie Oddziału Łódzkiego Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego. Posiadała niezwykłą łatwość logicznego formułowania myśli i umiejętność wyrażania ich poprawną i piękną polszczyzną. Interesowała się nie tylko bieżącą literaturą fachową, ale znajdowała czas na śledzenie nowości literackich. Mimo ciężkiej choroby cechowała ją radość życia i głęboka życzliwość wobec swoich współpracowników, studentów i pacjentów. Była pełna nowych pomysłów i planów pracy naukowej do ostatnich swoich dni. Mimo krótkiego życia opublikowała 36 prac oryginalnych i 4 prace przeglądowe. Utraciliśmy wspaniałą Koleżankę i Człowieka.

Prof. Jacek Kuźnicki  
 Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

# Rola modyfikacji SUMO w utrzymaniu stabilności genomowej

Ewelina Synowiec

Dominika Książek

Janusz Błasiak

Katarzyna Woźniak<sup>✉</sup>

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

<sup>✉</sup>Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel./faks: (042) 635 47 76, e-mail: woźniak@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 24 stycznia 2008 r.  
Artykuł zaakceptowano 14 kwietnia 2008 r.

**Słowa kluczowe:** SUMO, ciała jądrowe PML, naprawa DNA, sumoilacja białek, p53, Ubc9

**Wykaz skrótów:** BLM (ang. *Bloom's protein*) – helikaza DNA z rodziny RecQ; CPT – kaptoproteaza; DAXX – białko biorące udział w indukcji apoptozy; HR (ang. *homologous recombination*) – rekombinacja homologiczna; HRR (ang. *homologous recombination repair*) – naprawa DNA przez rekombinację homologiczną; MDM2 (ang. *murine double minute 2 homologue*) – białko onkogenne, regulator aktywności p53; PARP (ang. *poly(ADP-ribose) polymerase*) – polimeraza poli(ADP-rybozy); pRb (ang. *retinoblastoma protein*) – białko supresorowe, zidentyfikowane w siatkówczaku; RAD51 – białko biorące udział w rekombinacji homologicznej; SUMO (ang. *small ubiquitin-like modifier*) – białko SUMO, podobne do ubikwityny; TOPO I (ang. *topoisomerase I*) – topoizomeraza I; p53 (ang. *tumor protein 53*) – białko supresorowe transformacji nowotworowej o masie 53 kDa; Ubc9 (ang. *ubiquitin-conjugating enzyme 9*) – enzym (E2) koniugujący w cyklu SUMO; WRN (ang. *Werner's protein*) – helikaza DNA z rodziny RecQ

## STRESZCZENIE

Modyfikacja SUMO (sumoilacja) jest potranslacyjnym przekształcaniem białek, odgrywającą rolę w kształtowaniu organizacji chromatyny, metabolizmie DNA, regulacji transkrypcji i utrzymaniu stabilności genomowej. Mechanizmy tych efektów nie są jeszcze w pełni poznane, a wpływ sumoilacji na stabilność genomową wydaje się szczególnie ważny, gdyż jej zaburzenie może prowadzić do poważnych stanów patologicznych, w tym nowotworów złośliwych. Zasadnicze znaczenie w utrzymaniu stabilności genomowej mają białka cyklu komórkowego i białka naprawy DNA, a sumoilacja może zmieniać ich lokalizację i funkcje. O ile struktura niektórych obiektów subjądrowych, takich jak jąderka, jest stosunkowo dobrze poznana, to o innych, w tym o ciałach jądrowych PML, wiemy jeszcze niewiele, ale wyniki wykonanych ostatnio badań sugerują, że to sumoilacja może odgrywać kluczową rolę w ich architekturze i funkcjonowaniu. Wpływ modyfikacji SUMO na stabilność genomową i strukturę chromatyny może mieć zasadnicze znaczenie dla żywotności komórki, konieczne jest zatem poznanie mechanizmów tych modyfikacji.

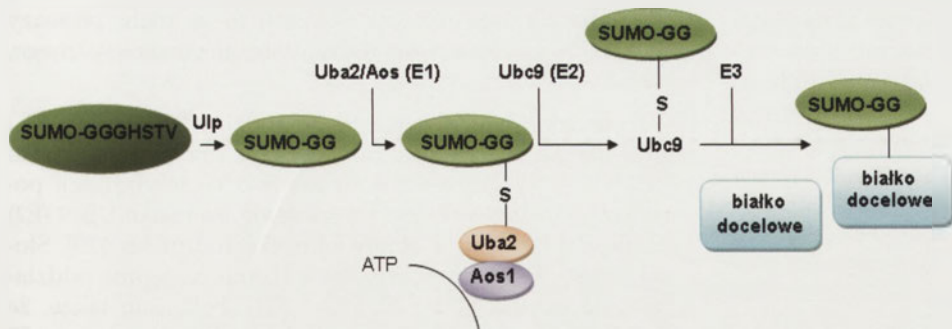
## WPROWADZENIE

Modyfikacja SUMO (sumoilacja, ang. *small ubiquitin-like modification*) jest procesem potranslacyjnego przekształcania białek, odgrywającą rolę w oddziaływaniu pomiędzy białkami i organizacją struktury chromatyny. Jest to proces podobny do ubikwitylacji, czyli modyfikacji białek, polegającej na kowalencyjnym związaniu z nimi małego białka zwanego ubikwityną. Pomimo że ubikwitylacja najczęściej prowadzi do proteosomalnej degradacji białek, sumoilacja modyfikuje białka, które następnie biorą udział w szeregu różnorodnych, ważnych dla komórki procesów, takich jak transport jądrowy, metabolizm DNA, regulacja transkrypcji i stabilność genomowa [1-3]. System modyfikacji SUMO jest ewolucyjnie zachowany u wszystkich eukariontów i w ogólności obejmuje enzym aktywujący E1, enzym koniugujący E2 i/albo ligazę E3 dla koniugacji oraz proteazy SUMO dla desumoilacji. W przeciwieństwie do systemu ubikwitylacji, obejmującym wiele enzymów koniugujących, w modyfikacji SUMO rolę enzymu E2 odgrywa zasadniczo jedno białko, Ubc9. Niewiele jeszcze wiadomo o regulacji systemu SUMO, jednakże ze względu na jego udział w zmianie funkcji szeregu białek istotnych dla podstawowych czynności komórki, poznanie mechanizmów tej regulacji może mieć duże znaczenie dla oceny jej stanu oraz jego modyfikacji, w szczególności przywrócenia prawidłowego fenotypu. Rola modyfikacji SUMO w utrzymaniu stabilności genomowej wydaje się szczególnie ważna, gdyż jej zaburzenia sprzyjają indukcji i promocji stanów patologicznych, w tym nowotworów złośliwych. Zasadnicze znaczenie dla utrzymania stabilności genomowej mają białka cyklu komórkowego oraz białka naprawy DNA, nie raz wypełniające obie te funkcje, i poznanie mechanizmów ich sumoilacji może wnieść wiele do naszej wiedzy o podstawowych procesach biochemicznych.

## CYKL SUMO

Potranslacyjna modyfikacja SUMO polega na przyłączeniu zbudowanego z 97 reszt aminokwasowych białka SUMO do grupy ε-aminowej lizyny białka docelowego. Proces ten przebiega w kilku etapach [1-3] (Ryc. 1).

Na początku prekursor białka SUMO, zbudowany z 101 reszt aminokwasowych, ulega dojrzewaniu, polegającemu na usunięciu jego C-końca przez specyficzne hydrolazy, w wyniku czego odsłonięciu ulegają dwie reszty glicyny, tworzące wiązanie kowalencyjne z grupą ε-aminową lizyny białka docelowego. Następnie białko SUMO jest aktywowane przez enzym E1, będący u drożdży heterodimerem białek Aos1 i Uba2 (SAE1/SAE2 lub Sua1/hUba2 u człowieka). Aktywacja ta jest procesem zależnym od ATP i polega na utworzeniu wiązania tioestrowego pomiędzy SUMO a podjednostką Uba2 enzymu E1. Następnie SUMO ulega przemieszczeniu do zachowanej ewolucyjnie reszty cysteiny w pozycji 93 enzymu koniugującego E2 (Ubc9). Enzym ten katalizuje utworzenie wiązania izopeptydowego między grupą



Rycina 1. Reakcja przyłączania białka SUMO do białka docelowego. „Dojrzewianie” białka SUMO polega na usunięciu C-końca przez specyficzne hydrolazy (Ulp). Następnie białko SUMO jest aktywowane przez enzym E1, będący u drożdży heterodimerem białek Aos1 i Uba2. Aktywacja ta jest procesem zależnym od ATP i polega na utworzeniu wiązania tioestrowego pomiędzy białkiem SUMO a podjednostką Uba2 enzymu E1. Następnie białko SUMO ulega przemieszczeniu do enzymu koniugującego E2, zwanego Ubc9. Enzym ten katalizuje utworzenie wiązania izopeptydowego między grupą karboksylową na C-końcu białka SUMO i grupą ε-aminową lizyny w białku docelowym [1-3].

karboksylową na C-końcu SUMO i grupą ε-aminową lizyny w białku docelowym. W większości przypadków sumoilacji ulega lizyna występująca w sekwencji: ΨKXE, gdzie Ψ oznacza aminokwas hydrofobowy a X – dowolny aminokwas [4]. Efektywność reakcji przeprowadzanej przez Ubc9 wzrasta w obecności białek zwanych ligazami SUMO, bądź enzymami E3. Wyróżnia się trzy typy ligaz SUMO. Pierwszy typ obejmuje u ssaków co najmniej 5 białek należących do rodziny białek PIAS – PIAS1, PIAS3, PIAS $\alpha$ , PIAS $\beta$  i PIAS $\gamma$ . W drożdżach zidentyfikowano dwa enzymy E3: Siz1 i Siz2, wykazujące podobieństwo sekwencyjne do białek PIAS ssaków. Drugi typ ligaz SUMO to białka podobne do RanBP2, które jest częścią jądrowego kompleksu porowego. Trzeci typ tych enzymów stanowią białka Pc2 należące do rodziny białek *Polycomb*.

Odwroćenie procesu modyfikacji SUMO, desumoilację, przeprowadzają specyficzne proteazy cysteinowe SUSP lub SENP [1-3]. W genomie ssaków zidentyfikowano siedem potencjalnych białek SUSP. Białka te, o wielkości od około 200 do 1200 aminokwasów, zawierają zachowaną ewolucyjnie C-końcową domenę katalityczną o sekwencji HDC. Pięć spośród nich: SENP1, SENP2, SENP3 (SMTSIP1), SENP6 (SUSP1) i SUSP4, funkcjonuje jako proteazy SUMO.

Cykl SUMO może być regulowany na dwa sposoby [5]. Pierwszy obejmuje oddziaływanie innych modyfikacji posttranslacyjnych białka docelowego. Na przykład, fosforylacja może być zarówno pozytywnym, jak i negatywnym sygnałem dla sumoilacji. Fosforylacja seryny w pozycji 20 p53 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA, znacząco redukuje sumoilację tego białka [6]. Z drugiej strony, fosforylacja seryny w pozycji 303 czynnika szoku termicznego HSF1, jest niezbędna dla jego sumoilacji w pozycji 298 [7]. Inne modyfikacje potranslacyjne, takie jak ubikwitylacja czy acetylacja tych samych reszt lizyny co modyfikacja SUMO, są procesami dla niej konkurencyjnymi [5]. Drugi sposób regulacji cyklu SUMO może odbywać się poprzez zmianę aktywności enzymów biorących w nim udział. W ten sposób białka wirusowe hamują sumoilację białek, takich jak PML, Sp100 i pRB [5]. Na przykład, białko Gam1 adenowirusa CELO może degradować enzym E1 cyklu SUMO, redukując sumoilację wielu białek komórek gospodarza [8,9]. Ponieważ sumoilacja na ogół hamuje ekspresję genów, takie działanie

Gam1 zwiększa aktywność transkrypcyjną komórek gospodarza, a tym samym przyczynia się do propagacji wirusa CELO.

Enzymy przeprowadzające cykl SUMO mogą być także regulowane przez czynniki stresu termicznego, osmotycznego i oksydacyjnego [5]. Choć stres komórkowy w ogólności pobudza sumoilację białek, to jednak stres oksydacyjny może działać dwukierunkowo albowiem nadtlenek wodoru stymulował sumoilację jedynie w wysokich stężeniach, podczas gdy w stężeniach niższych hamował ten proces, inaktywując enzymy E1 i E2 [10]. Inaktywacja ta była odwracalna i była spowodowana powstawaniem mostków disiarczkowych

między cysteinami centrów aktywnych tych enzymów. Z kolei izopeptydazy przeprowadzające desumoilację nie są inaktywowane przez nadtlenek wodoru. Tak więc enzymy cyklu SUMO można zaliczyć do nielicznej grupy efektorów H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a reaktywne formy tlenu do czynników regulujących reakcje sumoilacji i desumoilacji.

## BIAŁKA SUMO

Białka SUMO występują w postaci czterech paralogów: SUMO-1, -2, -3 i -4. SUMO-1 (SMT3C) człowieka jest identyczne sekwencyjnie w 46% z białkami SUMO-2 (SMT3CA) i SUMO-3 (SMT3B). Białka SUMO-2 i SUMO-3 wykazują 96% homologii, stąd często określa się je jedną nazwą SUMO-2/3. W 2004 roku został zidentyfikowany czwarty paralog białka SUMO, SUMO-4, występujący głównie w nerkach [11]. Wcześniej uznawano, że paralog ten kodowany jest przez pseudogen [12]. Wykazuje ono 86% homologię sekwencji z białkiem SUMO-2. W komórkach ssaków SUMO-1 występuje przede wszystkim w formie związanej z innymi białkami, których liczbę ocenia się na ponad 100, natomiast białko SUMO-2/3 występuje głównie w postaci niezwiązanej. Znanych jest zaledwie kilka białek, które ulegają sumoilacji za pośrednictwem SUMO-2/3 [13]. W przeciwieństwie do SUMO-1, SUMO-2/3 przyłącza się do białek docelowych w postaci polimeru.

## UDZIAŁ MODYFIKACJI SUMO W REGULACJI AKTYWNOŚCI p53

Gen supresorowy p53 koduje czynnik transkrypcyjny, regulujący ekspresję wielu genów w odpowiedzi na różne sygnały, które zaburzą homeostazę komórkową. Locus tego genu znajduje się w krótszym ramieniu chromosomu 17 (17p13). Produktem jego ekspresji jest białko p53 – fosfoproteina o masie cząsteczkowej 53 kDa. Utrata prawidłowej funkcji tego białka jest wynikiem mutacji lub też wynika z połączenia z białkiem MDM2. p53 reguluje wzrost, różnicowanie, starzenie komórkowe, apoptozę i integralność genomu, poprzez udział w regulacji replikacji DNA, naprawy uszkodzeń DNA i cyklu komórkowego [14]. Pod wpływem

stresu genotoksycznego p53 ulega różnorodnym modyfikacjom, takim jak fosforylacja, acetylacja czy sumoilaacja, które prowadzą do zwiększenia jego poziomu i aktywności. Charakter i zakres tych modyfikacji zależy od rodzaju uszkodzenia DNA, jak również od tkanki, w której do niego dochodzi. Poziom p53 w jądrze komórkowym ulega podwyższeniu pod wpływem stresu, czego konsekwencją jest zatrzymanie cyklu komórkowego i rozpoczęcie naprawy DNA. W przypadku gdy uszkodzenia okazują się zbyt poważne i systemy naprawcze komórki nie są w stanie ich usunąć, uruchomiony zostaje proces apoptozy. p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym dla co najmniej 30 różnych genów, których produkty hamują cykl komórkowy, biorą udział w procesach naprawy DNA i apoptozie. Oczywiście jest zatem, że produkt genu tak istotny dla prawidłowego funkcjonowania komórki musi podlegać precyzyjnej kontroli.

Naturalnym regulatorem funkcji białka p53 jest białko MDM2 [15]. W prawidłowej komórce p53 jest obecne w niewielkich ilościach, głównie dlatego, że ulega szybkiemu rozpadowi przez ubikwitynacyjny system degradacji białek. Jednym z najważniejszych składników ubikwitylacji p53, jest białko MDM2, które ma aktywność ligazy ubikwityny. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA następuje aktywacja p53, która związana jest z fosforylacją seryny w pozycji 15. Fosforylacja seryny 20 i 37 powoduje uwolnienie p53 z kompleksu p53-MDM2, utworzenie jego funkcjonalnej formy i aktywację transkrypcji genów naprawy DNA lub apoptozy.

Niedawno opisano nowy mechanizm regulacji p53 oparty na sumoilaacji i desumoilaacji MDM2 (Ryc. 2) [16,17]. Sumoilaacja białka MDM2 ogranicza jego autoubikwitylację, a tym samym wpływa na utrzymanie niskiego poziomu p53. W warunkach stresu wywołanego promieniowaniem UV następuje desumoilaacja MDM2, a w konsekwencji – jego wzmożona autoubikwitylacja i degradacja w proteasomie 26S. Skutkiem tego jest stabilizacja p53 i pobudzenie procesów komórkowych zależnych od tego białka. Zidentyfikowano nowy enzym powodujący desumoilaację MDM2 – proteazę SUSP4, indukowaną promieniowaniem UV. Inne

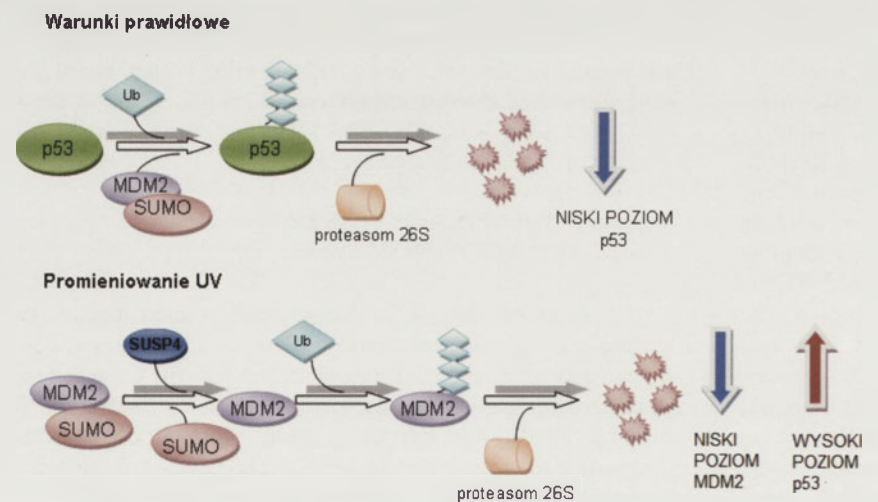
czynniki uszkodzające DNA, w tym inhibitory TOPO I, nie indukują tego enzymu. Sugeruje to, że różne proteazy SUMO, w zależności od rodzaju stresu genotoksycznego, mogą wpływać na poziom p53.

Wszystkie białka należące do rodziny p53 (p53, p63 i p73) ulegają modyfikacji SUMO przez przyłączenie białka SUMO-1 [18]. Pierwsze doniesienia o tej modyfikacji pochodzą z badań, w których wykazano, że białko Ubc9 (E2) człowieka łączy się z p53 w komórkach drożdży [19]. Stosując test dwuhybrydowy, stwierdzono następnie oddziaływanie między p53 a SUMO-1 [20]. Pokazano także, że oddziaływanie to stymuluje aktywność transkrypcyjną p53 [21]. SUMO-1 przyłącza się do p53 w domenie C-końcowej w pozycji K386, odpowiedzialnej za wiązanie z DNA [22]. Stwierdzono również, że mutanty p53 K386R, u których stwierdzono defekt przyłączania SUMO-1, mają zaburzoną aktywność apoptotyczną. Trzy białka zaliczane do ligaz SUMO (E3) – PIAS1, PIASxβ i PIASy oddziałują z białkiem p53 [23-25]. Ponadto stwierdzono, że PIAS1 i PIASxβ hamowały aktywność transkrypcyjną p53, a PIAS1 aktywowało transkrypcję zależną od p53, a także stymulowało zależne od tego białka zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1, niezależnie od funkcji tych ligaz w procesie sumoilaacji [24, 25]. Trzecie białko z rodziny PIAS – PIASy hamuje aktywność transkrypcyjną p53, lecz nie wpływa na jego zdolność do indukowania apoptozy [26]. Lizyna w pozycji 386 p53 jest miejscem przyłączania nie tylko białka SUMO-1, lecz także SUMO-2/3 [13]. Polisumoilaację p53 przez SUMO-2/3 obserwowano w odpowiedzi na stres oksydacyjny. W komórkach z nadekspresją SUMO-2/3 obserwowano ponadto wzrost aktywności transkrypcyjnej p53, który prowadził do przedwczesnego starzenia komórek. Fenotyp przedwczesnego starzenia w komórkach z nadekspresją SUMO-2/3 związany jest nie tylko ze szlakiem p21/p53, ale także ze szlakiem p16/pRB [13].

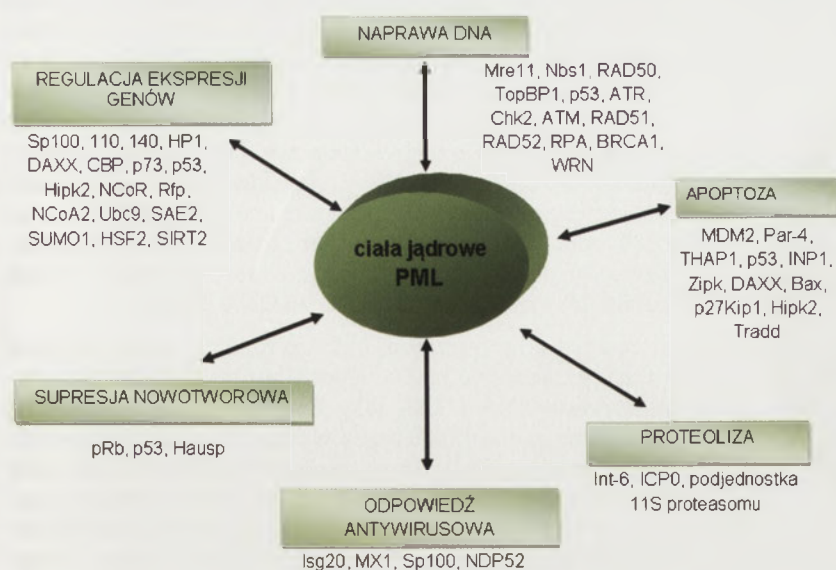
## ROLA MODYFIKACJI SUMO W POWSTAWANIU CIAŁ JĄDROWYCH PML

Białko PML (ang. *Promyelocytic Leukemia*) to składnik wielobiałkowego kompleksu zwanego ciałem jądrowym PML (PML-NBs, ang. *Promyelocytic Leukemia-nuclear bodies*). PML-NBs zwane są również ciałkami Kremera lub domenami jądrowymi 10 (ND10). Gen *PML* o długości około 53 kbp znajduje się w chromosomie 15 i zawiera 9 eksonów. Gen ten może uczestniczyć w translokacji chromosomalnej t(15;17), której efektem jest fuzja *PML* z genem receptora α kwasu retinowego *RARα* z chromosomu 17. Ekspresja genu fuzyjnego *PML-RARα* prowadzi do ostrej białaczki promielocytowej (APL, ang. *Acute Promyelocytic Leukemia*) [27]. Z tego względu ciała PML-NBs zwane są także domenami onkogennymi PML-PODs.

Poza PML, które jest niezbędne do tworzenia ciał jądrowych PML-NBs, w ich skład wchodzi kilkadziesiąt różnych białek.



Rycina 2. Regulacja stabilności p53 poprzez sumoilaację MDM2. W warunkach prawidłowych sumoilaacja białka MDM2 ogranicza jego autoubikwitylację, a tym samym wpływa na utrzymanie niskiego poziomu p53. W warunkach stresu wywołanego promieniowaniem UV następuje desumoilaacja MDM2 przy udziale proteazy SUSP4, a w konsekwencji - jego wzmożona autoubikwitylacja i degradacja w proteasomie 26S. Skutkiem tego jest stabilizacja p53 i pobudzenie procesów komórkowych zależnych od tego białka [16,17].



Rycina 3. Procesy komórkowe, w których biorą udział białka ciał jądrowych PML [29].

łek, wśród nich: DAXX, Sp100, ISG20, CBP, MDM2, BLM, p53 i pRB [28,29]. Niektóre z nich, np. p53, pRB czy DAXX, bezpośrednio oddziałują z PML. Ciała jądrowe PML spełniają w komórce różnorodne funkcje: biorą udział w regulacji ekspresji genów, apoptozie, naprawie DNA, starzeniu komórkowym, supresji nowotworów, proteolizie i odpowiedzi przeciwwirusowej (Ryc. 3) [29].

Warunkiem koniecznym do właściwego tworzenia ciał jądrowych PML jest modyfikacja białka PML przez SUMO-1 [30]. PML tworzy kowalencyjne wiązanie z SUMO-1 poprzez lizyny w pozycjach: 65, 160 i 490 [31]. Mutanty, u których nie

zachodzi proces sumoilacji PML nie są zdolne do prawidłowego tworzenia tych struktur jądrowych. Ponieważ białko PML odgrywa kluczową rolę w tworzeniu i stabilności PML-NBs, to w konsekwencji wpływa także na właściwości wielu białek tego kompleksu. Sumoilacja PML może hamować apoptozę, ponieważ przeciwdziała odłączaniu się proapoptotycznego białka DAXX od kompleksu PLM-NBs, a specyficzna dla SUMO proteaza SENP1 może działać przeciwnie [32]. Wyniki wcześniejszych badań przeprowadzonych na mutantach *UBC9* komórek raka piersi MCF-7 również sugerowały udział modyfikacji SUMO w indukcji apoptozy [33]. Jak pokazuje rycina 4, białko Ubc9 oddziałuje z białkiem DAXX, które bierze udział w szlaku przemian prowadzących do apoptozy niezależnej od kaspaz. Szlak ten ulega aktywacji wskutek wzbudzenia receptora Fas, a następnie przebiega z udziałem kinaz proapoptotycznych Ask1 i c-Jun, których aktywacja jest wynikiem oddziaływania białka DAXX z domeną śmierci receptora Fas w cytoplazmie. Komórki ze zmutowanym genem

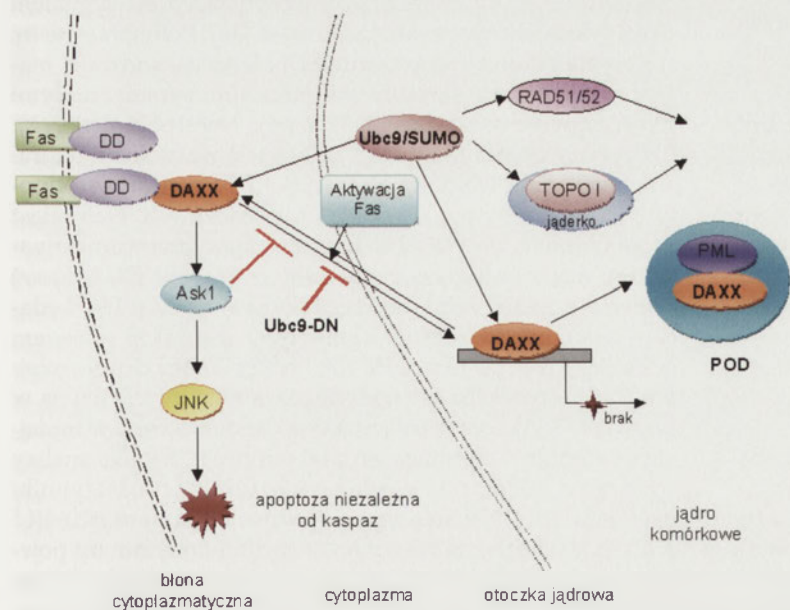
*UBC9* akumulują większe ilości cytoplazmatycznego białka DAXX niż komórki prawidłowe. Ponieważ białko DAXX uczestniczy w apoptozie, sugeruje to, że oddziaływanie Ubc9 z DAXX i zmiana lokalizacji wewnątrzkomórkowej tego białka może podwyższać podatność na apoptozę.

#### MODYFIKACJA SUMO BIAŁEK NAPRAWY DNA

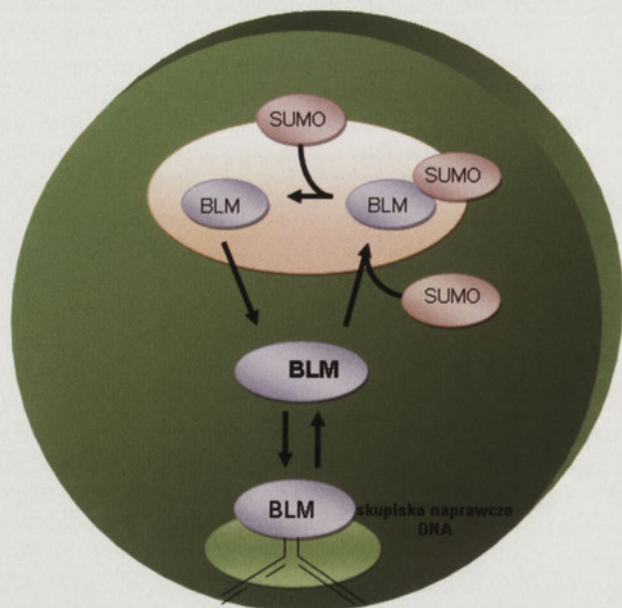
Ciała jądrowe PML gromadzą wiele białek biorących udział w naprawie DNA [29]. W odpowiedzi komórki na działanie substancji genotoksycznych białka naprawcze przemieszczają się do miejsca uszkodzenia DNA, gdzie „wykonują swoje zadanie”, a następnie „wędrują” do innego uszkodzonego miejsca w DNA. Wyniki wielu doświadczeń sugerują, że cykliczna sumoilacja i desumoilacja białek naprawy DNA, jest procesem umożliwiającym zmianę ich lokalizacji w jądrze komórkowym [29,34,35]. Zmiana ta jest konieczna dla efektywnej naprawy DNA.

Jednym z białek naprawy DNA ulegającym modyfikacji SUMO jest helikaza BLM, należąca do rodziny helikaz RecQ. Jest to enzym, który bierze udział w HR i HRR. Mutacja w genie *BLM* znajdującym się w 15q26.1, jest przyczyną zespołu Blooma (BS), rzadkiej choroby genetycznej dziedziczonej w sposób autosomalny recesywny, charakteryzującej się zwiększoną częstością wymiany siostrzanych chromatyd.

BLM gromadzi się w ciałach jądrowych PML, osiągając najwyższy poziom w późnej fazie S cyklu komórkowego [36]. W strukturach tych białko to występuje w formie niezmodyfikowanej (Ryc. 5) [34]. BLM opuszcza ciała PML wtedy, gdy w DNA pojawiają się takie struktury przestrzenne, jak struktury Holidaya czy pętle D, które mogą doprowadzić do HR podczas replikacji DNA. Delokali-



Rycina 4. Schemat przedstawiający rolę Ubc9 w odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA. Opis w tekście. DD (ang. death domain) – domena śmierci; Ask1 (ang. apoptosis signal-regulating kinase 1) – kinaza 1 regulująca apoptozę; JNK (ang. c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) – kinaza czynnika c-Jun; POD (ang. promyelocytic leukemia oncogenic domain) – domeny onkogenne białka PML (ciała jądrowe PML); RAD51/52 – białka biorące udział w HR; Ubc9-DN (ang. dominant-negative Ubc9) – zmutowane białko Ubc9 [33].



Rycina 5. Schemat przedstawiający udział modyfikacji SUMO w zmianach lokalizacji helikazy BLM. Opis w tekście [34].

zacja BLM występuje także wtedy, gdy na komórkę działają czynniki uszkodzające DNA lub powodujące zatrzymanie widełek replikacyjnych indukujące w N-końcowym fragmencie białka zmiany strukturalne, uniemożliwiające jego sumoilację. Wówczas BLM „rekrutuje” do miejsca uszkodzenia DNA inne białka i uczestniczy w naprawie DNA, samo ulega modyfikacji SUMO i wnika do ciała PML, gdzie szybko ulega desumoilacji. BLM w formie niezmodyfikowanej może wziąć udział w kolejnej rundzie naprawy DNA. Sumoilacja helikazy BLM może obejmować lizyny w pozycjach: 317, 331, 334 i 347 [34]. Mutanty BLM, K317R i K331R, które nie mogą ulegać modyfikacji SUMO, nie mogą być także efektywnie gromadzone w ciałach PML. Lokalizacja BLM w strukturach PML jest konieczna dla współdziałania tego białka z innymi białkami biorącymi udział w naprawie DNA, w tym z RAD51, RPA czy p53 [29].

Inne białko z rodziny helikaz RecQ – WRN może być także substratem dla białka SUMO [35]. Autosomalna recesywna mutacja w genie WRN jest przyczyną rzadkiej choroby dziedzicznej, zwanej zespołem Wernera, czasem określanej jako progeria dorosłych. Stres genotoksyczny indukuje proces sumoilacji helikazy WRN, umożliwiając tym samym jej migrację z jąderka i oddziaływanie z białkami RAD51 i RAD52 w procesie HR, naprawie DNA, utrzymaniu długości telomerów czy odtworzeniu struktury zatrzymanych widełek replikacyjnych [37].

Białko RAD51 jest najważniejszym białkiem w procesie HR u ssaków. Wiąże się z jednoniciowym DNA powstającym na końcach podwójnego pęknięcia, łącząc się z wolną grupą 3'OH i rozpoznaje homologiczną sekwencję, po czym promuje inwazję na ten fragment z wytworzeniem pętli D. W wymianie nici, oprócz RAD51, biorą udział białka: RPA, RAD52, paralogi RAD51: RAD51B, RAD51C, XRCC2 i XRCC3, a także białka: RAD54, RAD54B, BRCA1 i BRCA2 [38].

Proces sumoilacji odgrywa ważną rolę w naprawie pęknięć DNA przez HR, jak również w samej rekombinacji mejo-

tycznej. RAD51 i RAD52 – kluczowe białka eukariotycznego szlaku naprawy DNA przez HR, biorące udział w początkowym etapie tego procesu, bezpośrednio oddziałują z Ubc9 i SUMO-1 [39,40]. Ponadto, SUMO-1 może niekwalencyjnie łączyć się z RAD51, zmniejszając w ten sposób oporność komórek nowotworowych poprzez hamowanie naprawy pęknięć dwuniciowych DNA na drodze HR [41]. Obniżenie poziomu Ubc9 powoduje przerwanie migracji RAD51 do jądra komórkowego, a tym samym zahamowanie jego gromadzenia w skupiskach naprawczych, które powstają wskutek działania czynnika uszkodzającego DNA [37,42].

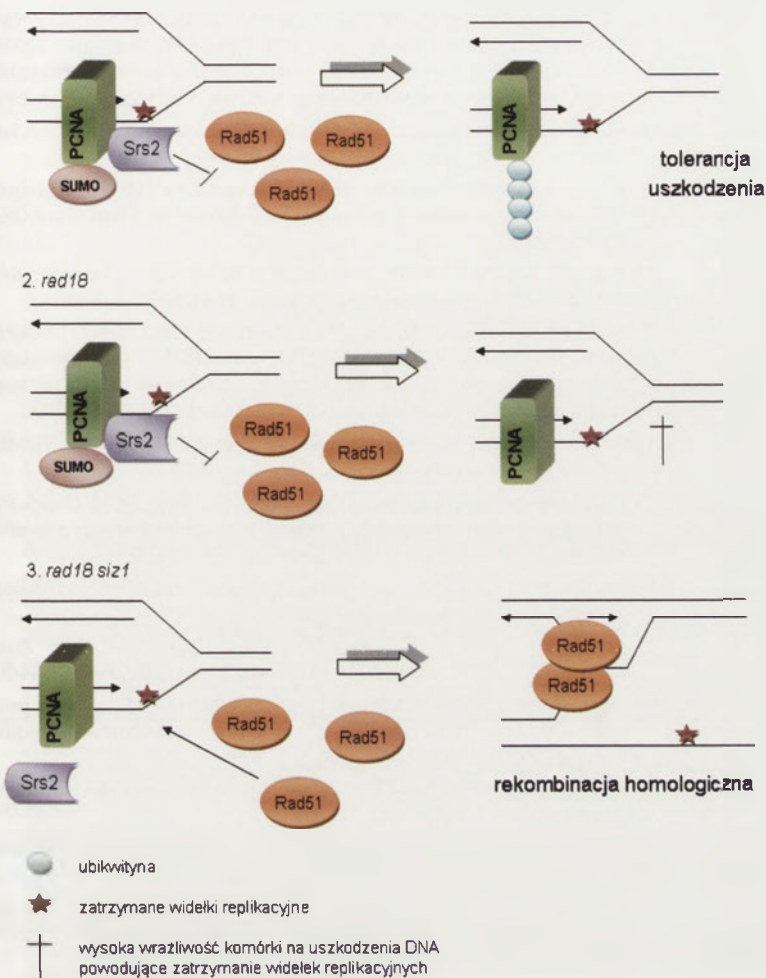
Białkiem naprawczym, którego funkcja jest regulowana przez przyłączenie białka SUMO, jest także glikozylaza tymidynowa DNA (TDG) [43]. Enzym ten odgrywa ważną rolę w naprawie DNA przez wycinanie zasad azotowych, która uruchamiana jest w odpowiedzi komórki na wiele uszkodzeń DNA. TDG usuwa tyminę i uracyl z błędnie sparowanych par zasad G-T i G-U. Przyłączenie białka SUMO powoduje zmiany konformacyjne w glikozylazie, które wpływają na jej aktywność, a modyfikacja SUMO obniża powinowactwo TDG do DNA, umożliwiając jej oddysocjowanie i przyłączenie kolejnego enzymu w szlaku naprawy DNA przez wycinanie zasad [43].

## ROLA MODYFIKACJI SUMO W REPLIKACJI DNA

PCNA (ang. *Proliferating Cell Nuclear Antygen*), białko o masie cząsteczkowej 36 kDa, ma kluczowe znaczenie dla replikacji DNA, gdyż podwyższa procesywność polimeraz DNA  $\delta$  i  $\epsilon$ . Bierze również udział w rekrutacji innych białek kontroli cyklu komórkowego oraz naprawy DNA [44,45].

Uszkodzenia DNA mogą powodować blokowanie polimeraz DNA  $\delta$  i  $\epsilon$ , które mogą kopiować wyłącznie nieuszkodzoną matrycę DNA. Jeżeli w matrycy występuje uszkodzenie do PCNA przyłącza się ubikwityna, co jest sygnałem do przyłączenia się polimeraz klasy Y [46]. Polimerazy te ( $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ ) mają zdolność kopiowania DNA na uszkodzonej matrycy, stąd zwane są także polimerazami syntetyzującymi DNA poprzez uszkodzenie (TLS, ang. *translesion synthesis*). U drożdży poliubikwitylacja PCNA jest warunkiem naprawy bezbłędnej DNA (ang. *error-free DNA repair*) w odpowiedzi na zatrzymanie widełek replikacyjnych. Natomiast monoubikwitylacja PCNA skutkuje zapoczątkowaniem naprawy wprowadzającej błędy (ang. *error-prone DNA repair*) poprzez udział polimeraz TLS. Lizyna w pozycji 164, będąca miejscem przyłączenia ubikwityny, jest także miejscem sumoilacji. W cząsteczce PCNA występuje też drugie miejsce akceptorowe dla tej modyfikacji, a mianowicie lizyna w pozycji 127. Akceptor ten jest jednak sumoilowany w mniejszym stopniu i nie ulega on ubikwitylacji. Wyniki analizy mutantów PCNA pod względem wrażliwości na czynniki uszkodzające DNA sugerują, że podwójny mutant (K164R/K127R) jest mniej wrażliwy na te czynniki niż mutant pojedynczy (K164R). Wyniki te sugerują, że sumoilacja PCNA hamuje HR podczas replikacji dzięki bezpośredniemu oddziaływaniu między PCNA a antyrekombinacyjną helikazą Srs2 (Ryc. 6) [47]. Gdy dochodzi do zatrzymania widełek replikacyjnych wskutek uszkodzenia DNA, helikaza Srs2 przyłącza się do PCNA zmodyfikowanego przez SUMO, co zapobiega tworzeniu niezbędnych dla rekombinacji fila-

1. typ dziki



**Rycina 6.** Schemat przedstawiający udział modyfikacji SUMO w hamowaniu HR. 1. W komórkach prawidłowych, gdy dochodzi do zatrzymania widelki replikacyjnych wskutek uszkodzenia DNA, helikaza Srs2 przylączy się do PCNA zmodyfikowanego przez SUMO, co zapobiega tworzeniu niezbędnych dla rekombinacji filamentów białka Rad51. Prowadzi to do wolnej od błędów naprawy DNA. 2. W zmutowanych komórkach drożdży – mutanty *rad18*, w których nie następuje poliubikwitylacja PCNA, obserwuje się wysoką wrażliwość na czynniki blokujące widelki replikacyjne. 3. W mutantach *rad18 siz1*, w których dodatkowo nie następuje sumoilacja PCNA, dochodzi do HR [47].

mentów białka RAD51. Ostatecznie takie działanie helikazy Srs2 umożliwia komórce wolną od błędów naprawę DNA. W zmutowanych komórkach drożdży – mutanty *rad18*, w których nie następuje poliubikwitylacja PCNA, obserwuje się wysoką wrażliwość na czynniki blokujące widelki replikacyjne. W mutantach *rad18 siz1*, w których dodatkowo nie następuje sumoilacja PCNA dochodzi do HR [47]. Ponieważ w odróżnieniu od ubikwitylacji, sumoilacja PCNA zachodzi także w nieuszkodzonych komórkach w fazie S, modyfikacja ta może brać udział w replikacji DNA i przeciwdziałać HR podczas tego procesu [47,48].

### MODYFIKACJA SUMO A NOWOTWORY

Modyfikacja SUMO i jej udział w indukcji apoptozy może być jednym z ważnych mechanizmów leżących u podstaw wielu chorób, a tym samym odpowiedzi na stosowane w nich terapie. Dotyczy to także chorób nowotworowych. We wspomnianych już badaniach nad mutantami Ubc9 komórek raka

piersi MCF-7 stwierdzono, że komórki te są bardziej wrażliwe na inhibitor TOPO I – topotekan (Hycamtin) [33]. Związek ten jest pochodną naturalnego alkaloidu stosowanego w leczeniu nowotworów – kamptotecyny (CPT). Wewnątrzkomórkowym miejscem działania CPT i jej pochodnych jest kompleks rozszczepialny, jaki tworzy TOPO I z DNA. Kompleks, który powstaje po działaniu CPT – TOPO I:DNA:CPT jest trwały i uniemożliwia przeprowadzenie przez enzym religacji DNA. Stanowi on także przeszkodę przestrzenną dla polimerazy DNA, z którą kolizja prowadzi do rozpadu widełek replikacyjnych i pęknięć DNA. Komórki nowotworowe są selektywnie uśmiercane przez CPT i jej pochodne. Jest to możliwe, ponieważ w komórkach tych brakuje proteazy specyficznej względem TOPO I, która stymuluje aktywność enzymu w komórkach prawidłowych [49]. Rola eukariotycznej TOPO I nie ogranicza się wyłącznie do usuwania naprężeń powstających w DNA podczas replikacji i transkrypcji. Jest ona ponadto kinazą odpowiedzialną za fosforylację białek uczestniczących w obróbce mRNA, specyficzną endorybonukleazą, rekombinazą, a także czynnikiem zdolnym do hamowania i stymulowania transkrypcji [50].

W odpowiedzi na CPT, TOPO I jest szybko i intensywnie modyfikowana przez białko SUMO-1 [51]. Ponadto, modyfikacja ta wzmacnia tworzenie się kompleksu rozszczepialnego i indukcję apoptozy przez CPT. Wyniki badań przeprowadzonych na mutantach K117 i K153 (miejsca sumoilacji TOPO I) sugerują mniej efektywne tworzenie kompleksu rozszczepialnego w porównaniu z komórkami typu dzikiego. Nie ma to jednak wpływu na aktywność katalityczną TOPO I. Ponadto wykazano, że enzym ten jest modyfikowany przez SUMO-1 niezależnie od CPT, przez inaktywującą mutację w miejscu Y723 [52]. Przypuszcza się, że sumoilacja TOPO I może być mechanizmem stymulującym naprawę DNA. Sugestia ta oparta jest na wynikach badań, w których stwierdzono nadwrażliwość drożdży ze zmutowanym genem *UBC9* na CPT [51]. W odpowiedzi na działanie CPT, TOPO I jest najpierw sumoilowana, a następnie uwalniana z jąderka i gromadzi się w strukturach przypominających ciała jądrowe, które mogą być skupiskami naprawczymi DNA [53]. Z drugiej strony możliwe jest także i to, że po delokalizacji TOPO I jest degradowana, ze względu na obserwowane obniżenie poziomu zarówno zmodyfikowanej, jak i niezmodyfikowanej TOPO I po działaniu CPT [53].

W takiej sytuacji nowe cząsteczki enzymu mogą być przyłączane do DNA. Jednakże degradacja TOPO I związanej w kompleksie rozszczepialnym może powodować usunięcie przeszkody dla białek naprawczych DNA, a więc jest prawdopodobne, że zarówno sumoilacja jak i ubikwitylacja prowadząca do degradacji TOPO I, są niezbędne, by komórka naprawiła uszkodzenia DNA wywołane przez inhibitory tego enzymu.

Wyniki badań, w których stwierdzono nadwrażliwość mutantów *UBC9* na topotekan oraz inne leki przeciwnowotworowe, w tym VM-26 (inhibitor topoisomazy II) i cisplatinę

[53], sugerują, że białko to może być dobrym celem dla terapii przeciwnowotworowej. Ubc9 jest kluczowym białkiem w cyklu SUMO, gdyż jest to jedyny enzym koniugujący, a więc sumoilacja może być zahamowana przez jego eliminację. Ponadto, jest to białko, które bezpośrednio oddziałuje z ważnymi białkami naprawy DNA, w tym RAD51 [40]. Pomimo że samo nie jest czynnikiem transkrypcyjnym, białko Ubc9 reguluje ekspresję wielu genów zarówno zależnie jak i niezależnie od cyklu SUMO [54-57]. Z drugiej strony, wiele onkogenów i supresorów procesu nowotworzenia, w tym MDM2, c-Myb, pRb, KAI1 czy p53 ulega modyfikacji SUMO [58]. Sumoilowane są także receptory – androgenowy [59] i estrogenowy [55], które biorą udział w rozwoju raków prostaty i piersi.

O roli procesu sumoilacji w rozwoju i progresji nowotworów mogą świadczyć wyniki doświadczeń, w których stwierdzono zmianę ekspresji genów kodujących enzymy cyklu SUMO w nowotworach człowieka. Nadekspresję UBC9 stwierdzono w raku jajnika, prostaty i gruczolakoraku płuc. Z kolei SENP1, specyficzna dla SUMO proteaza, ma co najmniej dwukrotnie wyższy poziom w gruczolaku tarczycy i raku prostaty. Inny enzym cyklu SUMO, ligaza PIAS3, charakteryzuje się podwyższoną ekspresją w raku piersi, prostaty, płuc, mózgu i jelita grubego [60].

## PODSUMOWANIE

Pierwszym, opisanym w 1996 r. białkiem zmodyfikowanym przez SUMO było niewielkie białko RanGAP, biorące udział w transporcie jądrowym [61]. Od tego czasu zidentyfikowano ponad 100 białek będących substratami sumoilacji. Wiele z nich to białka odgrywające ważne role w utrzymaniu integralności genomu poprzez udział w procesach naprawy DNA, rekombinacji i kontroli cyklu komórkowego. Modyfikacje SUMO mogą zmieniać właściwości białek, wpływając na ich lokalizację, konformację, stabilność i aktywność enzymatyczną. Jednakże w wielu przypadkach mechanizm tego procesu i jego skutki biologiczne są słabo poznane, a ich badanie jest trudne metodologicznie. Zaburzenia w cyklicznych procesach sumoilacji i desumoilacji białek kontrolujących integralność i stabilność DNA mogą zakłócać homeostazę komórkową i prowadzić do groźnych chorób, w tym nowotworów złośliwych, dlatego badanie znaczenia modyfikacji SUMO dla aktywności białek odgrywających ważną rolę w transformacji nowotworowej może dostarczyć wielu cennych informacji dotyczących procesu nowotworzenia i otworzyć nowe możliwości poszukiwań terapeutycznych. Enzymy cyklu SUMO są zatem kandydatami jako potencjalne wyznaczniki (markery) molekularne nowotworów oraz cele terapii.

## PIŚMIENNICTWO

- Gill G (2004) SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes & Dev* 18: 2046-2059
- Hilgarth RS, Murphy LA, Skaggs HS, Wilkerson DC, Xing H, Sarge KD (2004) Regulation and function of SUMO modification. *J Biol Chem* 279: 53899-53902
- Hay RT (2005) SUMO: A history of modification. *Mol Cell* 18: 1-12
- Rodriguez MS, Dargemont C, Hay RT (2001) SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* 276: 12654-12659
- Bossis G, Melchior F (2006) SUMO: regulating the regulator. *Cell Div* 1: 1-8

- Lin JY, Ohshima T, Shimotohno K (2004) Association of Ubc9, an E2 ligase for SUMO conjugation, with p53 is regulated by phosphorylation of p53. *FEBS Lett* 573: 15-18
- Hietakangas V, Ahlskog JK, Jakobsson AM, Hellesuo M, Sahlberg NM, Holmberg CI, Mikhailov A, Palvimo JJ, Pirkkala L, Sistonen L (2003) Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol* 23: 2953-2968
- Boggio R, Colombo R, Hay RT, Draetta GF, Chiocca S (2004) A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Mol Cell* 16: 549-561
- Boggio R, Passafaro A, Chiocca S (2007) Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation. *J Biol Chem* 282: 15376-15382
- Bossis G, Melchior F (2006) Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Mol Cell* 21: 349-357
- Bohren KM, Nadkarni V, Song JH, Gabbay KH, Owerbach D (2004) A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (*SUMO-4*) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* 279: 27233-27238
- Su H, Li S (2002) Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene* 296: 65-73
- Li T, Santocytte R, Shen R-F, Tekle E, Wang G, Yang DCH, Chock PB (2006) Expression of SUMO-2/3 induced senescence through p53- and pRB-mediated pathways. *J Biol Chem* 281: 36221-36227
- Ljungman M (2000) Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia* 2: 208-225
- Szemraj J, Rozpończyk E, Bartkowiak J, Greger J, Oszejka K (2005) Znaczenie białka MDM2 w cyklu komórkowym. *Postepy Biochem* 51: 44-51
- Lee MH, Lee SW, Lee EJ, Choi SJ, Chung SS (2006) SUMO-specific protease SUSP4 positively regulates p53 by promoting Mdm2 self-ubiquitination. *Nat Cell Biol* 8: 1424-1431
- Kim KI, Baek SH (2006) SUMOylation code in cancer development and metastasis. *Mol Cells* 22: 247-253
- Watson IR, Irwin MS (2006) Ubiquitin and ubiquitin-like modifications of the p53 family. *Neoplasia* 8: 655-666
- Shen Z, Pardington-Purtymun PE, Comeaux JC, Moyzis RK, Chen DJ (1996) Associations of UBE2L with RAD52, UBL1, p53, and RAD51 proteins in a yeast two-hybrid system. *Genomics* 36: 271-279
- Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, Sandy P, Schwarz SE, Scheffner M, Del Sal G (1999) Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J* 18: 6462-6471
- Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Midgley CA, Lane DP, Hay RT (1999) SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J* 18: 6455-6461
- Müller S, Berger M, Lehembre F, Seeler J-S, Haupt Y, Dejean A (2000) c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 275: 13321-13329
- Kahyo T, Nishida T, Yasuda H (2001) Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell* 8: 713-718
- Schmidt D, Müller S (2002) Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2872-2877
- Megidish T, Xu JH, Xu CW (2002) Activation of p53 by protein inhibitor of activated Stat1 (PIAS1). *J Biol Chem* 277: 8255-8259
- Nelson V, Davis GE, Maxwell SA (2001) A putative protein inhibitor of activated STAT (PIASy) interacts with p53 and inhibits p53-mediated transactivation but not apoptosis. *Apoptosis* 6: 221-234
- Altabel M, Garcia M, Lavau C, Bae SC, Dejean A, Samarut J (1996) A retrovirus carrying the promyelocyte-retinoic acid receptor PML-RAR alpha fusion gene transforms haematopoietic progenitors in vitro and induces acute leukaemias. *EMBO J* 15: 2707-2716
- Hodges M, Tissot C, Howe K, Grimwade D, Freemont PS (1998) Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am J Hum Genet* 63: 297-304
- Dellaire G, Bazett-Jones DP (2004) PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* 26: 963-977



30. Zhong S, Müller S, Ronchetti S, Freemont PS, Dejean A, Pandolfi PP (2000) Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95: 2748-2753
31. Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Wada H, Fukuda-Kamitani T, Yeh ET (1998) Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem* 273: 675-682
32. Meinecke I, Cinski A, Baier A, Peters MA, Dankbar B, Wille A, Drynda A, Mendoza H, Gay RE, Hay RT, Ink B, Gay S, Pap T (2007) Modification of nuclear PLM protein by SUMO-1 regulates Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 5073-5078
33. Mo Y-Y, Yu Y, Ee PLR, Beck WT (2004) Overexpression of a dominant-negative mutant Ubc9 is associated with increased sensitivity to anticancer drugs. *Cancer Res* 64: 2793-2798
34. Eladad S, Ye TZ, Hu P, Leversha M, Beresten S, Matunis MJ, Ellis NA (2005) Intra-nuclear trafficking of the BLM helicase to DNA damage-induced foci is regulated by SUMO modification. *Hum Mol Genet* 14: 1351-1365
35. Woods YL, Xirodimas DP, Prescott AR, Sparks A, Lane DP, Saville MK (2004) p14 Arf promotes small ubiquitin-like modifier conjugation of Werner's helicase. *J Biol Chem* 279: 50157-50166
36. Bischof O, Kim S-H, Irving J, Beresten S, Ellis NA, Campisi J (2001) Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *J Cell Biol* 153: 367-380
37. Moschos SJ, Mo YY (2006) Role of SUMO/Ubc9 in DNA damage repair and tumorigenesis. *J Mol Hist* 37: 309-319
38. Popławski T, Błasiak J (2006) Naprawa DNA przez rekombinację homologiczną w komórkach ssaków. *Postepy Biochem* 52: 180-193
39. Shen Z, Pardington-Purtymun PE, Comeaux JC, Moyzis RK, Chen DJ (1996) Associations of UBE2L with RAD52, UBL1, p53, and RAD51 proteins in a yeast two-hybrid system. *Genomics* 36: 271-279
40. Kovalenko OV, Plug AW, Haaf T, Gonda DK, Ashley T, Ward DC, Radding CM, Golub EI (1996) Mammalian ubiquitin enzyme Ubc9 interacts with Rad51 recombination protein and localizes in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2958-2963
41. Li W, Hesabi B, Babbo A, Pacione C, Liu J, Chen DJ, Nickolff JA, Shen Z (2000) Regulation of double-strand break-induced mammalian homologous recombination by UBL1, a RAD51-interacting protein. *Nucleic Acids Res* 28: 1145-1153
42. Saitoh H, Pizzi MD, Wang J (2002) Perturbation of SUMOylation enzyme Ubc9 by distinct domain within nucleoporin Ran-BP2/Nup358. *J Biol Chem* 277: 4755-4763
43. Hardeland U, Steinacher R, Jiricny J, Schar P (2002) Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *EMBO J* 21: 1456-1464
44. Warbrick E (2000) The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays* 22: 997-1006
45. Maga G, Hubscher U (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 116: 3051-3060
46. Czechowska A, Błasiak J (2005) Eukariotyczne polimerazy DNA. *Postepy Biochem* 51, 130-139
47. Ulrich HD, Vogel S, Davies AA (2005) SUMO keeps a check on recombination during DNA replication. *Cell Cycle* 4: 1699-1702
48. Matunis MJ (2002) On the road to repair: PCNA encounters SUMO and ubiquitin modifications. *Mol Cell* 10: 421-422
49. Chen H-J, Hwong Ch-L, Wang Ch-H, Hwang J (2000) Degradation of DNA topoisomerase I by a novel trypsin-like serine protease in proliferating human T lymphocytes. *J Biol Chem* 275: 13109-13117
50. Derlacz R (2001) Informacja genetyczna pod kontrolą – rola eukariotycznej topozomeryazy I. *Postepy Biochem* 47: 243-252
51. Mo Y, Sun M, Desai SD, Liu LF (2000) SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: a possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4046-4051
52. Horie K, Tomida A, Sugimoto Y, Yasugi T, Yoshikawa H, Taketani Y, Tsuruo T (2002) SUMO-1 conjugation to intact DNA topoisomerase I amplifies cleavable complex formation induced by camptothecin. *Oncogene* 21: 7913-7922
53. Mo Y-Y, Yu Y, Shen Z, Beck WT (2002) Nucleolar delocalization of human topoisomerase I in response to topotecan correlates with sumoylation of the protein. *J Biol Chem* 277: 2958-2964
54. Kurtzman AL, Schechter N (2001) Ubc9 interacts with a nuclear localization signal and mediates nuclear localization of the paired-like homeobox protein Vsx-1 independent of SUMO-1 modification. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5602-5607
55. Sents S, Le Romancer M, Bianchin C, Rostan M-C, Corbo L (2005) Sumoylation of the estrogen receptor  $\alpha$  hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 19: 2671-2684
56. Lu Z, Wu H, Mo Y-Y (2006) Regulation of *bcl-2* expression by Ubc9. *Exp Cell Res* 312: 1865-1875
57. Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Badra FA, Papavassiliou AG (2008) SUMO and estrogen receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 107: 195-210
58. Baek SH (2006) A novel link between SUMO modification and cancer metastasis. *Cell Cycle* 5: 1492-1495
59. Poukka H, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ (2000) Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14145-14150
60. Wang L, Banerjee S (2004) Differential PIAS3 expression in human malignancy. *Oncol Reports* 11: 1319-1324
61. Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135: 1457-1470

## Role of SUMO modification in the maintenance of genome stability

Ewelina Synowiec, Dominika Ksiazek, Janusz Błasiak, Katarzyna Wozniak 

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

e-mail: wozniak@biol.uni.lodz.pl

**Key words:** SUMO protein, sumoylation of proteins, Ubc9, p53, PML nuclear bodies, DNA repair

### ABSTRACT

SUMO modification (SUMOylation) is a posttranslational modification playing an important role in chromatin structure, DNA metabolism, transcriptional regulation and genomic stability. Molecular mechanisms underlying such effects of SUMO-modified proteins are largely obscure, but the influence of SUMOylation on genomic stability seems to be of particular importance since its disturbances may lead to serious pathological states, including cancer. Cell cycle control and DNA repair proteins essential for preserving genomic stability and SUMO modification may change their localization and function. We have relatively much information on some subnuclear components, like nucleolus, while little is known on some others, like PML bodies, but the results of some recent research suggest, that this is SUMOylation, which plays a key role in their architecture and functioning. The influence of SUMO modifications on genomic stability and chromatin structure may be fundamental for the cell's viability, therefore the mechanisms of SUMOylation are worth studying.

# Regulacja transkrypcji genów przez długołańcuchowe kwasy tłuszczowe

Magdalena Jazurek

Paweł Dobrzyń

Agnieszka Dobrzyń

Pracownia Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Warszawa

Pracownia Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (022) 5892 261, e-mail: a.dobrzyn@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 17 czerwca 2008 r.  
Artykuł zaakceptowano 14 lipca 2008 r.

**Słowa kluczowe:** kwasy tłuszczowe, ekspresja genów, receptory jądrowe, czynniki transkrypcyjne, rafty lipidowe, lipidy

**Wkaz skrótów:** ACC – karboksylaza acylo-CoA; AMPK – kinaza białkowa zależna od AMP; ChREBP – białko wiążące sekwencję odpowiedzi na cukry; DHA – kwas dokozaheksaenowy; EPA – kwas eikozapentaenowy; FAS – syntaza kwasów tłuszczowych; GLUT4 – białko transportujące glukozę 4; HNF-4 $\alpha$  – hepatocytowy czynnik jądrowy 4 $\alpha$ ; LXR – wątrobowy receptor X; NF $\kappa$ B – jądrowy czynnik  $\kappa$ B; PPAR – receptory aktywowane przez czynniki proliferacji peroksyosomów; PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe; RAR – receptor kwasu retinowego; RXR – receptor kwasu retinowego X; SCD1 – desaturaza stearoil-CoA1; SCAP – białko aktywujące cięcie SREBP; SREBP – białko wiążące sterolowy element regulatorowy

**Podziękowanie:** Praca powstała w trakcie realizacji projektów finansowanych przez MNiSW nr N301 0129 33 oraz EMBO nr 1643

## STRESZCZENIE

Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe to nie tylko bogate źródło energii i składników budulcowych, ale także aktywne biologicznie związki biorące udział w regulacji takich procesów jak: proliferacja i różnicowanie komórek, acylacja i sortowanie białek, procesy zapalne, aktywacja enzymów i receptorów błonowych oraz regulacja wewnątrzkomórkowego metabolizmu. Jednym z głównych mechanizmów, poprzez które kwasy tłuszczowe wpływają na tak wiele różnych procesów biologicznych jest regulacja transkrypcji genów. W zależności od liczby wiązań podwójnych oraz długości łańcucha węglowego, kwasy tłuszczowe mogą hamować lub aktywować ekspresję określonych genów poprzez: (1) bezpośrednią regulację aktywności receptorów jądrowych takich jak PPAR, LXR, i HNF-4 $\alpha$ , oraz czynników transkrypcyjnych takich jak SREBP, ChREBP i NF $\kappa$ B; (2) w sposób pośredni, poprzez zmianę fizyko-chemicznych właściwości błon biologicznych i aktywację szlaków przekazywania sygnałów komórkowych. W obecnej pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy dotyczącej mechanizmów regulacji ekspresji genów przez długołańcuchowe kwasy tłuszczowe oraz przedyskutowano ich rolę w patogenezie chorób metabolicznych.

## WPROWADZENIE

Jeszcze do niedawna uważano, że kwasy tłuszczowe pełnią wyłącznie funkcję materiału energetycznego, gromadzonego w postaci triacylogliceroli w tkance tłuszczowej, oraz elementów budujących błony komórkowe [1]. Tymczasem badania przeprowadzone w ciągu ostatnich dziesięciu lat wykazały, że kwasy tłuszczowe to także bardzo aktywne biologicznie związki, pełniące kluczową rolę w regulacji takich procesów jak: acylacja i sortowanie białek, aktywacja enzymów i receptorów błonowych, proliferacja i różnicowanie komórek, oraz tworzenie odpowiedzi immunologicznej [2]. Jednym z głównych mechanizmów, poprzez które kwasy tłuszczowe wpływają na tak wiele różnych procesów biologicznych jest regulacja transkrypcji genów.

Ze względu na liczbę podwójnych wiązań w łańcuchu węglowym, kwasy tłuszczowe dzieli się na: nasycone kwasy tłuszczowe, jednonienasycone kwasy tłuszczowe oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA, ang. *polyunsaturated fatty acids*). Wśród PUFA wyróżnia się kwasy n-3 i n-6 (zwane też omega-3 i omega-6, odpowiednio), różniące się numerem węgla, przy którym występuje pierwsze podwójne wiązanie. Wewnątrzkomórkowe kwasy tłuszczowe mogą pochodzić z trzech głównych źródeł: z diety, lipolizy zmagazynowanych w tkance tłuszczowej triacylogliceroli lub z syntezy *de novo* [1]. Niezależnie od źródła pochodzenia, w komórce kwasy tłuszczowe są przekształcane w acylo-CoA [3], a następnie wykorzystywane do syntezy lipidów złożonych takich jak triacyloglicerole, fosfolipidy, sfingolipidy, eikosanoidy (prostaglandyny, leukotrieny i tromboksany) [4], lub utleniane w procesie  $\beta$ -oksydacji (w mitochondriach i peroksyosomach) lub  $\omega$ -oksydacji (w mikrosomach) [1]. Wolne kwasy tłuszczowe pełnią funkcję związków sygnałowych i regulują aktywność czynników transkrypcyjnych. Liczne badania wykazały, że efekt ich działania, polegający na hamowaniu lub aktywacji ekspresji określonych genów, jest uzależniony głównie od liczby podwójnych wiązań oraz długości łańcucha węglowego [5]. Stąd, wszelkie zaburzenia w procesie utylizacji, elongacji lub/i desaturacji kwasów tłuszczowych, jak również nieprawidłowa dieta (nadmiar lub niedobór podstawowych kwasów tłuszczowych), prowadzą do poważnych zaburzeń funkcjonowania komórki i są częstą przyczyną takich chorób jak insulinooporność, cukrzyca typu 2, lipotoksyczna choroba serca, zaburzenia pracy nerek itd. [4].

W obecnej pracy przedyskutowaliśmy najnowsze dane dotyczące roli kwasów tłuszczowych w regulacji transkrypcji genów oraz przedstawiliśmy współczesną wiedzę na temat mechanizmów ich działania.

## KWASY TŁUSZCZOWE JAKO REGULATORY EKSPRESJI GENÓW

Pierwsze doniesienia na temat potencjalnej roli kwasów tłuszczowych w regulacji ekspresji genów pojawiły się w połowie lat 60-tych. Wtedy to Allman i Gibson [6] po raz pierwszy zaobserwowali, że myszy karmione kwasem linolowym charakteryzuje znacznie obniżona lipogeneza i zmniejszona aktywność syntazy kwasów tłuszczowych (FAS, ang. *fatty acid synthase*), enzymu jabłczanowego i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu w wątrobie. Podobny spadek aktywności lipogennej, będący efektem podania kwasu linolowego, stwierdzono w wątrobie szczurów typu dzikiego [7] oraz szczurów z genetycznie warunkowaną otyłością (*fa/fa*) [8].

Kolejne badania wykazały, że kwasy tłuszczowe mogą w sposób bezpośredni hamować proces transkrypcji wielu genów związanych z lipogenezą oraz aktywować ekspresję genów zaangażowanych w oksydację lipidów (Tabela 1). Wykazano, że PUFA hamują ekspresję genów kodujących desaturazę stearylo-CoA 1 (SCD1, ang. *stearoyl-CoA desaturase 1*), karboksylazę acylo-CoA (ACC; ang. *acetyl-CoA carboxylase*), FAS, kinazę pirogronianową typu L, desaturazy  $\Delta 5$  i  $\Delta 6$ , dehydrogenazę glukozy-6-fosforanową i białko transportujące glukozę 4 (GLUT4, ang. *glucose transporter 4*) [9]. Poza tym, wykazano, że kwasy tłuszczowe regulują także ekspresję genów związanych z glukoneogenezą, glikolizą, termogenezą, oraz metabolizmem cholesterolu i lipoprotein (Tabela 1). Badania wykazały, że większość tych genów kontrolowana jest przez PUFA [9].

Supresja genu kodującego FAS w tkance tłuszczowej szczurów wydaje się być tkankowo-specyficzna. Dieta bo-

gata w PUFA wywołuje tego typu odpowiedź w trzewnej, ale nie w podskórnej tkance tłuszczowej [10], co ma prawdopodobnie związek z tkankowo-specyficznym metabolizmem kwasów tłuszczowych. Ponadto zaobserwowano, że ekspresja genów w tej tkance jest regulowana głównie przez n-3 PUFA. Wyjątkiem od tej reguły jest gen kodujący SCD1, w regulacji którego biorą także udział n-6 PUFA. Badania Sesslera i wsp. [11] pokazały, że traktowanie adipocytów 3T3-L1 kwasem arachidonowym, linolowym i eikozapentaenowym (EPA, ang. *eicosapentaenoic acid*) prowadzi do zmniejszenia poziomu mRNA SCD1 w sposób zależny od dawki poprzez zmiany w stabilności mRNA. Co ciekawe, odmiennie niż w wątrobie, represja genów lipogennej tkanki tłuszczowej zależna od PUFA, wymaga produkcji eikosanoidów [5]. Badania wykazały, że arachidonian jest w stanie obniżyć poziom mRNA genów kodujących FAS i białko S14 w adipocytach 3T3. Natomiast zablokowanie w tych komórkach szlaku cyklooksygenazy znosi hamujący wpływ tego kwasu [12].

Liczne badania opisują również wpływ PUFA na ekspresję genów kodujących leptynę i rezystynę, hormony wydzielane przez tkankę tłuszczową. Raclot i wsp. [10] wykazali, że szczury karmione n-3 PUFA mają zmniejszony poziom mRNA leptyny w trzewnej ale nie podskórnej tkance tłuszczowej, niezależnie od poziomu insuliny w osoczu. Natomiast badania Reseland i wsp. [13], polegające na traktowaniu hodowli ludzkich trofoblastów (BeWo) kwasami EPA i dokozaheksaenowym (DHA, ang. *docosahexaenoic acid*), wykazały zmniejszoną transkrypcję transfekowanego promotora ludzkiej leptyny.

Ze względu na to, że kwasy tłuszczowe są kluczowymi regulatorami różnicowania adipocytów, są one niezwykle silnymi aktywatorami

genów warunkujących adipogenezę. Ponadto, w przeciwieństwie do represji, w aktywacji tych genów biorą udział zarówno nasycone jak i nienasycone kwasy tłuszczowe [1]. Ponadto gen kodujący karboksylkinazę fosfoenolopirogronianową, która w tkance tłuszczowej jest odpowiedzialna za dostarczanie glicerofosforanów do syntezy triacylogliceroli, jest również aktywowany w odpowiedzi na PUFA [14].

W wątrobie, w odpowiedzi na PUFA, dochodzi do ekspresji genów kodujących apolipoproteinę AII, syntazę acylo-CoA, oksydazę acylo-CoA, białko wiążące kwasy tłuszczowe, acylotransferazę karnitynową 1, cytochrom P450 A1 (Tabela 1) [9]. Ponadto ekspresja genów kodujących acylotransferazę

Tabela 1. Wpływ długocząsteczkowych kwasów tłuszczowych na ekspresję wybranych genów.

Aktywacja	Supresja
<b>Transport i metabolizm kwasów tłuszczowych</b> białka wiążące kwasy tłuszczowe syntaza acylo-CoA transporter kwasów tłuszczowych CD36	<b>Lipogeneza</b> desaturaza stearylo-CoA 1 syntaza kwasów tłuszczowych karboksylaza acylo-CoA białko S14
<b>Beta i omega oksydacja kwasów tłuszczowych oraz ketogeneza</b> acylotransferaza karnitynowa 1 oksydaza acylo-CoA cytochrom P450 A1 hydrataza enoilo-CoA tiolaza ketoacylo-CoA	liaza ATP cytrynianowa białko wiążące sterolowy element regulatorowy 1c desaturazy $\Delta 5$ i $\Delta 6$ enzym jabłczanowy
<b>Metabolizm cholesterolu</b> 7 $\alpha$ hydroksylaza reduktaza hydroksymetyloglutarylo-CoA	<b>Glikoliza</b> kinaza pirogronianowa typu L
<b>Termogeneza</b> białka rozprzęgające fosforylację oksydacyjną	<b>Glukoneogeneza</b> glukozy-6-fosfataza
<b>Metabolizm lipoprotein</b> lipaza lipoproteinowa, apolipoproteina AII	<b>Procesy zapalne</b> czynnik martwicy nowotworów $\alpha$ interleukina 1 $\beta$
<b>Inne</b> karboksylkinaza fosfoenolopirogronianowa	apolipoproteina AI apolipoproteina CIII  leptyna rezystyna transferyna transporter glukozy 4

Wymieniono białka kodowane przez regulowane geny [1,3,5,9].

palmitynową 1 i białko wiążące kwasy tłuszczowe, w wątrobie, jest kontrolowana również przez nasycone kwasy tłuszczowe [1]. Co ciekawe regulację ekspresji tych dwóch genów przez kwasy tłuszczowe stwierdzono także w innych tkankach tj. w jelicie cienkim oraz w linii INS1 komórek  $\beta$ -trzustki [5].

## MECHANIZM REGULACJI EKSPRESJI GENÓW PRZEZ KWASY TŁUSZCZOWE

Badania ostatniej dekady znacznie poszerzyły wiedzę na temat potencjalnego mechanizmu regulacji ekspresji genów przez kwasy tłuszczowe. Przełomowym odkryciem było sklonowanie w 1990 roku przez Issemanna i Greena jądrowych receptorów aktywowanych przez czynniki proliferacji peroksyosomów (PPAR, ang. *peroxisome proliferator activated receptor*), których agonistami okazały się kwasy tłuszczowe [15]. Dalsze badania wykazały, że omawiane związki, pełniąc rolę ligandów receptorów jądrowych takich jak PPAR, wątrobowy receptor X (LXR, ang. *liver X receptor*), hepatocytowy czynnik jądrowy 4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ , ang. *hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$* ), receptor kwasu retinowego (RAR, ang. *retinoic acid receptor*) i receptor kwasu retinowego X (RXR, ang. *retinoid X receptor*), regulują ich aktywność. Natomiast, w przypadku takich czynników transkrypcyjnych jak: białko wiążące sterolowy element regulatorowy (SREBP, ang. *sterol regulatory element binding protein*), białko wiążące sekwencję odpowiedzi na cukry (ChREBP, ang. *carbohydrate responsive element binding protein*) i jądrowy czynnik  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B, ang. *nuclear factor  $\kappa$ B*), kwasy tłuszczowe regulują proces translokacji tych czynników do jądra komórkowego. Ponadto kwasy tłuszczowe, będąc substratami enzymów generujących bioaktywne lipidy, wpływają na strukturę mikrodomen błonowych oraz modulują aktywność białek kluczowych w transdukcji sygnałów, przez co pośrednio regulują proces transkrypcji [5].

### PPAR – RECEPTORY AKTYWOWANE PRZEZ CZYNNIKI PROLIFERACJI PEROKSYOSOMÓW

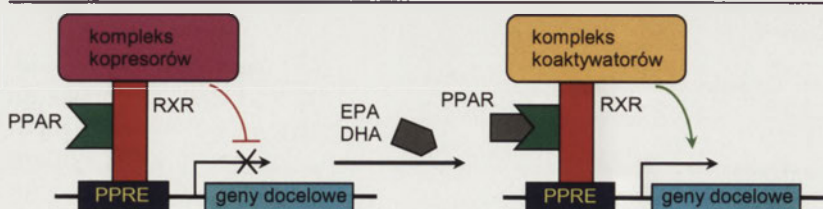
PPAR są najlepiej scharakteryzowanymi receptorami aktywowanymi przez kwasy tłuszczowe i produkty ich przemian metabolicznych [16]. Pełnią one głównie funkcje wskaźników aktualnego stężenia lipidów i zmieniają metabolizm oraz rozwój tkanek w zależności od ich dostępności, a także odgrywają ważną rolę w różnicowaniu komórek, insulinooporności, nowotworzeniu i powstawaniu chorób metabolicznych. PPAR należą do dużej nadrodziny receptorów jądrowych aktywowanych przyłączeniem liganda, do

której zalicza się także LXR, RAR, RXR czy receptory hormonów steroidowych i tyroidowych [17].

Do tej pory wykryto 3 izoformy PPAR: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  i PPAR $\gamma$ , kodowane przez oddzielne geny i pełniące różne funkcje. Charakteryzują się one tkankowo-specyficznym wzorem ekspresji i aktywacją przez różne ligandy [16]. PPAR $\alpha$  jest syntetyzowany w wątrobie, nerkach, mięśniach, sercu i brunatnej tkance tłuszczowej podczas gdy PPAR $\gamma$  występuje głównie w tkance tłuszczowej oraz jelicie, makrofagach i łożysku. Natomiast PPAR $\beta/\delta$  jest izoformą ulegającą syntezie we wszystkich tkankach, z największym nasileniem w jelicie cienkim, mięśniach, mózgu i tkance tłuszczowej [17].

PPAR posiadają typową dla jądrowych receptorów domenową budowę. Można tu wyróżnić silnie konserwatywną domenę wiążącą DNA, która umożliwia wiązanie receptorów z sekwencją nukleotydową odpowiedzi na PPAR w promotorach docelowych genów oraz domenę wiążącą ligand, składającą się z 12  $\alpha$ -helis [18]. PPAR wiążą się z DNA w postaci heterodimeru z RXR [18]. Przy braku połączenia z ligandem heterodimer PPAR-RXR asocjuje z wieloskładnikowym kompleksem korepresorów, w skład którego wchodzi m. in. deacetylaza histonowa, korepresor receptora jądrowego czy mediator wyciszający receptor retinoidowy i tyroidowy, co uniemożliwia rozpoczęcie transkrypcji [19]. Przyłączenie liganda (np. kwas arachidonowy, eikosanoidy, EPA, DHA) indukuje zmiany konformacyjne w obrębie domeny wiążącej ligand, prowadząc do przemieszczenia helisy 12 [18]. Stwarza to miejsce dla wiązania koaktywatorów takich, jak koaktywator receptora steroidowego i białko wiążące PPAR o aktywności acetylotransferazy histonowej, w wyniku czego dochodzi do aktywacji transkrypcji docelowych genów (Ryc. 1) [5].

Badania przeprowadzone na różnych liniach komórkowych (hepatocyty, adipocyty, mioblasty) potwierdziły, że kwasy tłuszczowe o długich łańcuchach, głównie nienasycone, aktywują wszystkie trzy izoformy PPAR. Agonistami PPAR mogą być także metabolity kwasów tłuszczowych takie, jak kwasy o rozgałęzionych łańcuchach czy eikosanoidy [16]. Powinowactwo tych ligandów do receptorów jest jednak różne, co sugeruje rolę tkankowo-specyficznej dostępności i metabolizmu kwasów tłuszczowych [9]. Dodatkowo zauważono, że pochodne kwasów tłuszczowych są bardziej wybiórczymi aktywatorami niż wolne kwasy tłuszczowe. 15-deoksy- $\Delta$ 12,14-prostaglandyna J2, pochodna prostaglandyny D2, jest agonistą PPAR $\gamma$  [17], podczas gdy leukotrien B4 i kwas fitanowy selektywnie aktywują izoformę PPAR $\alpha$  [16], a prostacyklina PPAR $\beta/\delta$  [20]. Kwasy tłuszczowe, jak i produkty ich metabolizmu, są zdolne do fizycznego oddziaływania z PPAR. Badania współzawodniczego wiązania pokazały, że PPAR $\alpha$  i PPAR $\beta/\delta$  oddziałują zarówno z nasyconymi, jak i z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi (wartości stałej hamowania IC<sub>50</sub> wahają się w granicach 1–30  $\mu$ M), natomiast PPAR $\gamma$  charakteryzuje się ograniczonym profilem wiązania i oddziałuje jedynie z PUFA takimi, jak kwas linolenowy czy arachidonowy



Rycina 1. Schemat regulacji ekspresji genów przez kwasy tłuszczowe z udziałem PPAR. W środowisku, w którym brak jest liganda, heterodimer PPAR/RXR wiąże się z kompleksem korepresorów hamując proces transkrypcji. Przyłączenie agonisty, np. kwasu eikozapentaenowego (EPA) lub dokozaheksaenowego (DHA), prowadzi do zmiany konformacji heterodimeru PPAR/RXR, jego interakcji z kompleksem koaktywatorów, a w konsekwencji do aktywacji ekspresji genów docelowych. PPAR – receptory aktywowane przez czynniki proliferacji peroksyosomów; RXR – receptor kwasu retinowego; PPRE – element odpowiedzi na PPAR.

(wartości  $IC_{50}$  wahają się w granicach 1–10  $\mu M$ ) [21]. Co ciekawe wiązanie eikosanoidów zależy od izotypu PPAR. I tak 15-deoksy- $\Delta 12,14$ -prostaglandyna J2 lepiej oddziałuje z PPAR $\gamma$  podczas, gdy kwas 8-S-hydroksyeikozatetraenowy preferencyjnie wiąże PPAR $\alpha$  [16]. Ponadto wykazano, że aktywatorem PPAR $\gamma$  jest skoniugowany kwas linolowy, cieszący się ostatnio dużym zainteresowaniem ze względu na zastosowanie w profilaktyce i leczeniu chorób metabolicznych i nowotworowych [22].

#### HNF-4 $\alpha$ – HEPATOCYTOWY CZYNNIK JĄDROWY 4 $\alpha$

Kolejnym receptorem którego aktywność jest regulowana przez kwasy tłuszczowe jest HNF-4 $\alpha$ . Jest on głównie syntetyzowany w wątrobie, nerkach, jelicie i trzustce. W przeciwieństwie do poprzednio omawianej rodziny receptorów jądrowych, wiąże on docelową sekwencję w postaci homodimeru [9]. Badania przeprowadzone na myszach z warunkową mutacją w genie kodującym HNF-4 $\alpha$ , pokazały, że receptor ten jest niezbędny w regulacji takich procesów jak różnicowanie hepatocytów, metabolizm lipoprotein i cukrów oraz synteza kwasów żółciowych [23]. HNF-4 $\alpha$  kontroluje ekspresję genów kodujących apolipoproteiny (ApoCII, ApoCIII, ApoAII, ApoAIV), enzymy uczestniczące w metabolizmie żelaza (transferyna) i cukrów (kinaza pirogronianowa L, monoooksygenazę cytochromu P450 i enzymy katalizujące syntezę kwasów żółciowych (7 $\alpha$ -hydroksylaza) [23]. Mutacje w HNF-4 $\alpha$  prowadzą do wystąpienia monogenowej formy cukrzycy tzw. MODY1 [24].

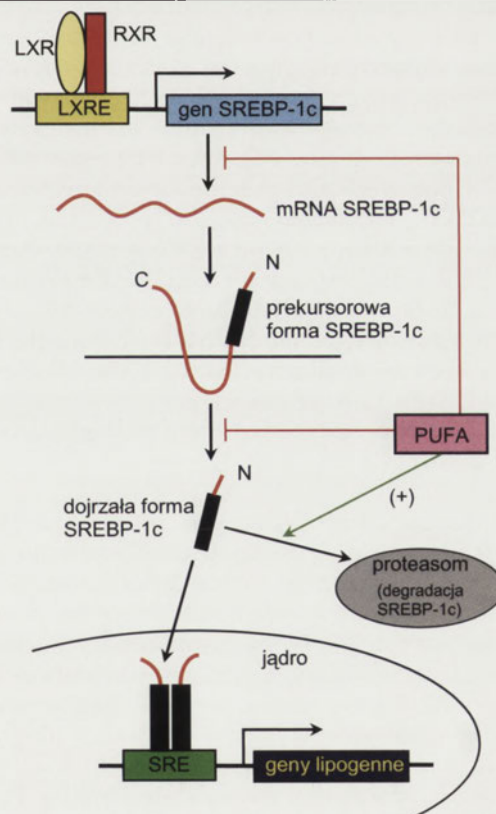
Pierwsze informacje wskazujące, że HNF-4 $\alpha$  regulowany jest przez kwasy tłuszczowe i ich metabolity pochodzą z badań grupy Bar-Tana [20]. Zaobserwowali oni, że palmitoilo-CoA jest w stanie, w stężeniach fizjologicznych, wiązać się bezpośrednio z domeną wiążącą ligand HNF-4 $\alpha$ . Ponadto wykazali, że wiązanie nasyconych kwasów tłuszczowych, palmitoilo-CoA i mirystoilo-CoA, aktywuje HNF-4 $\alpha$ , natomiast wiązanie kwasu  $\alpha$ -linolenowego, EPA czy DHA prowadzi do zahamowania ekspresji genów regulowanych przez ten czynnik transkrypcyjny. Jednakże brak jest danych, które jednoznacznie wykazałyby, że wiązanie acylo-CoA prowadzi do zmian w konformacji domeny wiążącej ligand oraz w oddziaływaniach receptora z koaktywatorami, co poddaje w wątpliwość stwierdzenie, iż acylo-CoA jest funkcjonalnym ligandem dla HNF-4 $\alpha$  [25].

Badania krystalograficzne struktury HNF-4 $\alpha$  wskazują, że naturalnymi ligandami tych receptorów są wolne kwasy tłuszczowe. Dhe-Paganon i wsp. [26] po skryzystalizowaniu domeny regulatorowej HNF-4 $\alpha$  stwierdzili obecność nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych zasocjowanych z kieszenią wiążącą ligand. Kolejne badania pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu aktywacji HNF-4 $\alpha$  z udziałem liganda i koaktywatora [27]. Wydaje się, że wiązanie kwasu tłuszczowego ułatwia powstanie aktywnej formy zamkniętej domeny wiążącej ligand. Jest ona jednak nietrwała i do jej stabilizacji wymagane jest przyłączenie koaktywatora. Innym proponowanym mechanizmem poprzez który kwasy tłuszczowe regulują aktywność HNF-4 $\alpha$  jest fosforylacja tego czynnika przez kinazę białkową A [23].

#### SREBP – BIAŁKA WIĄŻĄCE STEROŁOWY ELEMENT REGULATORYWY

SREBP należą do rodziny czynników transkrypcyjnych posiadających zasadową domenę o budowie helisa-pętla-helisa-suwak leucynowy. Opisano 3 izoformy białek SREBP: SREBP-1a, SREBP-1c i SREBP-2. Dwa pierwsze białka są transkrybowane z jednego genu przy wykorzystaniu alternatywnego promotora, podczas gdy SREBP-2 kodowany jest przez odrębny gen. Regulują one wspólnie ekspresję genów związanych z syntezą kwasów tłuszczowych, cholesterolu i złożonych lipidów [3].

SREBP są syntetyzowane w postaci dużych (125 kDa), prekursorowych białek związanych z błoną siateczki śródplazmatycznej. Z ich końcem C wiąże się białko aktywujące cięcie SREBP (SCAP, ang. *SREBP cleavage-activating protein*). Dodatkowo, ze SCAP oddziałuje białko Insig, które, pełniąc rolę sensora stężenia steroli, reguluje proces dojrzewania SREBP [2]. W odpowiedzi na obniżony poziom steroli w komórce, kompleks SREBP-SCAP jest transportowany do aparatu Golgiego, gdzie w wyniku cięcia proteolitycznego dochodzi do uwolnienia N-końcowej domeny (64 kDa), stanowiącej dojrzałe białko. Następnie po przemieszczeniu do jądra, w formie dimeru wiąże się ono z sekwencją odpowiedzi na sterole zlokalizowaną w regionach regulatorowych docelowych genów, co prowadzi do indukcji transkrypcji (Ryc. 2) [5].



**Rycina 2.** Model wielopoziomowej regulacji aktywności i dostępności czynnika transkrypcyjnego SREBP-1c przez wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) prowadzą do zmniejszenia ilości dojrzałej formy SREBP-1c dostępnej w komórce, poprzez (1) hamowanie transkrypcji genu kodującego to białko, (2) inhibicję procesu jego dojrzewania oraz (3) kierowanie go na ścieżkę degradacji w proteasomach 26S. LXR – wątrobowy receptor X; RXR – receptor kwasu retinowego; LXRE – element odpowiedzi na LXR; SREBP-1c – białko wiążące sterolowy element regulatorowy 1c; SRE – element odpowiedzi na sterole.

Wiele badań, przeprowadzonych zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, jednoznacznie wskazuje na istotną rolę PUFA w hamowaniu ekspresji genów lipogennych regulowanych przez SREBP. Inkubacja komórek CHO, HepG2, CV-1 i CaCo-2 z mikromolowymi ilościami PUFA prowadzi do zmniejszenia transkrypcji genów zawierających w promotorach sekwencję odpowiedzi na sterole, w sposób zależny od dawki [28,29]. Ponadto myszy ze znokautowanym genem leptyny *ob/ob* karmione dietą wzbogaconą w EPA, bądź DHA mają silnie zredukowaną zawartość jądrowej formy SREBP, jak również ekspresję genów docelowych dla SREBP [30]. Nadprodukcja SREBP w myszach transgenicznym prowadzi do zmniejszenia poziomu zależnej od PUFA represji transkrypcji docelowych genów [31].

Liczne eksperymenty wykazały, że, w przeciwieństwie do SREBP-2, ekspresja genu kodującego SREBP-1 jest regulowana przez PUFA. Mechanizm tej regulacji nie jest do końca wyjaśniony, chociaż sugeruje się, że może on być związany z receptorem LXR – głównym aktywatorem transkrypcji genu kodującego SREBP-1c. Wykazano, że n-3 i n-6 PUFA konkurują o miejsce wiązania z naturalnymi ligandami tych receptorów – oksysterolami. Przyłączenie PUFA prowadzi do zahamowania wiązania heterodimeru LXR/RXR z sekwencją docelową, w obrębie promotora genu kodującego SREBP-1c [32]. Mutacje sekwencji rozpoznawanej przez LXR znoszą ten efekt. Jednakże badania Pawar i wsp. [33] prowadzone na szczurach karmionych dietą bogatą w PUFA wykazały supresję genów docelowych dla SREBP, bez widocznych zmian w ekspresji genów bezpośrednio regulowanych przez LXR. Ponadto stwierdzono, że w hepatocytach traktowanych EPA dochodzi do zahamowania ekspresji genów regulowanych przez SREBP-1c zarówno w obecności jak i przy braku syntetycznych agonistów LXR [33]. Yoshikawa i wsp. [32] proponują model, w którym PUFA pośrednio hamują LXR poprzez stymulację PPAR. Wykazali oni, że nadekspresja PPAR $\alpha$  prowadzi do zaburzenia powstawania heterodimeru LXR-RXR, ze względu na preferencyjne tworzenie PPAR-RXR. Ponadto PPAR $\alpha$  jest w stanie wydajnie dimeryzować z LXR $\alpha$  i  $\beta$ . Ponieważ kompleks PPAR $\alpha$ -LXR $\alpha/\beta$  nie wiąże się z sekwencją odpowiedzi na LXR, tworzenie tego dimeru prowadzi do represji ekspresji genów [32].

PUFA mogą także regulować proces dojrzewania SREBP zwiększając pulę dostępnego cholesterolu. Wykazano, że PUFA zwiększając hydrolizę sfingomieliny, lipidu o dużym powinowactwie do cholesterolu, prowadzą do jego redystrybucji z błony cytoplazmatycznej do siateczki śródplazmatycznej, a tym samym hamują proces proteolizy SREBP (Ryc. 2). Co ciekawe, zaobserwowano również, że uwalniany w trakcie hydrolizy sfingomieliny ceramid hamuje ekspresję genów zależnych od SREBP wpływając na proces dojrzewania tego białka. Ponadto Worgall i wsp. [34] pokazali, że zablokowanie syntezy ceramidu prowadzi do akumulacji prekursorowej formy SREBP oraz zmniejszenia poziomu formy dojrzałej. Wydaje się, że ma to związek z rolą, jaką ceramidy pełnią w regulacji procesu transportu pęcherzykowego między siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego [34]. Ostatnio pojawiło się doniesienie, opisujące nowy me-

chanizm regulacji aktywności SREBP-1c przez PUFA, w którym DHA kieruje SREBP-1c na ścieżkę degradacji w proteasomach 26 S (Ryc. 2) [35].

#### CHREBP – BIAŁKO WIĄŻĄCE SEKWENCJĘ ODPOWIEDZI NA CUKRY

ChREBP to interesujący przykład czynnika transkrypcyjnego, który pośredniczy w zależnej od glukozy i PUFA regulacji ekspresji genów glikolitycznych i lipogennych w wątrobie [36]. Należy on, podobnie jak SREBP, do rodziny czynników transkrypcyjnych helisa-pętla-helisa-suwak leucynowy i występuje w wątrobie i tkance tłuszczowej. Sekwencję rozpoznawaną przez ChREBP, tzw. element odpowiedzi na cukry zlokalizowano w rejonach promotorowych genów kodujących kinazę pirogronianową typu L, FAS, ACC i białka S14.

Zgodnie z modelem zaproponowanym przez Kawaguchi i wsp. [37], białko to występuje w cytoplazmie w warunkach niskiego stężenia glukozy i ulega translokacji do jądra podczas aktywacji metabolizmu glukozy, co pozwala wiązać się z sekwencją elementu odpowiedzi na cukry. Aktywacja ChREBP jest regulowana poprzez proces fosforylacji/defosforylacji i zależy od aktywności kinazy białkowej A, kinazy białkowej zależnej od AMP (AMPK, ang. *AMP activated protein kinase*) oraz białkowej fosfatazy 2A. Zmniejszenie fosforylacji seryny w pozycji 196, zlokalizowanej blisko sygnału lokalizacji jądrowej, aktywuje translokację ChREBP do jądra komórkowego. Następnie, zachodząca już na terenie jądra defosforylacja Ser-568 i Thr-666 warunkuje wiązanie tego czynnika z DNA. Wydaje się, że białkowa fosfataza 2A, która jest aktywowana przez ksylulozo-5-fosforan katalizuje zarówno cytoplazmatyczną, jak i jądrową defosforylację ChREBP [38].

Badania demonstrujące zmniejszoną aktywność wiązania DNA przez ChREBP w ekstraktach jądrowych pochodzących z wątroby szczurów karmionych dietą wysokotłuszczową wykazały, że PUFA mogą wpływać na ekspresję genu tego białka lub też na proces jego translokacji [37,39]. Dentin i wsp. [36] w doświadczeniach przeprowadzonych zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, wykazali, że kwasy linolowy, EPA i DHA hamują aktywność ChREBP poprzez przyspieszenie rozpadu mRNA oraz zaburzenie procesu translokacji. Natomiast, w przypadku kwasów nasyconych (stearynian) i jednonienasyconych (oleinian) nie obserwowano żadnego działania. Podobną regulację ilości mRNA przez PUFA, wykazano dla opisanego wyżej SREBP-1c. Jednak pomimo identyfikacji potencjalnego elementu destabilizującego w regionie 3' nie ulegającego translacji (region bogaty w A-U), mechanizm, w wyniku którego PUFA przyspieszają degradację mRNA obu genów, pozostaje niejasny.

Zahamowanie translokacji ChREBP z cytoplazmy do jądra zależne od PUFA jest związane z hamowaniem metabolizmu glukozy. PUFA hamują bowiem ekspresję genu kodującego glukokinazę (kluczowy enzym procesu glikolizy) oraz aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej [36]. Prowadzi to do spadku ilości dwóch ważnych metabolitów: glukozo-6-fosforanu i ksylulozo-5-fosforanu, a tym samym uniemożliwia translokację ChREBP do jądra.

Nadekspresja konstytutywnie występującej w jądrze formy ChREBP w hepatocytach całkowicie hamujący wpływ PUFA na ekspresję genu kinazy pirogronianowej L [40], natomiast transkrypcję FAS redukuje jedynie częściowo, co świadczy o istotnym udziale SREBP-1c w regulacji ekspresji tego genu [36]. Tak więc stymulacja i supresja genów kodujących kinazę pirogronianową L i FAS przez glukozę i PUFA odpowiednio, zależy od skoordynowanego działania ChREBP i SREBP-1c [36].

Inny, zaproponowany przez Kawaguchi i wsp. [37] mechanizm wyjaśniający hamujący wpływ PUFA na funkcje ChREBP, wskazuje na aktywację kinazy AMPK jako kluczowego elementu w tym procesie. Model ten budzi jednakże pewne kontrowersje. Kawaguchi i wsp. [37] zaobserwowali w hodowli hepatocytów, że nasycone kwasy tłuszczowe o krótkich, średnich i długich łańcuchach aktywują kinazę AMPK, która to fosforylując resztę seryny w pozycji 568, powodowała zmniejszenie zdolności wiązania ChREBP z docelową sekwencją. Jednak wcześniej opisano, że jedynie PUFA są w stanie hamować ekspresję genów glikolitycznych i lipogennych [5,41]. Ponadto, sama zdolność kwasów tłuszczowych do aktywowania AMPK budzi pewne kontrowersje. Chociaż Suchankowa i wsp. [42] pokazali, że PUFA są zdolne do modulowania stopnia fosforylacji AMPK w wątrobie szczurów, to badania Dobrzyn i wsp. [43] przeprowadzone na tkankach mysich, wykazały, że PUFA nie aktywują tej kinazy. Dodatkowo przeciwko temu modelowi przemawiają doświadczenia na myszach AMPK $\alpha$ 1<sup>-/-</sup> i AMPK $\alpha$ 2<sup>-/-</sup>. Wykazano w nich, że pomimo braku aktywności AMPK, zdolność PUFA do zaburzania procesu translokacji ChREBP z cytoplazmy do jądra hepatocytów jest niezmienną [36].

#### NF $\kappa$ B – CZYNNIK JĄDROWY $\kappa$ B

NF $\kappa$ B jest czynnikiem transkrypcyjnym odgrywającym ważną rolę w stanach zapalnych regulując ekspresję genów kodujących różne cytokiny (interleukina 1, interleukina 2), chemokiny (interleukina 8, czynnik chemotaktyczny monocytów), cząsteczki adhezyjne (ICAM, VCAM), czy indukowalne enzymy efektorowe takie jak syntaza tlenu azotu czy cyklooksigenaza 2 [44]. Białko to w formie nieaktywnej tworzy w cytoplazmie heterodimer z inhibitorem I- $\kappa$ B. W odpowiedzi na bodziec pozakomórkowy inhibitor jest fosforylowany przez kinazę I- $\kappa$ K, co jest sygnałem do jego ubikwitylacji, a następnie degradacji. Odłączenie I- $\kappa$ B aktywuje NF $\kappa$ B i umożliwia jego translokację z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie wiążąc się z DNA aktywuje odpowiednie geny [9].

Proces translokacji NF $\kappa$ B do jądra komórkowego może być regulowany zarówno pozytywnie jak i negatywnie przez różne PUFA. Badania przeprowadzone na hodowlach monocytów człowieka wykazały, że EPA blokuje aktywność NF $\kappa$ B poprzez zmniejszenie degradacji inhibitora I- $\kappa$ K [45]. Zostało to dodatkowo potwierdzone w doświadczeniu na myszach transgenicznym, które były zdolne do endogennej biosyntezy PUFA n-3 z n-6. Myszy te były chronione przed przewlekłym procesem zapalnym błony śluzowej odbytu i jelita grubego dzięki zmniejszonej aktywności NF $\kappa$ B indukowanej przez kwasy tłuszczowe

[46]. Ponadto ostatecznie doniesienia porównujące przeciwzapalne właściwości EPA i DHA w makrofagach THP-1 pokazują, że EPA jest silniejszym inhibitorem NF $\kappa$ B niż DHA. Natomiast arachidonian i powstający z niego kwas epoksyeikozatrienowy, nie blokują aktywności i translokacji tego czynnika. Co ciekawe 5-lipoksygenaza, enzym biorący udział w syntezie leukotrienów i kwasu 5-hydroksyeikozatetraenowego z arachidonianu, ulega translokacji do jądra komórkowego w asocjacji z NF $\kappa$ B [44].

#### TRATWY LIPIDOWE

Tratwy lipidowe to heterogenne regiony błony komórkowej bogate w cholesterol i sfingolipidy, które wybiórczo wbudowują białka i determinują oddziaływania białko-białko i białko-lipid [47]. Oprócz warunkowania struktury kaweoli czy regulacji procesów endocytozy i transcytozy, tratwy funkcjonują jako swoiste platformy dla różnych ścieżek sygnałowych. Zaobserwowano, że wiele białek zaangażowanych w procesie przekazywania sygnałów, takich jak białka G, białka z kotwicą GPI, kinazy z rodziny Src, kaweolina i Gap43, lokalizuje się w obrębie tych sfingolipidowo-cholesterolowych mikrodomen [5]. Zmiany w strukturze tratw lipidowych są jednym z mechanizmów, poprzez które lipidy wpływają na ekspresję genów.

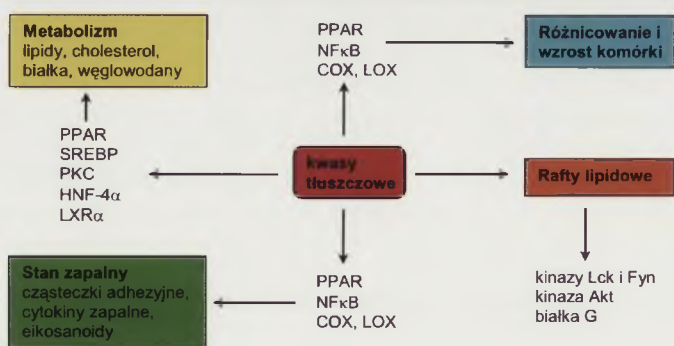
Po pierwsze mirystylacja i palmitylacja kinaz Lck i Fyn z rodziny Src warunkuje ich zakotwiczenie w omawianych strukturach. Prawdopodobnie obecność grup acylowych umożliwia asocjację tych białek ze sfingolipidami tratw [5]. Po drugie badania przeprowadzone *in vitro* i *in vivo* pokazują, że DHA może modulować poziom fosfatydyloseryny w tratwach [48]. Kwas ten promuje akumulację tego fosfolipidu służąc jako preferowany substrat do jego biosyntezy. Zgromadzenie fosfatydyloseryny po stronie cytoplazmatycznej mikrodomen ułatwia translokację i aktywację serynowo-treoninowej kinazy Akt, która następnie, uruchamiając kaskady sygnałowe prowadzi do ekspresji genów antyapoptycznych. Ciekawe wyniki uzyskano traktując komórki Jurkat (linia nowotworowa limfocytów T) kwasem arachidonowym i EPA [49]. Zaobserwowano w nich spadek ilości kinaz Lck i Fyn z rodziny Src w tratwach lipidowych, który doprowadził do redukcji kaskady sygnałowej zależnej od wapnia i szlaku kinaz MAP. Sugerowano, że efekt ten może być wynikiem acylacji kinaz kwasami nienasyconymi co uniemożliwiło oddziaływanie z tratwami [5]. Ostatnie badania pokazały, że EPA zmienia skład mikrodomen poprzez zwiększenie zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych [49].

Dodatkowo, coraz więcej informacji pojawia się na temat kluczowej roli ceramidów w determinacji struktury i właściwości tratw lipidowych [47]. Promieniowanie UV, promieniowanie gamma czy stymulacja komórek poprzez immunoreceptory prowadzi do aktywacji kwaśnej sfingomielinazy, która w obrębie tratw hydrolizuje sfingomielinę do ceramidu. Następnie, ze względu na ich silnie hydrofobowy charakter, związki te asocjują ze sobą, tworząc odrębne ceramidowe domeny. Ich funkcją jest stabilizacja struktury tratw oraz grupowanie receptorów, które umożliwia im asocjację z białkami sygnałowymi. Tak więc, domeny te ułatwiają i nasilają procesy sygnałowe [47].

Kwasy tłuszczowe są prekursorami szerokiej gamy bioaktywnych lipidów [50]. W wyniku działania fosfolipazy A<sub>2</sub> dochodzi do uwolnienia z błon komórkowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które stają się substratami w syntezie eikosanoidów. Związki te oprócz pełnienia funkcji aktywatorów PPAR, wiążą się z receptorami sprzężonymi z białkami G, prowadząc do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia i cAMP. To z kolei uruchamia kolejne kaskady sygnałowe (w tym kaskadę kinaz MAP) prowadząc do zmian w ekspresji genów uczestniczących w procesie zapalnym [4].

Fosfatydyloinozytol jest prekursorem dwóch ważnych cząsteczek sygnałowych: inozytolotrisfosforanu oraz diacyloglicerolu. Inozytolotrisfosforan oddziałując z kanałami wapniowymi zlokalizowanymi w błonie siateczki śródplazmatycznej uwalnia jony wapnia, co z kolei aktywuje różnorodne szlaki sygnałowe. Natomiast diacyloglicerol aktywuje kinazę białkową C, która fosforylując docelowe białka, w tym czynniki transkrypcyjne, prowadzi do określonych zmian w procesach komórkowych [4]. Ponadto aktywatorami tej kinazy są także kwasy tłuszczowe, fosfatydyloseryna, fosfatydyloinozytol i lizofosfolipidy [5].

Ceramidy nie tylko wpływają na strukturę tratw lipidowych, ale również pełnią funkcję istotnych cząsteczek sygnałowych w regulacji cyklu komórkowego, różnicowania i apoptozy [51]. W odpowiedzi na różnorodne czynniki stresowe takie jak promieniowanie UV, szok cieplny, infekcje wirusowe czy ligandy śmierci, dochodzi do zwiększenia poziomu ceramidów, w wyniku hydrolizy sfingomieliny lub syntezy *de novo* z L-seryny i palmitoilo-CoA. Wykazano, że związki te aktywują całą gamę białek sygnałowych takich jak kinaza białkowa C $\zeta$ , kinaza fosforylująca N-końcowy region białka c-Jun, kinaza I- $\kappa$ K, kinaza c-Raf-1, kinazy z rodziny Src, fosfolipaza A<sub>2</sub>, małe białka G Ras i Rac oraz fosfatazy serynowo-treoninowe 1 i 2A indukowane ceramidem, prowadząc do zahamowania podziałów i indukcji śmierci komórki [52]. Liczne badania pokazały, że ceramidy hamują insulinozależną translokację GLUT 4 z cytoplazmy do błony komórkowej, prowadząc do insulinooporności a w konsekwencji do rozwoju pełnoobjawowej cukrzycy [53]. Ten ha-



Rycina 3. Schemat ilustrujący udział długocząsteczkowych kwasów tłuszczowych w regulacji różnych procesów komórkowych, w wyniku modulacji wzoru ekspresji genów. PPAR – receptory aktywowane przez czynniki proliferacji peroksisomów; SREBP – białko wiążące sterolowy element regulatorowy; PKC – kinaza białkowa C; HNF-4 $\alpha$  – czynnik jądrowy 4 $\alpha$ ; LXR $\alpha$  – wątrobowy receptor X  $\alpha$ ; NF $\kappa$ B – jądrowy czynnik  $\kappa$ B; COX – cyklooksigenaza; LOX – lipooksygenaza.

mujący efekt wynika z inaktywacji kinazy Akt, która odgrywa kluczową rolę w szlaku insulinowym. Aktywna forma kinazy Akt jest ufosforylowana w pozycji Thr-308 i Ser-473. Ceramidy aktywując fosfatazę 2A prowadzą do defosforylacji tych miejsc na kinazie Akt. Jednocześnie kinaza białkowa C $\zeta$  fosforyluje resztę Thr-34 zlokalizowaną w domenie PH blokuje translokację kinazy Akt do błony komórkowej, co jest niezbędne do jej aktywacji. Dodatkowo w zależności od ceramidów indukcji insulinooporności, biorą udział kinazy JNK i I- $\kappa$ K, które aktywując czynniki transkrypcyjne c-Jun i NF $\kappa$ B, indukują ekspresję genów proapoptycznych prowadząc do śmierci komórek  $\beta$ -trzustki [53]. Warto wspomnieć, że oprócz ceramidów także inne sfingolipidy tj. fosforan sfingozyny, glukozyloceramid, dihydroceramid czy lizofingomielina, są związkami biologicznie czynnymi [51].

## PODSUMOWANIE

W wyniku szeroko zakrojonych badań, prowadzonych od wielu lat, stało się jasne, że kwasy tłuszczowe to nie tylko bogate źródło energii i składników budulcowych, ale także aktywne biologicznie związki regulujące różnorodne funkcje komórki poprzez zmianę ekspresji genów. Jak przedstawiono w obecnej pracy, regulacja ta jest bardzo złożona i ciągle w wielu płaszczyznach słabo poznana. Wpływ jaki wywierają kwasy tłuszczowe zależy od długości ich łańcucha węglowego, stopnia utlenienia i formy metabolicznej. Mogą one bezpośrednio regulować ekspresję genów wpływając na aktywność receptorów jądrowych takich jak PPAR, LXR i HNF-4 $\alpha$  czy czynników transkrypcyjnych SREBP, ChREBP i NF $\kappa$ B, lub działać w sposób pośredni, poprzez generowanie szerokiej puli bioaktywnych lipidów oraz aktywację różnorodnych kaskad sygnałowych. Długocząsteczkowe kwasy tłuszczowe regulują transkrypcję genów zaangażowanych w takie procesy jak wewnątrzkomórkowy metabolizm cukrów i lipidów, stan zapalny oraz wzrost i różnicowanie komórek (Ryc. 3). Wiele badań wskazuje na to, że nieprawidłowości w metabolizmie kwasów tłuszczowych są jedną z głównych przyczyn występowania niektórych nowotworów oraz chorób metabolicznych takich jak cukrzyca typu 2, nadciśnienie tętnicze, niedokrwienne choroby serca. Poznanie szczegółowego mechanizmu regulacji ekspresji genów przez kwasy tłuszczowe budzi nadzieję na stworzenie nowych strategii terapeutycznych pozwalających na skuteczną walkę i zapobieganie w/w chorobom.

## PIŚMIENNICTWO

- Duplus E, Glorian M, Forest C (2000) Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem* 275: 30749-30752
- Deckelbaum RJ, Worgall TS, Seo T (2006) n-3 fatty acids and gene expression. *Am J Clin Nutr* 83: 1520S-1525S
- Pégorier JP, Le May C, Girard J (2004) Control of gene expression by fatty acids. *J Nutr* 134: 2444S-2449S
- Weymann M, Schneider R (2008) Lipid signaling in disease. *Nature* 9: 162-179
- Jump DB (2004) Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41: 42-78
- Allman DW, Gibson DM (1965) Fatty acid synthesis during early linoleic acid deficiency in the mouse. *J Lipid Res* 79: 51-62
- Jeffcoat R, James AT (1978) The control of stearoyl-CoA desaturase by dietary linoleic acid. *FEBS Lett* 85: 114-118




8. Wahle KW, Radcliffe JD (1977) Effect of a diet rich in sunflower oil on aspects of lipid metabolism in the genetically obese rat. *Lipids* 12: 135-139
9. Sampath H, Ntambi JM (2005) Polyunsaturated fatty acid regulation of gene of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 25: 317-340
10. Raclot T, Groscolas R, Langin D, Ferre P (1997) Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acid in rat white adipose tissue. *J Lipid Res* 38: 1963-1972
11. Sessler AM, Kaur N, Palta JP, Ntambi JM (1996) Regulation of stearoyl CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acid in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 271: 29854-29858
12. Mater MK, Pan D, Berger WG, Jump DB (1999) Arachidonic acid inhibits lipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes through a prostanoic pathway. *J Lipid Res* 39: 1327-1334
13. Reseland JE, Haugen F, Hollung K, Solvoll K, Halvorsen B, Brude IR, Nenseter MS, Christiansen EN, Drevon CA (2001) Reduction of leptin gene expression by dietary polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 42: 743-750
14. Duplus E, Forest C (2002) Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? *Biochem Pharmacol* 64: 893-901
15. Issemann I, Green S (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-650
16. Grimaldi PA (2007) Peroxisome proliferators-activated receptors as sensors of fatty acids and derivatives. *Cell Mol Life Sci* 64: 2459-2464
17. Kota BP, Huang TH-W, Roufogalis BD (2005) An overview on biological mechanism of PPARs. *Pharmacol Res* 51: 85-94
18. Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C (2003) Peroxisome proliferators-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85: 267-273
19. Ricote M, Glass CK (2007) PPARs and molecular mechanism of trans-repression. *Biochim Biophys Acta* 1771: 926-935
20. Hertz R, Berman I, Keppler D, Bar-Tana J (1996) Activation of gene transcription by prostacyclin analogues is mediated by the peroxisome-proliferators-activated receptor (PPAR). *Eur J Biochem* 235: 242-247
21. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA, Milburn MV (1999) Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferators-activated receptors. *Mol Cell* 3: 397-403
22. Pariza MW (2004) Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *Am J Clin Nutr* 79: 1132S-1136S
23. Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, Gonzalez FJ. (2001) Hepatocyte nuclear factor-4 alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* 21: 1393-1403
24. Navas MA, Munoz-Elias EJ, Kim J, Shih D, Stoffel M (1999) Functional characterization of the MODY1 gene mutations (HNF4R127W), HNF4(V255M), and HNF4(E276Q). *Diabetes* 48: 1459-1465
25. Bogan AA, Dallas-Yang Q, Ruse MD Jr, Maeda Y, Jiang G, Nepomuceno L, Scanlan TS, Cohen FE, Sladek FM (2000) Analysis of protein dimerization and ligand binding of orphan receptor HNF4alpha. *J Mol Biol* 302: 831-851
26. Dhe-Paganon S, Duda K, Iwamoto M, Chi YI, Shoelson SE (2002) Crystal structure of the HNF-4alpha ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand. *J Biol Chem* 277: 37973-37976
27. Duda K, Chi YI, Shoelson SE (2004) Structural basis for HNF-4alpha activation by ligand and coactivator binding. *J Biol Chem* 279: 23311-23316
28. Worgall TS, Sturley SL, Soe T, Osborne TF, Deckelbaum RJ (1998) Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory element by decreasing levels of sterol regulatory element-binding protein. *J Biol Chem* 273: 23537-23540
29. Field FJ, Born E, Murthy S, Mathur SN (2002) Polyunsaturated fatty acids decrease the expression of sterol regulatory element-binding protein-1 in CaCo-2 cells: effect on fatty acid synthesis and triacylglycerol transport. *Biochem J* 368: 855-864
30. Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Najima Y, Nakakuki M, Nagai R, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N, and Shimano H (2003) Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology* 38: 1529-1539
31. Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N (1999) A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 274: 35840-35844
32. Yoshikawa T, Ide T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Yatoh S, Kitamine T, Okazaki H, Tamura Y, Sekiya M, Takahashi A, Hasty AH, Sato R, Sone H, Osuga J, Ishibashi S, Yamada N (2003) Cross-talk between peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol Endocrinol* 17: 1240-1254
33. Pawar A, Botolin D, Mangelsdorf, Jump DB (2003) The role of liver X receptor-alpha in the fatty acid regulation of hepatic gene expression. *J Biol Chem* 278: 40736-40743
34. Worgall TS, Juliano RA, Seo T, Deckelbaum RJ (2004) Cermide synthesis correlate with the posttranscriptional regulation of the sterol-regulatory element-binding protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 943-948
35. Botolin D, Wang Y, Christian B, Jump DB (2006) Docosahexaenoic acid (22:6,n-3) regulates rat hepatocyte SREBP-1 nuclear abundance by Erk- and 26S proteasome-dependent pathways. *J Lipid Res* 47: 181-192
36. Dentin R, Benhamed F, Pégrier JP, Foufelle F, Viollet B, Vaulont S, Girard J, Postic C (2005) Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest* 115: 2843-2854
37. Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K (2002) Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase *J Biol Chem* 277: 3829-3835
38. Kabashima T, Kawaguchi T, Wadzinski BE, Uyeda K (2003) Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5107-5112
39. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K (2001) A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9116-9121
40. Stoekman AK, Ma L, Towle HC (2004) Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* 279: 15662-15669
41. Foufelle F, Perdureau D, Gouhot B, Ferré P, Girard J (1992) Effects of diets rich in medium-chain and long-chain triglycerides on lipogenic-enzyme gene expression in liver and adipose tissue of the weaned rat. *Eur J Biochem* 208: 381-387
42. Suchankova G, Tekle M, Saha AK, Ruderman NB, Clarke SD, Gettys TW (2005) Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 851-858
43. Dobrzyn A, Dobrzyn P, Miyazaki M, Ntambi JM (2005) Polyunsaturated fatty acids do not activate AMP-activated protein kinase in mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 892-896
44. Schmitz G, Ecker J (2008) The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res* 47: 147-155
45. Zhao Y, Joshi-Barve S, Chen LH (2004) Eicosapentaenoic acid prevent LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kB activation. *J Am Coll Nutr* 23: 71-78
46. Hudert CA, Weylandt KH, Lu Y, Wang J, Hong S, Dignass A, Serhan CN, Kang JX (2006) Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 11276-11281

47. Grassmé H, Riethmüller J, Gulbins E (2007) Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains. *Prog Lipid Res* 46: 161-170
48. Akbar M, Calderon F, Wen Z, Kim HY (2005) Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10858-10863
49. Li Q, Tan L, Wang C (2006) Polyunsaturated eicosapentaenoic acid changes lipid composition in lipid rafts. *Eur J Nutr* 45: 144-151
50. Nagao K, Yanagita T (2008) Bioactive lipids in metabolic syndrome. *Prog Lipid Res* 47: 127-146
51. Hannun YA, Obeid LM (2008) Principles of bioactive lipid signaling: lessons from sphingolipids. *Nature Rev* 9: 139-150
52. Lahiri S, Futerman AH (2007) The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci* 2007: 2270-2284
53. Summers SA (2006) Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* 45: 42-72

## Regulation of gene expression by long-chain fatty acids

Magdalena Jazurek, Paweł Dobrzyń, Agnieszka Dobrzyń 

Laboratory of Cell Signaling and Metabolic Disorders, Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology Polish Academy of Sciences, 3 Pasteura St., 02-093 Warsaw, Poland

 e-mail: a.dobrzyn@nencki.gov.pl

**Key words:** fatty acids, gene expression, nuclear receptors, transcription factors, lipid rafts, lipids

### ABSTRACT

Besides of their role as important energy source and membrane component, long chain fatty acids also act as bioactive lipids involved in the regulation of such processes like cell proliferation and differentiation, protein acylation and sorting, inflammation, activation of enzymes and membrane receptors, and regulation of intracellular metabolism. One of the mechanisms by which fatty acids affect so many various biological processes is regulation of the gene transcription. Depending on the number of double bonds and carbon chain length, fatty acids may inhibit or activate expression of defined genes through either direct regulation of activity of nuclear receptors including PPAR, LXR and HNF-4 $\alpha$  or transcription factors mainly SREBP, ChREBP and NF $\kappa$ B; or indirectly, through physicochemical changes in membrane properties and activation of signal transduction pathways. In this paper we review the current understanding of the mechanisms by which fatty acids regulate gene expression and discuss their role in the pathogenesis of metabolic disorders.

# Struktura i funkcjonowanie rybosomu eukariotycznego

## STRESZCZENIE

Proces biosyntezy białka jest bardzo skomplikowany i do dziś nie jest w pełni poznany. Najlepiej poznano mechanizm translacji zachodzący w organizmach prokariotycznych. Ze względu na mniejsze rozmiary oraz mniej skomplikowaną budowę rybosomów prokariotycznych 70S badania na tym układzie są bardziej zaawansowane. Rybosomy eukariotyczne 80S są bardziej złożone i stwarzają więcej trudności w trakcie badań. Dotychczas określono morfologię rybosomu 80S i uzyskuje się coraz więcej informacji o mechanizmie funkcjonowania. Nadal wielkim wyzwaniem pozostaje zbadanie oddziaływań rybosomu z czynnikami biorącymi udział w biosyntezie białka oraz określenie dynamicznych zmian tych oddziaływań podczas poszczególnych etapów translacji. Zmiany strukturalne rybosomu mają zasadnicze znaczenie funkcjonalne i regulatorowe podczas biosyntezy białka. Są one istotne dla całego kompleksu zagadnień ekspresji genu. Jedynie dzięki dalszym badaniom nad strukturą i funkcjonowaniem rybosomów możemy zbliżyć się do poznania specyfiki mechanizmu działania rybosomów eukariotycznych. W artykule tym przedstawiamy obecnie panujące poglądy na temat struktury oraz funkcjonowania rybosomów eukariotycznych.

## WPROWADZENIE

Rybosomy są makrokompleksami białkowo-nukleinowymi, których zasadniczą funkcją jest odszyfrowanie informacji genetycznej zakodowanej w mRNA oraz synteza polipeptydów. Rybosomy występują w cytoplazmie komórek wszystkich organizmów żywych zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych, a także w organellach półautonomicznych – chloroplastach i mitochondriach. Struktura i funkcja rybosomów była intensywnie badana w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat, czego ukoronowaniem jest przedstawienie kryształów podjednostek 50S [1] i 30S [2], rybosomu prokariotycznego 70S z rozdzielczością 2.4–5.5 Å [3–6], a także struktury rybosomu eukariotycznego, w zasadniczym stopniu ustalonej techniką mikroskopii krioelektronowej przy rozdzielczości 12–25 Å [7–11].

Każdy rybosom jest zbudowany z dwóch różnej wielkości podjednostek, na które składają się rybosomalne kwasy nukleinowe (rRNA) oraz białka. Stwierdzono, że u bakterii 2/3 masy rybosomu stanowią rRNA, a 1/3 – białka [1]. Podjednostka 50S rybosomu *E. coli* zawiera dwie cząsteczki RNA, 23S rRNA i 5S rRNA oraz 33 białka, natomiast podjednostka 30S zbudowana jest z 16S rRNA i 21 różnych białek [4]. W rybosomach eukariotycznych 80S istnieje dodatkowa cząsteczka – 5.8S rRNA oraz 20–30 dodatkowych białek, natomiast rRNA są znacznie dłuższe dzięki obecności tzw. sekwencji wstawionych (ES, ang. *expansion segments*). Pomimo tych różnic, obserwuje się wysoką zgodność regionów odpowiadających wspólnemu rdzeniowi rybosomów 70S i 80S.

## STRUKTURA RYBOSOMU EUKARIOTYCZNEGO

Mimo iż rybosomy 80S są bardziej skomplikowane zarówno pod względem strukturalnym jak i funkcjonalnym od prokariotycznych, poznano struktury rybosomów cytoplazmatycznych kilku organizmów eukariotycznych: drożdży (*Sacharomyces cerevisiae*) [11], szczura (*Rattus norvegicus*) [8], królika (*Oryctolagus cuniculus*) [7], świdrowca *Trypanosoma cruzi* [9], grzyba *Thermomyces lanuginosus* [12], glonu *Chlamydomonas reinhardtii* [13] oraz rybosomów izolowanych z linii komórkowych HeLa [14] (Ryc. 1A–B). Struktury te rozwiązano metodą mikroskopii krioelektronowej, przy rozdzielczości od 35 Å do 12 Å. Mikroskopia krioelektronowa (cryo-EM, ang. *cryo-electron microscopy*) jest atrakcyjną metodą badania struktury rybosomów ze względu na mniejszą ilość homogenego materiału niezbędnego do analizy w porównaniu z ilością potrzebną do uzyskania kryształu. Na podstawie map uzyskanych dzięki mikroskopii krioelektronowej stworzony został niepełny model rybosomalnych podjednostek eukariotycznych 40S (kod 1S1H) i 60S (1S1I) [15,16]. Za pomocą metod biochemicznych uzyskano

Kamilla Bąkowska-Żywicka<sup>✉</sup>

Tomasz Twardowski

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

<sup>✉</sup>Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań; tel.: (061) 852-85-03, faks: (061) 852-05-32, e-mail: bakowska@ibch.poznan.pl

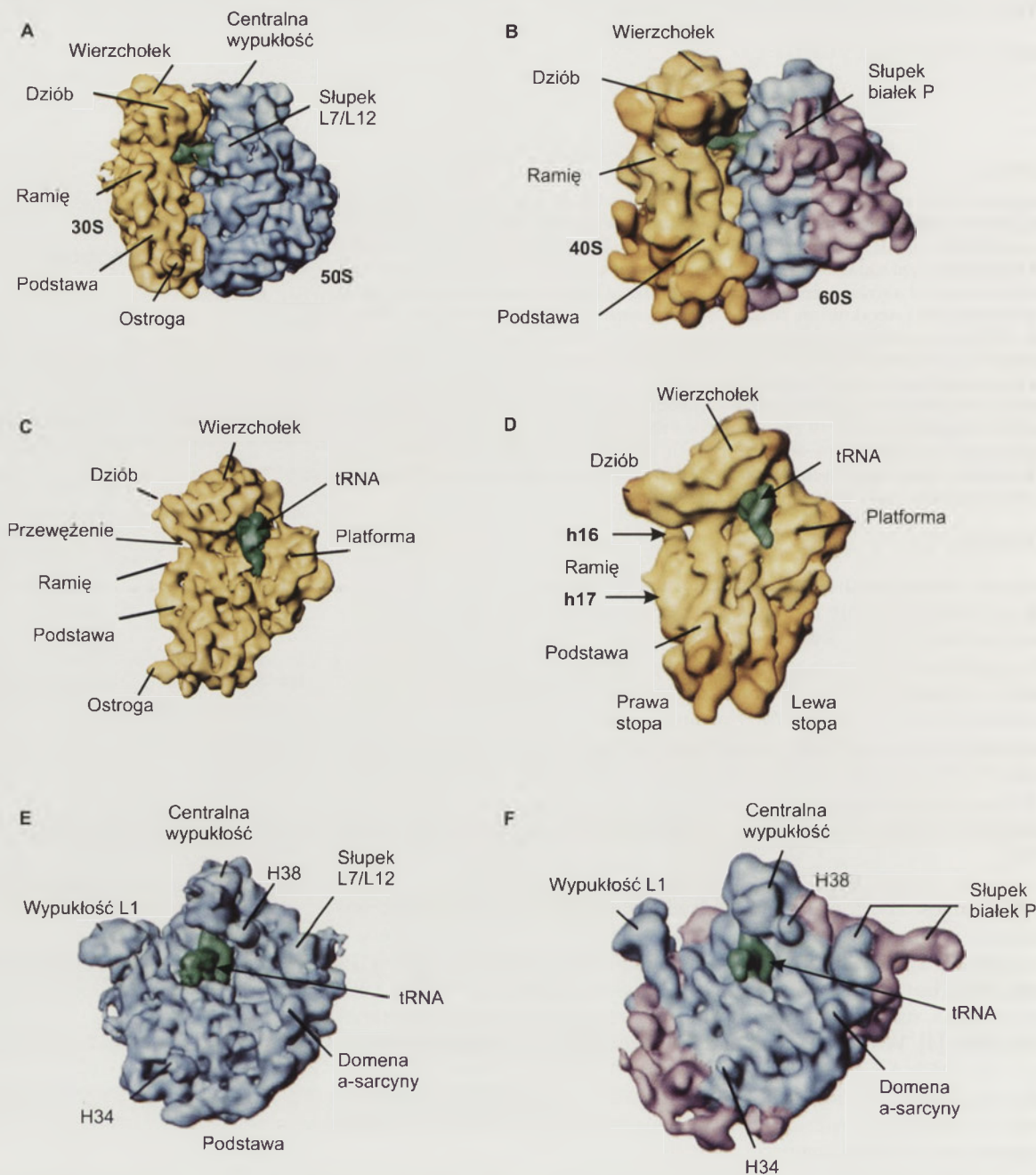
Artykuł otrzymano 21 listopada 2007 r.

Artykuł zaakceptowano 16 stycznia 2008 r

**Słowa kluczowe:** biosynteza białka, rRNA, rybosom eukariotyczny, 80S, białka rybosomalne

**Wykaz skrótów:** AA-tRNA – aminoacylo-tRNA; D-tRNA – deacylowany tRNA; eEF – eukariotyczny czynnik elongacyjny; eIF – eukariotyczny czynnik inicjujący biosyntezę białka; ES – sekwencja wstawiona w rRNA; FRS – płaska powierzchnia rybosomu; PTC – centrum peptydylotransferazowe; P-tRNA – peptydylo-tRNA; RF – czynnik uwalniający; RRF – czynnik odzyskujący

**Podziękowania:** Praca jest finansowana z grantu MNiSW nr PZB-MNiSW-2/3/2006. Autorzy dziękują Panom Profesorom: J. Barciszewskiemu, H. Nollerowi oraz J. Frankowi za wyrażenie zgody na przedruk rycin



**Rycina 1.** Struktura rybosomu prokariotycznego 70S i eukariotycznego 80S z cząsteczką tRNA przyłączoną w miejscu P. A – struktura rybosomu 70S *E. coli* [26], kolorem żółtym oznaczono podjednostkę 30S, niebieskim – podjednostkę 50S; B – struktura rybosomu 80S *S. cerevisiae* [11], kolorem żółtym oznaczono podjednostkę 40S, niebieskim – podjednostkę 60S; C – struktura podjednostki 30S *E. coli* [26]; D – struktura podjednostki 40S *S. cerevisiae* [11]; E – struktura podjednostki 50S *E. coli* [26]; F – struktura podjednostki 60S *S. cerevisiae* [11].

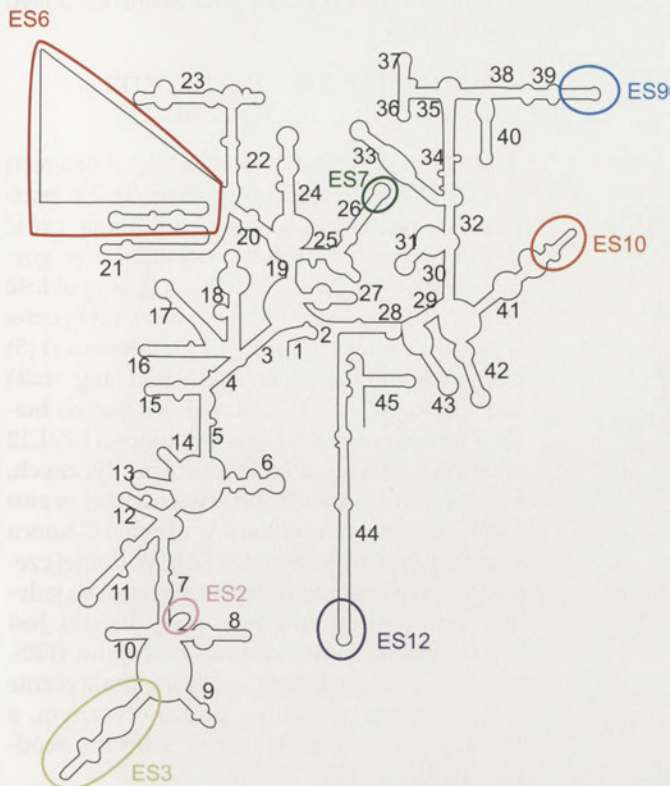
informacje na temat dynamicznych zmian konformacji i mechanizmu funkcjonowania rybosomów eukariotycznych [17-24].

#### STRUKTURA MAŁEJ PODJEDNOSTKI RYBOSOMU EUKARIOTYCZNEGO

W obrębie małej podjednostki 40S (Ryc. 1D) wyróżniono wierzchołek (ang. *head*), który połączony jest z podstawą (ang. *body*) przez przewężenie (ang. *neck*) w pobliżu platformy (ang. *platform*). Po prawej stronie podstawy znajduje się niewielkie ramię (ang. *shoulder*), pozostające w bliskim kontakcie z wierzchołkiem podjednostki, tworząc szczelinę między tymi elementami. Nad ramieniem

obserwowany jest dziób (ang. *beak*). U dołu podstawy znajduje się stopa (ang. *foot*) wyraźnie rozdzielona na dwie części: prawą i lewą [11]. Z tego względu w podjednostce 40S nie obserwowano dodatkowo wystającej helisy RNA, nazwanej ostrogą (ang. *spur*), występującej w lewej dolnej części podstawy podjednostki 30S (Ryc. 1C) [2,25].

Poza wspólnym rdzeniem strukturalnym, który jest zachowany w ewolucji zarówno u pro-, jak i eukariota, zauważyć można interesujące różnice między podjednostką 40S a 30S. Zmiany są bardzo ważne pod względem funkcjonalnym i dotyczą zarówno rRNA, jak i białek.



Rycina 2. Struktura II-rzędowa 18 rRNA *Glycine max* [156], numer X02623). Zaznaczono poszczególne helisy (liczby 1-45) oraz sekwencje wstawione (ES2-ES12).

### rRNA małej podjednostki rybosomalnej

18S rRNA organizmów eukariotycznych jest dłuższy niż 16S rRNA Prokaryota o kilkaset nukleotydów. Dla przykładu, 16S rRNA *E. coli* ma długość 1542 nt [26], 18S rRNA *S. cerevisiae* – 1798 nt [11], a 18S rRNA *T. cruzi* – 2315 nt [9]. Jest to związane z obecnością dodatkowych sekwencji rRNA w podjednostkach 40S, zwanych sekwencjami wstawionymi (ES, Ryc. 2). Największa sekwencja wstawiona, ES6, którą znaleziono we wszystkich rybosomach eukariotycznych, występuje w helisie h21, po zewnętrznej stronie podstawy podjednostki. Długość ES6 jest zróżnicowana u różnych organizmów i wynosi od 170 do 504 nt. ES6 ma kształt dwóch nieregularnych helis (Ryc. 2). Mniejsza z nich jest równoległa do h21. Dłuższa skierowana jest do dołu podjednostki i tworzy wraz z ES3 lewą stopę, charakterystyczną wyłącznie dla organizmów eukariotycznych (por. Ryc. 1). Sekwencja wstawiona ES3 ma 120 nukleotydów długości i zlokalizowana jest w h9 [7,9,14], natomiast ES2 (około 20 nt) występuje w miejscu połączenia helis h7 i h8. W 18S rRNA *T. cruzi* wykazano obecność sekwencji wstawionej ES7 (147 nt) w h26 [9]. ES7, w połączeniu z fragmentem ES6, tworzy u *T. cruzi* strukturę nazwaną wieżyczką (ang. *turret*) po bocznej stronie małej podjednostki. Wieżyczka jest zakończona ostrą spiralą nazwaną iglicą (ang. *spire*) i bierze udział w tworzeniu kontaktu RNA-RNA z podjednostką 60S. W helisach h39 i h41 stwierdzono występowanie krótkich (około 20 nt) sekwencji wstawionych ES9 i ES10 [7,9], których obecność wpływa na strukturę wierzchołka podjednostki 40S. W obrębie h44 występuje sekwencja wstawiona ES12, co ma swoje od-

zwierciedlenie w długości h44, wynoszącej 103 nt u *E. coli*, 113 nt u *T. cruzi* oraz 129 nt u *S. cerevisiae*.

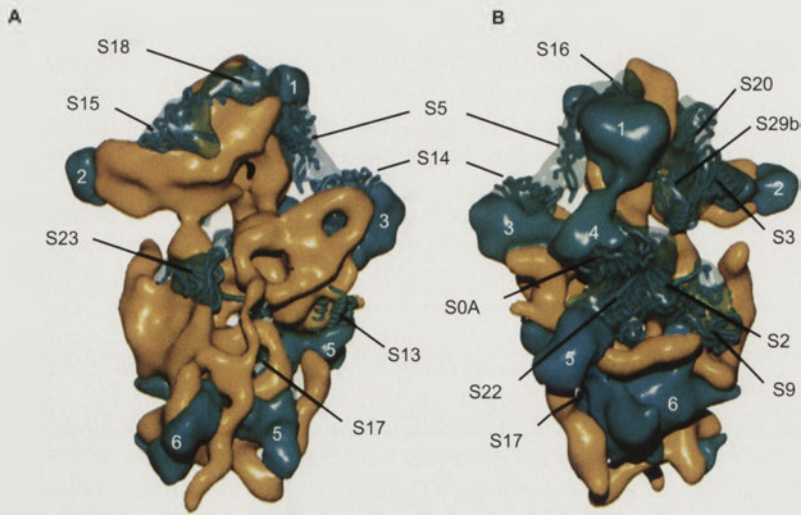
Największe różnice strukturalne pomiędzy 30S i 40S widoczne są w trzech regionach podjednostki: w obrębie ramienia, dziobu oraz podstawy (Ryc. 1 C-D). W uformowaniu ramienia biorą udział helisy h16 i h17. W podjednostce 30S h16 jest bardziej zwinięta, a h17 biegnie równoległe w stosunku do długiej osi podjednostki ku dołowi podstawy [1,26]. W podjednostce *S. cerevisiae* i u ssaków h16 jest obrócona w kierunku boku podjednostki i wystaje ponad powierzchnię rybosomu [11], a h17 jest krótsza i mniej więcej w połowie następuje jej ostry zwrot. Te różnice między podjednostkami 30S i 40S w obrębie ramienia mogą odgrywać ważną rolę w odmiennym mechanizmie inicjacji translacji u organizmów pro- i eukariotycznych [27]. Zasadnicze różnice między małą podjednostką prokariotyczną i eukariotyczną stanowi również pozycja i kształt dziobu, który jest uformowany przez h33 (Ryc. 1 C-D). Helisa h33 jest dłuższa w 18S rRNA niż w 16S rRNA, przez co cały dziób jest wydłużony [11]. Różnice pomiędzy 30S i 40S widoczne są również w ułożeniu dolnej części podstawy. W przypadku eukariotycznych rybosomów jest ona przesunięta w stronę ramienia.

### Białka małej podjednostki rybosomalnej

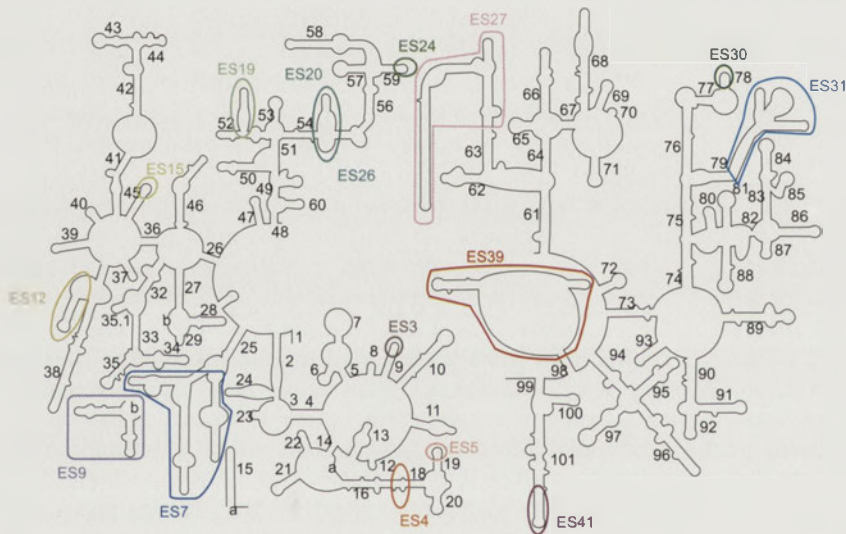
W małej podjednostce rybosomu drożdżowego znaleziono trzydzieści dwa białka (S0-S31) [11], z czego piętnaście posiada swoje homologi w rybosomie bakteryjnym. Poza białkami, które posiadają swoje prokariotyczne odpowiedniki, w strukturze rybosomu *S. cerevisiae* zidentyfikowano osiem regionów, w których występują dodatkowe, nie scharakteryzowane dotychczas białka. Większość z nich położona jest po zewnętrznej stronie podjednostki (Ryc. 3). Dwa zgrupowania białek umieszczone są w rejonie wierzchołka oraz wchodzą w skład dzioba (oznaczone jako 1 i 2 na Ryc. 3). Kolejne klastry białek znajdują się: w górnej części platformy, w rejonie otaczającym białko S14 (oznaczony jako 3 na Ryc. 3), w rejonie otaczającym białko S0A w miejscu, gdzie w rybosomach prokariotycznych znajduje się białko S16 (oznaczony jako 4 na Ryc. 3) oraz po stronie oddziaływania podjednostek, na dole prawej i lewej stopy (oznaczone jako 5 i 6 na Ryc. 3). Klastr białek zlokalizowany w obrębie lewej stopy ma podobną pozycję jak prokariotyczne białko S20, dla którego nie znaleziono homologu eukariotycznego.

Ostatnio zidentyfikowano dodatkowe białko występujące jedynie na rybosomie eukariotycznym, nazwane RACK1 (ang. *receptor for activated C kinase*) [12]. Jest ono obecne we wszystkich poznanych dotąd strukturach cryo-EM rybosomów eukariotycznych i służy jako rusztowanie dla szerokiej gamy kinaz i receptorów związanych z błonami komórkowymi. Przypuszcza się, że pełni funkcję podczas regulacji inicjacji translacji.

Rola, jaką odgrywają białka rybosomalne małej podjednostki została poznana jedynie dla kilku cząsteczek (Tabela 1). Wiadomo, że niektóre z nich pełnią funkcje podczas składania podjednostek, natomiast ich udział w funkcjonowaniu dojrzałego rybosomu nie jest znany. Przypuszcza



Rycina 3. Położenie białek w małej podjednostce rybosomu drożdży [11]. A – widok od strony oddziaływania podjednostek; B – widok od strony zewnętrznej. Białka homologiczne z białkami Prokaryota oznaczono nazwami (S0A-S29b). Białka, dla których nie znane są homologi prokaryotyczne oznaczono kolorem turkusowym i cyframi 1-6.



Rycina 4. Struktura II-rzędowa 26S rRNA *Oryza sativa* [56], numer M16845). Zaznaczono poszczególne helisy (liczby 1-101) oraz sekwencje wstawione (ES3-ES39).

się, że białka te odgrywają rolę w utrzymaniu stabilności rybosomu [28]. Białko S0 bierze udział w przyłączaniu czynnika inicjacyjnego translacji eIF3 do małej podjednostki rybosomalnej; białka S2, S9 i S28 są ważne dla utrzymania dokładności i wierności procesu translacji; natomiast białka S10, S26, S3, S0, S15 i S2 bezpośrednio uczestniczą

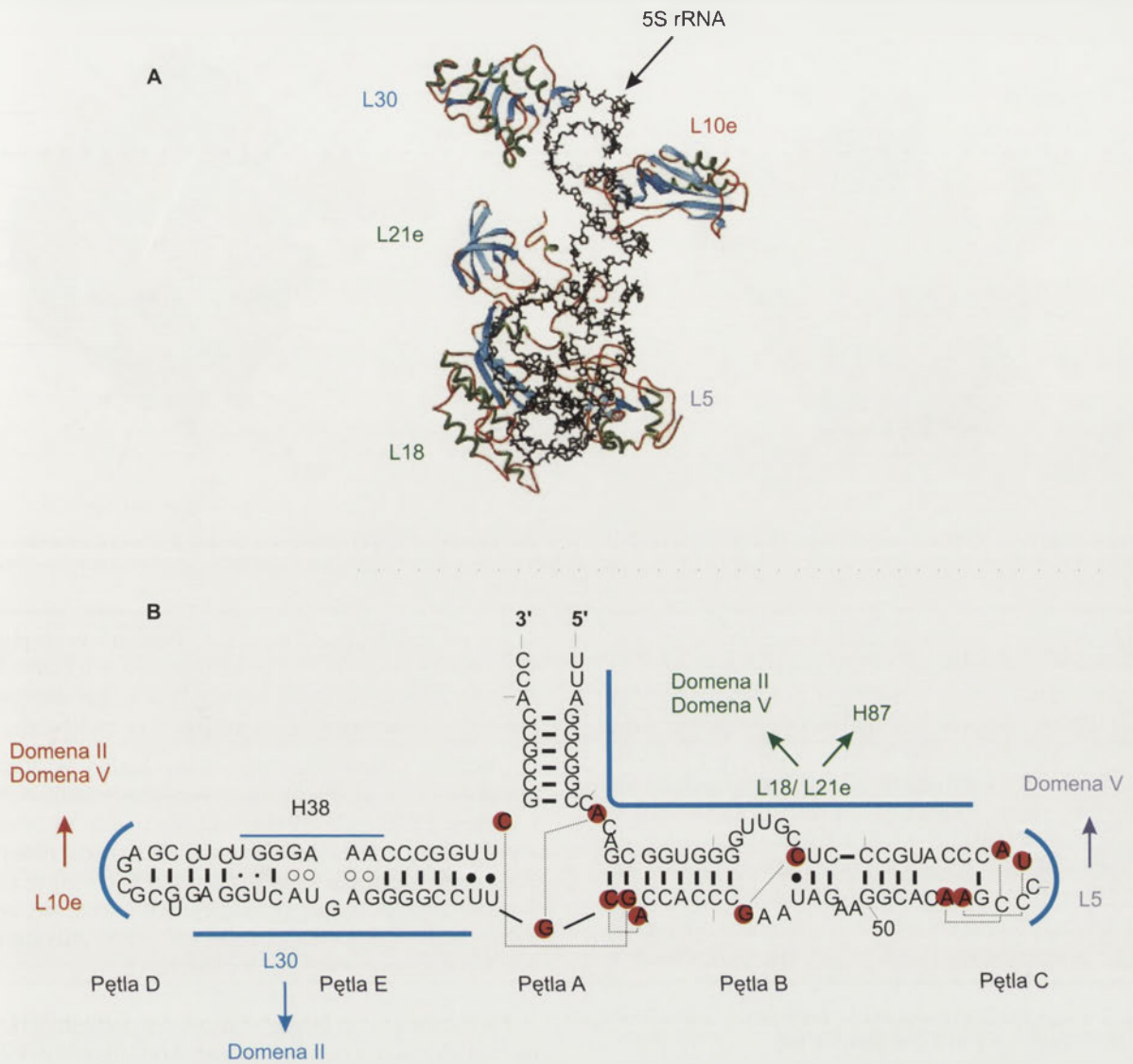
w transporcie 18S rRNA podczas procesu jego dojrzewania. Duża podjednostka składa się z czterech podstawowych elementów (Ryc. 1E-F): podstawy (ang. *body*), stanowiącej dolną część podjednostki oraz trzech wypukłości w górnej części, opisywanych jako: (1) wypukłość centralna (ang. *central protuberance*), (2) boczna wypukłość białka L1 (ang. *L1 protuberance*) i (3) boczna wypukłość zwana kciukiem (ang. *stalk*) lub słupkiem białek P. Słupek kwaśnych białek P jest odpowiednikiem wypukłości L7/L12 znajdującej u organizmów prokaryotycznych, a jego nazwa pochodzi od stwierdzonej *in vivo* fosforylacyjnej modyfikacji w obrębie C-końca znajdujących się tam białek [20]. W dolnej części 60S po jej zewnętrznej stronie istnieje jedyny niesfałdowany fragment podjednostki. Jest to tzw. płaska powierzchnia rybosomu (FRS, ang. *flat ribosomal surface*), która praktycznie nie istnieje w rybosomie prokaryotycznym, a która służy do dokowania w siateczce śródplazmatycznej [8].

#### rRNA dużej podjednostki rybosomalnej

Na część rybonukleinową dużej podjednostki 60S *S. cerevisiae* składają się: 25S rRNA (3392 nt), 5S rRNA (121 nt) oraz 5.8S rRNA (158 nt), który jest homologiczny do części 5' prokaryotycznego 23S rRNA [11,29]. Długość rRNA dużej podjednostki rybosomu jest uwarunkowana obecnością charakterystycznych tylko dla Eukaryota sekwencji wstawionych (Ryc. 4). W obrębie helisy H9, H18 i H19 zauważono 60 dodatkowych nukleotydów (sekwencje wstawione ES3, ES4 i ES5). Kilka sekwencji wstawionych tworzy wypukłość pod słupkiem białek P (por. Ryc. 1E-F). Są to: ES7 w helisie H25 o długości od 400 do 760 nt; ES15 o długości około 100 nt w helisie H45 oraz dwie mniejsze sekwencje wstawione, ES9 i ES12, ulokowane z tyłu centralnej wypukłości. ES9 w helisie H34 ma długość około 30-50 nt. ES12 występuje w H38, ma 90 nukleotydów długości w przypadku rybosomów szczura [8], a jej apikalna pętla oddziałuje z białkiem wiążącym 5S RNA (L15) w obrębie sekwencji specyficznej w tym białku jedynie dla Eukaryota [11]. Duże dodatkowe sekwencje obserwowano w helisach: H63 (ES27, około 560 nt), H98 (ES39 – ok. 200 dodatkowych nt) oraz H79 (ES31 – około 65 nt).

Tabela 1. Rybosomalne białka małej podjednostki o znanych funkcjach [79,80].

Białko rybosomalne	Proponowana funkcja
S1	niespecyficzne wiązanie mRNA
S3, S4, S5	tworzenie części tunelu wejścia mRNA, możliwe działanie jako helikaza mRNA
S4	utrzymywanie wierności translacji
S7, S11	wiązanie mRNA i tRNA w rybosomalnym miejscu E
S9, S13	oddziaływania z tRNA w miejscu P
S12	odczytywanie drugiej i trzeciej pozycji kodonu tRNA w miejscu A



**Rycina 5.** Struktura 5S rRNA dużej podjednostki rybosomalnej *H. marismortui* [30]: A – struktura III-rzędowa 5S rRNA w kryształowej podjednostce 50S wraz z oddziałującymi białkami; B – struktura II-rzędowa 5S rRNA; zaznaczono poszczególne helisy oraz pętle.

Mniejsze sekwencje wstawione, długości około 30-50 nukleotydów, zidentyfikowano w obrębie helisy: H52 (ES19), H54 (ES20 i ES26), H59 (ES24), H78 (ES30) oraz H101 (ES41) [10,11,14].

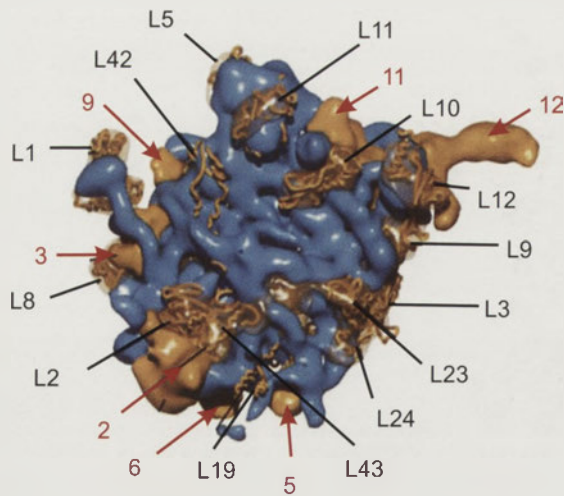
Najmniejszym komponentem rRNA dużej podjednostki, obecnym we wszystkich rybosomach, jest 5S rRNA (Ryc. 5). Jest to cząsteczka o długości około 120 nukleotydów i masie ok. 40 kDa [30]. W przypadku bakterii cząsteczka 5S rRNA wraz z białkami L5, L18 i L25 tworzy centralną wypukłość dużej podjednostki rybosomalnej. Funkcje, które pełni cząsteczka 5S rRNA w rybosomie zarówno pro-, jak i eukariotycznym, pozostaje nadal niewyjaśniona [31,32], jednakże sugeruje się, że w rybosomach 70S może ona działać jako przekaźnik sygnału pomiędzy centrum peptydylotransferazowym rybosomu a domeną II L-rRNA, odpowiedzialną za proces transportu [33]. Inne proponowane funkcje 5S rRNA miałyby polegać na utrzymywaniu stabilności dużej podjednostki rybosomalnej [34] oraz, poprzez oddziaływania 5S rRNA z helisami H42, H39 i H89, wpływaniu na strukturę miejsc wiązania czynników elongacyjnych w 60S [35].

Struktura 5S rRNA jest wysoce zachowawcza u wszystkich znanych organizmów [36-39]. Składa się na nią pięć regionów dwuniciowych: (helisy H I – H V), dwie apikalne pętle (C, E), dwie pętle wewnętrzne (B, D) oraz region zawiasowy (A) [30]. Najbardziej znaczące różnice między 5S rRNA pochodzącym z Eubakterii i Archebakterii lub Eukaryota występują w obrębie pętli wewnętrznej E. W przypadku Eubakterii obie nici tworzące pętle są tej samej długości. Natomiast u Eukaryota i Archebakterii w obrębie nici od strony 5' występuje dodatkowy nukleotyd. Taka asymetria prowadzi do jednonukleotydowego wybrzuszenia. Helisa H II 5S rRNA stanowi miejsce wiązania białek rybosomalnych i czynnika transkrypcyjnego IIIA (TFIIIA).

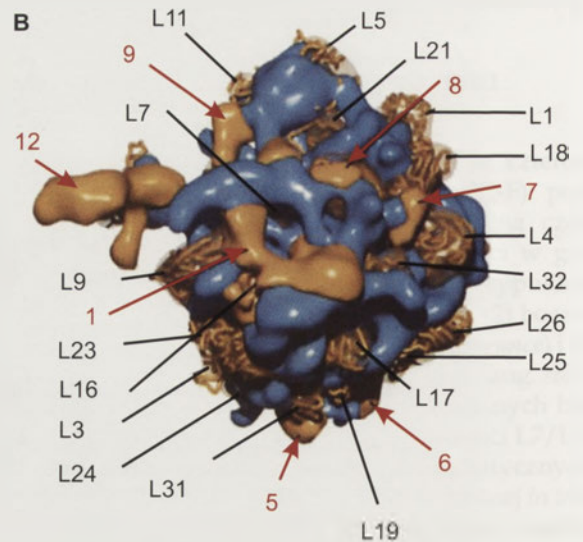
#### Białka dużej podjednostki rybosomalnej

W strukturze dużej podjednostki rybosomalnej 60S *S. cerevisiae* znaleziono 45 białek, z czego 28 posiada swoje homologi w organizmach prokariotycznych, a 19 jest zachowanych ewolucyjnie we wszystkich trzech królestwach organizmów żywych (Ryc. 6). Poza białkami, które posiadają

A



B



Rycina 6. Położenie białek w dużej podjednostce rybosomu drożdżowego [11]. A – widok od strony oddziaływania podjednostek; B – widok od strony zewnętrznej. Białka homologiczne z białkami Prokaryota oznaczono nazwami (L1-L43). Białka, dla których nie znane są homologi prokariotyczne oznaczono kolorem żółtym i cyframi 1-12.

swoje prokariotyczne odpowiedniki, w strukturze rybosomu *S. cerevisiae* zidentyfikowano dwanaście regionów zawierających dodatkowe, niescharakteryzowane dotychczas białka [11]. Duże zgrupowanie białek wchodzące w skład rozciągniętego słupka zostało zidentyfikowane jako kompleks P0/P1/P2 (oznaczone jako 12 na Ryc. 6), odpowiednik bakteryjnego kompleksu L10(L7/L12)<sub>4</sub> [19,20,40-42]. Co interesujące, słupek białek P posiada boczny płat, który ulokowany jest w bliskiej odległości od N-końcowej domeny białka L12. Dokładnie w tej pozycji występują w rybosomie eukariotycznym oddziaływania z czynnikiem elongacyjnym eEF2. Oddziaływania takie nigdy nie były obserwowane w przypadku kompleksu 70S/EF-G *E. coli* (czynnik elongacyjny EF-G spełnia taką samą funkcję u Prokaryota, jak czynnik elongacyjny eEF2 u Eukaryota).

Po zewnętrznej stronie podjednostki 60S również zidentyfikowano dodatkowe grupy nieznanymi białek. Znajdują się one w bliskim sąsiedztwie białek L9 i L16 (oznaczone jako 1 na Ryc. 6), poniżej białka L18 (oznaczone jako 7 na Ryc. 6) oraz poniżej L21 (oznaczone jako 8 na Ryc. 6). Natomiast po stronie oddziaływania podjednostek niescharakteryzowane białka eukariotyczne występują w następujących regionach: poniżej białka L2 (oznaczone jako 2 na Ryc. 6), w niedalekiej odległości od L8, poniżej L1 (oznaczone jako 3 na Ryc. 6), poniżej L11 w pobliżu L42 (oznaczone jako 9 na Ryc. 6) oraz powyżej białka

L 10 (oznaczone jako 11 na Ryc. 6). Ponadto, w obrębie podstawy podjednostki 60S, w regionie otaczającym białko L19, znajdują się dwa dodatkowe klastry białek charakterystycznych tylko dla Eukaryota (oznaczone jako 5 i 6 na Ryc. 6)

Ostatnio zidentyfikowano nowe białko występujące jedynie w dużej podjednostce rybosomów eukariotycznych, nazwane PS1D [43]. Wykazano, że białko to powszechnie występuje w rybosomach ssaczy, jednak nie obserwowano homologicznego białka w przypadku *S. cerevisiae* czy *Caenorhabditis elegans*. Na tej podstawie wnioskuje się, że rybosomalne białko PS1D jest charakterystyczne jedynie dla wyższych organizmów eukariotycznych.

Podobnie jak w przypadku małej podjednostki rybosomalnej, dokładną rolę białek poznano jedynie w kilku przypadkach (Tabela 2). Białka L1 oraz L16/L27 pełnią funkcję w uwalnianiu i wiązaniu cząsteczki tRNA do rybosomu [28]. Białka L4 i L22 biorą udział w tworzeniu ścian tunelu wejścia mRNA. Ponadto, sugeruje się oddziaływanie L22 z nowo utworzonym łańcuchem peptydowym i regulację syntezy poszczególnych białek, a także wpływ L9 na stabilność cząsteczki tRNA oraz translokację mRNA.

#### ODDZIAŁYWANIA POMIĘDZY PODJEDNOSTKAMI RYBOSOMU EUKARIOTYCZNEGO

Dla prawidłowego działania rybosomu, niezbędna jest komunikacja między małą i dużą podjednostką. Dla przykładu, sygnały z centrum dekodującego małej podjednostki do centrum peptydylotransferazowego dużej podjednostki mogą być

Tabela 2. Rybosomalne białka dużej podjednostki o znanych funkcjach [79,80].

Białko rybosomalne	Proponowana funkcja
L5	oddziaływanie z tRNA w miejscu P oraz 5S rRNA
L9	wpływ na efektywność biosyntezy białka
L11	sugerowany udział w procesie translokacji
L16 (L10e)	prawidłowe umiejscowienie domeny akceptorowej tRNA w miejscu A oraz P; oddziaływanie z czynnikiem odzyskującym rybosomu (RRF, ang. <i>ribosome recycling factor</i> )
L4/L22	regulacja translacji poprzez oddziaływanie z nowo zsyntetyzowanym polipeptydem
L23/L24	obecne w tunelu wyjścia polipeptydu
L27	oddziaływanie z domeną akceptorową tRNA w miejscu P oraz z RRF
L29	ulokowane w sąsiedztwie tunelu wyjścia polipeptydu; sugeruje się udział w tworzeniu miejsca wiązania cząsteczki SRP (SRP, ang. <i>signal recognition particle</i> )



przekazywane przez ligandy, które oddziałują z obydwoma regionami (np. poprzez cząsteczki tRNA) lub poprzez specyficzne oddziaływania między podjednostkami, zwane mostkami. Zarówno w rybosomach pro-, jak i eukariotycznych istnieją trzy rodzaje tego typu oddziaływań: RNA-RNA, RNA-białko oraz białko-białko. Tak w rybosomach 70S *T. thermophilus* [3], jak i 80S *S. cerevisiae* [11] zaobserwowano, że kontakty RNA-RNA z reguły obejmują oddziaływania małych bruzd dwóch helis RNA, jednak zauważono również występowanie oddziaływań między dużymi bruzdami, pętlami oraz szkieletem dwóch cząsteczek RNA.

W strukturze rybosomu *S. cerevisiae* uwidoczniło się wszystkie mostki, które mają swoje bakteryjne odpowiedniki (B1–B7) oraz nowe mostki charakterystyczne dla rybosomów eukariotycznych (eB8–eB11) [11]. Większość z tych mostków, to oddziaływania między rRNA małej i dużej podjednostki, jednak znaleziono też oddziaływania RNA-białko oraz jeden mostek białko-białko.

Dwa mostki, B1a i B1b, łączą wierzchołek podjednostki 40S z centralną wypukłością 60S [11]. W przypadku B1a występuje różnica między elementami tworzącymi ten mostek u Pro- i Eukaryota. W rybosomie 70S białkowym komponentem tego mostka jest S13, natomiast w 80S – białko S19. Różnica ta ma swoje uzasadnienie, gdyż białko S13 występuje w innej pozycji w rybosomach pro- i eukariotycznych. Mostek B1b to jedyny mostek utworzony wyłącznie przez oddziaływanie białek rybosomalnych. Są to białka: S18 małej podjednostki i L11 dużej podjednostki.

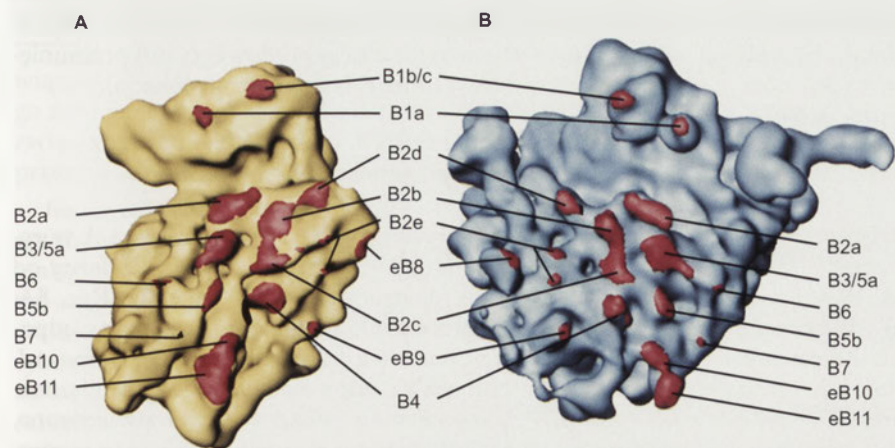
Większość mostków łączących 60S z podstawą i platformą podjednostki 40S leży w przybliżeniu wzdłuż trzech równoległych linii [11]. Mostki leżące na linii najbliższej ramienia 40S lub słupka białek P 60S, to: B2a, B3, B5a, B5b, eB10 i eB11 (Ryc. 7). Mostki B2a, B3 i B5b utworzone są przez oddziaływania między małymi bruzdami helisy h44 18S rRNA a helisami, odpowiednio: H69, H71 i H62 25S rRNA. Mostek B5a powstał dzięki oddziaływaniom pomiędzy h44 18S rRNA i białkiem L23 podjednostki 60S. Nieco poniżej znajduje się mostek B7 (oddziaływania h44

18S rRNA z białkiem L24 podjednostki 60S). Mostek B7 w rybosomie 70S (gdzie nazwano go mostkiem B6) jest tworzony przez białko L19 ze względu na fakt, że białko L24 nie posiada homologu w 70S [3].

Kierując się w dół hipotetycznej linii łączącej mostki, znajdujemy mostki eB10 i eB11 (Ryc. 7), które są najsilniejszymi oddziaływaniami w rybosomie *S. cerevisiae*. eB10, utworzony jest przez oddziaływanie RNA-RNA pomiędzy h11 18S rRNA i H65 25S rRNA. Sugeruje się również udział nieznanego u Prokaryota białka w tworzeniu tego mostka, co tłumaczyłoby dlaczego oddziaływanie to jest obserwowane tylko u organizmów eukariotycznych [11]. eB11 jest utworzony przez oddziaływanie między h9 18S rRNA i sekwencją wstawioną ES 41 w helisie H101 25S rRNA. Również w tym mostku bierze udział białko specyficzne tylko dla Eukaryota [11].

Mostki B2b, B2c oraz B4 leżą wzdłuż środkowej linii wyznaczającej ułożenie mostków w rybosomie 80S (Ryc. 7). W tworzeniu mostka B2b biorą udział helisy h24 oraz h45 18S rRNA a także H68 25S rRNA. Mostek B2c jest tworzony przez helisę h27 18S rRNA oraz H62 25S rRNA. B4 został wcześniej zidentyfikowany u *T. thermophilus* [3], jako kontakt RNA-białko między S13 małej podjednostki oraz H34 23S rRNA. W przypadku *S. cerevisiae* mostek ten jest również tworzony przez S13 i H34, jednak wydaje się angażować również dodatkowe oddziaływania H34 z helisami h10 i h11 18S rRNA [11].

Trzecia linia wyznaczająca położenie mostków zawiera B2d, B2e oraz eB9 (Ryc. 7). B2d jest tworzony w wyniku oddziaływań h23 18S rRNA w części platformy 40S z małą bruzdą H68 25S rRNA. B2e został wcześniej zidentyfikowany w rybosomach *E. coli* [26], jako mostek B8. B2e jest kontaktem typu RNA-białko, którego częścią białkową jest L2 [11,26], a w przypadku drożdży – również L43. Komponentem pochodzącym z podjednostki 40S są helisy h22 i h23 18S rRNA [11]. Natomiast mostek eB9 jest tworzony przez elementy nieobecne w rybosomie 70S. Sugeruje się, że jest to białko specyficzne dla podjednostki 60S Eukaryota oraz sekwencją wstawioną w 18S rRNA [11].



**Rycina 7.** Umieszczenie mostków między podjednostkami 40S i 60S w rybosomie 80S *S. cerevisiae* [11]. Mała podjednostka 40S (A) oraz duża podjednostka 60S (B) ukazane zostały od strony oddziaływania podjednostek. Mostki między podjednostkami oznaczono kolorem czerwonym. Mostki występujące u Prokaryota oznaczono B1–B7, dodatkowe mostki występujące jedynie u Eukaryota oznaczono eB8–eB11.

Po najbardziej zewnętrznej stronie powierzchni oddziaływania podjednostek znajdują się dwa kolejne mostki, B6 oraz eB8 (Ryc. 7). B6 jest kontaktem między h14 18S rRNA i białkiem L23 60S [10,11]. Natomiast mostek eB8 jest ulokowany nieco poniżej wypukłości L1 i tworzony jest przez oddziaływanie między białkiem specyficznym dla eukariotycznej 40S i sekwencją wstawioną w helisie H79 25S rRNA. Ze względu na to, że H79 ułożona jest warstwowo nad helisą H76 tworzącą wypukłość L1, mostek eB8 może odgrywać ważną rolę w zmianach konformacyjnych w obrębie wypukłości L1 [10,11].

## FUNKCJA RYBOSOMU W BIOSYNTEZIE BIAŁKA

### INICJACJA PROCESU BIOSYNTETY BIAŁKA

Inicjacja procesu translacji jest złożonym procesem, w którym cząsteczka inicjatorowego tRNA oraz podjednostki rybosomalne 40S i 60S są składane przy udziale czynników inicjatorowych (eIFs, ang. *eukaryotic initiation factors*) w rybosom 80S. W biosyntezie białka organizmów prokariotycznych biorą udział trzy czynniki inicjatorowe: IF1, IF2 i IF3, natomiast u organizmów eukariotycznych wyróżnia się ich aż 11 [44]. Proces biosyntezy białka rozpoczyna selekcja inicjatorowego tRNA z puli elongacyjnych cząsteczek tRNA przez eIF2. Następnie ma miejsce utworzenie kompleksu potrójnego eIF2/GTP/Met-tRNA<sub>i</sub>, który przyłącza się do małej podjednostki przy udziale eIF1A oraz eIF3 [44]. Czynniki eIF3 oddziałuje bezpośrednio z 40S poprzez jedną z dwunastu podjednostek – eIF3j [45] i stymuluje tworzenie kompleksu preinicjatorowego 43S [46].

43S łączy się z mRNA, najczęściej poprzez wstępne rozpoznanie struktury czapeczki (<sup>m</sup>G ang. *cap*, ) na końcu 5' mRNA przez kompleks wiążący się z czapeczką (ang. *cap-binding complex*), eIF4F [47]. eIF4F składa się z białka wiążącego czapeczkę (eIF4E), helikazy RNA zależnej od ATP (eIF4A) oraz dużego białka modulatorowego, eIF4G. Czynniki eIF4G służy jako „rusztowanie”, którego N-koniec oddziałuje z PABP (ang. *PolyA Binding Protein*), białkiem mającym powinowactwo do poliadenylowego odcinka na końcu 3' mRNA, co powoduje zbliżenie obu końców mRNA i utworzenie struktury pseudokolistej. eIF4G oddziałuje również z czynnikiem eIF3, który z kolei wiąże się z podjednostką 40S [44].

Następnie ma miejsce proces zwany skanowaniem rybosomalnym (ang. *ribosomal scanning*), w którym kompleks 43S przesuwa się wzdłuż mRNA w poszukiwaniu kodonu inicjatorowego (najczęściej jest nim pierwszy tryplet AUG). Mechanizm skanowania nie jest w pełni poznany. Wiadomo, że podczas tego procesu może dochodzić do rozplatania struktur drugorzędowych typu spinki do włosów (ang. *hairpin*) w regionie 5' mRNA nie ulegającym translacji (UTR, ang. *untranslated region*), których energia swobodna jest niższa od wartości -50 do -60 kcal/mol. Proces ten jest zależny od ATP, jednak nie wiadomo, czy hydroliza ATP jest niezbędna do ruchu podjednostki 40S czy też do rozplatania struktury mRNA. Najnowsze doniesienia wskazują, że w procesie skanowania biorą udział eIF4F oraz eIF1 [48].

Po rozpoznaniu kodonu inicjatorowego, następuje utworzenie wiązania typu Watson-Crick z komplementarnym antykodonom cząsteczki inicjatorowego tRNA. W ten sposób powstaje kompleks preinicjatorowy 48S. Zasadniczą rolę podczas selekcji kodonu inicjatorowego odgrywają eIF1, eIF2 oraz eIF5 [49]. Czynniki eIF5 stymuluje hydrolizę GTP związanego z eIF2 [50]. Następnie kompleks GDP/eIF2 i pozostałe czynniki z kompleksu 48S ulegają oddysocjowaniu i następuje przyłączenie podjednostki 60S przy udziale eIF5B [51]. W rezultacie utworzony zostaje rybosom 80S z cząsteczką Met-tRNA<sub>i</sub> przyłączoną w miejscu P.

Podczas inicjacji translacji, niezbędna jest pula samodzielnie występujących podjednostek 40S i 60S, aby umożliwić związanie czynników inicjatorowych. Dlatego też po każdym cyklu biosyntezy białka rybosomy 80S ulegają dysocjacji do podjednostek i są chronione przed ponownym niespecyficznym zasocjowaniem. Sugeruje się udział eIF3 oraz eIF1 w tych procesach [52].

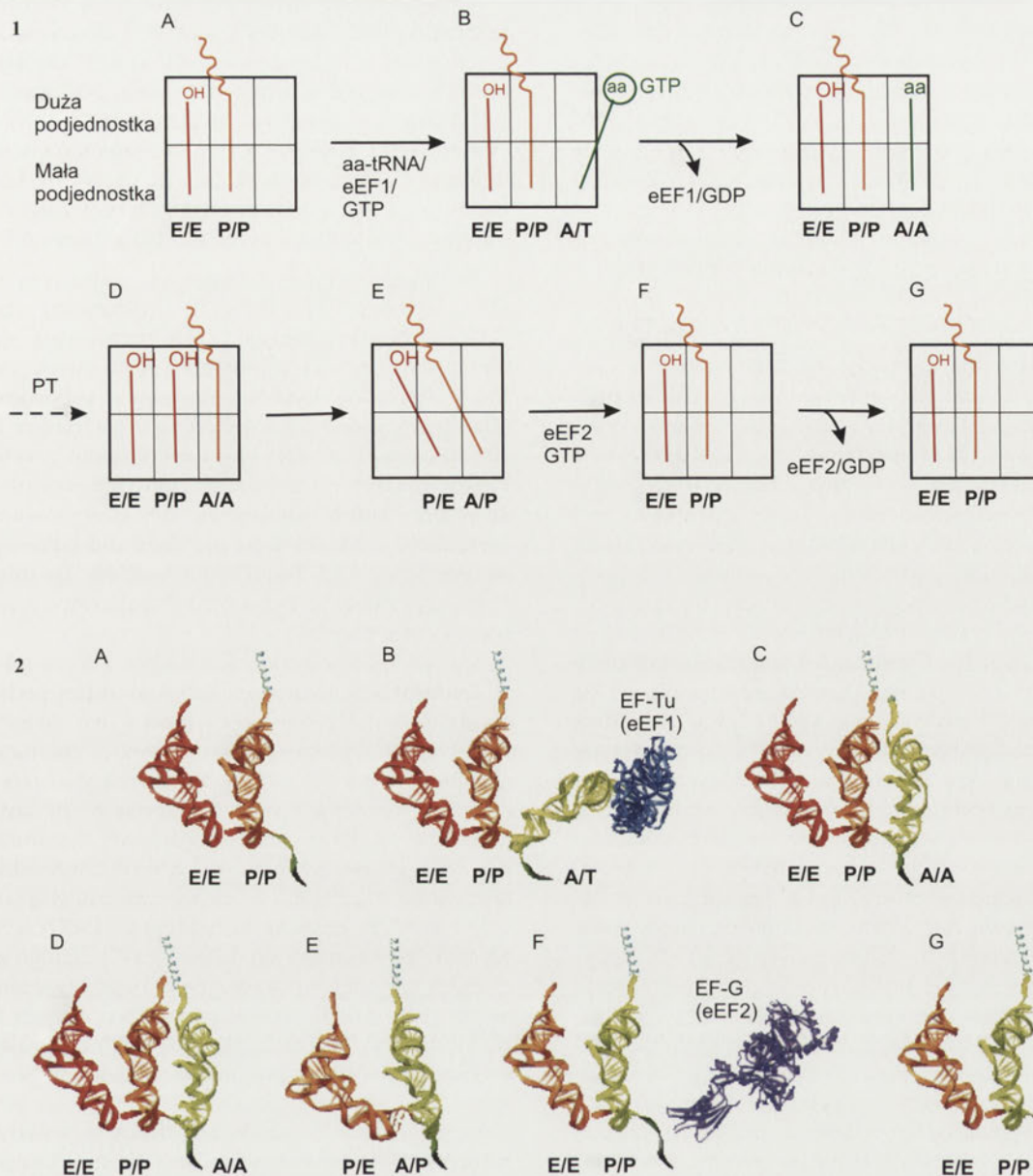
### ELONGACJA PROCESU BIOSYNTETY BIAŁKA

Elongacja procesu biosyntezy białka w ogólnym zarysie zachodzi w ten sam sposób u organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych. Zarówno w rybosomach 70S [3,26], jak i 80S [10,11] uwidoczono trzy zasadnicze miejsca wiązania cząsteczek tRNA podczas biosyntezy białka: miejsce A – wiązania aminoacylo-tRNA (AA-tRNA), miejsce P – wiązania peptydylo-tRNA (P-tRNA) oraz miejsce E, tzw. miejsce wyjścia (ang. *exit site*), wiążące deacylowany tRNA (D-tRNA). Dzięki dowodom potwierdzającym istnienie dodatkowych miejsc wiązania, A/P oraz P/E [53], oraz więcej niż jednego miejsca E [54], zaproponowano istnienie kilku (siedmiu lub więcej) miejsc wiązania tRNA w rybosomie prokariotycznym. Dziś przyjmujemy, że najbardziej prawdopodobnym modelem elongacji biosyntezy białka jest model hybrydowy (ang. *hybrid-site model*, [55]) (Ryc. 8), który został udowodniony w komórkach prokariotycznych, jednak ze względu na wysokie podobieństwo strukturalne funkcjonalnych części rybosomów 70S i 80S [56], przyjmuje się, że model ten obowiązuje również komórki eukariotyczne. W głównych założeniach modelu hybrydowego w rybosomie podczas elongacji istnieją stany pośrednie, w których dwa końce tRNA mogą znajdować się w różnych miejscach podjednostek. Oznacza to, że tRNA może równocześnie zajmować, na przykład, miejsce A w małej podjednostce i miejsce P dużej podjednostki, tj. antykodon tRNA oddziałuje z kodonem mRNA w miejscu A małej podjednostki, podczas gdy koniec akceptorowy tRNA znajduje się w miejscu P dużej podjednostki [57]. Taki stan może powstać wskutek przechylenia się cząsteczek tRNA lub ruchu dużej podjednostki względem małej.

W trakcie elongacji łańcucha polipeptydowego w rybosomie mają miejsce trzy główne procesy: (i) rozpoznanie mRNA – tRNA poprzez oddziaływanie kodon – antykodon; (ii) utworzenie wiązania peptydowego; (iii) przesunięcie tRNA i mRNA wzdłuż rybosomu (translokacja).

#### Rozpoznanie mRNA – AA-tRNA poprzez oddziaływanie kodon-antykodon

Pierwszym etapem elongacji jest zajęcie miejsca A w rybosomie przez aminoacylo-tRNA. Jest to proces zależny od obecności czynnika elongacyjnego eEF1 i GTP (Ryc. 8A, [59]). Czynniki eEF1 (podobnie jak jego prokariotyczny odpowiednik, EF-Tu) składa się z trzech domen [59]. Domena I, nazywana też domeną G, odpowiedzialna jest za wiązanie GTP lub GDP. U organizmów eukariotycznych stwierdzono, że domena G posiada duże sekwencje wstawione w porównaniu do czynnika EF-Tu, jednak żadna z nich nie wpływa zasadniczo na funkcjonowanie eEF1. eEF1 tworzy kompleks potrójny z GTP i AA-tRNA, ochraniając przed hydrolizą



**Rycina 8.** Translokacja tRNA podczas elongacji biosyntezy białka [55]: 1 – Schemat przedstawiający główne etapy cyklu translokacji (A-G) według modelu hybrydowego. Rybosom jest przedstawiony jako kwadrat i podzielony na podjednostki oraz na miejsca A, P i E. tRNA przedstawiono jako linie pionowe. PT oznacza transfer reszty peptydylowej; 2 – Trójwymiarowy obraz głównych etapów cyklu translokacji według modelu hybrydowego (A-G jak w 1). Zaznaczono cząsteczki tRNA i EF. W nawiasach podano eukariotyczne odpowiedniki prokariotycznych czynników elongacyjnych.

wiązanie estrowe i dostarczając AA-tRNA do rybosomalnego miejsca A/T (Ryc. 8B). Miejsce T określa położenie nowo związanego AA-tRNA, kiedy ten jest jeszcze utrzymywany przez czynnik EF-Tu (eEF1 u Eukaryota) [55].

Rozpoznanie komplementarnego kodonu mRNA przez antykonon AA-tRNA zachodzi w centrum dekodującym małej podjednostki rybosomu. U Prokaryota wykazano, że ten etap przebiega przez wiele stanów pośrednich [60] i prowadzi do przesunięcia cząsteczki AA-tRNA w miejsce A/A rybosomu (Ryc. 8C). Utworzenie odpowiedniego dupleksu kodon-antykonon powoduje zmiany konformacji zasad A1492, A1493 oraz G530 w 16S rRNA rybosomów prokariotycznych [61] oraz 18S rRNA rybosomów eukariotycznych [17]. Stwierdzono, że tworzenie stabilnego kompleksu jest preferowane, kiedy w pozycji 37 antykononu cząsteczki tRNA znajduje się reszta purynowa [62].

Oddziaływanie kodon-antykonon jest sygnałem aktywującym centrum GTPazowe znajdujące się w dużej podjednostce rybosomu. Następujące wówczas lokalne zmiany strukturalne w centrum dekodującym powodują globalne zmiany małej podjednostki, która zmienia konformację z otwartej na zamkniętą [63]. Hydroliza GTP prowadzi do powstania GDP i nieorganicznego fosforanu Pi w miejscu aktywnym czynnika eEF1. Uwolnienie AA-tRNA z kompleksu eEF1/GDP najprawdopodobniej ma miejsce podczas zmiany konformacji czynnika eEF1. Wiadomo, że u Prokaryota do uwolnienia GDP, Pi i AA-tRNA wymagana jest reorientacja w obrębie domeny I i II czynnika EF-Tu [64].

Po hydrolizie GTP cząsteczka AA-tRNA ulega przesunięciu o ok. 70 Å od miejsca wiązania z czynnikiem eEF1 do centrum peptydylotransferazowego rybosomu (PTC,

ang. *peptidyltransferase center*). Akomodacja AA-tRNA o odpowiednim antykodonie (komplementarnym do kodonu mRNA) w PTC przebiega w sposób szybki i efektywny. Natomiast AA-tRNA o antykodonie podobnym (częściowo komplementarnym) są odrzucane z PTC ze względu na niską stabilność wiązania z mRNA. Proces ten nazywa się selekcją korekcyjną. Po przesunięciu cząsteczki AA-tRNA do miejsca P może dochodzić do przyłączania kolejnej cząsteczki AA-tRNA do miejsca A. W ten sposób w rybosomie znajdują się substraty do syntezy wiązania peptydowego.

### Utworzenie wiązania peptydowego w rybosomie

Utworzenie wiązania peptydowego ma miejsce w centrum peptydylotransferazowym rybosomu (PTC). Na podstawie badań struktury atomowej dużej podjednostki rybosomalnej *H. marismortui* stwierdzono, że miejsce aktywne rybosomu jest zbudowane wyłącznie z rRNA – tworzą je nukleotydy centralnej pętli domeny V 23S rRNA otoczonej przez helisy H73, H74, H89, H90 i H93 (patrz Ryc. 4) [1,4-6]. W tych obszarach dużej podjednostki występują zachowane sekwencje rRNA zarówno w rybosomach pro-, jak i eukariotycznych [56], co świadczy o ich zasadniczej funkcji w procesie translacji i o tym, że proces ten przebiega w ten sam sposób w rybosomach 70S i 80S. Pomimo że w pobliżu PTC znajduje się kilka rybosomalnych białek (L2, L3, L4 i L10e), żadne z nich nie znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie centrum aktywnego, aby mogło katalizować syntezę wiązania peptydowego. Pełnią one raczej funkcję stabilizującą, utrzymując odpowiednią strukturę trzeciorzędową rRNA.

Utworzenie wiązania peptydowego to wynik reakcji między grupą  $\alpha$ -aminową AA-tRNA, znajdującego się w miejscu A, a grupą karboksylową peptydylotRNA (P-tRNA) w miejscu P. To niezwykle precyzyjne zagadnienie zostało omówione w naszym wcześniejszym artykule [66]. Substraty do utworzenia wiązania peptydowego przyjmują odpowiednią orientację dzięki specyficznym oddziaływaniom między tRNA a rRNA i białkami rybosomalnymi. Zostały one dokładnie opisane dla rybosomów prokariotycznych [67]. Usytuowanie cząsteczki P-tRNA w miejscu P jest stabilizowane głównie poprzez oddziaływania nukleotydów C74 i C75 tRNA z resztami zasad G2253 i G2252 23S rRNA. Zasadnicze znaczenie mają również oddziaływania między A76 tRNA i A2450-C2501 23S rRNA [68]. Natomiast cząsteczka AA-tRNA zawdzięcza odpowiednie położenie w miejscu A przede wszystkim oddziaływaniom nukleotydu C75 z G2553 23S rRNA oraz A76 z U2506-G2583 [68].

### Przesunięcie tRNA i mRNA wzdłuż rybosomu (translokacja)

Po utworzeniu wiązania peptydowego w rybosomie znajdują się produkty tej reakcji, czyli deacylowany tRNA w miejscu P oraz peptydylotRNA wydłużony o jeden aminokwas w miejscu A (Ryc. 8E). Rybosomalne miejsce A musi zostać zwolnione, aby mogła związać się kolejna cząsteczka aminoacylotRNA. Następuje wówczas przesunięcie tRNA i mRNA wzdłuż rybosomu, proces zwany translokacją [55].

W pierwszym etapie translokacji, następującym spontanicznie po syntezie wiązania peptydowego, końce akcepto-

rowe D-tRNA i P-tRNA przesuwać się wzdłuż dużej podjednostki rybosomalnej z miejsc A i P do miejsc P i E. P-tRNA znajduje się w hybrydowym stanie A/P, czyli jego część antykodonowa jest w miejscu A małej podjednostki, podczas gdy koniec akceptorowy związany jest z miejscem P dużej podjednostki. D-tRNA w tym samym momencie znajduje się w stanie P/E, co oznacza, że jego część antykodonowa zlokalizowana jest w małej podjednostce w miejscu P, a koniec akceptorowy w dużej podjednostce w miejscu E (Ryc. 8F).

W drugim etapie translokacji, zależnym od czynnika elongacyjnego eEF2 (EF-G u Prokaryota), części antykodonowe obu cząsteczek tRNA przesuwać się względem małej podjednostki z miejsc P i A do miejsc, odpowiednio, E i P (Ryc. 8G). D-tRNA zajmuje w rybosomie miejsce E (stan E/E), natomiast P-tRNA zajmuje miejsce P (stan P/P). Kompleks eEF2/GDP ulega uwolnieniu z rybosomu, który jest gotowy na ponowny cykl elongacyjny. Wykazano, że w przypadku rybosomów 70S, deacylowany tRNA jest uwalniany z miejsca E po przyłączeniu kolejnego kompleksu potrójnego EF-Tu/GTP/AA-tRNA do miejsca A [69]. Przypuszczalnie w rybosomach eukariotycznych ma miejsce taki sam proces.

Translokacja cząsteczek tRNA w dużej podjednostce zachodzi wskutek różnego powinowactwa określonych miejsc rybosomu do poszczególnych stanów chemicznych końca akceptorowego tRNA [55]. Miejsce A w dużej podjednostce rybosomalnej jest specyficzne dla grupy aminoacylowej, miejsce P – dla grupy peptydylowej, natomiast miejsce E dla wolnego, deacylowanego końca 3' cząsteczki tRNA. Taka specyficzność sprawia, że po utworzeniu wiązania peptydowego, kiedy w miejscu A znajduje się P-tRNA, wykazuje on wysokie powinowactwo do miejsca P i dlatego ze względów energetycznych faworyzowane jest jego przesunięcie. Podobne zjawisko ma miejsce w przypadku miejsca P, w którym po utworzeniu wiązania peptydowego znajduje się D-tRNA wykazujący wysokie powinowactwo do miejsca E.

Przemieszczenie cząsteczek tRNA wewnątrz małej podjednostki jest procesem bardziej skomplikowanym ponieważ musi być skoordynowane z przesuwaniami się cząsteczki mRNA. Wymaga obecności czynnika elongacyjnego eEF2 oraz energii w postaci GTP. Mechanizm molekularny katalizacyjnej aktywności eukariotycznego czynnika eEF2 pozostaje nadal niewyjaśniony [16]. Zaobserwowano jednak, że struktura czynnika prokariotycznego EF-G w kompleksie z GDP przypomina kształtem kompleks EF-Tu/GTP/AA-tRNA, dlatego też zaproponowano, że przyłączanie EF-G do rybosomu następuje na zasadzie podobieństwa strukturalnego do kompleksu potrójnego. Zjawisko takie nosi nazwę mimikry molekularnej. Mniej informacji jest dostępnych na temat eukariotycznego czynnika eEF2, jednak zarówno jego struktura krystaliczna [70], jak i model wiązania do rybosomu rozwiązany metodą mikroskopii krioelektronowej [71], wskazują na wiele podobieństw w stosunku do EF-G. Czynniki eEF2 jest dużo większy od odpowiednika bakteryjnego i jego struktura mniej przypomina helisę antykodonową cząsteczki tRNA. Ta obserwacja stawia zatem znak zapytania przy koncepcji mimikry molekularnej, wysuniętej na podstawie podobieństwa czynnika prokariotycznego do kompleksu potrójnego [16].

Sygnałem do terminacji procesu biosyntezy białka i uwolnienia nowo utworzonego łańcucha polipeptydowego jest wystąpienie kodonu STOP w miejscu A rybosomu [72]. Proces terminacji jest uniwersalny i zachodzi w centrum peptydylotransferazowym rybosomu (PTC). Uwolnienie peptydu z P-tRNA jest bezpośrednio wspomagane przez białka nazywane czynnikami uwalniającymi (RF, ang. *release factors*) oraz GTP. U Prokaryota i Eukaryota istnieją dwie klasy czynników uwalniających [73]. Klasa I rozpoznaje kodon STOP w mRNA i katalizuje hydrolizę P-tRNA. Czynniki uwalniające klasy II nie są specyficzne względem kodonów mRNA i wspomagają uwalnianie z rybosomu czynników RF1 w procesie zależnym od GTP. Czynniki uwalniające zostały scharakteryzowane po raz pierwszy u Prokaryota, gdzie dwa podobne białka – RF1 i RF2, funkcjonują jako czynniki klasy I, natomiast strukturalnie niespokrewniony RF3 należy do klasy II. Obydwa czynniki klasy I rozpoznają kodon UAA; UAG jest rozpoznawany wyłącznie przez RF1; a UGA przez RF2. U Eukaryota występują czynniki: eRF1 (rozpoznaje wszystkie trzy kodony STOP) oraz eRF3.

Mechanizm molekularny uwalniania polipeptydu przez czynniki uwalniające nie jest do końca poznany. Postuluje się dwa modele terminacji translacji: zależny od RF oraz zależny od samego rybosomu. Pierwszy z nich jest oparty na zjawisku mimikry molekularnej. Dzięki strukturze krystalicznej ludzkiego eRF1, wykazano podobieństwo strukturalne domen I, II i III do, odpowiednio, pętli antykodonowej, ramienia akceptorowego oraz ramienia T $\Psi$ C cząsteczki tRNA [72]. eRF1 ma w tym przypadku za zadanie koordynowanie i odpowiednie usytuowanie cząsteczki wody w centrum PTC w tej samej pozycji, co grupa aminowa cząsteczki AA-tRNA. W wyniku ataku nukleofilowego cząsteczki wody na wiązanie estrowe P-tRNA w miejscu P uwolniony zostaje łańcuch polipeptydowy z P-tRNA. Zachowana w ewolucji sekwencja czynników uwalniających klasy I, GGQ (glicyna-glicyna-glutamina), znajduje się w takiej pozycji, że sugeruje się jej bezpośredni udział w terminacji [72].

Inne modele terminacji translacji, które bardziej skupiają się na samym rybosomie, przedstawiają reakcję uwalniania peptydu jako zmodyfikowaną wersję reakcji transferu peptydu, podczas której reszta polipeptydowa jest przenoszona na cząsteczkę wody zamiast na grupę aminową AA-tRNA. W takim przypadku RF odgrywa rolę modulatora, zmieniającego aktywność centrum PTC. Zgodnie z wynikami najnowszych badań nad rybosomami prokariotycznymi, ryboza nukleotydu A2602 (numeracja według *E. coli*) jest krytyczna dla wiązania RF1 oraz dla odpowiedniej orientacji RF w PTC, a także może być bezpośrednio związana z katalizą hydrolizy P-tRNA [74,75]. Wiązanie czynnika RF1 w odpowiedzi na występowanie kodonu STOP w rybosomalnym miejscu A powoduje zmianę konformacyjną nukleotydu A2602. Ta reorientacja powoduje umiejscowienie A2602 w pozycji, w której reaktywne grupy tego nukleotydu mogłyby potencjalnie aktywować cząsteczkę wody. Następnie miałyby miejsce atak nukleofilowy wody na karbonylowy węgiel wiązania estrowego P-tRNA. Ze względu na wysoką zachowawczość nukleotydu w pozycji 2602 [56], przypuszcza się, że podobny proces ma miejsce również w rybosomach eukariotycznych.

W ostatnim etapie terminacji translacji biorą udział czynnik elongacyjny EF2 oraz czynnik odzyskujący rybosomu (RRF, ang. *ribosome-recycling factor*). Powodują one oddysocjowanie rybosomu i uwolnienie dużej podjednostki oraz kompleksu mała podjednostka/mRNA/tRNA [76]. Na podstawie struktury RRF zaproponowano mechanizm jego działania [77]. Najbardziej charakterystyczną cechą tego czynnika jest podobieństwo strukturalne do cząsteczki tRNA. Zaproponowano, że RRF wiąże się do rybosomalnego miejsca A, co powoduje znaczące zmiany konformacyjne rybosomu. Nakładające się na siebie miejsca wiązania RRF, EF-G i tRNA w miejscu P rybosomów prokariotycznych sugerują, że wiązanie EF-G powoduje przeniesienie RRF i D-tRNA z miejsc A i P do, odpowiednio, P i E. Deacylowany tRNA nie może być związany z miejscem E w sposób stabilny, gdy miejsce P nie jest obsadzone przez cząsteczkę P-tRNA [78], dlatego następuje dysocjacja rybosomu na podjednostki z wykorzystaniem energii pochodzącej z hydrolizy GTP przy udziale EF-G. Prawdopodobnie proces taki ma również miejsce w rybosomach eukariotycznych. W wyniku tego procesu rybosom jest gotowy na kolejny cykl biosyntezy białka.

## UWAGI KOŃCOWE

Pomimo wielu lat badań, nadal większość wiedzy na temat struktury i sposobu funkcjonowania rybosomu eukariotycznego opiera się na podobieństwach do rybosomu prokariotycznego. Jest to spowodowane znacznie bardziej skomplikowaną budową rybosomu eukariotycznego. Duża liczba zasocjowanych białek powoduje problemy z pozyskaniem odpowiedniego preparatu do badań strukturalnych i funkcjonalnych. Najważniejszym wyzwaniem na następne lata wydaje się być rozwiązanie struktury krystalicznej rybosomu eukariotycznego. Na tej podstawie możliwe byłoby dokładne określenie oddziaływań pomiędzy poszczególnymi elementami tego złożonego makrokompleksu. Tylko w ten sposób możliwe będzie poznanie mechanizmów towarzyszących biosyntezie białka.

## PIŚMIENNICTWO

- Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, Steitz TA (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905-920
- Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM, Jr, Morgan-Warren RJ, Carter AP, Vornrhein C, Hartsch T, Ramakrishnan V (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407: 327-339
- Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JH, Noller HF (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292: 883-896
- Schuwirth BS, Borovinskaya MA, Hau CW, Zhang W, Vila-Sanjurjo A, Holton JM, Cate JH (2005) Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 310: 827-834
- Selmer M, Dunham CM, Murphy FVt, Weixlbaumer A, Petry S, Kelley AC, Weir JR, Ramakrishnan V (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* 313: 1935-1942
- Korostelev A, Trakhanov S, Laurberg M, Noller HF (2006) Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements. *Cell* 126: 1065-1077
- Dube P, Bacher G, Stark H, Mueller F, Zemlin F, van Heel M, Brimacombe R (1998) Correlation of the expansion segments in mammalian rRNA with the fine structure of the 80 S ribosome; a cryoelectron microscopic reconstruction of the rabbit reticulocyte ribosome at 21 Å resolution. *J Mol Biol* 279: 403-421

8. Dube P, Wieske M, Stark H, Schatz M, Stahl J, Zemlin F, Lutsch G, van Heel M (1998) The 80S rat liver ribosome at 25 Å resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. *Structure* 6: 389-399
9. Gao H, Ayub MJ, Levin MJ, Frank J (2005) The structure of the 80S ribosome from *Trypanosoma cruzi* reveals unique rRNA components. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10206-10211
10. Morgan DG, Menetret JF, Radermacher M, Neuhof A, Akey IV, Rapoport TA, Akey CW (2000) A comparison of the yeast and rabbit 80S ribosome reveals the topology of the nascent chain exit tunnel, inter-subunit bridges and mammalian rRNA expansion segments. *J Mol Biol* 301: 301-321
11. Spahn CM, Beckmann R, Eswar N, Penczek PA, Sali A, Blobel G, Frank J (2001) Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*—tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* 107: 373-386
12. Sengupta J, Nilsson J, Gursky R, Spahn CM, Nissen P, Frank J (2004) Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol* 11: 957-962
13. Manuell AL, Yamaguchi K, Haynes PA, Milligan RA, Mayfield SP (2005) Composition and structure of the 80S ribosome from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: 80S ribosomes are conserved in plants and animals. *J Mol Biol* 351: 266-279
14. Spahn CM, Jan E, Mulder A, Grassucci RA, Samow P, Frank J (2004) Cryo-EM visualization of a viral internal ribosome entry site bound to human ribosomes: the IRES functions as an RNA-based translation factor. *Cell* 118: 465-475
15. <http://www.rcsb.org/pdb>
16. Spahn CM, Gomez-Lorenzo MG, Grassucci RA, Jorgensen R, Andersen GR, Beckmann R, Penczek PA, Ballesta JP, Frank J (2004) Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J* 23: 1008-1019
17. Bakowska-Zywicka K, Twardowski T (2007) Correlation of the structure and conformational changes of selected fragments of plant small ribosomal RNA within the steps of polypeptide chain elongation. *J Plant Physiol* 164: 496-504
18. Dudzinska-Bajorek B, Bakowska K, Twardowski T (2006) Conformational changes of L-rRNA during elongation of polypeptide. *J Plant Physiol* 163: 463-474
19. Krokowski D, Tchorzewski M, Boguszewska A, Grankowski N (2005) Acquisition of a stable structure by yeast ribosomal P0 protein requires binding of P1A-P2B complex: in vitro formation of the stalk structure. *Biochim Biophys Acta* 1724: 59-70
20. Tchorzewski M, Boldyreff B, Issinger O, Grankowski N (2000) Analysis of the protein-protein interactions between the human acidic ribosomal P-proteins: evaluation by the two hybrid system. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 737-746
21. Unbehaun A, Marintchev A, Lomakin IB, Didenko T, Wagner G, Hellen CU, Pestova TV (2007) Position of eukaryotic initiation factor eIF5B on the 80S ribosome mapped by directed hydroxyl radical probing. *EMBO J* 26: 3109-3123
22. Fringer JM, Acker MG, Fekete CA, Lorsch JR, Dever TE (2007) Coupled release of eukaryotic translation initiation factors 5B and 1A from 80S ribosomes following subunit joining. *Mol Cell Biol* 27: 2384-2397
23. Shenvi CL, Dong KC, Friedman EM, Hanson JA, Cate JH (2005) Accessibility of 18S rRNA in human 40S subunits and 80S ribosomes at physiological magnesium ion concentrations — implications for the study of ribosome dynamics. *RNA* 11: 1898-1908
24. Bulygin K, Chavatte L, Frolova L, Karpova G, Favre A (2005) The first position of a codon placed in the A site of the human 80S ribosome contacts nucleotide C1696 of the 18S rRNA as well as proteins S2, S3, S3a, S30, and S15. *Biochemistry* 44: 2153-2162
25. Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407: 340-348
26. Gabashvili IS, Agrawal RK, Spahn CM, Grassucci RA, Svergun DI, Frank J, Penczek P (2000) Solution structure of the *E. coli* 70S ribosome at 11.5 Å resolution. *Cell* 100: 537-549
27. Bąkowska K (2005) Funkcja wybranych fragmentów 16S rRNA małej podjednostki rybosomalnej w procesie biosyntezy białka. *Biotechnologia* 2: 206-214
28. Wilson DN, Nierhaus KH (2005) Ribosomal proteins in the spotlight. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40: 243-267
29. Bąkowska-Żywicka K, Kietrys A. (2007) Molekularne podstawy biosyntezy białka — funkcja 23S rRNA. *Biotechnologia* 1: 186-196
30. Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdmann VA, Barciszewski J (2003) 5S rRNA: structure and interactions. *Biochem J* 371: 641-651
31. Barciszewska MZ, Szymanski M, Erdmann VA, Barciszewski J (2000) 5S ribosomal RNA. *Biomacromolecules* 1: 297-302
32. Barciszewska MZ, Szymanski M, Erdmann VA, Barciszewski J (2001) Structure and functions of 5S rRNA. *Acta Biochim Polon* 48: 191-198
33. Dokudovskaya S, Dontsova O, Shpanchenko O, Bogdanov A, Brimacombe R (1996) Loop IV of 5S ribosomal RNA has contacts both to domain II and domain V of 23S RNA. *RNA* 2: 146-152
34. Holmberg L, Nygård O (2000) Release of ribosome-bound 5S rRNA upon cleavage of the phosphodiester bond between nucleotides A54 and A55 in 5S rRNA. *Biol Chem* 381: 1041-1046
35. Kiparisov S, Petrov A, Meskauskas A, Sergiev PV, Dontsonova OA, Dinman JD (2005) Structural and functional analysis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genomics* 274: 235-247
36. Szymanski M, Barciszewska MZ, Barciszewski J, Erdmann VA (1999) 5S Ribosomal RNA Data Bank. *Nucleic Acids Res* 27: 158-160
37. Szymanski M, Barciszewska MZ, Barciszewski J, Erdmann VA (2000) 5S Ribosomal RNA database Y2K. *Nucleic Acids Res* 28: 166-167
38. Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdmann VA, Barciszewski J (2002) 5S Ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids Res* 30: 176-178
39. Szymanski M, Specht T, Barciszewska MZ, Barciszewski J, Erdmann VA (1998) 5S rRNA Data Bank. *Nucleic Acids Res* 26: 156-159
40. Grela P, Sawa-Makarska J, Gordiyenko Y, Robinson CV, Grankowski N, Tchorzewski M (2008) Structural properties of the human acidic ribosomal P proteins forming the P1-P2 heterocomplex. *J Biochem (Tokyo)* 143: 169-177
41. Grela P, Helgstrand M, Krokowski D, Boguszewska A, Svergun D, Liljas A, Bernado P, Grankowski N, Akke M, Tchorzewski M (2007) Structural characterization of the ribosomal P1A-P2B protein dimer by small-angle X-ray scattering and NMR spectroscopy. *Biochemistry* 46: 1988-1998
42. Krokowski D, Boguszewska A, Abramczyk D, Liljas A, Tchorzewski M, Grankowski N (2006) Yeast ribosomal P0 protein has two separate binding sites for P1/P2 proteins. *Mol Microbiol* 60: 386-400
43. Gueydan C, Wauguier C, De Mees C, Huez G, Krays V (2002) Identification of ribosomal proteins specific to higher eukaryotic organisms. *J Biol Chem* 277: 45034-45040
44. Dever TE (2002) Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108: 545-556
45. Mayeur GL, Fraser CS, Peiretti F, Block KL, Hershey JWB (2003) Characterization of eIF3k. *Eur J Biochem* 270: 4133-4139
46. Fraser CS, Lee JY, Mayeur GL, Bushell M, Doudna JA, Hershey JWB (2004) The j-subunit of human translation initiation factor eIF3 is required for stable binding of eIF3 and its subcomplexes to 40S ribosomal subunits in vitro. *J Biol Chem* 279: 8946-8956
47. Gingras A-C, Raught B, Sonenberg N (1999) eIF4 initiation factors: Effectors on mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68: 913-963
48. Pestova TV, Kolupaeva VG (2006) The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* 16: 2906-2922
49. Donahue TF (2000) Genetic approaches to translation in *Saccharomyces cerevisiae*, w: *Translational control of gene expression*, Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 487-502
50. Das S, Maitra U (2001) Functional significance and mechanism of eIF5-promoted GTP hydrolysis in eukaryotic translation initiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 70: 207-231

51. Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7029-7036
52. Kolupaeva VG, Unbehaun A, Lomakin IB, Hellen CU, Pestova TV (2005) Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association. *RNA* 11: 470-486
53. Moazed D, Noller HF (1989) Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* 342: 142-148
54. Lill R, Robertson JM, Wintermeyer W (1986) Affinities of tRNA binding sites of ribosomes from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 25: 3245-3255
55. Noller HF, Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Cate JH (2002) Translocation of tRNA during protein synthesis. *FEBS Lett* 514: 11-16
56. Cannone JJ, Subramanian S, Schnare MN, Collett JR, D'Souza LM, Du Y, Feng B, Lin N, Madabusi LV, Muller KM, Pande N, Shang Z, Yu N, Gutell RR (2002) The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* 3: 2
57. Dudzińska B, Twardowski T (2001) Struktura rybosomu prokariotycznego. *Postepy Biochem* 47: 19-29
58. Pape T, Wintermeyer W, Rodnina MV (2000) Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat Struct Biol* 7: 104-107
59. Andersen GR, Nissen P, Nyborg J (2003) Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends Biochem Sci* 28: 434-441
60. Rodnina MV, Fricke R, Wintermeyer W (1994) Transient conformational states of aminoacyl-tRNA during ribosome binding catalyzed by elongation factor Tu. *Biochemistry* 33: 12267-12275
61. Ogle JM, Brodersen DE, Clemons WM, Jr, Tarry MJ, Carter AP, Ramakrishnan V (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* 292: 897-902
62. Konevega AL, Soboleva NG, Makhno VI, Semenov YP, Wintermeyer W, Rodnina MV, Katunin VI (2004) Purine bases at position 37 of tRNA stabilize codon-anticodon interaction in the ribosomal A site by stacking and Mg<sup>2+</sup>-dependent interactions. *RNA* 10: 90-101
63. Ogle JM, Murphy FV, Tarry MJ, Ramakrishnan V (2002) Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* 111: 721-732
64. Knudsen C, Wieden HJ, Rodnina MV (2001) The importance of structural transitions of the switch II region for the functions of elongation factor Tu on the ribosome. *J Biol Chem* 276: 22183-22190
65. Piotrowska I, Dudzińska B, Twardowski T (2002) Struktura i funkcja rybosomu prokariotycznego. *Postepy Biochem* 48: 2-19
66. Bąkowska-Żywicka K, Tyczewska A, Twardowski T (2006) Kontrowersje wokół mechanizmu syntezy wiązania peptydowego w rybosomie. *Postepy Biochem* 52: 166-172
67. Polacek N, Gaynor M, Yassin A, Mankin AS (2001) Ribosomal peptidyl transferase can withstand mutations at the putative catalytic nucleotide. *Nature* 411: 498-501
68. Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore PB, Steitz TA (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920-930
69. Dinos G, Kalpaxis DL, Wilson DN, Nierhaus KH (2005) Deacylated tRNA is released from the E site upon A site occupation but before GTP is hydrolyzed by EF-Tu. *Nucleic Acids Res* 33: 5291-5296
70. Jorgensen R, Ortiz PA, Carr-Schmid A, Nissen P, Kinzy TG, Andersen GR (2003) Two crystal structures demonstrate large conformational changes in the eukaryotic ribosomal translocase. *Nat Struct Biol* 10: 379-385
71. Gomez-Lorenzo MG, Spahn CM, Agrawal RK, Grassucci RA, Penczek P, Chakraborty K, Ballesta JP, Lavandera JL, Garcia-Bustos JF, Frank J (2000) Three-dimensional cryo-electron microscopy localization of EF2 in the *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosome at 17.5 Å resolution. *EMBO J* 19: 2710-2718
72. Song H, Mugnier P, Das AK, Webb HM, Evans DR, Tuite MF, Hemmings BA, Barford D (2000) The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1-mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* 100: 311-321
73. Connell S, Nierhaus K (2000) Translational termination not yet at its end. *ChemBiochem* 1: 250-253
74. Polacek N, Gomez MJ, Ito K, Xiong L, Nakamura Y, Mankin A (2003) The critical role of the universally conserved A2602 of 23S ribosomal RNA in the release of the nascent peptide during translation termination. *Mol Cell* 11: 103-112
75. Amort M, Wotzel B, Bakowska-Zywicka K, Erlacher MD, Micura R, Polacek N (2007) An intact ribose moiety at A2602 of 23S rRNA is key to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis during translation termination. *Nucleic Acids Res* 35: 5130-5140
76. Agrawal RK, Sharma MR, Kiel MC, Hirokawa G, Booth TM, Spahn CM, Grassucci RA, Kaji A, Frank J (2004) Visualization of ribosome-recycling factor on the *Escherichia coli* 70S ribosome: functional implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8900-8905
77. Karimi R, Pavlov M, Buckingham M, Ehrenberg M (1999) Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Mol Cell* 3: 601
78. Gnirke A, Geigenmuller U, Rheinberger HJ, Nierhaus KH (1989) The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle. Analysis with a heteropolymeric mRNA. *J Biol Chem* 264: 7291
79. Brodersen DE, Nissen P (2005) The social life of ribosomal proteins. *FEBS J* 272: 2098-2108
80. Klein DJ, Moore PB, Steitz TA (2004) The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol* 340: 141-177

## Structure and function of the eukaryotic ribosome

Kamilla Bąkowska-Żywicka<sup>✉</sup>, Tomasz Twardowski

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

<sup>✉</sup>e-mail: bakowska@ibch.poznan.pl

**Key words:** protein biosynthesis, eukaryotic ribosome, 80S, rRNA, ribosomal proteins

### ABSTRACT

The protein biosynthesis is a complicated process and not fully understood yet. According to smaller size and less complicated structure, understanding of prokaryotic 70S ribosomes is much more advanced. Eucaryotic 80S ribosomes are more complex and generate more difficulties in research. The morphology of 80S ribosome has been pretty well resolved and we know a lot about mechanism of functioning. Determination of the interactions between the ribosomes and the factors taking part in protein biosynthesis is still a great challenge. Dynamic changes of these interactions during particular steps of elongation cycle are quite difficult to understand. Conformational changes of the ribosome are of great functional and regulatory importance during protein biosynthesis. They are essential for the whole gene expression process. Only further research of the structure and function of the ribosome will lead us to knowledge about specificity of the mechanism of their action. In this article we present current opinions concerning structure and function of the eukaryotic ribosomes.

Jacek Mokrosiński

Wanda Małgorzata Krajewska

Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel.: (042) 635 44 87, e-mail: wmkraj@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 24 stycznia 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 14 kwietnia 2008 r.

**Słowa kluczowe:** TGF $\beta$ , betaglikan, endogлина, CD109, receptory pomocnicze

**Wykaz skrótów:** Alk (ang. *activin receptor-like kinase*) – kinaza receptora TGF $\beta$  typu I; Smad (ang. *similar to mother against, mother against decapentaplegic*) – wewnątrzkomórkowe białko efektorowe szlaku sygnalizacyjnego TGF $\beta$ ; TGF $\beta$  (ang. *transforming growth factor*) – transformujący czynnik wzrostu  $\beta$ ; TGF $\beta$  RI – receptor TGF $\beta$  typu I (Alk5); TGF $\beta$  RII – receptor TGF $\beta$  typu II

Podziękowanie: Praca napisana w ramach realizacji projektu badawczego nr 505/375 finansowanego przez Uniwersytet Łódzki

## STRESZCZENIE

W szlakach sygnalizacyjnych TGF $\beta$ , oprócz receptorów i ich ligandów oraz wewnątrzkomórkowych białek efektorowych, uczestniczą białka wiążące ligandy, które nie pełnią funkcji klasycznych receptorów. Białka te nie są bezpośrednimi przekaźnikami sygnału do wnętrza komórki, ale poprzez swoje oddziaływanie z czynnikami z rodziny TGF $\beta$  oraz receptorami TGF $\beta$  typu I i II wpływają na aktywność szlaku. Zidentyfikowano trzy białka charakteryzujące się takimi właściwościami, tj. betaglikan (TGF $\beta$  RIII), endoglinę (CD105) oraz antygen CD109, które określa się wspólnym terminem receptory pomocnicze TGF $\beta$  lub receptory TGF $\beta$  typu III. Ich podstawową funkcją jest modulowanie dostępności ligandów dla receptorów TGF $\beta$  typu I i II. Udział receptorów pomocniczych w przekazywaniu sygnału TGF $\beta$  został najlepiej poznany w przypadku czynnika TGF $\beta$  występującego w trzech izoformach – TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$  2 i TGF $\beta$  3. Każdy z receptorów pomocniczych charakteryzuje się inną specyficznością wiązania izoform TGF $\beta$  oraz charakterem odpowiedzi komórkowej. Szlak TGF $\beta$  jest jak dotąd jedynym komórkowym szlakiem sygnalizacyjnym, dla którego opisano występowanie receptorów pomocniczych.

## WPROWADZENIE

Czynniki z rodziny transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  (TGF $\beta$ , ang. *transforming growth factor*) regulują proliferację i różnicowanie szeregu typów komórek. Są one inhibitorami proliferacji komórek nabłonka, śródbłonka, komórek krwiotwórczych i odgrywają istotną rolę w takich procesach biologicznych, jak embriogeneza, angiogeneza, kostnienie, gojenie się ran czy synteza białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz jej przebudowa [1-3]. Liczne badania wskazują, że czynniki TGF $\beta$  modulują apoptozę oraz odgrywają plejotropową rolę w procesie nowotworzenia [2,4-7].

Do czynników rodziny TGF $\beta$ , obejmującej około kilkudziesięciu różnych białek, należą izoformy czynnika TGF $\beta$ , aktywiny i inhibiny, białka morfogenetyczne kości (BMP, ang. *bone morphogenetic proteins*) czy czynniki wzrostu i różnicowania (GDF, ang. *growth and differentiation factors*) [1,3,8]. Wszystkie one oddziałują za pośrednictwem receptorów błonowych o aktywności kinazy serynowo-treoninowej (klasa 3.3 wg klasyfikacji Międzynarodowej Unii Farmakologicznej – IUPHAR, ang. *International Union of Pharmacology* [9]). Receptory czynników rodziny TGF $\beta$  dzieli się na dwie podstawowe grupy, tj. receptory TGF $\beta$  typu I oraz receptory TGF $\beta$  typu II. Cechą odróżniającą receptory TGF $\beta$  typu I od receptorów TGF $\beta$  typu II jest obecność w sekwencji tych pierwszych 30-aminokwasowego regionu bogatego w powtórzenia reszty glicyny i seryny (ang. *GS region*). Zlokalizowany jest on powyżej domeny katalitycznej i pełni funkcję regulatorową. W komórkach człowieka wyróżnia się 7 receptorów TGF $\beta$  typu I, które określa się jako Alk (ang. *activin receptor-like kinase*) oraz odpowiadającym danemu receptorowi numerem od 1 do 7. W przypadku receptorów TGF $\beta$  typu II opisano dotychczas 5 białek pełniących tę funkcję, tj. receptor czynnika TGF $\beta$  (TGF $\beta$  RII), dwa receptory aktywiny, białek BMP i GDF (Act RII, Act RIIB, ang. *activin receptor*), receptor białek BMP i GDF (BMP RII) oraz receptor MIS/AMH (MIS RII/AMH RII, ang. *Mullerian inhibiting substance receptor/anti-Mullerian hormone receptor*). Wyniki badań sugerują dwa sposoby wiązania się ligandów z receptorami TGF $\beta$  typu I i II. Mogą się one przyłączać do receptora TGF $\beta$  typu II, a utworzony kompleks łączy się z receptorem typu I lub mogą się one przyłączać jednocześnie do obu typów receptorów. Określone czynniki z rodziny TGF $\beta$  mogą wiązać się z więcej niż jednym z receptorów TGF $\beta$  typu II, który z kolei może oddziaływać z różnymi receptorami TGF $\beta$  typu I (Ryc. 1) [8,10,11].

W przekazywaniu sygnału TGF $\beta$  wewnątrz komórki uczestniczą białka efektorowe Smad. Ich nazwa wywodzi się od dwóch homologów białek szlaku TGF $\beta$ , tj. białka Sma (ang. *similar to mothers against*) zidentyfikowanego u *Caenorhabditis elegans* oraz białka Mad (ang. *mothers against decapentaplegic*) opisanego dla *Drosophila*. Wśród białek Smad wyróżniane są trzy kategorie. Do pierwszej



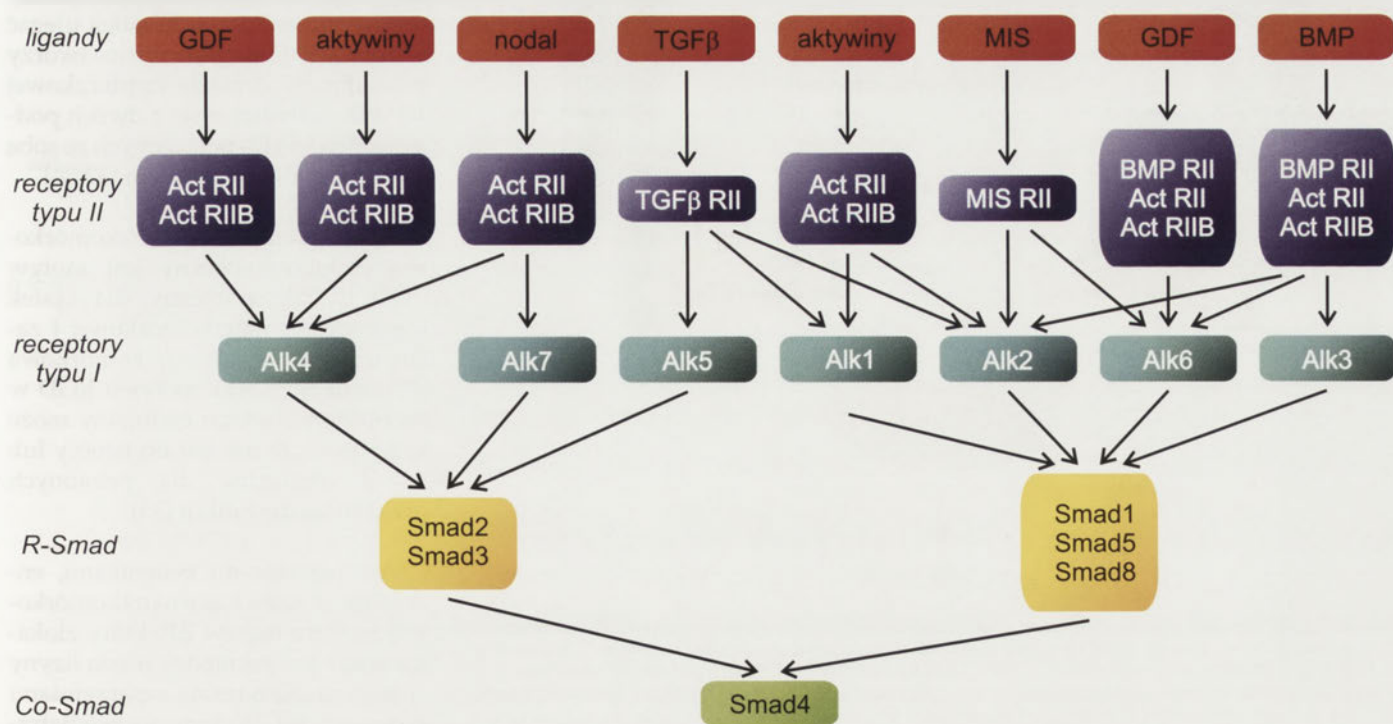
należą białka receptorowe Smad, tj. R-Smad (ang. *receptor-regulated Smad*). Od strony C-końca zawierają one motywy sekwencyjne dwóch reszt seryny oddzielonych od siebie jednym dowolnym aminokwasem, który ulega fosforylacji wskutek aktywności enzymatycznej receptorów TGF $\beta$ . Antagonistami tego procesu są białka inhibitorowe Smad, tj. I-Smad (ang. *inhibitor Smad*). Do trzeciej kategorii należą pośredniczące Smad, tj. Co-Smad (ang. *common-mediator Smad*). Uczestniczy ono w tworzeniu kompleksów z ufosforylowanymi R-Smad, które ulegają przeniesieniu do jądra komórkowego, gdzie oddziałują z szeregiem czynników transkrypcyjnych, aktywatorów i represorów regulujących funkcje docelowych genów (Ryc. 1) [11-14]. Transdukcja sygnału TGF $\beta$  może zachodzić także poprzez szlaki niezależne od białek Smad, w tym kinaz MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) [12,14,15].

W sygnalizacji indukowanej przez czynniki z rodziny TGF $\beta$ , oprócz receptorów TGF $\beta$  typu I i II, uczestniczą białka określane jako receptory pomocnicze TGF $\beta$  (ang. *accessory receptor/auxiliary receptor*), nazywane także receptorami TGF $\beta$  typu III. Dotychczas zidentyfikowano trzy białka zaliczane do tej grupy, tj. betaglikan (TGF $\beta$  RIII), endoglinę (CD105, ang. *cluster of differentiation 105*) oraz antygen powierzchniowy CD109 (ang. *cluster of differentiation 109*) [16-20]. Termin receptor pomocniczy nie jest pojęciem systematycznym, gdyż białka te nie pełnią wszystkich funkcji przypisanych receptorom. Choć są one białkami transbłonowymi lub są zakotwiczone w błonie komórkowej za pośrednictwem glikolipidów, a ich domena zewnątrzkomórkowa jest silnie rozbudowana i zdolna do wiązania ligandów, to nie mają one wewnątrzkomórkowej domeny funkcjonalnej, tj. wykazującej aktywność enzymatyczną lub zdolnej do oddziaływania z białkami o takich właściwościach. Pomimo że receptory pomocnicze TGF $\beta$  nie są bezpośrednimi przekaznikami sygnału, wpływają one na aktywność szlaku sygna-

lizacyjnego. Mogą one prezentować czynniki TGF $\beta$  receptorom TGF $\beta$  typu I i II, bądź też ograniczać ich oddziaływanie z tymi receptorami [21,22].

Dane literaturowe wskazują na istotny udział receptorów pomocniczych w przekazywaniu sygnału przez czynnik TGF $\beta$  występujący w trzech izoformach – TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3. Przekazywanie sygnału przez czynnik TGF $\beta$  zapoczątkowuje jego uwolnienie z kompleksu latentnego w postaci aktywnego dimeru zdolnego do wiązania się z dimerem receptorów TGF $\beta$  RII. Czynnik TGF $\beta$  syntezowany jest w formie pre-probiałka, z którego najpierw usuwany jest peptyd sygnałowy, a następnie dojrzęła forma odpowiadająca 112 aminokwasom od strony C-końca. Pozostaje ona jednak nadal związana niekowalencyjnie z N-końcowym fragmentem probiałka określanym jako białko LAP (ang. *latency-associated peptide*). Czynnik TGF $\beta$  związany z białkiem LAP tworzy dimery określane jako mały kompleks latentny (SLC, ang. *small latent complex*), który w połączeniu z białkiem LTBP (ang. *latent TGF $\beta$  binding protein*) tworzy tzw. duży kompleks latentny (LLC, ang. *large latent complex*). Białko LTBP, oddziałując z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, warunkuje magazynowanie TGF $\beta$  do czasu aktywacji [23,24].

Do kompleksu złożonego z dimeru TGF $\beta$  i dimeru receptorów TGF $\beta$  RII przyłącza się dimer receptorów TGF $\beta$  typu I, które *in vivo* nie są zdolne do samodzielnego wiązania ligandów. Funkcję receptora TGF $\beta$  typu I pełni najczęściej białko Alk5, w przypadku którego zamiennie stosuje się skrót TGF $\beta$  RI. W transdukcji sygnału czynnika TGF $\beta$  mogą uczestniczyć również receptory Alk1 i Alk2. Po utworzeniu się kompleksu sygnalizacyjnego receptory TGF $\beta$  RII, będące konstytutywnie aktywnymi kinazami, aktywują receptory typu I, przyłączając reszty fosforanowe w regionie bogatym w reszty glicyny i seryny [25]. W wyniku fosforylacji



Rycina 1. Ścieżki sygnalizacyjne czynników z rodziny TGF $\beta$  zależne od białek Smad (na podstawie [8,10-12]).

zmienia się konformacja receptorów TGF $\beta$  typu I, co umożliwia oddziaływanie z białkami R-Smad i, w konsekwencji, ich fosforylację. W transdukcji sygnału, indukowanej przez czynnik TGF $\beta$ , w której pośredniczy receptor TGF $\beta$  RI (Alk5), funkcję R-Smad pełnią białka Smad2 i Smad3, zaś w przypadku transdukcji sygnału przez receptory Alk1 lub Alk2 fosforylacji ulegają białka Smad1, Smad5, bądź Smad8. Ufosforylowane białka R-Smad tworzą heteromeryczne kompleksy z monomerem białka Co-Smad, tj. Smad4 (Ryc. 2) [26,27].

Sygnalizacja TGF $\beta$  jest jak dotąd jedyną, dla której opisano występowanie i scharakteryzowano znaczenie receptorów pomocniczych. Pojęcie to stosuje się także w odniesieniu do białek powierzchniowych uczestniczących w aktywacji komórek odpowiedzi immunologicznej.

## WŁAŚCIWOŚCI STRUKTURALNE RECEPTORÓW POMOCNICZYCH TGF $\beta$

### BETAGLIKAN

Betaglikan był pierwszym poznany receptorem pomocniczym uczestniczącym w sygnalizacji TGF $\beta$  [16,17]. Gen kodujący betaglikan, obejmujący 203 669 pz, zlokalizowany jest na chromosomie 1p33-p32 i zawiera 17 eksonów, a jego produkt białkowy zbudowany jest z 850 reszt aminokwasowych [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/, http://www.expasy.org/sprot/]. Betaglikan jest transbłonowym proteoglikanem występującym w formie mono-

merów. W jego strukturze wyróżnia się dwa miejsca O-glikozylacji modyfikowane przez reszty siarczanu heparanu i siarczanu chondroityny oraz pięć miejsc N-glikozylacji. Masa cząsteczkowa betaglikanu związanego z resztami glikozaminoglikanów wynosi od 250 do 350 kDa [17,19,28,29]. C-półowa regionu wewnątrzkomórkowego betaglikanu charakteryzuje się obecnością motywu ZP charakterystycznego dla powierzchniowych glikoprotein osłonki przejrzystej (*zona pellucida*). Obejmuje ona sekwencję o długości około 260 reszt aminokwasowych i zawiera osiem zachowanych ewolucyjnie reszt cysteiny tworzących wiązania disiarczkowe [30].

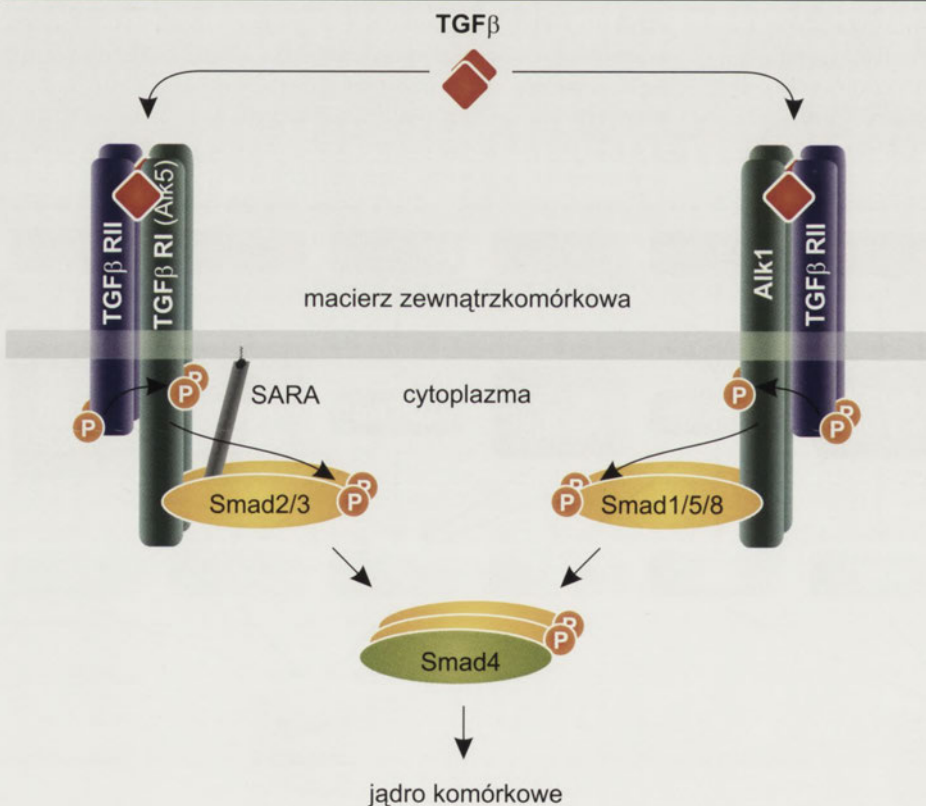
### ENDOGLINA

Endogлина, znana także pod nazwą antygen CD105, została zidentyfikowana na podstawie podobieństwa strukturalnego do betaglikanu (Ryc. 3). Odcinki C-końcowe obu białek obejmujące ich domeny cytoplazmatyczne oraz domeny transbłonowe charakteryzują się wysoką identycznością sekwencji szacowaną na 63%, oraz podobieństwem wynoszącym 71% [18,31]. Endogлина kodowana jest przez gen o długości 39 691 pz, zlokalizowany na chromosomie 9q33-q34.1 i złożony z 15 eksonów [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/].

Endogлина, będąca transbłonową glikoproteiną, występuje w dwóch izoformach różniących się długością sekwencji domeny cytoplazmatycznej. Forma dłuższa, tj. L-endogлина (658 aa), zawiera domenę wewnątrzkomórkową o długości 47 reszt aminokwasowych, zaś forma krótsza, tj. S-endogлина (625 aa) – o długości 14 reszt aminokwasowych. W strukturze I-rzędowej endogliny obecnych jest pięć potencjalnych miejsc N-glikozylacji oraz rejon bogaty w reszty seryny i treoniny, które mogą ulegać fosforylacji. Endogлина *in vivo* tworzy homodimery o masie cząsteczkowej 180 kDa, składające się z dwóch podjednostek 95 kDa połączonych ze sobą wiązaniem disiarczkowym [32-34].

W domenie zewnątrzkomórkowej endogliny obecny jest motyw RGD charakterystyczny dla białek macierzy zewnątrzkomórkowej i zaangażowany w adhezję komórkową [33]. Jednakże brak motywu RGD w szczurzym ortologu endogliny może sugerować, że nie jest on istotny lub nawet niezbędny dla pełnionych przez to białko funkcji [35].

Analogicznie do betaglikanu, endogлина w części zewnątrzkomórkowej zawiera motyw ZP, który zlokalizowany jest pomiędzy resztą lizyny w pozycji 362 a resztą asparaginanu w pozycji 561. W domenie zewnątrzkomórkowej monomeru endogliny,



**Rycina 2.** Przekazywanie sygnału TGF $\beta$  zależne od białek Smad. Dimer konstytutywnie aktywnego receptora TGF $\beta$  RII wiąże dimer czynnika TGF $\beta$ ; po przyłączeniu homodimeru jednego z dwóch receptorów TGF $\beta$  typu I, tj. TGF $\beta$  RI (Alk5) lub Alk1, domena katalityczna TGF $\beta$  RII fosforyluje receptory TGF $\beta$  typu I; zaktywowany receptor TGF $\beta$  typu I przyłącza i fosforyluje białka R-Smad, których funkcję w przypadku TGF $\beta$  RI pełnią Smad2 i Smad3, zaś Alk1 – Smad1, Smad5 i Smad8; ufosforylowane białka R-Smad łączą się z białkiem Co-Smad, tj. Smad4, a powstały heteromeryczny kompleks ulega przeniesieniu do jądra komórkowego, gdzie oddziałuje z szeregiem czynników transkrypcyjnych, aktywatorów lub represorów transkrypcji (na podstawie [8,10-12]).

ze względu na jej strukturę przestrzenną, wyróżnia się trzy regiony, tj. sierocy (Glu26-Ile359), ZP-N (Gln360-Ser457) i ZP-C (Pro458-Gly586). Struktura IV-rzędowa dimeru endogliny przypomina kopułę, w której regiony ZP-N podjednostek, każda o kształcie odwróconej litery U, wzajemnie się krzyżują [34].

#### CD109

Antygen CD109 nie jest strukturalnie spokrewniony z betaglikanem czy endogliną. W przeciwieństwie do nich, nie jest on białkiem transbłonowym, lecz jest zakotwiczony w błonie komórkowej przez glikozylofosfatydyloinozytol (GPI, ang. *glycosylphosphatidylinositol*), który przyłącza się do reszty alaniny 1420. Ta modyfikacja nowo zsyntetyzowanego białka zawierającego 1445 reszt aminokwasowych wymaga usunięcia C-końcowego hydrofobowego peptydu stanowiącego sygnał przyłączenia kotwicy GPI. Antygen CD109, podobnie jak inne białka zakotwiczone w błonie komórkowej przez GPI, jest wrażliwy na działanie fosfolipazy C specyficznej względem fosfatydyloinozytolu (PI-PLC, ang. *phosphatidylinositol-specific phospholipase C*) [19,36,37].

Gen kodujący białko CD109 o długości 128 962 pz znajduje się na chromosomie 6q13 i składa się z 33 eksonów, a sekwencja kodująca ma długość 4 338 nukleotydów [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/]. Finnson i wsp. [20] wykazali tkankowo-specyficzne występowanie krótszego transkryptu genu *CD109* pozbawionego fragmentu o dłu-

gości 51 nukleotydów (region 3652 – 3702 sekwencji kodującej). Delecja ta skutkuje skróceniem produktu białkowego o fragment o długości 17 reszt aminokwasowych, lecz nie wpływa na zmianę ramki odczytu dalszej sekwencji białka w kierunku C-końca. Taką formę białka CD109 określa się jako CD109S.

Białko CD109 jest monomeryczną glikoproteiną zawierającą 8 potencjalnych miejsc *N*-glikozylacji [http://www.expasy.org/sprot/]. Identyfikowane są formy białka CD109 o masach cząsteczkowych około 170 – 180 kDa, 150 i 120 kDa. Przypuszcza się, że forma o masie cząsteczkowej 150 kDa powstaje w wyniku degradacji formy 170 – 180 kDa [38-40]. Inna hipoteza tłumacząca występowanie form antygeny CD109 o masach cząsteczkowych 180 i 150 kDa mówi o alternatywnym składaniu eksonów kodujących *N*-końcowy odcinek białka w obrębie eksonów poniżej pierwszego [41]. Ponadto, białko CD109 wykazuje wrażliwość na działanie proteazy zależnej od jonów wapnia (CDP, ang. *calcium dependent protease*), pod wpływem której może powstawać forma o masie cząsteczkowej 120 kDa [39].

Na podstawie podobieństwa sekwencji, w tym obecności motywu PYGCGEQ odpowiedzialnego za tworzenie wiązania tioestrowego, antygen CD109 zalicza się do rodziny białek AMCOM (ang. *α2-macroglobulin/complement gene family*), w której skład wchodzi, między innymi,  $\alpha 2$ -makroglobulina i jej ortologi (ssaków, homara, raka), składowe układu dopełniacza (C3, C4, C5), białko pasma ciężowego (PZP, ang.



Rycina 3. Porównanie form prekursorowych betaglikanu i endogliny oraz antygeny CD109 i  $\alpha 2$ -makroglobuliny (na podstawie danych z bazy Swiss-Prot/TREMBL: http://www.expasy.org/sprot/; porównania sekwencji dokonano za pomocą programu Vector NTI 10.3.0).

pregnancy zone protein), ludzkie białko KIAA1283, szczurzy  $\alpha 1$ -inhibitor III, ptasia owostatyna czy białko ZK337.1 *Caenorhabditis elegans*. Stopień pokrewieństwa sekwencji białka CD109 w odniesieniu do pozostałych białek z tej rodziny wynosi w przybliżeniu 30%. Regiony białka CD109 istotne z punktu widzenia jego struktury i funkcji wydają się być wysoce zachowane ewolucyjnie, a samo białko jest prawdopodobnie najstarszym pod względem ewolucyjnym spośród ludzkich białek z rodziny AMCOM (Ryc. 3) [20,36,41].

## UDZIAŁ RECEPTORÓW POMOCNICZYCH TGF $\beta$ W SYGNALIZACJI KOMÓRKOWEJ

### BETAGLIKAN

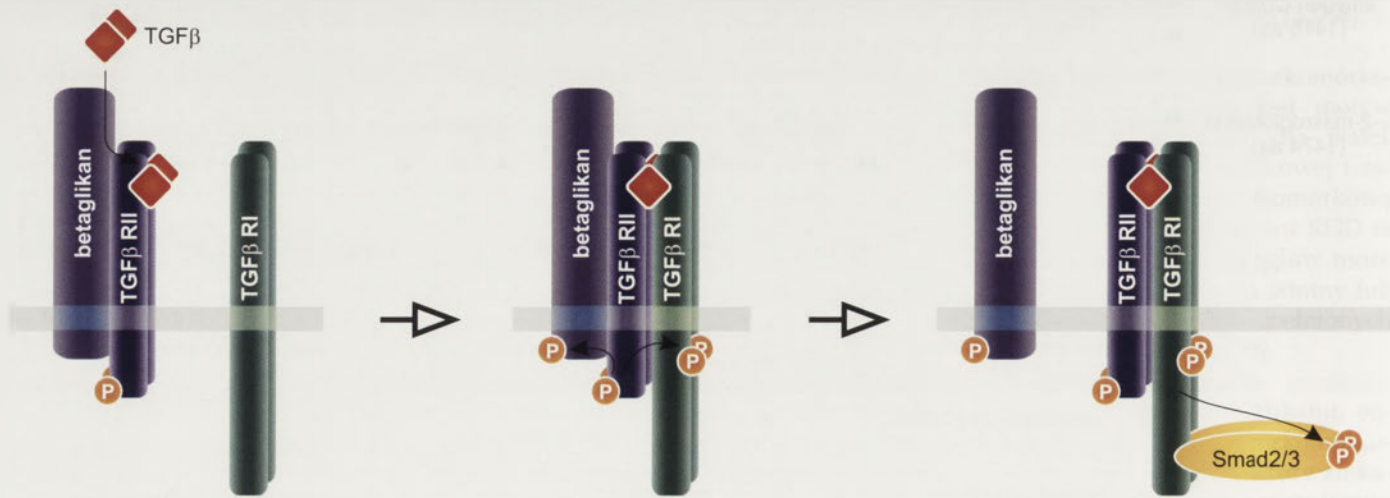
Betaglikan ma zdolność bezpośredniego wiązania wszystkich trzech izoform czynnika TGF $\beta$  występujących w komórkach człowieka. Ponieważ izoforma TGF $\beta 2$ , w odróżnieniu od dwóch pozostałych izoform, tj. TGF $\beta 1$  i TGF $\beta 3$ , ma bardzo słabe powinowactwo do receptorów TGF $\beta$  RI i TGF $\beta$  RII, przypuszcza się, że betaglikan pośredniczy głównie w sygnalizacji komórkowej indukowanej przez tę izoformę, prezentując ją receptorom. W komórkach niewykazujących ekspresji betaglikanu praktycznie nie obserwuje się efektu stymulacji czynnikiem TGF $\beta 2$ , przy jednoczesnym braku zaburzenia funkcji inhibitorów proliferacji i migracji komórek, którą pełnią dwie pozostałe izoformy TGF $\beta$  [8,42]. Wyjątek stanowią komórki, w których stwierdzono ekspresję alternatywnego produktu składania genu TGF $\beta$  RII określanego jako TGF $\beta$  RIIB. Ten wariant receptora TGF $\beta$  RII w miejscu kodonu dla reszty waliny 32 zawiera insercję o długości 75 nukleotydów, która kodowana jest przez ekson 1A. Dodatkowy 26 aminokwasowy fragment występujący w sekwencji receptora TGF $\beta$  RIIB, zawierający potencjalne miejsce N-glikozytacji oraz dwie reszty cysteiny, prawdopodobnie odpowiada za wiązanie i transdukcję sygnału izoformy TGF $\beta 2$  [43].

W domenie zewnątrzkomórkowej betaglikanu wyróżnia się dwa niezależne miejsca wiążące izoformy TGF $\beta$ . Jedno z nich znajduje się w jej N-końcowej części, w regio-

nie o pokrewieństwie do endogliny, zaś drugie w obrębie motywu ZP. Choć oba miejsca wiążące betaglikanu charakteryzują się podobnym powinowactwem do izoform TGF $\beta$ , tj. wyższym wobec TGF $\beta 2$  i niższym wobec TGF $\beta 1$  czy TGF $\beta 3$ , to jedynie poprzez miejsce w regionie o sekwencji pokrewnej do endogliny (bliżej N-końca) czynnik TGF $\beta 2$  może być prezentowany receptorem TGF $\beta$  RII. Zdolność do wiązania ligandów nie wydaje się być cechą motywu ZP. Wykazano bowiem, że w wiązaniu izoform TGF $\beta$  uczestniczą reszty aminokwasowe, które nie pełnią istotnej funkcji w tworzeniu struktury przestrzennej charakterystycznej dla tego motywu. Pozostaje to w zgodzie ze stosunkowo dużą zmiennością sekwencji motywu ZP w białkach, w których stwierdzono jego występowanie. Potwierdzają to również analizy oddziaływania betaglikanu z innymi czynnikiemami z rodziny TGF $\beta$ . Betaglikan może wiązać inhibinę A i oddziaływać z receptorami specyficznymi dla inhibin, tj. Act RII, Act RIIB oraz BMP RII. Wykazano, że za wiązanie TGF $\beta$  i inhibiny A odpowiadają różne reszty aminokwasowe w obrębie motywu ZP betaglikanu [8,21,44].

Chociaż betaglikan pozbawiony domeny cytoplazmatycznej jest zdolny do wiązania wszystkich trzech izoform TGF $\beta$  i tworzenia kompleksu z TGF $\beta$  RII, to domena ta wydaje się być niezbędną dla dalszego przekazywania sygnału. Model sygnalizacji TGF $\beta$  z udziałem betaglikanu zakłada, że betaglikan prezentuje aktywny dimer czynników TGF $\beta$  aktywnemu, tj. konstytutywnie ufosforylowanemu dimerowi TGF $\beta$  RII. Do utworzonego kompleksu przyłącza się dimer TGF $\beta$  RI, który ulega aktywacji wskutek fosforylacji przez domenę katalityczną TGF $\beta$  RII. Ostatnim etapem, który prawdopodobnie jest niezbędny dla uruchomienia szlaku białek R-Smad, jest oddysocjowanie betaglikanu od kompleksu sygnalizacyjnego receptorów, co możliwe staje się po ufosforylowaniu domeny cytoplazmatycznej tego receptora pomocniczego przez TGF $\beta$  RII (Ryc. 4) [45].

Badania nad stechiometrią i kinetyką tworzenia się kompleksu TGF $\beta$  RII z betaglikanem wykazały, że monomer be-



**Rycina 4.** Udział betaglikanu w przekazywaniu sygnału TGF $\beta$ . Betaglikan tworzy kompleks z receptorem TGF $\beta$  RII i pośredniczy w przyłączaniu się do niego czynników TGF $\beta$ ; do powstałego kompleksu przyłącza się receptor TGF $\beta$  RI; domena katalityczna TGF $\beta$  RII fosforyluje TGF $\beta$  RI, a także betaglikan w ich domenach cytoplazmatycznych; fosforylacja betaglikanu skutkuje jego oddysocjowaniem i aktywacją białek R-Smad (na podstawie [45]).

taglikanu jest zdolny do wiązania się z dwoma dimerami czynnika TGF $\beta$  i łączenia się z dwoma dimerami TGF $\beta$  RII. Do utworzonego kompleksu sygnalizacyjnego przypuszczalnie przyłączają się następnie dwa dimery TGF $\beta$  RI. Powyższe dane pozwalają sugerować, że betaglikan, oprócz prezentowania ligandów, przyczynia się do wzmocnienia sygnalizacji TGF $\beta$  [46,47].

Związany z błoną komórkową betaglikan może ulegać proteolizie, w wyniku której uwalniany jest fragment domeny zewnątrzkomórkowej określanej jako forma rozpuszczalna betaglikanu. Zachowuje ona zdolność do wiązania izoform TGF $\beta$ , co może ograniczać dostępność ligandów dla receptora TGF $\beta$  RII w wyniku ich deponowania w macierzy zewnątrzkomórkowej. Badania komórek nowotworowych wydają się potwierdzać udział rozpuszczalnej formy betaglikanu w hamowaniu sygnalizacji TGF $\beta$ . Wprowadzenie rekombinowanej postaci rozpuszczalnej formy betaglikanu do komórek nowotworowych prostaty istotnie ograniczało wzrost i angiogenezę oraz hamowało aktywność metaloproteinazy 9 macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *matix metalloproteinase 9*), której syntezę w nowotworach prostaty indukują czynniki TGF $\beta$  [48-50].

Eickelberg i wsp. [28] prezentują odmienny pogląd w kwestii negatywnej regulacji sygnalizacji TGF $\beta$  przez betaglikan. Uważają oni, że to nie obecność rozpuszczalnej formy betaglikanu w macierzy zewnątrzkomórkowej, ale stopień glikozylacji przez reszty glikozaminoglikanów związanej z błoną komórkową białka jest kluczowy w hamowaniu sygnalizacji TGF $\beta$ . Uważają oni, że modyfikacja ta w niektórych typach komórek może być czynnikiem przestrzennie ograniczającym tworzenie kompleksów betaglikanu z receptorami TGF $\beta$  RI i TGF $\beta$  RII.

Fosforylacja domeny cytoplazmatycznej betaglikanu przez konstytutywnie aktywny receptor TGF $\beta$  RII umożliwia oddysocjowanie betaglikanu i uruchomienie szlaku TGF $\beta$  lub wiązanie się kompleksu tych receptorów z  $\beta$ -arestyną. Rodzina  $\beta$ -arestyn charakteryzuje się zdolnością do wiązania się z aktywnymi receptorami 7-transbłonowymi (7TM, ang. *7-transmembrane receptors*), określanymi też jako receptory sprzężone z białkami G (GPCR, ang. *G-protein coupled receptors*) i desensytyzacji sygnału. Receptory 7TM w kompleksie z  $\beta$ -arestyną mają zablokowane miejsce wiązania białek G. Oddziaływanie z  $\beta$ -arestynami prowadzi więc do zahamowania szlaków sygnałowych białek G, a także do internalizacji receptorów i ich włączania w przekazywanie sygnału poprzez inne szlaki, w tym kinaz MAPK. Hamowanie sygnalizacji przez  $\beta$ -arestyny opisane dla receptorów 7TM obserwuje się także dla szlaku TGF $\beta$ . Oddziaływanie z  $\beta$ -arestyną może skutkować internalizacją kompleksu TGF $\beta$  RII/betaglikan i desensytyzacją sygnalizacji TGF $\beta$  zależnej od białek Smad [51-53]. Betaglikan w sposób niezależny od czynnika TGF $\beta$  uczestniczy w aktywacji jednego ze szlaków MAPK, tj. szlaku białka p38. Dokładna rola betaglikanu w fosforylacji tej kinazy nie jest jeszcze poznana. Prawdopodobnie kluczową funkcję w aktywacji szlaku białka p38 zależnej od betaglikanu pełni jego domena cytoplazmatyczna [54].

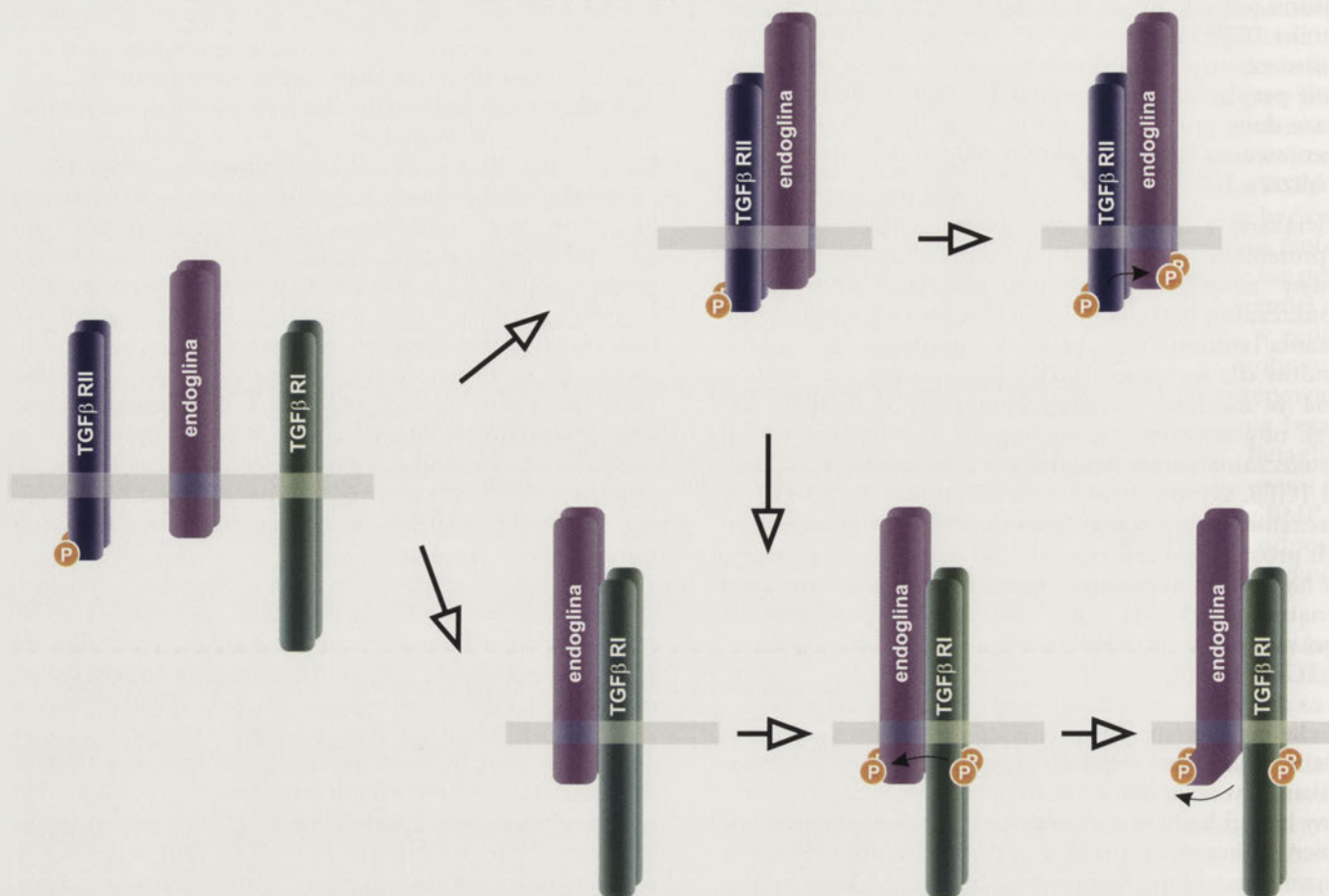
W przeciwieństwie do betaglikanu, endogлина nie wykazuje zdolności do bezpośredniego wiązania izoform czynnika TGF $\beta$  bez udziału specyficznych dla niego receptorów. Endogлина tworzy kompleksy zarówno z receptorami TGF $\beta$  RI, jak i TGF $\beta$  RII niezależnie od obecności ligandów. Wysokie powinowactwo endogliny wobec izoformy TGF $\beta$ 1 oraz umiarkowane wobec izoformy TGF $\beta$ 3 wynika z przyłączania się tego receptora pomocniczego do czynników związanych przez receptor TGF $\beta$  RII i jest bezpośrednią konsekwencją specyficzności tego receptora względem poszczególnych izoform TGF $\beta$ . Podobnie jak betaglikan, także endogлина nie jest receptorem pomocniczym wyłącznie izoform czynnika TGF $\beta$ . Białko to może współdziałać z kompleksami sygnalizacyjnymi innych ligandów z rodziny TGF $\beta$ , oddziałujących z właściwymi dla siebie receptorami I lub II typu, w tym aktywiny A i czynnika BMP7 związanych z receptorem Act RII lub Act RIIB czy czynnika BMP2 związanego z receptorem Alk3 lub Alk6 [55].

Endogлина wiąże się z receptorami TGF $\beta$  RI i TGF $\beta$  RII zarówno poprzez domenę cytoplazmatyczną, jak i domenę zewnątrzkomórkową. Dla oddziaływania endogliny z receptorem TGF $\beta$  RI, w przeciwieństwie do TGF $\beta$  RII, istotny jest stan fosforylacji jego domeny cytoplazmatycznej. Endogлина przyłączyć może się wyłącznie do receptora TGF $\beta$  RI pozostającego w konformacji nieaktywnej, czyli gdy jego region regulatorowy bogaty w reszty glicyny i seryny pozostaje nieufosforylowany. Zarówno TGF $\beta$  RI, jak i TGF $\beta$  RII wykazują zdolność do fosforylacji domeny cytoplazmatycznej endogliny. Fosforylacja endogliny skutkuje obniżeniem poziomu konstytutywnej fosforylacji receptora TGF $\beta$  RII. Domena cytoplazmatyczna endogliny po ufosforylowaniu przez TGF $\beta$  RI oddysocjowuje od domeny katalitycznej tego receptora, co prawdopodobnie ma miejsce w obecności ligandu (Ryc. 5). Konsekwencją oddziaływań TGF $\beta$  RI i TGF $\beta$  RII z endogliną jest wzrost poziomu ufosforylowanej formy białka Smad2. Nie stwierdzono natomiast, by endogлина wpływała na poziom aktywacji drugiego z białek R-Smad specyficznych dla receptora TGF $\beta$  RI, tj. białka Smad3, co wskazuje na udział tego receptora pomocniczego w modulowaniu sygnalizacji TGF $\beta$  [22].

Endogлина, podobnie jak betaglikan, może oddziaływać z  $\beta$ -arestyną, co prowadzi do jej internalizacji. Kluczową rolę w tworzeniu kompleksów endogliny z  $\beta$ -arestyną odgrywa fosforylacja reszty treoniny 650 tego receptora pomocniczego. Fosforylacja endogliny umożliwiająca jej internalizację jest wynikiem aktywności kinazowej receptorów TGF $\beta$  RII i Alk1. Endogлина, tworząc kompleks z  $\beta$ -arestyną, hamuje, stymulowaną przez czynnik TGF $\beta$ 1, aktywację szlaku MAPK/ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*), a pośrednio ma także wpływ na subkomórkową lokalizację ufosforylowanej formy ERK [56,57].

#### CD109

Antygen CD109 wykazuje wysokie powinowactwo do izoformy TGF $\beta$ 1, nieco słabsze do izoformy TGF $\beta$ 3 oraz prawie zupełny brak oddziaływania z izoformą TGF $\beta$ 2 [19,42,58-60]. Wiązanie TGF $\beta$ 1 z formami antygeny CD109



Rycina 5. Udział endogliny w transdukcji sygnału TGF $\beta$ . Endoglina przyłącza się zarówno do receptora TGF $\beta$  RII, jak i TGF $\beta$  RI, oddziałując z domeną zewnątrzkomórkową oraz domeną cytoplazmatyczną każdego z receptorów; wiązanie endogliny z TGF $\beta$  RII jest niezależne od jego aktywacji, natomiast w przypadku TGF $\beta$  RI ma miejsce wyłącznie, gdy receptor ten znajduje się w konformacji nieaktywnej; TGF $\beta$  RII w kompleksie z endogliną fosforyluje TGF $\beta$  RI; receptory TGF $\beta$  RII i TGF $\beta$  RI mają zdolność do fosforylacji endogliny; ufosforylowanie endogliny przez TGF $\beta$  RI prowadzi do oddysocjowania jej domeny cytoplazmatycznej (na podstawie [22]).

o masach cząsteczkowych 180 i 150 kDa zachodzi w szerokim spektrum pH i nie jest zakłócanie po uwolnieniu tego białka z powierzchni komórki w wyniku działania PI-PLC. Pozwala to sugerować, że antygen CD109 jest modulatorem dostępności izoform czynnika TGF $\beta$  dla receptorów uczestniczących w przekazywaniu sygnału przez tę cytokinę [37,58].

Podobnie jak antygen CD109, także inne białka z rodziny AMCOM, w tym  $\alpha$ 2-makroglobulina, oddziałują z czynnikiem TGF $\beta$ . Powinowactwo  $\alpha$ 2-makroglobuliny do izoformy TGF $\beta$ 1 jest wyższe w porównaniu z TGF $\beta$ 2, analogicznie jak ma to miejsce w przypadku antygeny CD109.  $\alpha$ 2-makroglobulina występuje w osoczu, gdzie prawdopodobnie pełni funkcję rezerwuaru i przenośnika czynnika TGF $\beta$ . Wiązanie czynnika TGF $\beta$  przez to białko hamuje stymulację receptorów TGF $\beta$ , lecz jest procesem w pełni odwracalnym. Za wiązanie izoformy TGF $\beta$ 1 przez  $\alpha$ 2-makroglobulinę odpowiada region między 718 a 733 resztą aminokwasową bogaty w reszty hydrofobowe. Ten 16-aminokwasowy fragment znajduje się w pobliżu regionu wykazującego powinowactwo do enzymów proteolitycznych, określanego *bait region* („region przynęty”). Region ten pokrywa się z miejscem wiążącym czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego BB (PDGF-BB, ang. *platelet-derived growth factor BB*) oraz czynnik wzrostu nerwów  $\beta$  (NGF- $\beta$ , ang. *nerve growth factor- $\beta$* ) [61-63].

Porównanie sekwencji antygeny CD109 i  $\alpha$ 2-makroglobuliny wskazuje na istnienie szeregu regionów o wysokim stopniu podobieństwa. Opisane przez Webb i wsp. [62] miejsce wiążące czynnik TGF $\beta$ 1 w strukturze  $\alpha$ 2-makroglobuliny występuje w jednym z takich regionów. Motyw sekwencyjny  $\alpha$ 2-makroglobuliny, o długości 16 aminokwasów, odpowiedzialny za przyłączanie TGF $\beta$ 1 nie jest w pełni identyczny z odpowiadającym mu regionem białka CD109, jednakże sekwencje po stronie N-końca cechują się identycznością, a po stronie C-końca wysokim stopniem podobieństwa [<http://www.expasy.org/sprot/>].

Białko CD109 ma zdolność nie tylko oddziaływania z izoformami TGF $\beta$ , ale i tworzenia heterokompleksów z receptorami TGF $\beta$  RI i TGF $\beta$  RII o masie cząsteczkowej w zakresie 200–300 kDa. Wiązanie się TGF $\beta$  RI i TGF $\beta$  RII z antygenem CD109 jest niezależne od obecności czynnika TGF $\beta$ . Oddziaływanie CD109 z receptorem TGF $\beta$  RII nie powoduje zmiany poziomu jego autofosforylacji. Ponadto, gdy receptor CD109 nie oddziałuje z izoformami TGF $\beta$ , dochodzi do jego wiązania z innym receptorem pomocniczym, tj. betaglikanem. Oddziaływanie antygeny CD109 z izoformą TGF $\beta$ 1 nie powoduje zasadniczego zmniejszenia poziomu tego białka na powierzchni komórki, co odróżnia go od TGF $\beta$  RI, TGF $\beta$  RII czy betaglikanu. Oddziaływanie CD109 z czynnikiem TGF $\beta$  w istotny sposób wpływa na

hamowanie fosforylacji białek efektorowych ich szlaku sygnalizacyjnego, tj. białek R-Smad. Pozwala to przypuszczać, że receptor CD109, poprzez wiązanie izoform TGF $\beta$ , może ograniczać ich dostępność dla receptorów TGF $\beta$  RI i TGF $\beta$  RII [20,58,59,64].

## BIOLOGICZNE FUNKCJE RECEPTORÓW POMOCNICZYCH TGF $\beta$

### BETAGLIKAN

Syntezę betaglikanu obserwuje się w różnych typach komórek. Wysoki wskaźnik letalności embrionów mysich o fenotypie betaglikan<sup>-/-</sup> sugeruje, że ekspresja genu kodującego to białko jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu embriogenezy. Najistotniejsze defekty w prawidłowym różnicowaniu się komórek i rozwoju tkanek zaobserwowano w sercu i wątrobie, stwierdzając jednocześnie zaburzenia hematopoezy, która w okresie rozwoju embrionalnego ma miejsce przede wszystkim w wątrobie. Betaglikan wydaje się być niezbędny dla prawidłowego wykształcenia się przegrody serca w wyniku przemiany komórek epitelialnych w mezenchymatyczne [65,66]. Jego podwyższoną syntezę stwierdzono także w procesie różnicowania się komórek mięśni szkieletowych [67]. Obniżenie poziomu betaglikanu zidentyfikowano w nowotworach, między innymi, nerek, piersi, jajników, błony śluzowej trzonu macicy. Konsekwencją jest zaburzenie prawidłowej sygnalizacji stymulowanej przez czynniki z rodziny TGF $\beta$ , co prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek oraz nabywania przez nie fenotypu złośliwego [50,68-70].

### ENDOGLINA

Znaczenie endogliny udokumentowane zostało w rozwoju embrionalnym i waskulogenezie. Najwyższą syntezę tego białka stwierdza się w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, co wiąże się bezpośrednio z jego udziałem w angiogenezie oraz procesach od niej zależnych [71-75]. Mutacje genu kodującego endoglinę są przyczyną wrodzonej naczyniakowatości krwotocznej, zwanej też zespołem Rendu-Oslera-Webera typu I (HHT1, ang. *hereditary hemorrhagic telangiectasia type I*). Jest to schorzenie autosomalne dominujące, które objawia się dysplazją naczyń krwionośnych, głównie naczyń włosowatych [34,76]. Zwiększoną syntezę endogliny obserwuje się w śródbłonku naczyń nowotworów takich narządów, jak jelito grube, mózg, płuca, prostata, piersi czy szyjka macicy. Jest to najprawdopodobniej związane z powstawaniem naczyń krwionośnych, które umożliwią rozwój i funkcjonowanie proliferujących komórek nowotworowych, a także stanowią potencjalną drogę ich przerzutowania. Ocena poziomu endogliny w wycinkach zmian patologicznych może mieć znaczenie diagnostyczne i prognostyczne, podobnie jak badanie poziomu tego białka w surowicy, który jest podwyższony u pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową. Postuluje się wykorzystanie przeciwciał skierowanych przeciwko endoglinie w scyntygrafii nowotworów oraz terapiach ukierunkowanych na blokowanie tworzenia się naczyń krwionośnych [77,78].

### CD109

Dotychczasowe doniesienia na temat ekspresji antygeny CD109 wskazują na występowanie tego białka w komórkach mioepitelialnych gruczołu mlekowego, ślinianek i gruczołów łzowych oraz w komórkach podstawnych prostaty. Jednocześnie stwierdzono brak syntezy CD109 w innych komórkach budujących te gruczoły, w tym komórkach przewodowych, pęcherzykowych czy wydzielniczych [79]. Brak produkcji antygeny CD109 wykazano także w przypadku limfocytów czy płytek krwi. Jednakże aktywacja limfoblastów T fitohemaglutyniną w obecności interleukiny 2, podobnie jak aktywacja płytek krwi trombiną, prowadzi do syntezy tego białka. Obecność białka CD109 stwierdzono również na powierzchni limfocytów izolowanych z krwi osób chorych na białaczkę [38].

Wysoki poziom antygeny CD109 zarówno na poziomie mRNA, jak i białka obserwuje się w rakach płaskonabłonkowych w przeciwieństwie do większości gruczolakoraków. Szczególne znaczenie wydaje się mieć wysoki poziom białka CD109 w raku płaskonabłonkowym płuc. Niska lub brak syntezy tego antygeny nie tylko w gruczolakoraku płuc, ale także raku drobnokomórkowym oraz wielkokomórkowym płuc sugeruje, że może on być rozpatrywany jako potencjalny marker nowotworów tego narządu [79-82].

## PIŚMIENNICTWO

1. Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB (2004) What is transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )? Br J Plast Surg 57: 215-221
2. Blobel GA, Schiemann WP, Lodish HF (2000) Role of transforming growth factor  $\beta$  in human disease. N Engl J Med 342: 1350-1358
3. Govindan R, Bhoola KD (2003) Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- $\beta$ . Pharmacol Ther 98: 257-265
4. Schuster N, Kriegstein K (2002) Mechanisms of TGF- $\beta$ -mediated apoptosis. Cell Tissue Res 307: 1-14
5. Pardoll K, Moustakas A (2007) Actions of TGF- $\beta$  as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. Biochim Biophys Acta 1775: 21-62
6. Kaminska B, Wesolowska A, Danilkiewicz M (2005) TGF beta signaling and its role in tumour pathogenesis. Acta Biochim Polon 52: 329-337
7. Massague J, Gomis RR (2006) The logic of TGF $\beta$  signaling. FEBS Lett 580: 2811-2820
8. de Caestecker M (2004) The transforming growth factor- $\beta$  superfamily of receptors. Cytokine Growth Factor Rev 15: 1-11
9. Humphrey PPA, Barnard EA (1998) International Union of Pharmacology. XIX. The IUPHAR receptor code: a proposal for an alphanumeric classification system. Pharmacol Rev 50: 271-277
10. Massague J (1998) TGF- $\beta$  signal transduction. Annu Rev Biochem 67: 753-791
11. Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K (2002) Two major Smad pathways in TGF- $\beta$  superfamily signalling. Genes Cells 7: 1191-1204
12. Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. Nature 425: 577-584
13. Piestrzeniewicz D, Brys M, Krajewska WM (2000) The Smad pathway in TGF- $\beta$  signalling. Cell Mol Biol Lett 5: 381-396
14. Zimowska M (2006) Ścieżki sygnalizacyjne rodziny transformujących czynników wzrostu  $\beta$ . Postępy Biochem 52: 360-366
15. Piestrzeniewicz-Ulanska D, Krajewska WM (2001) Crossing path with Smads. W: Heilmeyer LMG jr, Friedrich P (red) Protein Modules in Cellular Signalling, t. 318. IOS Press, Amsterdam, str. 123-131

16. Cheifetz S, Andres JL, Massague J (1988) The transforming growth factor- $\beta$  receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor. *J Biol Chem* 263: 16984-16991
17. Segarini PR, Seyedin SM (1988) The high molecular weight receptor to transforming growth factor- $\beta$  contains glycosaminoglycan chains. *J Biol Chem* 263: 8366-8370
18. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor- $\beta$  receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267: 19027-19030
19. Cheifetz S, Massague J (1991) Isoform-specific transforming growth factor- $\beta$  binding proteins with membrane attachments sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Biol Chem* 266: 20767-20772
20. Finsson KW, Tam BYY, Liu K, Marcoux A, Lepage P, Roy S, Bizet AA, Philip A (2006) Identification of CD109 as part of the TGF- $\beta$  receptor system in human keratinocytes. *FASEB J* 20: 1525-1527
21. Esparza-Lopez J, Montiel JL, Vilchis-Landeros MM, Okadome T, Miyazono K, Lopez-Casillas F (2001) Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor- $\beta$  and inhibin A. *J Biol Chem* 276: 14588-14596
22. Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C (2002) Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor- $\beta$  receptors I and II. *J Biol Chem* 277: 29197-29209
23. Keski-Oja J, Koli K, von Melchner H (2004) TGF- $\beta$  activation by traction? *Trends Cell Biol* 14: 657-659
24. Lawrence DA (2001) Latent-TGF- $\beta$ : an overview. *Mol Cell Biochem* 219: 163-170
25. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J (1994) Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature* 370: 341-347
26. Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P (2002) Transforming growth factor  $\beta$  signal transduction. *J Leukoc Biol* 71: 731-740
27. ten Dijke P, Hill CS (2004) New insights into TGF- $\beta$ -Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 29: 265-273
28. Eickelberg O, Centrella M, Reiss M, Kashgarian M, Wells RG (2002) Betaglycan inhibits TGF- $\beta$  signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J Biol Chem* 277: 823-829
29. Gray PC, Bilezikjian LM, Vale W (2001) Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan-glycan. *Mol Cell Endocrinol* 180: 47-53
30. Jovine L, Darie CC, Litscher ES, Wassarman PM (2005) Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem* 74: 83-114
31. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, ten Dijke P (2005) TGF- $\beta$  receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 65: 599-608
32. Bellon T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S, Cheifetz S, Massague J, Letarte M, Bernabeu C (1993) Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor- $\beta$ -binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* 23: 2340-2345
33. Gougos A, Letarte M (1990) Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 265: 8361-8364
34. Llorca O, Trujillo A, Blanco FJ, Bernabeu C (2007) Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol* 365: 694-705
35. Ge AZ, Butcher EC (1994) Cloning and expression of a cDNA encoding mouse endoglin, an endothelial cell TGF- $\beta$  ligand. *Gene* 138: 201-206
36. Lin M, Sutherland DR, Horsfall W, Totty N, Yeo E, Nayar R, Wu XF, Schuh AC (2002) Cell surface antigen CD109 is a novel member of the  $\alpha_2$  macroglobulin/C3, C4, C5 family of thioester-containing proteins. *Blood* 99: 1683-1691
37. Tam BYY, Larouche D, Germain L, Hooper NM, Philip A (2001) Characterization of a 150 kDa accessory receptor for TGF- $\beta$ 1 on keratinocytes: direct evidence for a GPI anchor and ligand binding of the released form. *J Cell Biochem* 83: 494-507
38. Sutherland DR, Yeo E, Ryan A, Mills GB, Bailey D, Baker MA (1991) Identification of a cell-surface antigen associated with activated T lymphoblasts and activated platelets. *Blood* 77: 84-93
39. Smith JW, Hayward CPM, Horsewood P, Warkentin TE, Denomme GA, Kelton JG (1995) Characterization and localization of the Gov<sup>a/b</sup> alloantigens to the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein CDw109 on human platelets. *Blood* 86: 2807-2814
40. Kelton JG, Smith JW, Horsewood P, Humbert JR, Hayward CPM, Warkentin TE (1990) Gov<sup>a/b</sup> alloantigen system on human platelets. *Blood* 75: 2172-2176
41. Solomon KR, Sharma P, Chan M, Morrison PT, Finberg RW (2004) CD109 represents a novel branch of the  $\alpha_2$ -macroglobulin/complement gene family. *Gene* 327: 171-183
42. Tam BYY, Philip A (1998) Transforming growth factor- $\beta$  receptor expression on human skin fibroblasts: dimeric complex formation of type I and type II receptors and identification of glycosyl phosphatidylinositol-anchored transforming growth factor- $\beta$  binding proteins. *J Cell Physiol* 176: 553-564
43. Rotzer D, Roth M, Lutz M, Lindemann D, Sebald W, Knaus P (2001) Type III TGF- $\beta$  receptor-independent signalling of TGF- $\beta$ 2 via T $\beta$ R $\beta$ II-B, an alternatively spliced TGF- $\beta$  type II receptor. *EMBO J* 20: 480-490
44. Wiater E, Harrison CA, Lewis KA, Gray PC, Vale WW (2006) Identification of distinct inhibin and transforming growth factor  $\beta$ -binding sites on betaglycan. Functional separation of betaglycan co-receptor actions. *J Biol Chem* 281: 17011-17022
45. Blobel GC, Schiemann WP, Pepin MC, Beauchemin M, Moustakas A, Lodish HF, O'Connor-McCourt MD (2001) Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor  $\beta$  receptor in regulating transforming growth factor  $\beta$  signaling. *J Biol Chem* 276: 24627-24637
46. De Crescenzo G, Grothe S, Zwaagstra J, Tsang M, O'Connor-McCourt MD (2001) Real-time monitoring of the interactions of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) isoforms with latency-associated protein and the ectodomains of the TGF- $\beta$  type II and III receptors reveals different kinetic models and stoichiometries of binding. *J Biol Chem* 276: 29632-29643
47. Letamendia A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, Attisano L, Bernabeu C (1998) Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor- $\beta$ . A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 273: 33011-33019
48. Velasco-Loyden G, Arribas J, Lopez-Casillas F (2004) The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *J Biol Chem* 279: 7721-7733
49. Bandyopadhyay A, Wang L, Lopez-Casillas F, Mendoza V, Yeh IT, Sun L (2005) Systemic administration of a soluble betaglycan suppresses tumor growth, angiogenesis, and matrix metalloproteinase-9 expression in a human xenograft model of prostate cancer. *Prostate* 63: 81-90
50. Dong M, How T, Kirkbride KC, Gordon KJ, Lee JD, Hempel N, Kelly P, Moeller BJ, Marks JR, Blobel GC (2007) The type III TGF- $\beta$  receptor suppresses breast cancer progression. *J Clin Invest* 117: 206-217
51. Chen W, Kirkbride KC, How T, Nelson CD, Mo J, Frederick JP, Wang XF, Lefkowitz RJ, Blobel GC (2003)  $\beta$ -arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF- $\beta$  receptor and down-regulation of its signaling. *Science* 301: 1394-1397
52. Gurevich EV, Gurevich VV (2006) Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol* 7: 236
53. Spiegel A (2003) Cell signaling.  $\beta$ -arrestin—not just for G protein-coupled receptors. *Science* 301: 1338-1339
54. Santander C, Brandan E (2006) Betaglycan induces TGF- $\beta$  signaling in a ligand-independent manner, through activation of the p38 pathway. *Cell Signal* 18: 1482-1491
55. Barbara NP, Wrana JL, Letarte M (1999) Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily. *J Biol Chem* 274: 584-594



56. Lee NY, Blobel GC (2007) The interaction of endoglin with  $\beta$ -arrestin2 regulates transforming growth factor- $\beta$ -mediated ERK activation and migration in endothelial cells. *J Biol Chem* 282: 21507-21517
57. Rodriguez-Barbero A, Obreo J, Alvarez-Munoz P, Pandiella A, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM (2006) Endoglin modulation of TGF- $\beta$ 1-induced collagen synthesis is dependent on ERK1/2 MAPK activation. *Cell Physiol Biochem* 18: 135-142
58. MacKay K, Danielpour D (1991) Novel 150- and 180-kDa glycoproteins that bind transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 but not TGF- $\beta$ 2 are present in several cell lines. *J Biol Chem* 266: 9907-9911
59. Tam BYY, Germain L, Philip A (1998) TGF- $\beta$  receptor expression on human keratinocytes: a 150 kDa GPI-anchored TGF- $\beta$ 1 binding protein forms a heteromeric complex with type I and type II receptors. *J Cell Biochem* 70: 573-586
60. Dumont N, O'Connor-McCourt MD, Philip A (1995) Transforming growth factor- $\beta$  receptors on human endometrial cells: identification of the type I, II, and III receptors and glycosylphosphatidylinositol anchored TGF- $\beta$  binding proteins. *Mol Cell Endocrinol* 111: 57-66
61. Arandjelovic S, Freed TA, Gonias SL (2003) Growth factor-binding sequence in human  $\alpha_2$ -macroglobulin targets the receptor-binding site in transforming growth factor- $\beta$ . *Biochemistry* 42: 6121-6127
62. Webb DJ, Roadcap DW, Dhakephalkar A, Gonias SL (2000) A 16-amino acid peptide from human  $\alpha_2$ -macroglobulin binds transforming growth factor- $\beta$  and platelet-derived growth factor-BB. *Protein Sci* 9: 1986-1992
63. Gonias SL, Carmichael A, Mettenburg JM, Roadcap DW, Irvin WP, Webb DJ (2000) Identical or overlapping sequences in the primary structure of human  $\alpha_2$ -macroglobulin are responsible for the binding of nerve growth factor- $\beta$ , platelet-derived growth factor-BB, and transforming growth factor- $\beta$ . *J Biol Chem* 275: 5826-5831
64. Tam BYY, Finson KW, Philip A (2003) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins regulate transforming growth factor- $\beta$  signaling in human keratinocytes. *J Biol Chem* 278: 49610-49617
65. Stenvers KL, Tursky ML, Harder KW, Kountouri N, Amatayakul-Chantler S, Grail D, Small C, Weinberg RA, Sizeland AM, Zhu HJ (2003) Heart and liver defects and reduced transforming growth factor  $\beta$ 2 sensitivity in transforming growth factor  $\beta$  type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol* 23: 4371-4385
66. Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, Barnett JV (1999) Requirement of type III TGF- $\beta$  receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* 283: 2080-2082
67. Lopez-Casillas F, Riquelme C, Perez-Kato Y, Ponce-Castaneda MV, Osses N, Esparza-Lopez J, Gonzalez-Nunez G, Cabello-Verrugio C, Mendoza V, Troncoso V, Brandan E (2003) Betaglycan expression is transcriptionally up-regulated during skeletal muscle differentiation. Cloning of murine betaglycan gene promoter and its modulation by MyoD, retinoic acid, and transforming growth factor- $\beta$ . *J Biol Chem* 278: 382-390
68. Elliott RL, Blobel GC (2005) Role of transforming growth factor beta in human cancer. *J Clin Oncol* 23: 2078-2093
69. Florio P, Ciarmela P, Reis FM, Toti P, Galleri L, Santopietro R, Tiso E, Tosi P, Petraglia F (2005) Inhibin  $\alpha$ -subunit and the inhibin coreceptor betaglycan are downregulated in endometrial carcinoma. *Eur J Endocrinol* 152: 277-284
70. Hempel N, How T, Dong M, Murphy SK, Fields TA, Blobel GC (2007) Loss of betaglycan expression in ovarian cancer: role in motility and invasion. *Cancer Res* 67: 5231-5238
71. Mancini ML, Verdi JM, Conley BA, Nicola T, Spicer DB, Oxburgh LH, Vary CPH (2007) Endoglin is required for myogenic differentiation potential of neural crest stem cells. *Dev Biol* 308: 520-533
72. Jonker L, Arthur HM (2002) Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. *Mech Dev* 110: 193-196
73. Arthur HM, Ure J, Smith AJH, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J, Diamond AG (2000) Endoglin, an ancillary TGF $\beta$  receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* 217: 42-53
74. Chung YC, Hou YC, Pan ACH (2004) Endoglin (CD105) expression in the development of haemorrhoids. *Eur J Clin Invest* 34: 107-112
75. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabeu C (2002) Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor- $\beta$  pathways. *J Biol Chem* 277: 43799-43808
76. van den Driesche S, Mummery CL, Westermann CJ (2003) Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on transforming growth factor  $\beta$  signaling in vasculogenesis and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 58: 20-31
77. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S (2003) CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 17: 984-992
78. Brekken RA, Li C, Kumar S (2002) Strategies for vascular targeting in tumors. *Int J Cancer* 100: 123-130
79. Hasegawa M, Hagiwara S, Sato T, Jijiwa M, Murakumo Y, Maeda M, Moritani S, Ichihara S, Takahashi M (2007) CD109, a new marker for myoepithelial cells of mammary, salivary, and lacrimal glands and prostate basal cells. *Pathol Int* 57: 245-250
80. Hashimoto M, Ichihara M, Watanabe T, Kawai K, Koshikawa K, Yuasa N, Takahashi T, Yatabe Y, Murakumo Y, Zhang JM, Nimura Y, Takahashi M (2004) Expression of CD109 in human cancer. *Oncogene* 23: 3716-3720
81. Zhang JM, Hashimoto M, Kawai K, Murakumo Y, Sato T, Ichihara M, Nakamura S, Takahashi M (2005) CD109 expression in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathol Int* 55: 165-169
82. Sato T, Murakumo Y, Hagiwara S, Jijiwa M, Suzuki C, Yatabe Y, Takahashi M (2007) High-level expression of CD109 is frequently detected in lung squamous cell carcinomas. *Pathol Int* 57: 719-724

## TGF $\beta$ signalling accessory receptors

Jacek Mokrosiński, Wanda Małgorzata Krajewska<sup>✉</sup>

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

<sup>✉</sup>e-mail: wmkraj@biol.uni.lodz.pl

**Key words:** TGF $\beta$ , betaglycan, endoglin, CD109, accessory receptors

### ABSTRACT

TGF $\beta$  signalling pathways apart from receptors, their ligands and intracellular effectors consist of proteins capable to bind ligands which are not classical receptors. They do not transmit the signal directly into the cell but by their interaction with TGF $\beta$  family factors and TGF $\beta$  type I and II receptors can influence TGF $\beta$  cascade activity. There are three proteins characterised by such features i.e., betaglycan (TGF $\beta$  RIII), endoglin (CD105) and antigen CD109 which are commonly called as TGF $\beta$  accessory/auxiliary receptors or TGF $\beta$  type III receptors. Their key function is to modulate accessibility of ligands to TGF $\beta$  type I and II receptors. The role of TGF $\beta$  accessory receptors has been well documented for signal transduction *via* TGF $\beta$  isoforms – TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 and TGF $\beta$ 3. Each TGF $\beta$  accessory receptor has different TGF $\beta$  isoforms binding specificity and cellular response character. TGF $\beta$  cascade is the only known cellular signalling pathway for which accessory receptors are identified until now.

# Izoenzymy kinazy kreatynowej – charakterystyka i funkcje w komórce

Katarzyna Grzyb<sup>✉</sup>

Edward F. Skorkowski

Pracownia Biochemii Porównawczej, Instytut Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk

<sup>✉</sup>Pracownia Biochemii Porównawczej, Instytut Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, ul. Ornitologów 26, 80-680 Gdańsk; tel.: (058) 308 07 14, e-mail: gkasia@biotech.ug.gda.pl

Artykuł otrzymano 20 stycznia 2008 r.  
Artykuł zaakceptowano 14 kwietnia 2008 r.

**Słowa kluczowe:** kinaza kreatynowa, izoenzymy, dimer, oktamer, mitochondrialna kinaza kreatynowa, apoptoza

**Wykaz skrótów:** AK – kinaza argininowa, AMPK – kinaza zależna od AMP, ANT – translokaza nukleotydów adeninowych, CK – kinaza kreatynowa, CL – kardiolipina, CP – fosfokreatyna, Cr – kreatyna, GK – kinaza glikocyaminowa, HK – heksokinaza, IMP – inozyno-5' monofosforan, LK – kinaza lombrycynowa, Mt-CK – mitochondrialna forma CK, TK – kinaza taurocyaminowa, TSAC – analogowy kompleks przejściowy o składzie: 4 mM ADP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Cr, 50 mM KNO<sub>3</sub>, VDAC – jonoselektywna poryna w błonie zewnętrznej mitochondriów

## STRESZCZENIE

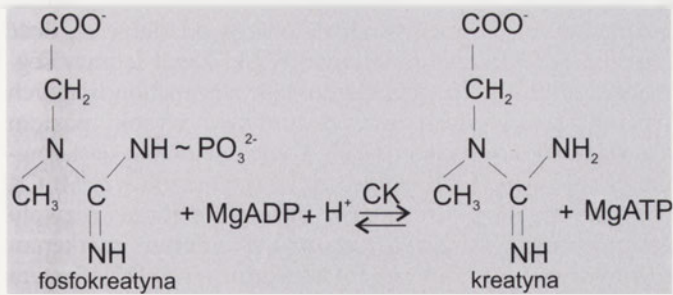
**K**inaza kreatynowa (CK, EC 2.7.3.2) jest enzymem kluczowym w bioenergetyce komórki, odgrywającym ważną rolę w homeostazie komórkowego ATP. Intensywne badania nad mitochondrialnymi formami CK przyczyniły się do stworzenia modelu funkcjonowania systemu CK/CP zwanego „czółkiem fosfokreatynowym”. Model ten obejmuje nie tylko funkcję buforującą stężenia ATP i ADP, ale równocześnie funkcję przestrzennego transportu energii, łączącą procesy wykorzystania ATP z procesami jego syntezy, do których należą glikoliza i fosforylacja oksydacyjna. Ważną rolę w transporcie energii odgrywa przede wszystkim Mt-CK, która pełni funkcję mostu pomiędzy błonami mitochondrialnymi i funkcjonalnie oddziałuje z poryną VDAC oraz ANT w bliskim sąsiedztwie kardiolipin. Takie powiązanie stwarza strukturalne podstawy do związku Mt-CK z transportem ATP do przestrzeni międzybłonowej mitochondriów przez ANT, a fosfokreatyny do cytoplazmy przez porynę VDAC. Aktywna forma Mt-CK w postaci oktameru stymuluje fosforylację oksydacyjną oraz efektywnie hamuje tworzenie mitochondrialnego megakanalu. Jakakolwiek destabilizacja tej struktury może spowodować aktywację łańcucha reakcji, które kończą się śmiercią komórki.

## WPROWADZENIE – SYSTEMY FOSFAGENOWE

Wszystkie procesy zaangażowane we wzrost i metabolizm komórki wymagają nakładu energii. Podstawowym źródłem energii w żywej komórce jest adenosynotryfosforan (ATP), chociaż jego stężenie w komórce jest raczej niskie. Wynosi ono od 2 do 5 mM i pozwala np. na skurcz mięśnia jedynie przez parę sekund. Związkiem, który zdecydowanie przewyższa stężenie ATP w komórce jest fosfokreatyna (CP), której stężenie w mięśniu szkieletowym osiąga od 20 do 35 mM. W tkankach i komórkach o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym, takich jak: mięsień szkieletowy, mięsień sercowy, mózg, komórki fotoreceptorowe, komórki organu elektrycznego u ryb oraz plemniki, zaobserwowano wysokie stężenia fosfagenów [1,2]. CP jest jednym z ośmiu fosfagenów występujących w świecie zwierząt. Każdy z nich posiada charakterystyczną grupę guanidynową i własny enzym, tzw. kinazę fosfagenową. Fosfageny to związki bogatoenergetyczne, które wraz z kinazami fosfagenowymi tworzą systemy fosfagenowe. Występowanie danego systemu jest uzależnione od filogenetycznego pochodzenia organizmów w grupie tkankowców [3].

Podczas aktywacji komórki nie odnotowano znaczącej zmiany stężenia ATP, ponieważ ATP ulega regeneracji z wysokich zasobów CP w wyniku odwracalnej reakcji katalizowanej przez kinazę kreatynową (CK). Za pośrednictwem CK grupa fosforanowa z CP przenoszona jest na ADP, czego konsekwencją jest odbudowa komórkowego ATP (Ryc. 1).

Oprócz wymienionego wcześniej fosforanu kreatyny (CP), u zwierząt można wyróżnić jeszcze: fosforan argininy (AP), fosforan talasminy (ThP), fosforan glikocyaminy (GP), fosforan taurocyaminy (TP), fosforan hypotaurocyaminy (HTP), fosforan lombrycyny (LP) oraz fosforan ofeliny (OP). System kinaza kreatynowa/fosfokreatyna (CK/CP) długo uważany był za system występujący jedynie u kręgowców, jednak aktywność CK stwierdzono również w wielu tkankach wyższych i niższych bezkręgowców, a także u wszystkich niższych strunowców. System ten niespodziewanie występuje również u gąbek, które stanowią początek linii tkankowców, co dowodzi, że system CK/CP powstał bardzo wcześnie w ewolucji [3,4]. System kinaza argininowa/fosfoarginina (AK/AP) jest drugim szeroko rozpowszechnionym systemem w świecie zwierząt. Występuje wyłącznie u stawonogów i mięczaków. W tych samych tkankach u wielu organizmów można spotkać dużą różnorodność występowania systemów fosfagenowych. U grup, takich jak niższe strunowce i wtórouste bezkręgowce, często występują dwa główne systemy: CK/CP oraz AK/AP, a w grupie pierścienic można spotkać nawet siedem różnych systemów fosfagenowych. Zjawisko to zwane jest fenomenem plurifosfagenowym, a współist-



Rycina 1. Reakcja katalizowana przez kinazę kreatynową (CK). CK katalizuje odwracalną reakcję przenoszenia grupy fosforanowej, regenerując ATP lub odbudowując zapasy komórkowe CP. Dlatego jest ona jednym z kluczowych enzymów w bioenergetyce komórki, odgrywającym ważną rolę w homeostazie komórkowego ATP.

nie różnych systemów fosfagenowych w jednej tkance i jej fizjologiczne następstwa nadal są obiektem badań. Bezkręgowce i niższe strunowce nie są zdolne do biosyntezy kreatyny (Cr). Mimo to, ich tkanki zawierają wysokie stężenia CP oraz CK. U tych organizmów Cr pochodzi prawdopodobnie z egzogennych źródeł, jednak mechanizm jej zdobywania i transportu jest nadal zagadką. U kręgowców natomiast, nie odnotowano żadnego innego systemu poza CK/CP [3]. Szereg wcześniejszych badań wskazuje, że fosfageny występują wszędzie tam, gdzie mają miejsce intensywne procesy zależne od ATP. Dlatego też kinazy fosfagenowe są enzymami kluczowymi w bioenergetyce komórki i odgrywają ważną rolę w homeostazie komórkowego ATP [1].

#### IZOENZYMY KINAZY KREATYNOWEJ

W rodzinie genów CK u wyższych kręgowców zidentyfikowano cztery niezależne geny jądrowe, z których każdy koduje inną podjednostkę CK, a ich ekspresja zachodzi w różnych tkankach oraz miejscach komórki charakterystycznych dla każdego produktu genu [5,6]. Te cztery geny kodują białka dwóch form cytoplazmatycznych: M-CK (forma mięśniowa, M – ang. *muscle*) i B-CK (forma mózgowa, B – ang. *brain*) oraz dwóch form mitochondrialnych: sMt-CK (s – ang. *sarcomeric*, forma charakterystyczna dla mięśni) i uMt-CK (u – ang. *ubiquitous* forma charakterystyczna dla pozostałych tkanek, tzw. „wszędobylska”). *In vivo* podjednostki M-CK i B-CK tworzą trzy izoenzymy o strukturze

dimeru (Ryc. 2A) i masie cząsteczkowej od 80 000 do 86 000 Da. Są to dwa homodimery: MM-CK i BB-CK oraz jeden heterodimer MB-CK, który wykryto w sercu oraz w rozwijających się komórkach mięśni szkieletowych, w których forma BB-CK poprzez heterodimer MB-CK przechodzi w formę MM-CK [1].

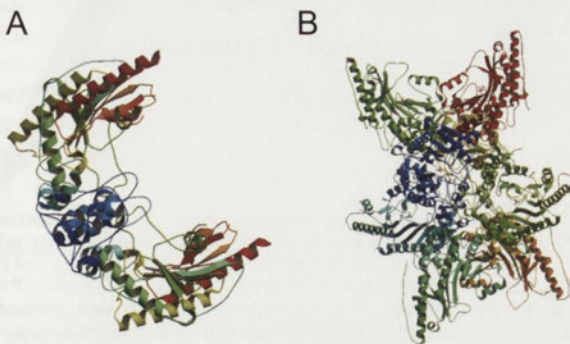
Formy mitochondrialne Mt-CK, w przeciwieństwie do form cytoplazmatycznych, mogą tworzyć struktury oktameryczne (Ryc. 2B) zbudowane z 8 identycznych podjednostek o masie około 43 000 Da [2]. Formy mitochondrialne różnią się nie tylko sekwencją aminokwasową, ale także właściwościami biochemicznymi i biofizycznymi, a szczególnie właściwościami wiązania do błon mitochondrialnych [7]. Identyfikacja mitochondrialnych form CK dała zupełnie inny pogląd na funkcjonowanie systemu CK/CP. Ustalono, że ATP z fosforylacji oksydacyjnej ulega przemianie do CP, który łatwo dyfunduje do cytosolu. Intensywne badania nad Mt-CK przyczyniły się do stworzenia nowego modelu funkcjonowania systemu CK/CP, zwanego „cyrkulacją CP” (ang. *CP circuit*) lub „czółenkiem fosfokreatynowym” (ang. *CP shuttle*). Model ten obejmuje nie tylko funkcję buforującą energię, ale równocześnie funkcję przestrzennego transportu energii, łączącą procesy wykorzystania ATP z procesami jego syntezy ATP [1].

#### „CZÓŁENKO FOSFOKREATYNOWE” – GŁÓWNE FUNKCJE SYSTEMU CK/CP

Tkankowo-specyficzna, subkomórkowa lokalizacja i funkcja izoenzymów CK w tkankach i komórkach o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym, a równocześnie molekularna struktura mitochondrialnej formy CK, wskazują na niezwykle ważną fizjologiczną rolę systemu CK/CP w bioenergetyce komórki. Pierwszą funkcją systemu CK/CP, ogólnie zaakceptowaną i najczęściej cytowaną, jest funkcja buforująca stężenia ATP i ADP w komórce. Zgodnie z tym modelem CP i kreatyna (Cr) jedynie zastępowały ścieżki dyfuzji ATP i ADP, sugerując „model dyfuzji ułatwionej”, zaproponowany przez Meyer i współpracowników [8]. Jednak model ten nie obejmował podziału wewnątrzkomórkowego izoenzymów CK, jak również funkcjonalnego związku izoenzymów CK z glikolizą, fosforylacją oksydacyjną oraz komórkowymi ATP-azami.

Dalsze badania wskazywały na drugą ważną funkcję tego systemu, a mianowicie – funkcję transportu energii, zwaną także funkcją przestrzennego bufora energii. Uwzględniała ona, nie tylko funkcję buforującą, ale również związek cytoplazmatycznych izoenzymów CK z glikolizą i z komórkowymi ATP-azami, a form mitochondrialnych CK z fosforylacją oksydacyjną. W modelu tym, CP pełni funkcję nośnika energii, który łączy miejsca syntezy ATP z miejscami jego wykorzystania poprzez izoenzymy CK zlokalizowane w odpowiednich częściach komórki. W 1992 roku Wallimann i współpracownicy [1] zaproponowali model funkcjonowania systemu CK/CP, zwany „czółenkiem fosfokreatynowym”, łączący wszystkie ważne jego funkcje.

Model „czółenka fosfokreatynowego” przedstawia rycina 3. Mt-CK w postaci oktamery zlokalizowana jest w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów i oddziałuje



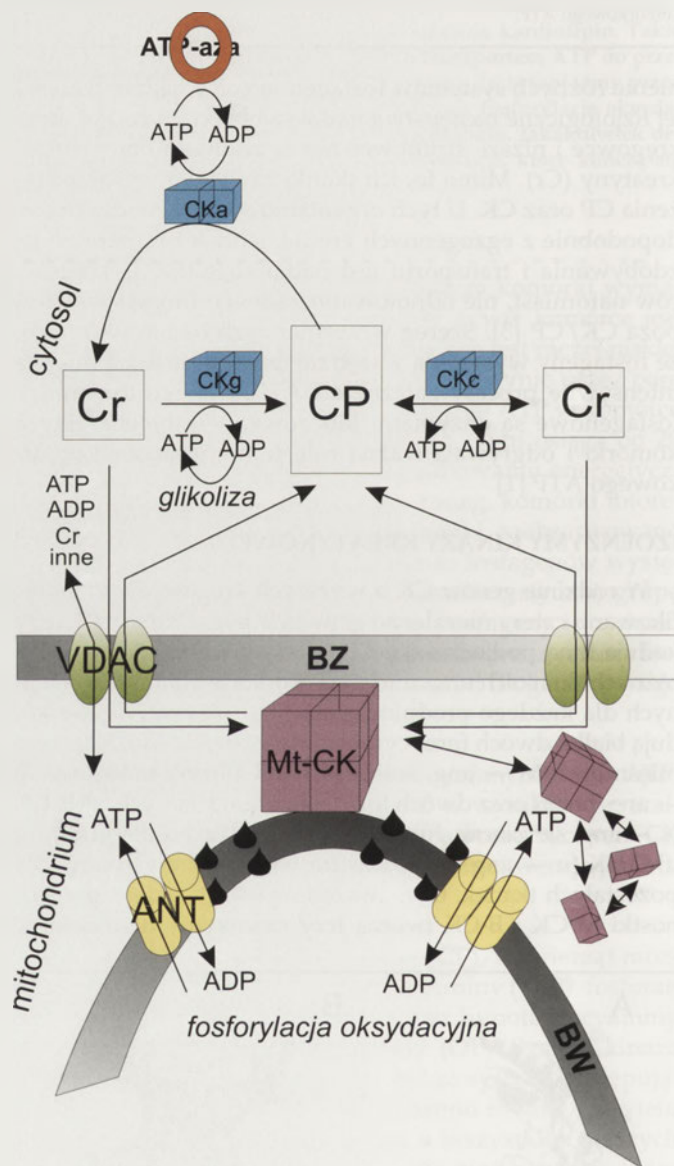
Rycina 2. A – struktura dimeru CK przypominająca kształtem banan (ang. *banana-shaped*) PDB ID: 110E [57]; B – struktura oktamery mitochondrialnego CK kształtem przypominająca sześcian (ang. *cube-like*) złożona z 8 identycznych monomerów PDB ID: 1QK1 [58].

z dwoma białkami transbłonowymi: translokazą nukleotydów adeninowych (ANT) w błonie wewnętrznej i poryną VDAC w błonie zewnętrznej. W takim kompleksie białkowym Mt-CK katalizuje reakcję przenoszenia grupy fosforanowej z ATP pochodzącego z fosforylacji oksydacyjnej na Cr. W ten sposób powstaje CP, która transportowana jest przez porynę VDAC do cytoplazmy. W cytoplazmie natomiast formy CK w postaci dimeru mogą być funkcjonalnie związane z glikolizą (CKg), wykorzystując ATP z fosforylacji substratowej do produkcji CP, która transportowana jest do miejsc bogatych w ATP-azy. Formy (CKa) występują w sąsiedztwie ATP-az miozynowej, wapniowej, sodowo-potasowej lub w plemnikach – dyneinowej. Tam głównie uczestniczą w regeneracji ATP. Formy cytoplazmatyczne (CKc), tzw. wolne, są rozpuszczone w cytosolu; ich zadaniem jest utrzymanie w równowadze stężeń CP i Cr oraz ATP i ADP.

Odkąd zaczęto brać pod uwagę funkcję transportową systemu CK/CP, pojawiły się rozważania na temat korzyści dyfuzji CP i Cr. Są one lepszymi cząsteczkami transportującymi energię od ATP i ADP dlatego, że są mniejsze i mają niższy ładunek ujemny od nukleotydów adeninowych. Potwierdzono, że zasięg dyfuzji CP i Cr jest znacznie większy od ATP i ADP (57 i 37  $\mu\text{m}$ ), a ADP, z zasięgiem wynoszącym tylko 1.8  $\mu\text{m}$ , jest najbardziej ograniczoną dyfuzyjnie cząsteczką ze wszystkich wyżej wymienionych. Jednak mała dyfuzyjność nukleotydów adeninowych nadal wystarcza do transportu energii w bardzo małych lub strukturalnie wyspecjalizowanych komórkach. Przykładem są mięśnie skrzydeł owadów, które zdolne są do ekstremalnie wysokiej produkcji energii, mimo braku mitochondrialnych form kinaz fosfagenowych. W tych wyspecjalizowanych mięśniach gęsto upakowane mitochondria są ściśle połączone z miofibrilami, w taki sposób, że odległość między mitochondriami a miofibrilami jest bardzo mała. Funkcja transportowa okazała się szczególnie ważna w komórkach o wysokiej polaryzacji, takich jak komórki fotoreceptorowe i plemniki, gdzie ograniczenia dyfuzyjne nukleotydów adeninowych mogą być ominięte dzięki systemowi izoenzymów CK [1]. W takich komórkach miejsca syntezy ATP (mitochondria zawierające Mt-CK) są oddalone od miejsc jego wykorzystania na ok. 50  $\mu\text{m}$  w komórkach fotoreceptorowych, a nawet 100  $\mu\text{m}$  w plemnikach [9]. Badania ewolucyjne nad budową plemników wskazują, że aktywność CK jest od 10 do 100 razy wyższa w plemnikach o prymitywnej budowie, niż w plemnikach o zaawansowanej budowie. Te pierwsze są charakterystyczne dla zapłodnienia zewnętrznego i zależne głównie od metabolizmu tlenowego. Charakteryzują się długą wtką i mitochondriami znajdującymi się głównie w główce plemnika. W tych komórkach dystans pomiędzy syntezą ATP a jego wykorzystaniem przez mikrotubule axonemy, pełniące funkcję ATP-azy dyneinowej, jest duży. Ponieważ dyfuzja nukleotydów adeninowych w tych komórkach jest szczególnie ograniczona, a CP i Cr wydają się znacznie lepszymi cząsteczkami transportowymi, system CK/CP w plemnikach ma duże znaczenie [1,10].

Komórki fotoreceptorowe, podobnie jak plemniki, wykazują silną polaryzację. Synteza ATP odbywa się w segmencie wewnętrznym, podczas gdy wiele reakcji odpo-

wiedzialnych za fototransdukcję odbywa się w segmencie zewnętrznym. Segmenty oddzielone są od siebie na dość znaczną odległość, a dodatkowo wąski kanał łączący segmenty redukuje dyfuzję. Obecność form mitochondrialnych i cytoplazmatycznych oraz stosunkowo wysoki poziom CP wskazuje, że system CK/CP zaangażowany jest również w bioenergetykę widzenia [1,11]. Dodatkowo, Mt-CK w siatkówce ulega dość późno ekspresji podczas rozwoju embrionalnego kurczaka i może być dobrym markerem różnicowania się komórek fotoreceptorowych [12]. System CK/CP daje więc możliwość ominięcia ograniczeń dyfuzji nukleotydów adeninowych, szczególnie w komórkach o



Rycina 3. „Czółenko fosfokreatynowe” w tkankach o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym na podstawie schematu z publikacji [1]. Oktaמר Mt-CK w kompleksie z VDAC i ANT katalizuje reakcję przenoszenia grupy fosforanowej z ATP pochodzącego z fosforylacji oksydacyjnej na Cr. Powstała w ten sposób CP transportowana jest do cytoplazmy. W cytoplazmie formy CK w postaci dimeru mogą być związane z glikolizą (CKg), wykorzystując ATP z fosforylacji substratowej do produkcji CP, która transportowana jest do miejsc bogatych w ATP-azy. Formy (CKa) występują w sąsiedztwie ATP-az, miozynowej, wapniowej, sodowo-potasowej lub w plemnikach – dyneinowej. Tam głównie uczestniczą w regeneracji ATP. Formy cytoplazmatyczne (CKc), tzw. wolne, są rozpuszczone w cytosolu; ich zadaniem jest utrzymanie w równowadze stężeń CP i Cr oraz ATP i ADP. BW – błona wewnętrzna, BZ – błona zewnętrzna.

wysokiej polaryzacji, wykorzystując CP i Cr jako nośniki energii pomiędzy mitochondriami a miejscami bogatymi w ATP-azy.

Stężenie CP i Cr, aktywność całkowita CK oraz lokalizacja i proporcje izoenzymów CK ściśle zależą od rodzaju tkanki i jej fizjologicznego zapotrzebowania oraz gatunku. W mięśniach glikolitycznych, odpowiedzialnych za szybkie skurcze, przeważa funkcja buforująca systemu CK/CP. Zaobserwowano tam bardzo wysokie zasoby CP oraz wyjątkowo wysoką ekspresję genu cytoplazmatycznej formy CK (CKg), znajdującej się w bliskim sąsiedztwie enzymów odpowiedzialnych za glikolizę. W mięśniach oksydacyjnych, o wolnych skurczach oraz mięśniu sercowym, przeważa funkcja transportowa systemu CK/CP. Odzwierciedla to niższy poziom CP oraz CKc, a stosunkowo wyższy Mt-CK, funkcjonalnie związanej z fosforylacją oksydacyjną. W mięśniu sercowym wartość Mt-CK oszacowano na ponad 30% aktywności całkowitej CK. Dla porównania, w mięśniach glikolitycznych wartość Mt-CK stanowi tylko 4%. Ekspresja genów danych form CK zależy od metabolicznych potrzeb komórki, od rodzaju i organizacji tkanki. W związku z tym, w pewnych tkankach preferowana będzie funkcja transportowa, a w innych funkcja buforująca systemu CK/CP. Dlatego w mięśniach oksydacyjnych, mięśniu sercowym, jak również w plemnikach i komórkach fotoreceptorowych funkcja transportowa systemu jest wyraźnie uzasadniona [1,13].

Kolejną bardzo ważną funkcją systemu CK/CP jest zabezpieczenie przed wzrostem stężenia wewnątrzkomórkowego ADP, i w konsekwencji, zapobieganie inaktywacji komórkowych ATP-az oraz utracie nukleotydów adeninowych. W mięśniu zaobserwowano 5–10% MM-CK związanej z prążkiem M w miofibrylach. Wysoki poziom CK reguluje również reakcję kinazy adenylanowej. Efektem tego jest utrzymanie odpowiednich zasobów nukleotydów adeninowych w komórce. Podczas regeneracji ATP, CK jako substraty wykorzystuje produkty komórkowych ATP-az, czyli ADP i jony  $H^+$ . W ten sposób CK zapobiega lokalnemu zakwaszeniu w pobliżu komórkowych ATP-az oraz wzrostowi stężenia ADP. W przeciwnym razie, po serii przemian enzymatycznych, nastąpiłby spadek nukleotydów adeninowych, co jest niebezpieczne dla komórki. ADP ulega wtedy przemianie do ATP i AMP za pośrednictwem kinazy adenylanowej, następnie z AMP powstaje IMP i amoniak przy udziale dezaminazy AMP, a IMP, tak jak AMP, ulega defosforylacji przez 5'-nukleotydazę. W wyniku tych przemian powstaje adenozyina i inozyna, które łatwo przechodzą przez błony. Dlatego enzymatyczna reakcja CK podczas aktywacji komórki zabezpiecza przed wzrostem wolnego ADP, które w przeciwnym razie mogłoby hamować procesy zależne od ATP i, dodatkowo, spowodowałoby utratę nukleotydów adeninowych poprzez aktywację kinazy adenylanowej, dezaminazy AMP oraz 5'-nukleotydazy [1].

Jednak podczas długotrwałej i wyczerpującej pracy mięśni obserwowany wzrost AMP jest przyczyną aktywacji kinazy zależnej od AMP (AMPK). Aktywność AMPK rośnie w wyniku metabolicznego stresu wywołanego ekstremalnym zapotrzebowaniem komórek mięśniowych na ATP. AMPK hamuje wiele szlaków biosyntezy, inaktywując en-

zymy poprzez ich fosforylację, a jednocześnie stymuluje wiele procesów katabolicznych, przykładowo – utlenianie kwasów tłuszczowych oraz transport glukozy [14]. Ponticos i współpracownicy [15] zaproponowali nowy model regulacji AMPK, w którym aktywacja AMPK następuje nie tylko w wyniku spadku stosunku ATP/AMP, ale także w wyniku spadku stosunku CP/Cr. Wykazali również, że AMPK może hamować aktywność mięśniowej formy MM-CK poprzez jej fosforylację. Wzajemne oddziaływanie tych dwóch kinaz wydaje się prawdopodobne. Jednakże system zaproponowany przez Ponticos i współpracowników nie został powszechnie zaakceptowany. W późniejszych badaniach zakwestionowano hamujący wpływ CP na aktywność AMPK oraz silne i bezpośrednie oddziaływanie AMPK z CK [16,17]. Kwestia związku AMPK i CK nadal wymaga wyjaśnienia. Mimo to, nie można wykluczyć zjawiska fosforylacji CK przez AMPK [15,17].

Model „cząłotka fosfokreatynowego” reprezentuje ważny z fizjologicznego punktu widzenia system. CK związana z retikulum sarkoplazmatycznym jest niezbędna do efektywnego działania pomp jonowych, a szczególnie pompy wapniowej. Prawdopodobnie, rola CK w homeostazie jonów wapniowych w aktywnych komórkach jest jedną z kluczowych funkcji systemu CK/CP [18]. Dowiedziono tego, badając transgeniczną mysz z wyłączoną ekspresją genów form MM-CK i Mt-CK. Jej mięśnie wykazywały problemy z pracą i gospodarką wapniową. Zakłócona równowaga jonowa, przede wszystkim jonów wapnia, może prowadzić do chronicznego jego wzrostu w cytosolu [19].

Wyżej wymienione funkcje oraz model „cząłotka fosfokreatynowego” przy udziale izoenzymów CK spełnia wymagania wysoce zorganizowanego systemu buforującego i transportującego energię. Równocześnie spełnia funkcję systemu regulującego i kontrolującego stosunek ATP/ADP w komórce. W cytoplazmie CK pośrednio zwiększa wydajność hydrolizy ATP przez utrzymanie wysokiego lokalnego stosunku  $[ATP]/[ADP]$  w sąsiedztwie komórkowych ATP-az. Z kolei współdziałanie Mt-CK, ANT i VDAC znacznie poprawia wydajność mitochondrialnej wymiany energii. Energia swobodna z hydrolizy ATP jest bezpośrednio „konserwowana” w postaci CP, która nie jest już substratem dla ANT. Translokaza ANT, wysycona ADP, gotowa jest do następnej reakcji wymiany ATP z ADP. Wszystko to prowadzi do stymulacji fosforylacji oksydacyjnej przez utrzymanie relatywnie niskiego stosunku  $[ATP]/[ADP]$  w macierzy mitochondrialnej [1].

## STRUKTURA MOLEKULARNA Mt-CK

Bogatoenergetyczny fosforan w postaci CP po raz pierwszy został odkryty w 1928 roku w mięśniach i początkowo uważany był za bezpośrednie źródło energii dla pracy mięśni [20]. Jednak w 1934 roku Lohman odkrył enzym – kinazę kreatynową i wykazał, że grupa fosforanowa z CP przenoszona jest na ADP, w wyniku czego następuje regeneracja ATP [21]. ATP został potem uznany za uniwersalne źródło energii we wszystkich żywych organizmach [22]. Po raz pierwszy CK oczyścił w 1954 roku Kuby i współpracownicy. Od tej pory, przez wiele lat, CK uważana była jedynie za enzym spełniający funkcję buforującą poziom ATP w ko-

mórcie [23]. Odkrycie form mitochondrialnych i wykazanie funkcjonalnego związku Mt-CK, ANT i poryny VDAC dało nowy pogląd na funkcjonowanie systemu CP/CK. Otrzymane ostatnio krystaliczne struktury Mt-CK oraz BB-CK w promieniach Rentgena rzucają nowe światło na ważne funkcjonalne aspekty systemu CK/CP zaangażowanego w przepływ energii. Szczegółowa analiza strukturalno-funkcjonalna pozwoliła na uzupełnienie wiedzy dotyczącej molekularnej fizjologii enzymów, ich miejsc katalitycznych i mechanizmów wiązania substratów, równowagi oktamer/dimer, a także oddziaływań z błonami mitochondrialnymi i znajdującymi się w niej białkami – poryną VDAC i ANT. Pierwsze próby krystalizacji form cytoplazmatycznych sięgają już lat 50. XX wieku, mimo to satysfakcjonującą strukturę krystaliczną otrzymano dopiero w 1996 roku w laboratorium Wallimanna, wykorzystując Mt-CK z mięśni kurczaka [24].

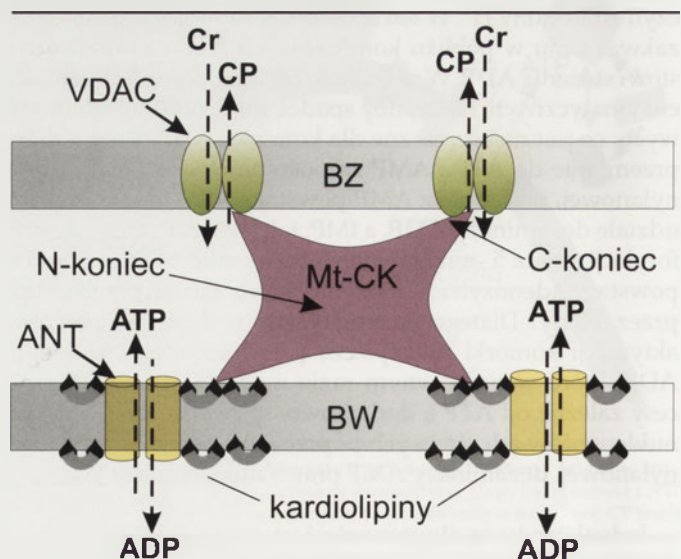
Monomer Mt-CK zbudowany jest z małej N-końcowej domeny (domena I) i drugiej, większej C-końcowej domeny (domena II) z miejscem wiązania ATP zlokalizowanym w szczelinie pomiędzy dwiema domenami [25]. Strukturę oktameru utrzymują liczne oddziaływania jego monomerów. Oktamery są całkiem stabilne, a dysocjacja do dimerów po rozcieńczeniu trwa zwykle od kilku godzin do kilku tygodni. Proces dysocjacji może być przyspieszony przez dodanie odpowiednich substratów tworzących analogowy kompleks przejściowy TSAC (ang. *Transition State Analogue Complex*), który redukuje czas dysocjacji do minut [26]. Dimery wszystkich izoenzymów CK są bardzo stabilne. Z tych informacji nasuwa się wniosek, że oktamer tworzą bloki dimerów oparte na wielu oddziaływaniach pomiędzy monomerami w takich warunkach, w których oddziaływania monomer-monomer tworzące dimer są ważniejsze i silniejsze, niż oddziaływania utrzymujące razem dimery w strukturze oktameru. Udowodniono udział Trp 206 w stabilizacji dimerów, który położony jest w rejonie kontaktowym monomer-monomer. Natomiast Trp 264 zlokalizowany pomiędzy dimerami odpowiedzialny jest za oddziaływania dimer-dimer, czego dowodem jest duży spadek fluorescencji tego tryptofanu w wyniku dysocjacji oktameru do dimerów z udziałem substratów TSAC. Z kolei Trp 223 i Cys 278 odgrywają kluczowe role w miejscu aktywnym dla aktywności enzymu [25,27].

#### MOTYWY WIĄŻĄCE Mt-CK DO BŁON MITOCHONDRIALNYCH

Chociaż związek Mt-CK, ANT i poryny został wykazany na funkcjonalnym poziomie [1], długo nie uzyskiwano bezpośrednich dowodów na strukturalne oddziaływania tych trzech elementów *in vivo*. Wkrótce zaobserwowano specyficzne, fizyczne oddziaływanie poryny i Mt-CK regulowane przez jony wapnia. Wskazywało to na fizjologiczną regulację formowania tego kompleksu [28]. Natomiast nie odnotowano żadnych bezpośrednich oddziaływań z ANT, chociaż wiadomo o dużym powinowactwie zarówno ANT, jak Mt-CK do kardiolipin (CL), znajdujących się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [7]. Przez długi czas nie było wiadomo dokładnie, która część struktury oktameru zaangażowana jest w oddziaływanie z CL w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Długo uważano, że strukturą tą jest N-końiec, ze

względu na obecność aminokwasów o ładunku dodatnim i silnie zachowany w ewolucji ciąg sekwencji, charakterystyczny dla wszystkich mitochondrialnych form CK. Jednak badania krystalograficzne wykazały, że N-końiec schowany jest wewnątrz oktameru, co wyklucza jego oddziaływanie z błonami (Ryc. 4) [29]. Dodatkowo, heptapeptyd na N-końcu pełni raczej ważną funkcję w formowaniu i stabilizacji oktamerycznej cząsteczki [30]. Oddziaływania dimer-dimer mogą mieć duże znaczenie w przejściach dimer-oktamer *in vivo*, co może regulować formowanie miejsc kontaktowych, a także fosforylację oksydacyjną. Khuchua i współpracownicy w 1998 roku wykazali, używając Mt-CK z mięśni myszy, że substytucja na N-końcu aminokwasów o ładunku dodatnim na aminokwasy obojętne wyraźnie zakłóca równowagę oktamer-dimer w kierunku tworzenia dimeru [31].

Wcześniej tylko przypuszczano, że domeną oddziałującą z błoną wewnętrzną jest ruchomy C-końiec oktameru [25]. Dopiero Schlattner i współpracownicy w 2004 roku udowodnili, że C-końiec oktameru, a szczególnie trzy reszty lizyny, determinują silne powinowactwo oktameru do kardiolipin [32]. Model rozmieszczenia Mt-CK, poryny VDAC i translokazy ANT przedstawia rycina 4. Kardiolipiny pełnią funkcję łącznika w formowaniu funkcjonalnego kompleksu pomiędzy Mt-CK i ANT, a struktura oktameru jest ważnym czynnikiem determinującym jego powstanie. C-końiec jest sekwencją spełniającą wszystkie kryteria, w której akumulacja 6 lub 7 zasadowych aminokwasów nadaje temu fragmentowi ładunek dodatni i równocześnie jest dobrze wyeksponowana na powierzchniach wiążących struktury oktameru (Ryc. 4). Sekwencja ta prawdopodobnie bierze udział w wiązaniu do błon mitochondrialnych, gdzie głównie elektrostatyczne oddziaływania przeważają nad hydrofobowymi. W tym modelu Mt-CK pełni funkcję mostu pomiędzy błonami mitochondrialnymi, funkcjonalnie oddziałując z ANT i poryną VDAC w bliskim sąsiedztwie kardiolipin/fosfolipidów. Dodatkowo, zaobserwowano, że miejsca kontaktowe bogate są w poryny VDAC, ANT oraz,



**Rycina 4.** Przedstawienie topologii Mt-CK i ANT, gdzie C-końiec oktameru Mt-CK i ANT położone są w bliskim sąsiedztwie przez wiązanie do wspólnych kardiolipin w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [32]. Na rysunku schematycznie zaznaczono główny motyw wiążący w Mt-CK (C-końiec) oraz sekwencję N-końca ukrytą wewnątrz struktury oktameru [29].

co najważniejsze, w oktamer Mt-CK. Takie powiązanie stwarza strukturalne podstawy do związku funkcjonalnego Mt-CK z transportem ATP do przestrzeni międzybłonowej mitochondriów przez ANT, a CP do cytoplazmy przez porynę VDAC [25,29,32].

### Mt-CK U BEZKREGOWCÓW

Badania sugerują, że w strukturze genomowej rodziny genów CK nastąpiły dwie specyficzne duplikacje genu. Pierwsza duplikacja dała początek genom mitochondrialnym i cytoplazmatycznym, która miała miejsce przed dywergencją pierwo- i wtóroustych. Wynika z tego, że oktamerizacja przypuszczalnie nie jest zaawansowaną cechą. W wyniku drugiej duplikacji powstały dwie formy cytoplazmatyczne, M-CK i B-CK, oraz dwie formy mitochondrialne, sMt-CK i uMt-CK [33,34]. Obecnie kwestia ewolucji genów CK, duplikacji i dywergencji jest nadal weryfikowana. Najnowsza analiza drzew filogenetycznych i struktury genomu wskazuje, że prawdopodobnie mitochondrialno-podobny gen CK jest wspólnym przodkiem dla izoenzymów CK, a także enzymów należących do innych systemów fosfagenowych. Dotyczy to zarówno form mitochondrialnych (Mt-CK, Mt-LK, Mt-TK), jak i form cytoplazmatycznych (CK, LK, TK, AK, GK). Konkluzja, że Mt-CK kręgowców i bezkręgowców ma to samo pochodzenie jest jak najbardziej prawdopodobna oraz to, że Mt-CK jest genem wyjściowym również dla enzymów mitochondrialnych i cytoplazmatycznych pierścienic (Mt-LK, Mt-TK, LK, TK, AK, GK). Jednak to, czy gen Mt-CK jest również przodkiem cytoplazmatycznych form CK, które powstałyby wtórnie w ewolucji nadal jest spekulacją wymagającą wyjaśnienia [35]. To, że struktura oktameru jest raczej prymitywną cechą rodziny tego enzymu potwierdza fakt występowania tej formy u wieloszczeta *Chaetopterus variopdatus*, należącego do grupy pierwoustych. Ellington i współpracownicy (1998) po raz pierwszy odnotowali obecność Mt-CK w formie oktameru u niższych bezkręgowców [36]. Wcześniej forma ta została opisana u kręgowców i w plemnikach szkarłupni, których przedstawiciele należą do wtóroustych, a linie ich rozeszły się 670 milionów lat temu z głównej linii pierwoustych. Udowodniono, że system CK/CP jest niezbędny do ruchu plemników, szczególnie o prymitywnej budowie, gdzie polaryzacja komórki jest wysoka [37]. Późniejsze badania wykazały, że Mt-CK szkarłupni rzeczywiście tworzy struktury oktameryczne, ale w porównaniu z Mt-CK kręgowców jest niezwykle stabilny i nie dysocjuje do dimerów podczas formowania kompleksu TSAC [38]. W plemnikach wieloszczeta również zlokalizowano formę mitochondrialną CK tworzącą struktury oktameryczne [36]. Na podstawie sekwencji aminokwasowej wykazano wiele podobieństw do Mt-CK kręgowców dotyczących motywów wiązania do błon mitochondrialnych oraz obecności zachowanej w ewolucji reszty tryptofanu, ważnej w stabilizacji dimeru, obecnej we wszystkich dimerycznych i oktamerycznych kinazach guanidynowych [34]. Mimo wysokiego stopnia podobieństwa sekwencji aminokwasowej (około 71% z Mt-CK kręgowców), u Mt-CK z *Chaetopterus* nie zidentyfikowano trzech reszt zasadowych aminokwasów biorących udział w bezpośrednim łączeniu z kardiolipinami w błonie mitochondrialnej. C-koniec raczej podobny jest do kinaz cytoplazmatycznych M-CK i B-CK, które znane są ze słabego oddziaływania z kardiolipinami

[29]. Prawdopodobnie oktamery bezkręgowców nie są w stanie stworzyć funkcjonalnego kompleksu w sposób, jaki tworzą ten kompleks oktamery kręgowców. Pojawiają się spekulacje, że wiązanie Mt-CK do kardiolipin i stworzenie metabolicznego i funkcjonalnego związku z ANT pojawiło się później w ewolucji kręgowców, podczas gdy Mt-CK bezkręgowców okazjonalnie wiązało się do błon na zasadzie hydrofobowych oddziaływań [32]. Podobnie, na N-końcu nie zlokalizowano charakterystycznego heptapeptydu, obecnego w Mt-CK u kurczaka, odpowiedzialnego za oddziaływanie dimer-dimer [34]. Oktamer wieloszczeta, tak jak oktamer szkarłupni, jest równie stabilny i bardzo słabo dysocjuje do dimerów w obecności TSAC w porównaniu do oktameru kręgowców [36,39]. Może to wskazywać na odmienny mechanizm łączenia dimerów w oktamer.

Warto również wspomnieć, że w plemnikach prawie zawsze występuje system CK/CP, mimo że w tkankach somatycznych tych samych osobników może występować inny system fosfagenowy (jeden z ośmiu) [40]. Fakt ten, a także obecność izoenzymów CK w wysoce spolaryzowanych komórkach plemnikowych prymitywnego typu, wskazuje na wczesną rolę systemu CK/CP w transporcie energii [3].

### Mt-CK JAKO REGULATOR KOMPLEKSU VDAC-ANT

Podstawą molekularną megakanalu mitochondrialnego PTP (ang. *Permeation Transition Pore*) jest poryna VDAC zlokalizowana w błonie zewnętrznej mitochondriów oraz ANT w błonie wewnętrznej. W obrębie kompleksu VDAC-ANT zlokalizowano także cyklofilinę D połączoną z ANT od strony macierzy mitochondrialnej, a także wiele innych białek i enzymów regulujących przepuszczalność tego kanału, takich jak: heksokinaza (HK), mitochondrialna kinaza kreatynowa (Mt-CK) oraz białka z rodziny Bcl-2 (Bax i t-Bid działające pro-apoptotycznie) [41].

Zaobserwowano dwie główne role mitochondrialnego kompleksu białkowo-lipidowego VDAC-ANT. Pierwsza, regulująca gospodarkę energetyczną komórki w momencie, gdy w skład kompleksu wchodzi HK lub Mt-CK oraz druga, indukująca śmierć komórki w momencie, gdy kompleks zmienia się w nieselektywny megakanal. Może to spowodować załamanie mitochondrialnego potencjału błonowego i aktywację łańcucha reakcji, które kończą się śmiercią komórki. Głównym sprawcą tego zjawiska jest stres oksydacyjny oraz wzrastający poziom jonów wapnia [42].

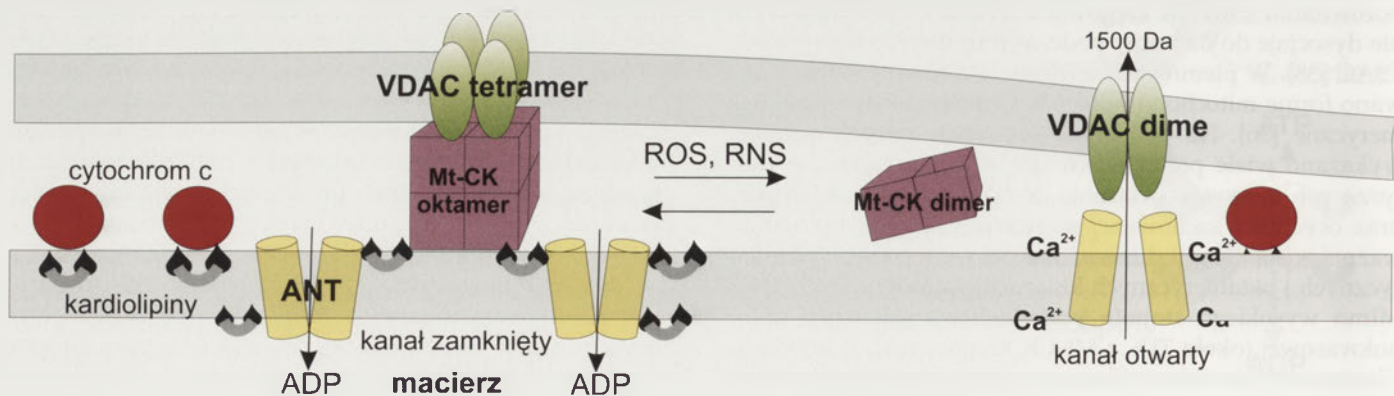
Kardiolipiny są istotnym składnikiem wewnętrznej błony mitochondrialnej. Odgrywają ważną rolę w inicjacji procesu apoptozy jako specyficzne miejsca wiązania ANT, cytochromu c i pro-apoptotycznych białek, takich jak Bax czy t-Bid. Wiadomo także, że miejsca kontaktowe (styku dwóch błon mitochondrialnych) bogate są w ten specyficzny dla błony wewnętrznej fosfolipid, porynę VDAC i wyżej wymienione białka. Kardiolipiny, według modelu Van Venetie'a i Verkleijego [43], w wyniku działania jonów wapnia mogą tworzyć odwrócone micle lub inne jednowarstwowe struktury błony lipidowej. To może wyjaśnić dlaczego kardiolipiny z błony wewnętrznej mitochondriów mogą przejść na powierzchnię mitochondriów, a cy-

tochrom c może być uwolniony przez białko Bax, wiążące się do kardiolipin w obrębie porony VDAC, bez tworzenia specjalnych porów. Białko pro-apoptotyczne Bax współzawodniczy również z HK o miejsce wiązania w obrębie VDAC. W momencie obecności jonów wapnia i braku ADP, ANT zmienia konformację z translokazy nukleotydów adeninowych na funkcję uniwersalnego przenośnika, a Bax, łącząc się do kardiolipin przy VDAC, uwalnia cytochrom c do cytosolu. Obecność HK związanej z VDAC uniemożliwia dostęp Bax do cytochromu c oraz ogranicza otwarcie megakanalu [42-45].

Natywna forma oktameru Mt-CK wykazuje wysokie powinowactwo do kardiolipin oraz porony VDAC. Dimery pochodzące z dysocjacji oktameru tracą te właściwości. Tylko natywna cząsteczka oktameru jest w stanie stworzyć funkcjonalny kompleks białkowo-lipidowy, odgrywający rolę nie tylko w gospodarce energetycznej komórki, ale także w procesie programowanej śmierci komórki [45]. Zaobserwowano, że obecność oktameru Mt-CK, podobnie jak HK, ochrania otwarcie kanału mitochondrialnego oraz ogranicza proces apoptozy. Oktamer Mt-CK zlokalizowany w miejscach kontaktowych uniemożliwia bezpośredni związek VDAC z ANT oraz jakiegokolwiek aranżacje odwróconych micel i innych jednowarstwowych struktur błony lipidowej (Ryc. 5) [42]. Dysocjacja oktameru CK zwiększa możliwość bezpośredniego kontaktu VDAC-ANT, a pod wpływem wzrastającego poziomu jonów wapnia kompleks ten może tworzyć niespecyficzny megakanal. Prowadzi to do zakłócenia mitochondrialnego potencjału błonowego i w konsekwencji – apoptozy. W komórkach z nadprodukcją ANT zaobserwowano wzrost apoptozy. Równoległa nadprodukcja Mt-CK zniósła efekt wzrostu apoptozy. Z tego wynika, że Mt-CK może pełnić funkcję regulatora przepuszczalności kanału mitochondrialnego. Jako oktamer redukuje szanse bezpośredniego kontaktu VDAC-ANT. Jednak szansa otwarcia wzrasta w przypadku nadprodukcji ANT lub dysocjacji oktameru [46]. W obecności HK i Mt-CK, ANT funkcjonuje tylko jako translokaza ATP i ADP, a cały białkowo-lipidowy kompleks błonowy zaangażowany jest w regulację fosforylacji oksydacyjnej i transport energii. Zaangażowanie Mt-CK w regulację przepuszczalności mitochondrialnego kanału zademonstrowano, izolując

mitochondria transgenicznej myszy, wykazujące syntezę Mt-CK w wątrobie. Eksperymenty te pokazują, że Mt-CK w kompleksie z ANT i w obecności substratów jest w stanie opóźnić lub nawet zapobiec otwarciu kanału indukowanego przez jony wapnia [47]. Dokładniej mówiąc, to nie sama obecność Mt-CK jest inhibitorem przepuszczalności, ale jej aktywność enzymatyczna i specyficzna lokalizacja w całym białkowo-lipidowym kompleksie mitochondrialnym. Tylko Mt-CK wraz z substratami reakcji, czyli Cr i ATP, jest zdolna utrzymać wysokie stężenie ADP w macierzy mitochondrialnej, co efektywnie hamuje otwarcie porów, a ANT działa głównie jako translokaza ADP i ATP [48]. Reakcja enzymatyczna Mt-CK stymuluje fosforylację oksydacyjną, co redukuje mitochondrialny potencjał błonowy oraz formowanie reaktywnych form tlenu ROS przez aktywację kompleksu syntazy ATP. Dlatego Mt-CK poprzez aktywność i funkcjonalny związek z ANT może zapobiegać tworzeniu ROS [49]. Niektóre doniesienia wskazują również na strukturalno-stabilizującą rolę Mt-CK w miejscach kontaktowych. Ekspresja genu kodującego Mt-CK w komórkach wątroby transgenicznej myszy wzmacnia odporność błon na działanie detergentu lizującego poprzez wzrost miejsc kontaktowych w mitochondriach [50]. W konsekwencji Mt-CK, poprzez oddziaływanie z błonami mitochondrialnymi, zwiększa stabilność całej błonowej architektury mitochondriów.

W mitochondrium około 90% aktywności CK stanowi mitochondrialny oktamer. Warunki *in vivo*, takie jak wysokie stężenie Mt-CK i temperatura w przestrzeni międzybłonowej faworyzują strukturę oktameru. W wielu stanach patologicznych zaobserwowano wzrost stężenia mitochondrialnych dimerów [51], a także destabilizację, inaktywację i dysocjację oktamerów podczas stresu oksydacyjnego [52]. Ze względu na lokalizację mitochondrialną wykazano, że Mt-CK jest jednym z głównych celów ataku reaktywnych form tlenu (ROS) i azotu (RNS), które wywołują inaktywację lub dimeryzację oktamerycznej cząsteczki (Ryc. 5). Jest to możliwe przez modyfikację odpowiednich aminokwasów wchodzących w skład miejsca aktywnego oktameru (cysteina 278) lub odpowiedzialnych za oddziaływanie dimer/dimer (tryptofan 264). Zaobserwowano również modyfikację cysteiny 358 na C-końcu, co prawdopodobnie związane jest ze spadkiem



Rycina 5. Struktura kompleksu VDAC-ANT w obecności mitochondrialnego oktameru Mt-CK. Oktamer Mt-CK, zlokalizowany w miejscach styku dwóch błon mitochondrialnych, uniemożliwia bezpośredni związek VDAC z ANT oraz jakiegokolwiek aranżacje odwróconych micel i innych jednowarstwowych struktur błony lipidowej [42]. Destabilizacja struktury oktameru Mt-CK przez ROS lub RNS zwiększa możliwość bezpośredniego kontaktu VDAC-ANT. Pod wpływem warunków stresowych i wzrastającego poziomu jonów wapnia kompleks VDAC-ANT może tworzyć niespecyficzny megakanal, biorąc udział w procesie apoptozy komórki [48].



powinowactwa motywu wiążącego do błon mitochondrialnych [48].

Wątroba jest idealnym obiektem badań nad funkcją izoenzymów CK ze względu na brak w niej ekspresji genów CK. Stanowi idealną kontrolę dla transgenicznych zwierząt, najczęściej myszy. W wielu przypadkach u transgenicznych zwierząt z ekspresją genu Mt-CK zaobserwowano większą wydajność fosforylacji oksydacyjnej, obniżony poziom nekrozy i apoptozy, przyspieszoną regenerację komórek i ogólnie lepszą przeżywalność tych organizmów podczas różnych sytuacji stresowych [53].

### CHOROBY ZWIĄZANE Z ZABURZONYM FUNKCJONOWANIEM SYSTEMU CK/CP

Patogeneza wielu neurozwyrodnieniowych chorób, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntington'a i ALS (ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* – stwardnienie zanikowe boczne), związana jest z dysfunkcją mitochondriów, która następuje wskutek mutacji w jądrowym lub mitochondrialnym DNA. Mutacje te prowadzą do powstania ROS i RNS, pogorszenia stanu energetycznego komórek, a w końcowym efekcie – nawet do nekrozy i apoptozy. Wrażliwość izoenzymów CK na ROS udokumentowano w rozdziale powyżej. Inaktywacja CK oraz destabilizacja oktameru Mt-CK może wpływać na poważne zaburzenia w gospodarce energetycznej komórek oraz na regulację megakanalu mitochondrialnego. Dość znaczny spadek aktywności izoenzymów CK oraz ich inaktywację przez ROS i RNS zaobserwowano w mózgu u pacjentów z chorobą Alzheimera oraz w ALS [48,54].

System CK/CP jest również niezbędny do prawidłowego funkcjonowania serca. Stężenie Mt-CK w sercu osiąga najwyższą wartość ze wszystkich pozostałych tkanek. Skutkiem stresu, niedokrwienia (ischemia) i innych kardiomiopatii jest inaktywacja izoenzymów CK zarówno cytoplazmatycznych, jak i mitochondrialnych, co zaburza homeostazę jonów wapniowych oraz gospodarkę energetyczną przez utratę funkcjonalnego związku Mt-CK, ANT i fosforylacji oksydacyjnej. Często też w takich komórkach obserwuje się wysoki stopień apoptozy [48].

Ekspresja genu Mt-CK regulowana jest w powiązaniu z metabolicznym stanem energetycznym komórki. Nadekspresja genu Mt-CK prowadzi do powstania kryształków, zwanych MIBs „mitochondrialnymi ciałkami inkluzyjnymi” (ang. *Mitochondrial Inclusion Bodies*). Mt-CK jest jednym z głównych białek ulegających nadprodukcji w komórkach mięśniowych w stanach chorobowych. Obecnie identyfikacja MIBs w tkankach mięśniowych pacjentów jest potwierdzeniem stanu patologicznego tych komórek. W przeciwieństwie do funkcjonalnego i strukturalnego uszkodzenia Mt-CK, w wyniku oksydacyjnej modyfikacji przez ROS i RNS, mechanizm nadprodukcji tego izoenzymu może rekompensować niski stan energetyczny komórki. Nadprodukcję Mt-CK zaobserwowano w wielu mitochondrialnych cytopatiach, takich jak MELAS, MERF lub CPEO oraz w złośliwych komórkach nowotworowych. Nadekspresja genów Mt-CK w komórkach nowotworowych może być wynikiem metabolicznej

adaptacji do szybkich podziałów w warunkach niedoboru tlenu i glukozy. Podwyższony poziom Mt-CK nie tylko pomaga w utrzymaniu wysokiego stanu energetycznego, ale także chroni komórki przed stresem i apoptozą. W tym wypadku kreatyna jako lek powinna potencjalnie zwiększyć odporność komórek rakowych. Jednak wszystkie badania *in vitro*, jak i *in vivo* potwierdzają, że kreatyna raczej wyraźnie hamuje, a nie stymuluje wzrost komórek rakowych. Ochronną rolę kreatyny odnotowano również w wielu chorobach neuro mięśniowych i neurodegeneracyjnych, jako znakomity dodatek do terapii, łagodzący objawy wyżej wymienionych chorób [48,55]. Komórki skóry, keratynocyty, także pozytywnie reagują na kreatynę, która prawdopodobnie opóźnia procesy starzenia oraz chroni komórki przed niszczącym działaniem stresu oksydacyjnego i promieniowania UV [56].

### ZAKOŃCZENIE

Kinaza kreatynowa jest kluczowym enzymem kontrolującym gospodarkę energetyczną komórki. Szczególnie ważną rolę odgrywa w tkankach o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym, a także w dużych, wysoce spolaryzowanych komórkach, takich jak komórki fotoreceptorowe i plemniki. W cytoplazmie u większości kręgowców izoenzymy CK występują w postaci dimeru, a w mitochondriach mogą tworzyć struktury oktameryczne. Ze względu na specyficzną lokalizację mitochondrialnych i cytoplazmatycznych izoenzymów CK oraz szybszą dyfuzję CP i Cr w porównaniu do ATP i ADP, CK/CP system efektywnie łączy miejsca syntezy ATP z miejscami jego wykorzystywania. Pozwala to na utrzymanie wysokiego lokalnego stosunku [ATP]/[ADP] w sąsiedztwie komórkowych ATP-az, a z drugiej strony – relatywnie niskiego stosunku [ATP]/[ADP] w macierzy mitochondrialnej, co stymuluje fosforylację oksydacyjną. Mt-CK zlokalizowana w miejscach kontaktowych błon mitochondrialnych funkcjonalnie oddziałuje z poryną VDAC oraz ANT. Czynnikiem warunkującym tworzenie tego białkowo-lipidowego kompleksu jest struktura oktameru, która wykazuje silne powinowactwo do kardiolipin.

Oktamer Mt-CK może być także ważnym składnikiem regulującym otwarcie nieselektywnego megakanalu mitochondrialnego, biorąc w ten sposób udział w procesie apoptozy komórki. Obecność oktameru Mt-CK wraz z substratami jego reakcji, czyli Cr i ATP, efektywnie hamuje otwarcie mitochondrialnego megakanalu indukowanego przez wzrastający poziom wapnia. Utrata jakiegokolwiek z mitochondrialnych funkcji i produkcja ROS oraz RNS są przyczyną szeregu chorób nerwowomięśniowych, neurodegeneracyjnych i innych dolegliwości związanych z wiekiem. Fenotyp tych chorób często charakteryzuje się słabym stanem energetycznym komórek, podwyższonym stężeniem jonów wapnia oraz zwiększoną apoptozą. Inaktywacja izoenzymów CK oraz destabilizacja struktury Mt-CK zakłóca prawidłowe funkcjonowanie systemu CK/CP i znosi funkcję ochronną Mt-CK w tworzeniu megakanalu mitochondrialnego. Zaburzenia związane z funkcjonowaniem izoenzymów CK mają coraz większe znaczenie w medycynie. Dlatego coraz częściej wykorzystuje się Cr i jej analogi, jako środki pomocnicze w leczeniu wyżej wymienionych chorób.

## PIŚMIENNICTWO

- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes: the phospho-creatine circuit for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281: 21-40
- Wyss M, Smeitnik J, Wevers RA, Wallimann T (1992) Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochem Biophys Acta* 1102: 119-166
- Ellington WR (2001) Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annu Rev Physiol* 63: 289-325
- Ellington WR (2000) A dimeric creatine kinase from a sponge: implications in terms of phosphagen kinase evolution. *Comp Biochem Physiol* 126B: 1-7
- Muhlebach SM, Gross M, Wirz T, Wallimann T, Perriard JC, Wyss M (1994) Sequences homology and structure predictions of creatine kinase isozymes. *Mol Cell Biochem* 133/134: 245-262
- Muhlebach SM, Wirz T, Brandle U, Perriard JC (1996) Evolution of the creatine kinases. *J Biol Chem* 271: 11920-11929
- Schlattner U, Wallimann T (2000) Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. *J Biol Chem* 275: 17314-17320
- Meyer R, Sweeney HL, Kushmeric MJ (1984) A simple analysis of the "phosphocreatine shuttle". *Am J Physiol* 254C: 365-377
- Quest AFG, Shapiro BM (1991) Membrane association of flagellar creatine kinase in the sperm creatine phosphate shuttle. *J Biol Chem* 266: 19803-19811
- Tombes RM, Shapiro BM (1989) Energy transport and cell polarity: relationship of phosphagen kinase activity to sperm function. *J Exp Zool* 251: 82-90
- Hemmer W, Riesinger I, Wallimann T, Eppenberger HM (1993) Brain type creatine kinase in photoreceptor cell outer segments: role of phosphocreatine circuit in outer segment energy metabolism and phototransduction. *J Cell Sci* 106: 671-684
- Wegmann G, Huber R, Zanolla E, Eppenberger HM, Wallimann T (1991) Differential expression and localization of brain-type and mitochondrial creatine kinase isoenzymes during development of the chicken retina: Mi-CK as a marker for differentiation of photoreceptor cells. *Differentiation* 46: 77-87
- Ventura-Clapier R, Kuznetsov A, Veksler V, Boehm E, Anfous K (1998) Functional coupling of creatine kinase in muscles: species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem* 184: 231-247
- Hardie DG, Hawley SA, Scott JW (2006) AMP-activated protein kinase-development of a energy sensor concept. *J Physiol* 574: 7-15
- Ponticos M, Lu QL, Morgan JE, Hardie DG, Partridge TA, Carling D (1998) Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *EMBO J* 17: 1688-1699
- Taylor EB, Ellingson WJ, Lamb JD, Chesser DG, Compton CL, Winder WW (2006) Evidence against regulation of AMP-activated protein kinase and LKB1/STRAD/MO25 activity by creatine phosphate. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E661-E669
- Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D (2006) Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 281: 32207-32216
- Rossi AM, Eppenberger HM, Volpe P, Cotrufo R, Wallimann T (1990) Muscle-type MM-creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and support  $Ca^{2+}$ -uptake and regulate local ATP/ADP ratios. *J Biol Chem* 265: 5258-5266
- Steeghs K, Benders A, Oerlemans F, deHaan A, Heerschap A, Ruitenberg W, Jost C, vanDeursen J, Perryman B, Pette D, Bruckwilder M, Koudijs J, Jap P, Veerkamp J, Wieringa B (1997) Altered  $Ca^{2+}$ -homeostasis in muscles with combined mitochondrial and cytosolic CK deficiencies. *Cell* 89: 93-103
- Eggleton P, Eggleton GP (1928) Further observations of phosphagens. *J Physiol* 65: 15-24
- Lohman K (1934) Über die enzymatische aufspaltung der kreatine-phosphorsäure; zugleich ein beitrag zum chemismus der muskelkontraktion. *Biochem Z* 271: 264-277
- Lipmann F (1941) Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Adv Enzymol* 1: 99-162
- Kuby SA, Noda L, Lardy HA (1954) Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase. I. Isolation of the crystalline enzyme from rabbit muscle. *J Biol Chem* 209: 191-201
- Fritz-Wolf K, Schnyder T, Wallimann T, Kabsch W (1996) Structure of mitochondrial creatine kinase. *Nature* 381: 341-345
- Schlattner U, Forstner M, Eder M, Stachowiak O, Fritz-Wolf K, Wallimann T (1998) Functional aspects of X-ray structure of mitochondrial creatine kinase: a molecular physiology approach. *Mol Cell Biochem* 184: 125-140
- Gross M, Wallimann T (1993) Kinetics of assembly and dissociation of the mitochondrial creatine kinase octamer. A fluorescence study. *Biochemistry* 32: 13933-13940
- Gross M, Furter-Gravers EM, Wallimann T, Eppenberger HM, Furter R (1994) The tryptophan residues of mitochondrial creatine kinase: Roles of Trp-223, Trp-206 and Trp-264 in active-site and quaternary structure formation. *Protein Sci* 3: 1058-1068
- Schlattner U, Dolder M, Wallimann T, Tokarska-Schlattner M (2001) Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. *J Biol Chem* 276: 48027-48030
- Stachowiak O, Schlattner U, Dolder M, Wallimann T (1998) Oligomeric state and membrane binding behaviour of creatine kinase isoenzymes: implications for cellular function and mitochondrial structure. *Mol Cell Biochem* 184: 141-151
- Kaldis P, Furter R, Wallimann T (1994) The-N-terminal heptapeptide of mitochondrial creatine kinase is important for octamerization. *Biochemistry* 33: 952-959
- Khuchua ZA, Qin W, Boero J, Cheng J, Payne RM, Saks VA, Strauss AW (1998) Octamer formation and coupling of cardiac sarcomeric mitochondrial creatine kinase are mediated by charged N-terminal residues. *J Biol Chem* 273: 22990-22996
- Schlattner U, Gehring F, Vernoux N, Tokarska-Schlattner M, Neumann D, Marcillat O, Vial C, Wallimann T (2004) C-terminal lysines determine phospholipid interaction of sarcomeric mitochondrial creatine kinase. *J Biol Chem* 279: 24334-24342
- Qin W, Khuchua Z, Cheng J, Boero J, Payne RM, Strauss AW (1998) Molecular characterization of the creatine kinases and some historical perspectives. *Mol Cell Biochem* 184: 153-167
- Pineda AO, Ellington WR (1999) Structural and functional implications of the amino acid sequences of dimeric, cytoplasmic and octameric mitochondrial creatine kinase from a protostome invertebrate. *Eur J Biochem* 264: 67-73
- Tanaka K, Uda K, Shimada M, Takahashi K, Gamou S, Ellington WR, Suzuki T (2007) Evolution of cytoplasmic and mitochondrial phosphagen kinases unique to annelid groups. *J Mol Evol* 65: 616-625
- Ellington WR, Roux K, Pineda AO (1998) Origin of octameric creatine kinases. *FEBS Lett* 425: 75-78
- Tombes RM, Shapiro BM (1985) Metabolite channeling: a phosphoryl-creatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. *Cell* 41: 325-334
- Wyss M, Maughan D, Wallimann T (1995) Re-evaluation of the structure and physiological function of guanidino kinases in fruitfly (*Drosophila*), sea urchin (*Psammechinus miliaris*) and man. *Biochem J* 309: 255-261
- Hoffman GG, Ellington WR (2005) Over-expression, purification and characterization of oligomerization dynamics of an invertebrate mitochondrial creatine kinase. *Biochim Biophys Acta* 1751: 184-193
- Ellington WR, Kinsey ST (1998) Functional and evolutionary implications of the distribution of phosphagens in primitive-type spermatozoa. *Biol Bull* 195: 264-272

41. Rasola A, Bernardi P (2007) The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 12: 815-833
42. Grimm S, Brdiczka D (2007) The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* 12: 841-855
43. Van Venetie R, Verkleij AJ (1982) Possible role of non-bilayer lipids in the structure of mitochondria. A freeze-fracture electron microscopy study. *Biochim Biophys Acta* 692: 397-405
44. Vysokikh MY, Zorova L, Zorov D, Heimlich G, Jurgensmeier JM, Brdiczka D (2002) Bax releases cytochrome c preferentially from a complex between porin and adenine nucleotide translocator. Hexokinase activity suppresses this effect. *Mol Biol Rep* 29: 93-96
45. Epand RF, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U, Wallimann T, Epand RM (2007) Cardiolipin clusters and membrane domain formation induced by mitochondrial proteins. *J Mol Biol* 365: 968-980
46. Vysokikh MY, Brdiczka D (2003) The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Polon* 50: 389-404
47. Dolder M, Walzel O, Speer O, Schlattner U, Wallimann T (2003) Inhibition of mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates, requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem* 278: 17760-17766
48. Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T (2006) Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1762: 164-180
49. Meyer LE, Machado LB, Santiago APSA, Seixas da-Silva W, De Felice FG, Holub O, Oliveira MF, Galina A (2006) Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation. *J Biol Chem* 281: 37361-37371
50. Speer O, Back N, Buerklen T, Brdiczka D, Koretsky A, Wallimann T, Eriksson O (2005) Octameric mitochondrial creatine kinase induces and stabilizes contact sites between the inner and outer membrane. *Biochem J* 385: 445-450
51. Soboll S, Brdiczka D, Jahnke D, Schmidt A, Schlattner U, Wendt S, Wyss M, Wallimann T (1999) Octamer-dimer transitions of mitochondrial creatine kinase in heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 31: 857-866
52. Stachowiak O, Dolder M, Wallimann T, Richter C (1998) Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation. *J Biol Chem* 273: 16694-16699
53. Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80: 1107-1213
54. Burklen TS, Schlattner U, Homayouni R, Gough K, Rak M, Szeghalmi A, Wallimann T (2006) The creatine kinase/creatine connection to Alzheimer's disease: CK inactivation, APP-CK complexes and focal creatine deposits. *J Biomed Biotech* 2006: 1-11
55. Tarnopolsky MA, Beal MF (2001) Potential of creatine and other therapies targeting cellular energy dysfunction in neurological disorders. *Ann Neurol* 49: 561-574
56. Lenz H, Schmidt M, Welge V, Schlattner U, Wallimann T, Elsasser HP, Wittern KP, Wenck H, Stab F, Blatt T (2005) The creatine kinase system in human skin: protective effects of creatine against oxidative and UV damage *in vitro* and *in vivo*. *J Invest Dermatol* 124: 443-452
57. Shen YQ, Tang L, Zhou HM, Lin ZJ (2001) Structure of human muscle creatine kinase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 1196-1200
58. Eder M, Fritz-Wolf K, Kabsch W, Wallimann T, Schlattner U (2000) Crystal structure of human ubiquitous mitochondrial creatine kinase. *Proteins* 39: 216-225

## Creatine kinase isoenzymes – characterization and functions in cell

Katarzyna Grzyb<sup>✉</sup>, Edward F. Skorkowski

Laboratory of Comparative Biochemistry, Institute of Biology, Gdansk University, 26 Ornitologów St., Gdansk, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: gkasia@biotech.ug.gda.pl

**Key words:** creatine kinase, isoenzymes, dimer, octamer, mitochondrial creatine kinase, PTP, apoptosis

### ABSTRACT

Creatine kinase (CK, EC 2.7.3.2) is a key enzyme of cellular bioenergetics. The tissue-specific distribution, subcellular localization and function of CK isoenzymes in tissues and cells with high energy requirements, as well as the molecular structure of mitochondrial CK, point to an important physiological role of CK system for cellular energetics. The extensive studies about properties of mitochondrial creatine kinase isoforms gave a new perspective to create a functional model of CK isoforms action called "phosphocreatine shuttle". In this model the CK isoforms together with easily diffusible compounds like creatine and phosphocreatine, maintain a cellular energy buffer and intracellular energy transport system, where the "high-energy" phosphate is transferred between site of ATP synthesis and site of ATP utilization. Mt-CK octamer is able to bridge two mitochondrial membranes and interacts functionally with porin VDAC and ANT in cardiolipin vicinity. Mt-CK with its substrates also activates oxidative phosphorylation and effectively inhibits formation of mitochondrial permeability transition pore. Any destabilization of octamer structure would induce an apoptosis process.

# Rola transporterów ABC w nerkowym wydalaniu organicznych anionów i leków

Agnieszka Piwkowska

Zespół Kliniczno-Badawczy Molekularnej i Komórkowej Nefrologii w Gdańsku, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

Zespół Kliniczno-Badawczy Molekularnej i Komórkowej Nefrologii PAN, Akademia Medyczna, ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk; tel.: (058) 349 27 83, e-mail: apiwkowska@cmdik.pan.pl

Artykuł otrzymano 26 października 2007 r.  
Artykuł zaakceptowano 7 kwietnia 2008 r.

**Słowa kluczowe:** glikoproteina P, MRP, transportery ABC, domeny PDZ, kwas moczowy

**Wykaz skrótów:** ABC – kasetta wiążąca ATP; GSH – zredukowany glutation; MDR – krzyżowa oporność wielolekowa, także oporność wielolekowa typu MDR związana z nadekspresją genu *mdr1* kodującego glikoproteinę P; MRP – białko MRP, także oporność wielolekowa typu MRP związana z nadekspresją genu *MRP1* kodującego białko MRP; NBD – domena wiążąca nukleotydy; OCT – transporter organicznych kationów; OAT – transporter organicznych anionów; PAH – para-aminohippuran; P-gp – glikoproteina P; TMD – domena transbłonowa

**Podziękowanie:** Autorka dziękuje Panu prof. dr. hab. Stefanowi Angielskiemu, bez którego krytycznych uwag i cennych rad nie powstałby ten artykuł

## STRESZCZENIE

Transportery ABC należą do dużej rodziny białek transbłonowych odpowiedzialnych za aktywny, transbłonowy transport organicznych jonów. Odgrywają one bardzo ważną rolę w nerkowej reabsorpcji i sekrecji ksenobiotyków. Obecnie scharakteryzowano jedenaście transporterów odpowiedzialnych za aktywny eksport leków z komórki. Dziewięć z nich zlokalizowano w nerkach. Różnią się one między sobą lokalizacją, poziomem ekspresji i spektrum substratowym. Poniższe opracowanie opisuje dotychczasowy stan wiedzy na temat roli nadrodziny białek błonowych ABC w nerkach, z uwzględnieniem ich funkcji regulatorowych w tym narządzie.

## WPROWADZENIE

Nerki odgrywają bardzo ważną rolę w wydzielaniu i wydalaniu z moczem wielu hydrofobowych ksenobiotyków, toksyn i endogennych związków. Za ten proces odpowiedzialny jest system wielu różnych transporterów zlokalizowanych w błonach plazmatycznych komórek cewek nerkowych. Nośniki te do wydzielania związków, wykorzystują energię pochodzącą z hydrolizy ATP lub z transbłonowego gradientu stężenia jonów sodu. Marshall i Vickers w 1923 roku po raz pierwszy stwierdzili obecność tego zjawiska w cewkach proksymalnych [1]. Wykazali oni, że organiczny anion fenolosulfoftaleina akumuluje się w komórkach cewek proksymalnych w dużo wyższych stężeniach w porównaniu z innymi tkankami. Ponadto, stwierdzili, że ilość tego barwnika wydalana z moczem była większa od tej, jaką obserwowali w przesączu kłębuszkowym. Na tej podstawie doszli do wniosku, że fenolosulfoftaleina musi ulegać wydzielaniu w komórkach cewek proksymalnych i że mechanizm ten jest istotny do zrozumienia farmakologicznego i toksycznego działania leków. Znaczenie tego transportu stało się jasne dopiero w trakcie II Wojny Światowej, kiedy to po raz pierwszy zastosowano penicylinę. Okazało się, że od momentu jej podania bardzo szybko ulegała ona nerkowemu wydalaniu. Skłoniło to Beyera i współpracowników do znalezienia takiego organicznego anionu, który mógłby konkurować z penicyliną w jej cewkowym wydzielaniu. Miało to zapobiegać szybkiej utracie antybiotyku z organizmu i przedłużyć jego okres półtrwania w organizmie. W 1951 roku zsyntetyzowano pochodną kwasu benzoowego (probenecid), która posiadała oczekiwane właściwości. Dzisiaj wiadomo, że jest to inhibitor transporterów organicznych anionów (OAT i MRP) [2]. Ostatnio probenecid jest stosowany również jako ochrona przed nefrotoksycznym działaniem leków przeciwwirusowych (adefowir, cidofowir, tenofowir). Wśród pacjentów, którym podawany jest cidofowir, stwierdzono jego działanie nefrotoksyczne związane z dużą akumulacją tego leku w komórkach cewek nerkowych, która jest wynikiem wydzielania poprzez transportery OAT. Zastosowanie kombinacji obu ksenobiotyków prowadzi do zmniejszenia nefrotoksycznego działania samego cidofowiru [3].

Te kilka przykładów ilustruje, jak ważną rolę odgrywa system transporterów organicznych w farmakologii i toksykologii. Ich podstawowa funkcja polega na aktywnym eksporcie endogennych i egzogennych substancji oraz ich metabolitów z komórek. Ważne jest zatem poznanie możliwych oddziaływań stosowanych ksenobiotyków, co ma bardzo istotne znaczenie w racjonalnej terapii. Dlatego też już od ponad stu lat system transporterów organicznych odpowiedzialnych za aktywne wydzielanie jest jednym z głównych tematów badań w fizjologii nerek.

W nerkach najlepiej poznany i scharakteryzowany jest transport jonów organicznych w cewkach proksymalnych. W tej części nefronu zlokalizowanych jest najwięcej różnych białek transportujących. Jest to podstawowe miejsce wydzielania ksenobiotyków, co w konsekwencji może prowadzić do akumulacji dużych ilości tych związków w komórkach cewek proksymalnych, w wyniku czego może dochodzić do zaburzeń funkcji i uszkodzenia miąższu nerkowego. Odkry-

to wiele białek należących do rodziny transporterów organicznych anionów (OAT), kationów (OCT) i transporterów anionowych polipeptydów (oatp). Cewkowa reabsorpcja peptydów zachodzi również przy udziale kotransporterów PEPT1 i PEPT2. Coraz więcej badań wskazuje również na ważną rolę, jaką odgrywają w tym procesie białka należące do rodziny transporterów ABC [4] (Ryc. 1). Transportery te zakotwiczone w błonie plazmatycznej usuwają ksenobiotyki z komórek na zewnątrz, wykorzystując do odkomórkowego transportu jednej cząsteczki związku energią pochodzącą z hydrolizy dwóch cząsteczek ATP. Nadprodukcja tych białek w komórkach jest odpowiedzialna za wykształcenie się mechanizmów oporności wielolekowej (MDR, ang. *MultiDrug Resistance*). Zjawisko to występuje powszechnie w komórkach nowotworowych i jest jednym z powodów nieskuteczności chemoterapii [5,6].

## RODZINA TRANSPORTERÓW ABC

Transportery ABC (ang. *ATP-Binding Cassette*) są dużą nadrodziną białek transbłonowych, do której należą między innymi glikoproteiny P (P-gp) [7], białka MRP [8,9,10] i BCRP [11] odpowiedzialne głównie za oporność wielolekową (MDR) oraz inne białka pełniące funkcję receptora (SUR) [12] lub kanałów jonowych (CFTR) [13]. Wyodrębniono również kilku przedstawicieli tej rodziny; którzy nie zużywają energii uwolnionej w wyniku hydrolizy ATP na transport przez błonę. Są to białka zaangażowane w organizację chromatyny (SMC) [14], naprawę DNA i telomerów (Rad50) [15] oraz odpowiedzialne za przemieszczanie się mRNA poprzez pory jądrowe (Elf1p) [16]. Podstawową fizjologiczną funkcją białek ABC jest transport z komórki produktów przemiany materii oraz ochrona przed substancjami toksycznymi. Dlatego też wysoką ekspresję genów tych transporterów (P-gp, BCRP i MRP) obserwuje się w jelitach, wątrobie czy nerce. Stwierdzono również obecność tych białek w narządach bardzo wrażliwych na obecność toksyn, tj. w mózgu i łożysku. Obecnie scharakteryzowanych jest jedenaście transporterów odpowiedzialnych za aktywny

eksport leków z komórki. Dziewięć z nich zlokalizowano w nerkach (Tab. 1) [4,17-19].

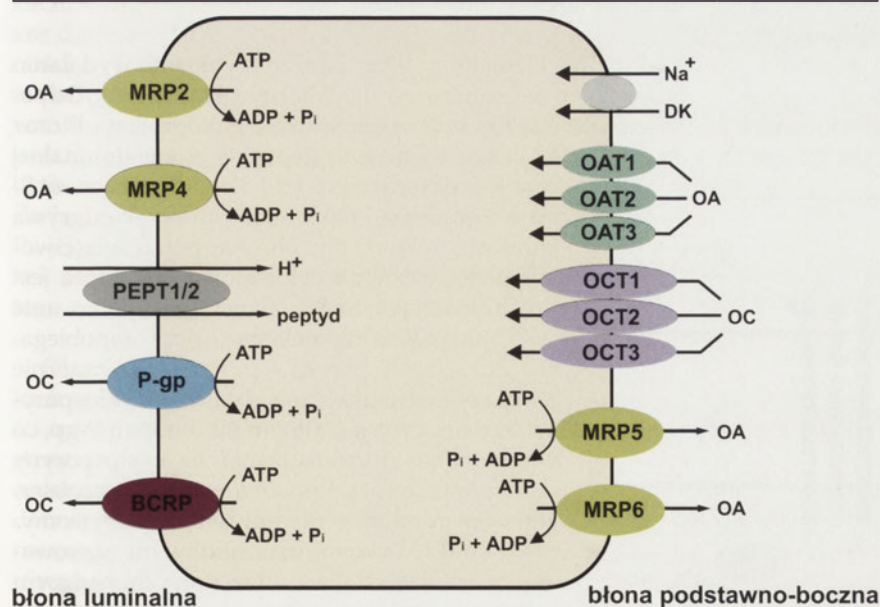
## GLIKOPROTEINA P

Glikoproteina P jest pierwszym, odkrytym w 1976 roku, i najlepiej poznanym białkiem z rodziny transporterów ABC odpowiedzialnym m.in. za oporność wielolekową [20]. Fizjologiczną rolą tego białka jest wydalanie substancji toksycznych z komórki (toksyny, ksenobiotyki) oraz transport różnych endogennych substancji, takich jak: lipidy (sfingomielina, fosfatydylocholina) [21], steroidy (testosteron, kortykosteron) [22], sterole [23], itp. Rola P-gp nie została dotąd w pełni poznana, wiadomo jednak, że bierze ona udział w transporcie substancji lipofilowych o masie molowej poniżej 1300 g/mol, dodatnio naładowanych w fizjologicznym zakresie wartości pH i o określonej strukturze [24].

Glikoproteina P jest białkiem o masie 170 kDa ulegającym fosforylacji i glikozylacji. P-gp zawiera 1280 reszt aminokwasowych, w większości hydrofobowych, osadzonych w błonie cytoplazmatycznej w formie dwunastu transbłonowych domen (TM1-12), które rozdzielają się na dwa homologiczne regiony, po sześć domen każdy TMD1 i 2 (ang. *Transmembrane Domain*) (Ryc. 2) [25]. Helisy obu domen TMD są miejscem wiązania dla ligandu i odpowiadają za specyficzność substratową P-gp. Główne miejsce wiązania ligandu znajduje się w pobliżu domen TM6 i TM12. Wykazano również na przykładzie dibromobimanu (substrat P-gp), że reaguje on dodatkowo z resztami cysteiny rozmieszczonymi w domenach TM 4, 5, 10 i 11 [26]. Po stronie cytoplazmatycznej błony znajdują się dwie domeny odpowiedzialne za wiązanie i hydrolizę ATP (NBD, ang. *Nucleotide Binding Domain*) [25]. Domena NBD posiada złożoną strukturę przestrzenną, w skład której wchodzi sekwencje charakterystyczne dla całej rodziny tych białek [27]. Są to miejsca kluczowe dla wiązania ATP: motyw Walkera A lub B, region podpisu (ang. *Signature Region*) oraz pętle D, H, i Q, które sprzęgają wiązanie i hydrolizę ATP w obrębie domeny NBD

ze zmianami konformacyjnymi w obrębie helis transbłonowych (TMD). Ogólnie przyjmuje się, że oddziaływanie ATP w obrębie domeny NBD jest kluczowe dla aktywności białek ABC oraz że hydroliza dwóch cząsteczek ATP jest sprzężona z przeniesieniem różnych substancji przez te transportery. Na podstawie aktualnych danych o strukturze przestrzennej tego białka, sądzi się, że cykl katalityczny glikoproteiny P jest czteroetapowy (Ryc. 3) [27].

Etap 1 – Białko w formie niezwiązanej (otwarta forma dimera NBD) z nukleotydami charakteryzuje się wysokim powinowactwem w stosunku do ligandu. Związanie substratu do domeny TMD powoduje zmiany konformacyjne w obrębie domeny NBD, przez co zwiększa się powinowactwo w stosunku do ATP.



Rycina 1. Schemat transportu organicznych jonów w cewkach proksymalnych nerek; OA – organiczne aniony, OC – organiczne kationy, DK – jony dikarboksyłanowe.

Tabela 1. Rozmieszczenie transporterów ABC w nerkach.

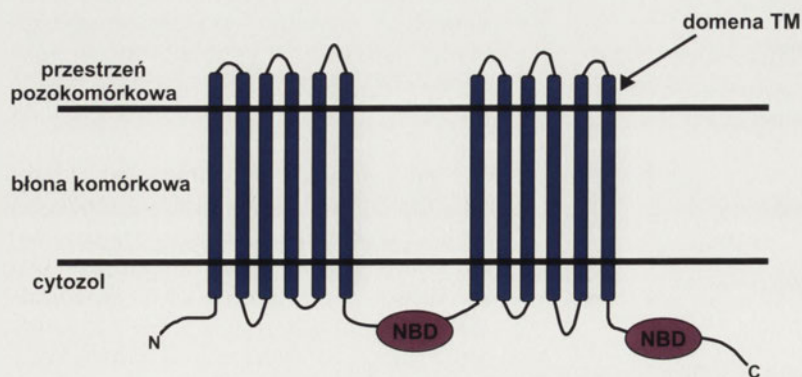
Białko (symbol genu)	Gatunek	Rozmieszczenie w nerce	Błonowa lokalizacja
MDR1 (ABCB1)	człowiek, mysz, szczur	kanaliki proksymalne, część wstępująca pętli Henlego, cewka zbiorcza, mezangium	błona luminalna
BCRP (ABCG2)	człowiek	kanaliki proksymalne	błona luminalna
MRP1 (ABCC1)	człowiek, mysz	pętla Henlego, cewka zbiorcza, kłębuszki nerkowe	błona bazolateralna
MRP2 (ABCC2)	człowiek, mysz, szczur	kanaliki proksymalne	błona luminalna
MRP3 (ABCC3)	człowiek, szczur	kanaliki proksymalne, część wstępująca pętli Henlego, kanaliki dystalne	błona bazolateralna
MRP4 (ABCC4)	człowiek, szczur	kanaliki proksymalne	błona luminalna
MRP5 (ABCC5)	człowiek	kanaliki nefronu	błona bazolateralna
MRP6 (ABCC6)	człowiek	kanaliki proksymalne, kanaliki dystalne	błona bazolateralna
MRP7 (ABCC10)	człowiek	stwierdzono obecność białka w nerkach, nie znana lokalizacja	?
MRP8 (ABCC11)	?	?	?
MRP9 (ABCC12)	?	?	?

Etap 2 – Związanie dwóch cząsteczek ATP z motywem Walkera A i B indukuje powstanie tzw. zamkniętej formy dimeru NBD. Prowadzi to do bardzo dużych zmian konformacyjnych w obrębie domen TMD, wystarczających do przeniesienia ligandu na zewnątrz komórki.

Etap 3 – Po przeniesieniu ligandu następuje hydroliza ATP do ADP i  $P_i$ , co powoduje destabilizację i rozłączenie formy zamkniętej dimeru NBD. W przypadku białek ABC, takich jak P-gp, dysocjacja obu cząsteczek ATP jest konieczna do przejścia całego cyklu katalitycznego. Wiadomo również, że ich hydroliza nie zachodzi jednocześnie. Wykazano, że w białku tym dwie kieszenie wiążące ATP są ułożone niesymetrycznie, ale nie wyjaśniono jeszcze, czy jest to przyczyna niejednoczesnej hydrolizy nukleotydów.

Etap 4 – Uwolnienie ADP i  $P_i$  prowadzi do zamknięcia cyklu katalitycznego. Przywrócona zostaje forma otwarta dimeru o wysokim powinowactwie do substratu. Uwalnianie  $P_i$  zachodzi szybko i odpowiada za zmiany konformacyjne białka, przywracające powinowactwo do ligandu.

Na podstawie rozmieszczenia przestrzennego domen transbłonowych TM, zaproponowano strukturę białka, która byłaby odpowiedzialna za wiązanie substratu. Stwier-



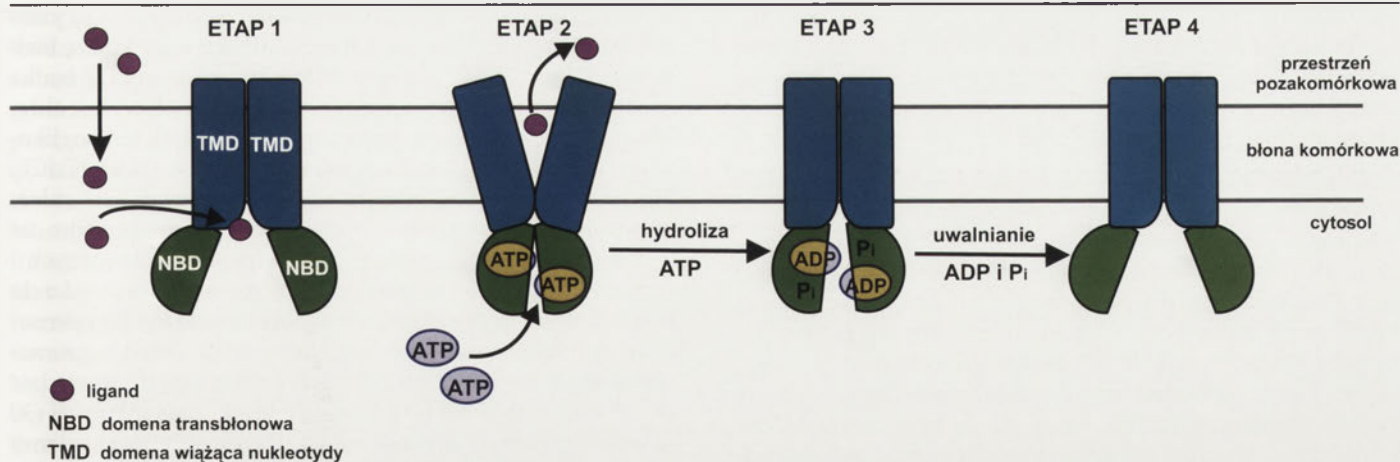
Rycina 2. Schemat przedstawiający strukturę glikoproteiny P.

dzono, że jest to centralnie umiejsczony w białku duży otwór o kształcie stożka, ulegający zwężeniu po stronie cytoplazmatycznej. Przypuszcza się, że centralny region, odpowiedzialny za wiązanie się ligandu w tym stożku, posiada średnicę w zakresie od 9 do 25 Å. Największa średnica

wynosi w przybliżeniu 50 Å i jest to miejsce o słabym powinowactwie do substratów, w którym zachodzi uwalnianie ich na zewnątrz komórki. Nie wiadomo natomiast, jakie miejsca wiążące substrat są odpowiedzialne za wiązanie i transport różnych grup związków [26].

Fizjologiczna rola, jaką odgrywa glikoproteina P w nerkach jest jeszcze słabo poznana. Dotychczas wiadomo, że występuje ona licznie w błonach luminalnych komórek cewki proksymalnej, części wstępującej pętli Henlego i cewkach zbiorczych, gdzie pełni funkcje wydalnicze, aktywnie transportując różne hydrofobowe ksenobiotyki z krwi do moczu [28]. I tak na przykład stwierdzono, że digoksyna, ważny glikozyd nasercowy, ulega sekrecji w cewkach proksymalnych w wyniku oddziaływania z P-gp. Zastosowanie kombinacji digoksyny z chinidyną powoduje spadek nerkowego wydalania glikozydu o 29%. Podobny efekt uzyskuje się przez zastosowanie kombinacji digoksyny z werapamiem (inhibitor P-gp) lub innych inhibitorów P-gp, takich jak introkonazol i ritonawir [29].

Innym lekiem, który ulega bardzo szybkiemu wydalaniu z moczem jest sandostatin (cykliczny oktapeptyd). Odpowiedzialna za ten proces jest właśnie glikoproteina P oraz białko MRP2, które również występuje w błonie luminalnej cewek proksymalnych [30]. Ponadto, obecność P-gp w komórkach nabłonkowych nerek odgrywa kluczową rolę w ich ochronie przed właściwościami toksycznymi cyklosporyny A, która jest substratem tego białka. Skojarzone podawanie cyklosporyny z rapamycyną, przy zapobieganiu odrzucania przeszczepów nerek, znacznie zwiększa nefrotoksyczne działanie cyklosporyny. Rapamycyna jest silnym inhibitorem P-gp, co prowadzi do nagromadzenia się cyklosporyny w komórkach [31]. Podobną zależność zaobserwowano pomiędzy rapamycyną a klarytromycyną (antybiotykiem makrolidowym stosowanym w infekcjach dróg oddechowych, będącym substratem P-gp), stosowanymi u pacjentów po transplantacji nerek. Zastosowanie kombinacji



Rycina 3. Cykl katalityczny glikoproteiny P.

obu leków prowadzi do bardzo szybkiego wzrostu stężenia rapamycyny we krwi czego efektem jest ostra niewydolność nerek [32].

Pochodna fluorochinolonów, puzofloksacylna, jest również wydzielana do moczu poprzez glikoproteinę P. Wykazano, że cyklosporyna A znacznie zwiększa stężenie tego związku w osoczu poprzez zmniejszenie jego cewkowego wydalania. Sparfloksacylna, inna pochodna fluorochinolonów, następny substrat P-gp, również znacznie zmniejsza nerkowe oczyszczanie puzofloksacylny, co wskazuje, że oba leki oddziałują z tym samym transporterem [33].

Innymi substratami glikoproteiny P są glibenklamid i jego pochodne. Leki te stosowane są w leczeniu cukrzycy typu II. Działają one poprzez receptory sulfonilomocznika (SUR), które – jak już wcześniej wspomniano – należą do rodziny białek ABC. Ich komórkowa akumulacja utrzymuje się na niskim poziomie i wzrasta znacznie tylko w obecności innych substratów P-gp (winblastyna, cyklosporyna A). Efektu tego nie obserwuje się w komórkach, w których nie wykryto glikoproteiny P [34]. Powyższe dane na temat udziału glikoproteiny P w biodostępności i rozmieszczeniu leków wskazują, że transporter ten odgrywa ważną rolę w skuteczności terapii z zastosowaniem związków będących jej substratami. Ponadto zauważono, że w przewlekłej niewydolności nerek wydalanie niektórych leków jest dramatycznie zahamowane. Związane to jest ze zmniejszeniem się ilości glikoproteiny P i jej mRNA w tym narządzie. Zatem istnieje ścisły związek pomiędzy zaburzeniami funkcji nerek a aktywnością tego transportera [35].

Obecność glikoproteiny P stwierdzono również w komórkach mezangialnych [36] kłębuszków nerkowych. W obecności substratów P-gp (adriamycyny, cyklosporyny A, winblastyny i werapamilu) obserwowano zahamowanie eksportu rodaminy 123 na zewnątrz komórki. Wynika z tego, że – podobnie jak w cewkach – ważną fizjologiczną rolę P-gp w mezangium jest ochrona komórek przed toksynami. P-gp jest również odpowiedzialna za transport czynnika aktywującego płytki krwi (PAF), który jest produkowany w mezangium i wpływa na hemodynamikę kłębuszka [28].

Inną fizjologiczną rolą białek z rodziny ABC jest ich udział w uwalnianiu ATP z komórek [39,40]. Stwierdzono, że w obecności glikoproteiny P znacznie wzrasta ilość zewnątrzkomórkowego ATP i wzrost ten jest proporcjonalny do wzrostu poziomu transportera. Wykazano także, że inhibitory P-gp, takie jak cyklosporyna A i werapamil, zmniejszają uwalnianie ATP średnio o 60%. Przypuszcza się, że transport substratów przez glikoproteinę P i uwalnianie ATP biegną dwiema niezależnymi drogami. Zatem P-gp, w tym przypadku, nie spełnia funkcji kanału dla ATP, posiada natomiast właściwości regulujące dla innej drogi transportu (kanał, transporter) tego nukleotydu [40].

#### TRANSPORTERY MRP

W 1992 roku zostało odkryte kolejne białko z rodziny transporterów ABC – MRP1 (ang. *Multidrug Resistance Associated Protein*) [9]. Obecnie znanych jest już dziewięć analogów tego transportera (MRP1÷9) [41]. Zbudowane są one z dwóch domen NBD (obszary odpowiedzialne za przyłączanie ATP) i dwóch lub trzech domen TMD, w większości przypadków zawierających sześć transbłonowych  $\alpha$ -helis. Ze względu na budowę białka MRP zostały podzielone na dwie grupy: I. MRP1÷3, MRP6, MRP7 – składają się z dwóch domen NBD i trzech domen TMD (białka pięciodomenowe); II. MRP4, MRP5, ABC11, ABC12 – składają się z dwóch domen NBD i dwóch domen TMD (białka czterodomenowe).

#### BIAŁKO MRP1

Gen *MRP1*, kodujący białko MRP1 po raz pierwszy został wyizolowany z komórek H69AR – drobnokomórkowego raka płuca człowieka [9]. Substratami dla tego transportera są aniony organiczne, kwas glukuronowy, koniugaty związków ze zredukowanym glutationem (GSH), takie jak leukotrieny cisteinowe  $C_4$  ( $LTC_4$ ) i 2,4-dinitrofenylo-S-glutation (DNP-SG) oraz koniugaty z kwasem glukuronowym, np. 17 $\beta$ -estradiol-17-( $\beta$ -D-glukuronid) ( $E_217\beta G$ ) [42,43]. Ponadto, substratami są również jony metali ciężkich (arsen, ołów), które są transportowane w formie kompleksów ze zredukowanym glutationem [44,45]. MRP1, podobnie jak P-gp, jest energozależną glikoproteiną odpowiedzialną za

oporność na antracykliny, etopozyd czy alkaloidy barwinka. W przypadku antracyklin i alkaloidów barwinka transport odbywa się na drodze kotransportu z GSH [46], etopozyd natomiast transportowany jest w formie koniugatu z kwasem glukuronowym [47].

Obecność białka MRP1 stwierdzono w błonie bazolateralnej komórek pętli Henlego i cewkach zbiorczych nefronu oraz w kłębuszkach nerkowych [28,48]. Stwierdzono, że białko MRP1 w cewkach zbiorczych jest odpowiedzialne za ochronę dystalnej części nefronu przed akumulacją toksycznych związków. Wykazano, że u myszy pozbawionych w nerkach genu *MRP1*, poddanych chemoterapii np. etopozydem, dochodzi do rozwinięcia się poliurii i nabytej nerko pochodnej cukrzycy. Sądzi się, że brak białka MRP1 w nerkach prowadzi do zniszczenia lub zaburzeń funkcji receptorów dla wazopresyny zlokalizowanych w błonie bazolateralnej cewek zbiorczych, co może prowadzić do ograniczenia reabsorpcji wody [41]. Dalszy segment kanalików zbiorczych jest również ważnym miejscem oddziaływania kortykosteroidów. Prawdopodobnie MRP1 bierze udział w transporcie również i tych związków [48].

#### BIAŁKO MRP2

Kolejne białko, MRP2, o nazwie cMOAT (ang. *canalicular Multispecific Organic Anion Transporter*), wykazuje 48% homologii z MRP1 [49]. Wykazano różnice pomiędzy tymi transporterami w kinetyce transportu leukotrienu  $C_4$  w formie S-koniugatów z glutationem (wartość  $K_m$  dla białka MRP2 jest dziesięć razy wyższa niż dla MRP1). Nie stwierdzono natomiast różnic w spektrum substratowym i nie znaleziono selektywnych inhibitorów [41]. MRP2 transportuje związki w formie koniugatów z GSH, kwasem glukuronowym lub różne organiczne aniony, np. metotreksat. Posiada zdolność do transportowania małych molekuł (cisplatyna, arsenian) w formie kompleksów z glutationem [8].

Transporter MRP2 występuje w luminalnej błonie komórek nabłonkowych cewek proksymalnych. Jest odpowiedzialny, podobnie jak MRP1, za oporność wielolekową na wiele chemoterapeutyków. Leki przeciwwirusowe, np. inhibitory proteazy HIV, są również aktywne eksportowanych z krwi do moczu za pomocą tego transportera [41,48]. MRP2 i jego homolog MRP4 biorą udział w wydzielaniu para-aminohipuranu (PAH) [50]. Stwierdzono, że wiele inhibitorów MRP2 również hamuje MRP4, np. probenecid. Można jednak, w odróżnieniu do MRP1, znaleźć selektywne inhibitory dla białek MRP2 i MRP4. I tak np. sulfinpyrazon stymuluje aktywność transportera MRP2, a hamuje MRP4 [50]. Wykazano również, że w ostrej niewydolności nerek zwiększa się poziom mRNA i białka MRP2. Ta specyficzna nadprodukcja transportera może być odpowiedzią organizmu na wzrastający poziom różnych toksyn, który towarzyszy zaburzeniom funkcji nerek [48].

Zidentyfikowano nową drogę sygnałową wpływającą na aktywność MRP2, która jest regulowana przez naczynioaktywny hormon, endotelinę-1 (ET-1) [51]. Podczas krótkiego oddziaływania endoteliny na cewki proksymalne obserwuje się zahamowanie aktywności białka MRP2. Peptyd ten, łącząc się z receptorem  $ET_B$ , aktywuje go, prowadząc następnie do aktywacji endotelialnej syntazy tlenu azotu (eNOS) i syntezy

tlenu azotu, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji cyklicznej guanylowej. Powstający z niej cGMP aktywuje kinazę białkową C (PKC). PKC, poprzez fosforylację domen PDZ białka MRP2, hamuje jego aktywność. Ten szlak sygnałowy jest aktywowany przez nefrotoksyczne związki, takie jak aminoglikozydy (gentamycyna, amikacyna), sole metali ciężkich ( $CdCl_2$ ,  $HgCl_2$ ) i środki radiokontrastowe, które wywołują  $Ca^{2+}$  zależne uwalnianie endoteliny z cewek. Stwierdzono ponadto, że wydłużenie czasu ekspozycji związków nefrotoksycznych i endoteliny (do 24 godzin) na cewki proksymalne prowadzi do wzrostu ilości białka MRP2. Prawdopodobnie ten kompensacyjny mechanizm ma na celu ochronę nerek przed nagromadzeniem się substancji toksycznych, które mogą doprowadzić do ich niewydolności [41]. Również krótki czas inkubacji (30 minut) z gentamycyną uruchamia długotrwałe mechanizmy chroniące nerki przed toksynami [52]. Wykazano także, że aktywność glikoproteiny P w cewkach proksymalnych jest również kontrolowana przez ET-1 [53].

#### BIAŁKO MRP3

Białko MRP3 wykazuje 58% homologii z MRP1. Występuje w basolateralnej błonie komórek kanalików proksymalnych, części wstępującej pętli Henlego i w kanalikach dystalnych [4,41]. Podobnie jak białko MRP1, jest odpowiedzialne za transport substancji z komórek do krwi. W odróżnieniu od białek MRP1 i MRP2, białko MRP3 wykazuje niskie powinowactwo do anionowych koniugatów i nie wymaga do transportu obecności glutationu. Wykazano, że białko to odpowiedzialne jest w nerkach również za eksport leków przeciwnowotworowych, m.in. etopozydu, winkrystyny, taksolu, antracyklin [54].

#### BIAŁKO MRP4

Białko MRP4 jest zlokalizowane w różnych tkankach, przy czym wysoki poziom jego ekspresji stwierdzono m.in. właśnie w nerkach. Transporter ten występuje w luminalnej błonie komórek cewek proksymalnych i jest on odpowiedzialny za transport cyklicznych nukleotydów (cAMP i cGMP) na tym odcinku nefronu [55,56]. Stwierdzono, że w cewkach proksymalnych wewnątrzkomórkowe stężenie cGMP jest około 20 razy mniejsze od stężenia cAMP. Badania *in vitro* wykazały, że przy wysokim stężeniu cAMP (250  $\mu M$ ) następuje zahamowanie o 60% transportu cGMP [55].

Wydaje się, że w nerkach cewki proksymalne są głównym miejscem wydzielania cAMP do płynu kanalikowego, gdzie, przy udziale ektoenzymów hydrolizujących, ulega przemianie do adenozyiny, która poprzez swoje receptory wpływa na funkcje nerek. Wynika z tego, że białko MRP4, poprzez regulację transportu cAMP, może wpływać na wewnątrzkomórkowe sygnałowanie. Natomiast w przypadku transportu cGMP, którego stężenie w osoczu jest bardzo niskie, nie zauważono zmian stężenia tego nukleotydu w wyniku jego wydalania przez MRP4 [55].

Białko MRP4 jest także odpowiedzialne za eksport analogów nukleotydów, takich jak 9-(2-fosfonylometoksyetylo)adenina (PMEA) czy tiopuryny (6-merkaptopu-



ryna i tioguanina). Substratami są również metotreksat, kwas foliowy i prostaglandyny [41]. Ostatnio do listy substratów tego białka dodano dwa ważne nerkowe, organiczne aniony: kwas moczowy [57] i para-aminohipuran [50]. PAH jest klasycznym substratem używanym do charakterystyki transportu organicznych anionów w cewkach proksymalnych. Transportery po stronie basolateralnej błony dla PAH są już dzisiaj dobrze poznane (OAC1 i OAC3), natomiast wciąż mało wiadomo na temat apikalnego transportu dla tego anionu. MRP4 zostało zakwalifikowane jako nowy transporter PAH i obecnie uważa się, że może on odgrywać ważną rolę w eliminacji tego anionu do moczu. Stwierdzono, że w korowej części nerek poziom MRP4 jest około pięciokrotnie wyższy niż innego białka z tej rodziny (MRP2), które również jest odpowiedzialne za eksport PAH. Ponadto powinowactwo PAH do MRP4 ( $K_m = 160 \mu\text{M}$ ) jest dużo wyższe w porównaniu z MRP2 ( $K_m = 5 \text{mM}$ ) [50]. W przypadku kwasu moczowego stwierdzono, że anion ten oddziałuje z miejscem wiążącym białka MRP4 i na zasadzie pozytywnego współdziałania wpływa, poprzez allosteryczne oddziaływanie dwóch miejsc transportujących, na transport innych substratów: metotreksatu, cAMP i cGMP [57].

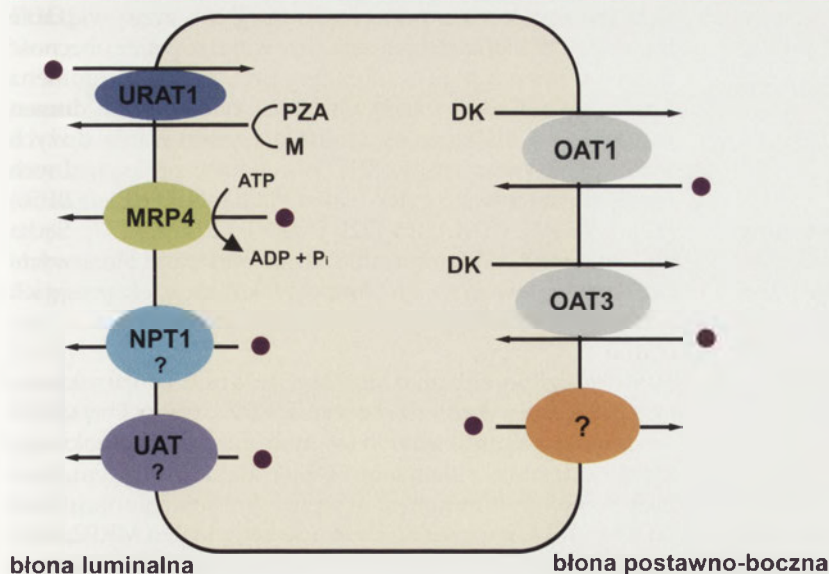
Coraz więcej danych wskazuje również, że i ten transporter odgrywa ważną rolę w wydalaniu różnych leków. Jest odpowiedzialny za nerkowe wydalanie leków przeciwwirusowych, takich jak adefowir i tenofowir (acykliczne nukleotydy), w niewielkim stopniu może również wpływać na ekskrecję cidofiru. [58]. Białko MRP4 bierze też udział w cewkowym wydzielaniu antybiotyków z grupy cefalosporyn. Wykazano, że u myszy knock-out pozbawionych genu *Mrp4* wzrasta w osoczu około dwukrotnie stężenie epocyliny i cefazoliny, co wskazuje, że białko to bierze udział w nerkowym oczyszczaniu z tych leków [59]. Również hydrochlorotiazyna i furesamid są w kanalikach proksymalnych wydalane do moczu za pośrednictwem białka MRP4 oraz jeszcze jednego, do dzisiaj nie zidentyfikowanego transportera [60].

## SYSTEM TRANSPORTU KWASU MOCZOWEGO

W fizjologicznych warunkach kwas moczowy ulega filtracji przez kłębuszki nerkowe, a następnie jest niemal całkowicie reabsorbowany z moczu. Poziom kwasu moczowego w osoczu ( $200 \div 500 \mu\text{M}$ ) jest utrzymywany poprzez system transporterów zlokalizowanych w cewkach proksymalnych. Do dzisiaj zlokalizowano w cewkach następujące białka, które mogą być odpowiedzialne za transport tego anionu u ssaków: URAT1, OAT1, OAT3, NPT1 (OATv1), UAT i ostatnio MRP4 (Ryc. 4) [61].

hURAT1 jest zlokalizowany w błonie luminalnej komórek cewek proksymalnych człowieka i jest głównym transportem odpowiedzialnym za reabsorbację kwasu moczowego. Jest to wymiennik kwasu moczowego na inne aniony organiczne, np. mleczan, pirazynian (PZA, metabolit pirazina-midu, lek zmniejszający wydalanie moczanu). Nie znana jest natomiast droga transportu kwasu moczowego przez błonę bazolateralną do krwi. Wiadomo jednak, że w błonie tej zlokalizowane są dwa transportery organicznych anionów: OAT1 i OAT3, które są odpowiedzialne za transport kwasu moczowego. Są to wymienniki kwasu moczowego na jony dikarboksyłanowe (glutaran,  $\alpha$ -ketoglutaran, bursztynian). Biorąc pod uwagę gradient elektrochemiczny dikarboksyłanów, utrzymywany przez dwa symportery (SLC13A2 – błona apikalna i SLC13A3 – błona bazolateralna; sprzęgają transport 3 cząsteczek  $\text{Na}^+$  i dikarboksyłanu) i antyporter (SLC26A1; wymiennik jonów sodu na dikarboksyłany lub siarczany) w cewkach proksymalnych nerek, uważa się, że transport kwasu moczowego przez wymienniki OAT odbywa się odkomórkowo. Zatem są one odpowiedzialne za wydzielenie tego anionu [61].

W błonie luminalnej zidentyfikowano trzy transportery mogące uczestniczyć w wydalaniu kwasu moczowego do moczu. Są to: OATv1, UAT i MRP4. OATv1 został zidentyfikowany w nerkach świńskich [62]. Stwierdzono, że jest to transporter regulowany napięciem błonowym, odpowiedzialny m.in. za wydzielenie PAH. U człowieka jednak do dzisiaj nie zidentyfikowano analogu tego białka. Stwierdzono jedynie obecność transportera NPT1, który wykazuje 60% homologii z tym białkiem. NPT1 (SLC17A1) jest odpowiedzialny za wydalanie nerkowe kwasu moczowego u świń i królików, u których poziom kwasu moczowego we krwi jest regulowany głównie poprzez wydzielenie [63]. U człowieka nie jest jednoznacznie stwierdzone, czy transporter ten bierze udział w wydalaniu moczanu. Innym kandydatem do luminalnego eksportu tego anionu jest UAT – kanał/transporter określany jako galaktyna 9, którego aktywność jest regulowana przez cukry i adenozyne [64]. Białko to na zewnątrz komórki posiada dwa  $\beta$ -galaktozydowe miejsca wiążące i miejsce wiążące adenozyne, natomiast po stronie cytoplazmatycznej zlokalizowano miejsce wiążące dla kwasu moczowego. Wykazano, że przyłączenie laktozy lub glukozy do miejsc  $\beta$ -galaktozydowych białka powoduje otwarcie kanału i wydzielenie kwasu moczowego. Stymulacja kanału przez



Rycina 4. Schemat transportu kwasu moczowego w cewkach proksymalnych nerek człowieka; ● – kwas moczowy, DK – jony dikarboksyłanowe, M – mleczan, PZA – pirazynian.

laktozę następuje przy 200 razy mniejszym stężeniu (100  $\mu\text{M}$ ) w porównaniu z glukozą. Ponieważ występuje związek pomiędzy wzrostem stężenia cukru w osoczu a zaburzeniem homeostazy moczanu, wynika z tego, że UAT może być odpowiedzialny za zwiększone wydalanie tego anionu, prowadzące to hiperurykემii w cukrzycy [65].

Ostatnio coraz więcej danych wskazuje również na dużą rolę transportera MRP4 w eksporcie ATP-zależnym od kwasu moczowego [57]. Transporter ten charakteryzuje się niskim powinowactwem do kwasu moczowego, dzięki czemu może być utrzymywane duże stężenie tego anionu w komórce. Do dzisiaj nie wiadomo czy inne białka z rodziny ABC mogą brać udział w tym procesie. Wiadomo jedynie, że kwas moczowy nie jest substratem białka MRP2, które również jest zlokalizowane w błonie luminalnej. Przypuszcza się, że MRP5 i MRP8 mogą być zaangażowane w eksport moczanu, mają one bowiem bardzo zbliżone spektrum substratowe do MRP4. Pokazano, że w komórkach HEK293, w których stwierdzono endogenną ekspresję MRP5, zachodzi transport odkomórkowy kwasu moczowego, który jest hamowany przez PMEA (9-(2-fosfonylometoksyetylo)adenina; substrat MRP5 i MRP8) [57].

Ponieważ białko MRP4 jest odpowiedzialne za transport cyklicznych nukleotydów, zbadano jak wpływają one na transport kwasu moczowego. Wykazano, że cAMP i cGMP są w sposób ciągły transportowane razem z kwasem moczowym aż do osiągnięcia stanu saturacji. Wysokie stężenia obu nukleotydów również nie wpływają na szybkość transportu kwasu moczowego. Odwrotnie, wysokie stężenia moczanu mogą regulować właściwości transportujące białka. Uznano, że MRP4 posiada dwa niezależne miejsca wiążące, działające na zasadzie pozytywnego współdziałania, jedno dla cGMP, a drugie dla kwasu moczowego oraz miejsce alleosteryczne wspólne dla obydwu substratów. Kwas moczowy, wypierając cGMP z miejsca allosterycznego, jest w stanie – na zasadzie pozytywnego współdziałania – pobudzać transport tego nukleotydu, jak i innych substratów (cAMP, metotretsat). cAMP posiada miejsce wiążące prawdopodobnie w tym samym miejscu co cGMP, co wyjaśniałoby dlaczego cAMP jest inhibitorem cGMP [55]. Cykliczny GMP jest również inhibitorem metotretsatu, co wskazuje, że związki te również mają to samo miejsce wiązania [57].

#### BIAŁKO MRP5

Podobnie jak MRP4, transporter MRP5 odpowiedzialny jest za transport cyklicznych nukleotydów. Wykazuje on małe powinowactwo do cAMP, a duże do cGMP. W przypadku transportera MRP4 występuje odwrotna zależność, tzn. duże jest powinowactwo do cAMP, a małe do cGMP [56]. Różnice w kinetyce eksportu nukleotydów obu białek świadczą o ich właściwościach regulatorowych w wewnątrzkomórkowej dystrybucji obu cyklicznych nukleotydów. Wykazano również, że mimo dużego powinowactwa cyklicznych nukleotydów do tych białek są one słabymi inhibitorami w stosunku do innych substratów tych transporterów. Transporter MRP5 wykazuje podobne spektrum substratowe do białka MRP4. Białko MRP5 zlokalizowane jest w basolateralnej błonie komórek kanalików nefronu.

Jednak do dzisiaj nie stwierdzono, gdzie dokładnie wzdłuż nefronu jest ono zlokalizowane [18,41].

#### BIAŁKO MRP6

Kolejne białko, MRP6, zostało zlokalizowane w bazolateralnej błonie komórek cewek proksymalnych i, w mniejszym stopniu, w cewkach dystalnych [18,41]. Transporter ten odpowiedzialny jest m.in. za transport niskocząsteczkowych peptydów zaangażowanych w sygnalizację komórkową. MRP6, podobnie jak poprzednie transportery, pełni ochronną funkcję przed toksynami w nerkach. Spektrum substratowe tego białka jest jednak dużo węższe w porównaniu z poprzednimi białkami. Wykazano, że substratami tego transportera są: etopozyd, tenipozyd i antracykliny. [66].

#### BIAŁKO MRP7-9

Białko MRP7 (ABCC10) nie zostało jeszcze w pełni scharakteryzowane, wiadomo jednak, że bierze ono udział w transporcie anionowych koniugatów  $\text{E}_2\text{17}\beta\text{G}$  i – w niewielkim stopniu – koniugatów leukotrienów cysteinowych ( $\text{LTC}_4$ ) [67]. Stwierdzono jego obecność w nerkach, jednak do dzisiaj nie ma żadnych danych dotyczących rozmieszczenia w nefronie [41]. Białko to jest również odpowiedzialne za lekooporność w stosunku do taksolu, winkrystyny i winblastyny [68]. Ostatnio odkrytymi białkami są MRP8 (ABCC11) [69] i MRP9 (ABCC12) [70]. Do dzisiaj nie stwierdzono jednoznacznie, czy w ogóle są one zaangażowane w transport nerkowy [41].

#### DOMENY REGULATOROWE PDZ

Ostatnio wykazano, że wiele transporterów, w tym białka MRP, zlokalizowanych w błonie apikalnej komórek nabłonkowych, posiada sekwencję aminokwasów zlokalizowaną na końcu C białka, nazwaną motywem PDZ [71]. Ta charakterystyczna sekwencja oddziałuje z białkami adapterowymi, które zawierają domeny PDZ składające się z około 90 aminokwasów. Uważa się, że oddziaływanie domen PDZ jest regulowane przez fosforylację lub przez wiązanie ligandów. W białkach tych zlokalizowano również obecność innych domen, np. SH3 (homolog Src), MAGUK (domena kinazy guanylowej) i inne. Obecność tylu różnych domen wskazuje, że białka te są zdolne do generowania dużych białkowych kompleksów [71]. W cewkach proksymalnych nerek zlokalizowano cztery takie białka: NHERF1 (EBP50) [72], NHERF2 (E3KARP) [72], PDZK1 i PDZK2 [73]. Sądzi się, że poprzez oddziaływanie z transporterami błonowymi białka te wpływają na ich błonową lokalizację, ekspresję ich genów i aktywność [71].

Stwierdzono, że białko MRP2 posiada na C końcu sekwencję charakterystyczną dla motywu PDZ: X(Ser/Thr)X $\Psi$  (X – dowolny aminokwas,  $\Psi$  – hydrofobowy aminokwas), która oddziałuje z białkiem PDZK1 zlokalizowanym również w błonie luminalnej. W celu określenia funkcji tych oddziaływań, poprzez modyfikację genu białka MRP2, usunięto z końca C tego białka trzy aminokwasy wchodzące w skład tego motywu. Przyczyniło się to do zmiany lokalizacji tego transportera w błonie komórek spolaryzowanych.

Wynika z tego, że przy braku tego motywu przeważa inny motyw sygnałowy (dotąd nie zlokalizowany), który ukierunkowuje to białko w stronę błony bazolateralnej. Nie wiadomo jaki jest wpływ białka PDZK1 na rozmieszczenie tego transportera, przypuszcza się jednak, że może ono brać udział w stabilizacji MRP2 w błonie luminalnej [74]. Stwierdzono, że transportery ABC zlokalizowane w błonie basolateralnej (MRP1, MRP3, MRP5, MRP6) nie posiadają motywu PDZ w odróżnieniu do transporterów błony apikalnej (MRP2, MRP4 i P-gp), co wskazuje na to, że motyw PDZ odgrywa ważną rolę w rozmieszczeniu błonowych białek w komórkach spolaryzowanych.

Jak już wcześniej wspomniano, kinaza białkowa C przez fosforylację wpływa na aktywność transportera MRP2 [74]. Stwierdzono, że miejscem fosforylacji PKC jest seryna w pozycji 1542 w obrębie motywu PDZ (STKF), co powoduje wzrost powinowactwa domen białka PDZK1 do tego transportera. Wynika z tego, że adapter ten poprzez zwiększone oddziaływanie z transporterem może regulować jego aktywność. Oddziaływanie domen PDZ białka PDZK1 wykazano z wieloma innymi transporterami: URAT1, NPT1, OAT4, PEPT1. Niektóre z tych białek, jak np. MRP2, oddziałują tylko z jedną domeną PDZK1 (PDZ1), inne natomiast mogą oddziaływać z kilkoma, np. URAT1 (wykazuje duże powinowactwo do domeny PDZ1 i niskie do PDZ2 i PDZ4). Fizjologiczne znaczenie wielu oddziaływań z transporterami nie zostało jeszcze wyjaśnione, wydaje się jednak, że poprzez białka adapterowe mogą być przenoszone sygnały pomiędzy transporterami, które w ten sposób mogą regulować transport transbłonowy poszczególnych substancji [71].

Wykazano również, że białka PDZ mogą się łączyć między sobą, tworząc homo- i heterodimery. Tworzą one w ten sposób kompleksy białkowe z dużą ilością domen PDZ, mogących oddziaływać z motywami PDZ transporterów błonowych i prawdopodobnie biorą udział w stabilizacji struktury błony apikalnej komórek nabłonkowych cewek proksymalnych [74].

## PODSUMOWANIE

W opracowaniu tym została zebrana aktualna wiedza na temat fizjologicznej roli transporterów z rodziny ABC oraz ich wpływu na transport nerkowy wielu stosowanych w klinice leków. Na podstawie powyższego przeglądu literatury można stwierdzić, że do dzisiaj specyficzna rola białek ABC w dystrybucji organicznych jonów w nerkach jest jeszcze bardzo słabo poznana, a wiedza na ten temat nieusystematyzowana. Najwięcej literatury dotyczy funkcji, jakie pełnią te transportery w cewkach proksymalnych. Nie ma natomiast prawie żadnych doniesień dotyczących rozmieszczenia i funkcji, jakie pełnią te białka w kłębuszkach nerkowych. Mało poznane są również mechanizmy regulatorowe wpływające na transport poszczególnych transporterów. Ostatnio wykazane oddziaływanie pomiędzy białkami adapterowymi PDZ a transporterami błonowymi wskazują na ścisłą zależność pomiędzy całym systemem transportującym. Nie wiadomo natomiast w jaki sposób zachodzi ta regulacja. Rozwiązanie tego zagadnienia jest dzisiaj jednym z priorytetów, ponieważ wiele stosowa-

nych leków, poprzez oddziaływanie z transporterami, może prowadzić do zaburzeń funkcji i ostrej niewydolności nerek.

## PIŚMIENNICTWO

1. Masereeuw R, Russel FG (2001) Mechanisms and clinical implications of renal drug excretion. *Drug Metab Rev* 33: 299-351
2. Shitara Y, Horie T, Sugiyama Y (2006) Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur J Pharm Sci* 27: 425-446
3. Russel FG, Masereeuw R, van Aubel RA (2002) Molecular aspects of renal anionic drug transport. *Annu Rev Physiol* 64: 563-594
4. Inui KI, Masuda S, Saito H (2000) Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney Int* 58: 944-958
5. Borowski E, Bontemps-Gracz MM, Piwkowska A (2005) Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochim Polon* 52: 609-627
6. Panczyk M, Sałagacka A, Mirowski M (2007) Gen MDR1 (ABCB1) kodujący glikoproteinę P (P-gp) z rodziny transporterów błonowych ABC: znaczenie dla terapii i rozwoju nowotworów. *Postepy Biochem* 53: 361-373
7. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11: 1156-1166
8. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Center M, Keppler D (1994) ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. *Cancer Res* 54: 4833-4836
9. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-1654
10. Yu XQ, Xue CC, Wang G, Zhou SF (2007) Multidrug resistance associated proteins as determining factors of pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Curr Drug Metab* 8: 787-802
11. Ross DD (2000) Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia* 14: 467-473
12. Inagaki N, Gono T, Clement JP 4th, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J (1995) Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonyleurea receptor. *Science* 270: 1166-1170
13. Tabcharani JA, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW (1991) Phosphorylation-regulated Cl<sup>-</sup> channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* 352: 628-631
14. Hirano T (2006) At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 311-322
15. Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, Tainer JA (2000) Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* 101: 789-800
16. Kozak L, Gopal G, Yoon JH, Sauna ZE, Ambudkar SV, Thakurta AG, Dhar R (2002) Elf1p, a member of the ABC class of ATPases, functions as a mRNA export factor in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 277: 33580-33589
17. Sekine T, Miyazaki H, Endou H (2006) Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F251-261
18. Launay-Vacher V, Izzedine H, Karie S, Hulot JS, Baumelou A, Deray G (2006) Renal tubular drug transporters. *Nephron Physiol* 103: 97-106
19. Fetsch PA, Abati A, Litman T, Morisaki K, Honjo Y, Mittal K, Bates SE (2006) Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett* 235: 84-92
20. Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455: 152-162
21. van Helvoort A, Giudici ML, Thielemans M, van Meer G (1997) Transport of sphingomyelin to the cell surface is inhibited by brefeldin A and in mitosis, where C6-NBD-sphingomyelin is translocated across the plasma membrane by a multidrug transporter activity. *J Cell Sci* 110: 75-83

22. Wolf DC, Horwitz SB (1992) P-glycoprotein transports corticosterone and is photoaffinity-labeled by the steroid. *Int J Cancer* 52: 141-146
23. Wang E, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW (2000) Cholesterol interaction with the daunorubicin binding site of P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 909-916
24. Kimura Y, Matsuo M, Takahashi K, Saeki T, Kioka N, Amachi T, Ueda K (2004) ATP hydrolysis-dependent multidrug efflux transporter: MDR1/P-glycoprotein. *Curr Drug Metab* 5: 1-10
25. Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE (2001) From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 58: 931-959
26. Ambudkar SV, Kim IW, Sauna ZE (2006) The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur J Pharm Sci* 27: 392-400
27. Linton KJ (2007) Structure and function of ABC transporters. *Physiology* 22: 122-130
28. Ernest S, Bello-Reuss E (1999) Secretion of platelet-activating factor is mediated by MDR1 P-glycoprotein in cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 10: 2306-2313
29. Endres CJ, Hsiao P, Chung FS, Unadkat JD (2006) The role of transporters in drug interactions. *Eur J Pharm Sci* 27: 501-517
30. Gutmann H, Miller DS, Droulle A, Drewe J, Fahr A, Fricker G (2000) P-glycoprotein- and mrp2-mediated ocreotide transport in renal proximal tubule. *Br J Pharmacol* 129: 251-256
31. Anglicheau D, Pallet N, Rabant M, Marquet P, Cassinat B, Meria P, Beaune P, Legendre C, Thervet E (2006) Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine-sirolimus interaction. *Kidney Int* 70: 1019-1025
32. Capone D, Palmiero G, Gentile A, Basile V, Federico S, Sabbatini M, Potenza M, Perfetti A, Pieri M, Tarantino G (2007) A pharmacokinetic interaction between clarithromycin and sirolimus in kidney transplant recipient. *Curr Drug Metab* 8: 379-381
33. Shimizu A, Miyoshi M, Sugie M, Ueyama J, Yamaguchi T, Sasaki T, Takagi K, Jin M, Miyamoto K, Tsuji A, Hasegawa T (2004) Possible involvement of P-glycoprotein in renal excretion of pazufloxacin in rats. *Eur J Pharmacol* 501: 151-159
34. Golstein PE, Boom A, van Geffel J, Jacobs P, Masereel B, Beauwens R (1999) P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds. *Pflugers Arch* 437: 652-660
35. Veau C, Leroy C, Banide H, Auchère D, Tardivel S, Farinotti R, Lacour B (2001) Effect of chronic renal failure on the expression and function of rat intestinal P-glycoprotein in drug excretion. *Nephrol Dial Transplant* 16: 1607-1614
36. Bello-Reuss E, Ernest S (1994) Expression and function of P-glycoprotein in human mesangial cells. *Am J Physiol* 267: C1351-1358
37. Taylor AL, Kudlow BA, Marrs KL, Gruenert DC, Guggino WB, Schwiebert EM (1998) Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia. *Am J Physiol* 275: C1391-1406
38. Roman RM, Lomri N, Braunstein G, Feranchak AP, Simeoni LA, Davison AK, Mechetner E, Schwiebert EM, Fitz JG (2001) Evidence for multidrug resistance-1 P-glycoprotein-dependent regulation of cellular ATP permeability. *J Membr Biol* 183: 165-173
39. van de Water FM, Masereeuw R, Russel FG (2005) Function and regulation of multidrug resistance proteins (MRPs) in the renal elimination of organic anions. *Drug Metab Rev* 37: 443-471
40. Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG, Keppler D (1994) The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem* 269: 27807-27810
41. Hipfner DR, Deeley RG, Cole SP (1999) Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta* 1461: 359-376
42. Konig J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. (1999) Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461: 377-394
43. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D (1996) Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res* 56: 988-994
44. Kruh GD, Zeng H, Rea PA, Liu G, Chen ZS, Lee K, Belinsky MG (2001) MRP subfamily transporters and resistance to anticancer agents. *J Bioenerg Biomem* 33: 493-501
45. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP (2001) Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* 167: 3-23
46. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 204: 216-237
47. Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RP (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 271: 1126-1128
48. Smeets PH, van Aubel RA, Wouterse AC, van den Heuvel JJ, Russel FG (2004) Contribution of multidrug resistance protein 2 (MRP2/ABCC2) to the renal excretion of p-aminohippurate (PAH) and identification of MRP4 (ABCC4) as a novel PAH transporter. *J Am Soc Nephrol* 15: 2828-2835
49. Notenboom S, Miller DS, Smits P, Russel FG, Masereeuw R (2004) Involvement of guanylyl cyclase and cGMP in the regulation of Mrp2-mediated transport in the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F33-38
50. Notenboom S, Miller DS, Kuik LH, Smits P, Russel FG, Masereeuw R (2005) Short-term exposure of renal proximal tubules to gentamicin increases long-term multidrug resistance protein 2 (Abcc2) transport function and reduces nephrotoxicant sensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 912-920
51. Masereeuw R, Terlouw SA, van Aubel RA, Russel FG, Miller DS (2000) Endothelin B receptor-mediated regulation of ATP-driven drug secretion in renal proximal tubule. *Mol Pharmacol* 57: 59-67
52. Zeng H, Bain LJ, Belinsky MG, Kruh GD (1999) Expression of multidrug resistance protein-3 (multispecific organic anion transporter-D) in human embryonic kidney 293 cells confers resistance to anticancer agents. *Cancer Res* 59: 5964-5967
53. van Aubel RA, Smeets PH, Peters JG, Bindels RJ, Russel FG (2002) The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J Am Soc Nephrol* 13: 595-603
54. Wielinga PR, van der Heijden I, Reid G, Beijnen JH, Wijnholds J, Borst P (2003) Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. *J Biol Chem* 278: 17664-17671
55. Van Aubel RA, Smeets PH, van den Heuvel JJ, Russel FG (2005) Human organic anion transporter MRP4 (ABCC4) is an efflux pump for the purine end metabolite urate with multiple allosteric substrate binding sites. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F327-333
56. Imaoka T, Kusuhara H, Adachi M, Schuetz JD, Takeuchi K, Sugiyama Y (2007) Functional involvement of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in the renal elimination of the antiviral drugs adefovir and tenofovir. *Mol Pharmacol* 71: 619-627
57. Ci L, Kusuhara H, Adachi M, Schuetz JD, Takeuchi K, Sugiyama Y (2007) Involvement of MRP4 (ABCC4) in the luminal efflux of ceftizoxime and cefazolin in the kidney. *Mol Pharmacol* 71: 1591-1597
58. Hasegawa M, Kusuhara H, Adachi M, Schuetz JD, Takeuchi K, Sugiyama Y (2007) Multidrug resistance-associated protein 4 is involved in the urinary excretion of hydrochlorothiazide and furosemide. *J Am Soc Nephrol* 18: 37-45
59. Sekine T, Miyazaki H, Endou H (2006) Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F251-261
60. Jutabha P, Kanai Y, Hosoyamada M, Chairoungdua A, Kim DK, Iribe Y, Babu E, Kim JY, Anzai N, Chatsudthipong V, Endou H (2003) Identification of a novel voltage-driven organic anion transporter present at apical membrane of renal proximal tubule. *J Biol Chem* 278: 27930-27938
61. Hediger MA, Johnson RJ, Miyazaki H, Endou H (2005) Molecular physiology of urate transport. *Physiology (Bethesda)* 20: 125-133

64. Lipkowitz MS, Leal-Pinto E, Cohen BE, Abramson RG (2004) Galectin 9 is the sugar-regulated urate transporter/channel UAT. *Glycoconj J* 19: 491-498
65. Magoula I, Tsapas G, Paletas K, Mavromatidis K (1991) Insulin-dependent diabetes and renal hypouricemia. *Nephron* 59: 21-26
66. Belinsky MG, Chen ZS, Shchavezleva I, Zeng H, Kruh GD (2002) Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res* 62: 6172-6177
67. Chen ZS, Hopper-Borge E, Belinsky MG, Shchavezleva I, Kotova E, Kruh GD (2003) Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10). *Mol Pharmacol* 63: 351-358
68. Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchavezleva I, Belinsky MG, Kruh GD (2004) Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer Res* 64: 4927-4930
69. Bera TK, Lee S, Salvatore G, Lee B, Pastan I (2001) MRP8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer. *Mol Med* 7: 509-516
70. Yabuuchi H, Shimizu H, Takayanagi S, Ishikawa T (2001) Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABCC11 and ABCC12. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 933-939
71. Kato Y, Watanabe C, Tsuji A (2006) Regulation of drug transporters by PDZ adaptor proteins and nuclear receptors. *Eur J Pharm Sci* 27: 487-500
72. Ingraffea J, Reczek D, Bretscher A (2002) Distinct cell type-specific expression of scaffolding proteins EBP50 and E3KARP: EBP50 is generally expressed with ezrin in specific epithelia, whereas E3KARP is not. *Eur J Cell Biol* 81: 61-68
73. Gisler SM, Stagljar I, Traebert M, Bacic D, Biber J, Murer H (2001) Interaction of the type IIa Na/Pi cotransporter with PDZ proteins. *J Biol Chem* 276: 9206-9213
74. Harris MJ, Kuwano M, Webb M, Board PG (2001) Identification of the apical membrane-targeting signal of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/MOAT). *J Biol Chem* 276: 20876-20881

## The role of ABC transporters in the renal elimination of organic anions and drugs

Agnieszka Piwkowska 

Laboratory of Cellular and Molecular Nephrology, Polish Academy of Sciences Medical Research Center, 7 Dębinki St., 80-211 Gdansk, Poland

 e-mail: apiwkowska@cmdik.pan.pl

**Key words:** P-glycoprotein, MRP, ABC transporters, PDZ domains, urate

### ABSTRACT

The ATP-binding cassette (ABC) transporters are a large superfamily of integral membrane proteins that actively transport organic ions across biological membranes. These transporters play important role in the reabsorptive and excretory capacity of the kidney. Nine structurally and functionally related members (MRP1-7, P-gp, BCRP) have been identified, which differ from each other by their localization, expression levels, and substrate specificity. This review discusses current knowledge on the renal characteristics of ABC transporters, with specific focus on their regulation.

# Zaangażowanie układu renina-angiotensyna (RAS) w proces kancerogenezy

Kamila Domińska<sup>✉</sup>

Agnieszka Lachowicz-Ochędalska

Zakład Endokrynologii Porównawczej, Katedra Endokrynologii Ogólnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>✉</sup>Zakład Endokrynologii Porównawczej, Katedra Endokrynologii Ogólnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Sterlinga 3, 91-425 Łódź; tel.: (050) 832 51 77, e-mail: kamila-107107@wp.pl

Artykuł otrzymano 28 października 2007 r.  
Artykuł zaakceptowano 10 stycznia 2008 r.

**Słowa kluczowe:** angiotensyna II, AT1, AT2, RAS, kancerogeneza

**Stosowane skróty:** ACE (ang. *angiotensin converting enzyme*) – enzym przekształcający angiotensynę; Ang II – angiotensyna II; angiotensyna (1-8); AT1 – receptor dla angiotensyny typu pierwszego; AT2 – receptor dla angiotensyny typu drugiego; RAS – system renina-angiotensyna

**Podziękowanie:** Praca finansowana ze środków przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego na realizację projektu badawczego N403355533

## STRESZCZENIE

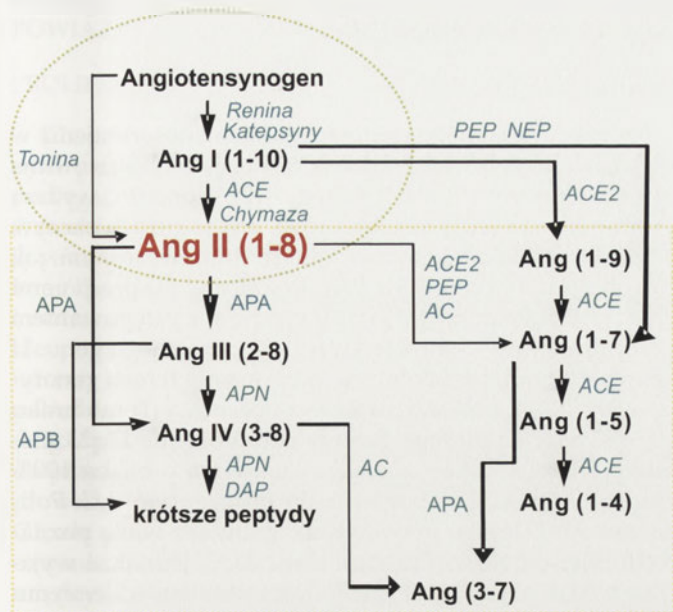
Peptydy z rodziny angiotensyn kojarzone są głównie z systemem sercowo-naczyniowym i homeostazą wodno-mineralną. W ostatnich latach stwierdzono również, że kluczowy peptyd systemu renina-angiotensyna (Ang II), poprzez dwa klasyczne receptory błonowe: AT1 i AT2, zaangażowany jest w regulację komórkowego wzrostu, proliferację, różnicowanie i migrację komórek, apoptozę, procesy zapalne, angiogenezę oraz ekspresję genów. W wielu komórkach nowotworowych potwierdzono występowanie zmian w poszczególnych elementach RAS, co może sugerować zaangażowanie tego układu w kancerogenezę. Niniejsza praca skupia się na roli tkankowych RAS w procesie nowotworzenia oraz potencjalnych możliwościach terapeutycznych wynikających z manipulowania tymże układem. W ostatnich latach stało się oczywiste, że układ renina-angiotensyna (RAS) ma daleko szersze znaczenie niż standardowa rola w regulacji systemu sercowo-naczyniowego i w homeostazie wodno-elektrolitowej. Badania prowadzone w ciągu kilku ostatnich lat, przyczyniły się do wykazania obecności tkankowych RAS, które mogą współdziałać między innymi z hormonami, czynnikami pozapalnymi lub czynnikami wzrostu. Odkryto kolejne peptydy efektorowe układu RAS, enzymy prowadzące do ich powstawania, a także specyficzne dla nich receptory. Potwierdzono istnienie oddziaływań między peptydami układu renina-angiotensyna, jak również wykryto nowe biologiczne funkcje już wcześniej znanych elementów RAS [1]. Badania potwierdziły, zaangażowanie RAS w liczne fizjologiczne i patologiczne procesy, takie jak: proliferacja komórek, ich migracja, angiogeneza, procesy zapalne czy apoptoza. Sugeruje to, że nieprawidłowe funkcjonowanie układu renina-angiotensyna może przyczynić się do różnych zmian patologicznych, w tym transformacji nowotworowej [2-4]. W niniejszej pracy przedstawimy nowe informacje dotyczące budowy i funkcjonowania lokalnych RAS. Poddamy analizie ścieżki sygnałowe angiotensyn oraz ich klasycznych receptorów, które mogłyby brać udział w kancerogenezie.

## BUDOWA LOKALNEGO SYSTEMU RENINA – ANGIOTENSYNA (RAS)

### PEPTYDY I PEPTYDAZY

Syntezę czynnych związków w RAS zapoczątkowuje proteolityczne przekształcenie angiotensynogenu do angiotensyny I przez reninę. Poza reniną, która jest proteazą kwasu asparaginowego, istnieją dwie kategorie tkankowych enzymów reninopodobnych (izorenin). Pierwsza kategoria obejmuje katepsyny (G, D i E), które są lizosomowymi proteazami serynowymi, pozwalającymi na lokalną lizę angiotensynogenu do Ang I. Druga natomiast jest reprezentowana przez cytozolową proteazę serynową – toninę, która pozwala na bezpośrednią syntezę Ang II z angiotensynogenu [5]. Inna droga powstawania Ang II jest zależna od enzymu ACE (ang. *angiotensin converting enzyme*), który poprzez odcięcie dipeptydu His-Leu od końca C angiotensyny I, przekształca ją w kluczowy peptyd układu RA. Angiotensyna II może ulegać kolejnym przekształceniom do Ang III, Ang IV i do krótszych peptydów w wyniku działania aminopeptydaz: A, N i B (APA, APB, APN) [5,6].

Alternatywna droga metabolizowania Ang I zachodzi przy udziale enzymu ACE2. Mimo podobieństwa strukturalnego do ACE (homologia 42%) aktywność katalityczna tych dwóch enzymów jest odmienna. Enzym ACE jest dikarboksylazą, podczas gdy ACE2 jest karboksylazą i ma zdolność odłączania tylko jednej reszty aminokwasowej od końca C Ang I, prowadząc do powstania angiotensyny (1-9). Ang (1-9) nie może być substratem dla ACE2 i ulegać przekształceniu do Ang II, może natomiast być metabolizowana przez enzym ACE do Ang (1-7), Ang (1-5), Ang (1-4) [7,8]. Ponadto, odkrycie ACE2 prawdopodobnie ujawniło główny szlak syntezy Ang (1-7). Aktywność katalityczna tego enzymu w wytwarzaniu Ang (1-7) z Ang II jest 10-krotnie większa niż endopeptydazy prolinowej (PEP) i aż 600-krotnie większa niż karboksypeptydazy prolinowej (angiotensynaza C – AC). Należy jednak podkreślić, że wysoki poziom ACE2 u ludzi jest ograniczony do nerek, jąder i serca [9] (Ryc. 1). Niewątpliwie aktywność układu RA zależy od równowagi jaka winna zachodzić między syntezą a metabolizmem Ang II (Ryc. 1). Nieprawidłowe proporcje



**Rycina 1.** Schemat lokalnego RAS z uwzględnieniem aktywnych peptydów efektorowych, dróg ich metabolizowania oraz zaangażowanych w ten proces aminopeptydaz.

między tymi procesami mogą przyczyniać się do zmian patologicznych w strukturze i funkcji poszczególnych narządów na drodze regulacji ekspresji genów, syntezy czynników wzrostu czy procesów odpowiedzi zapalnej.

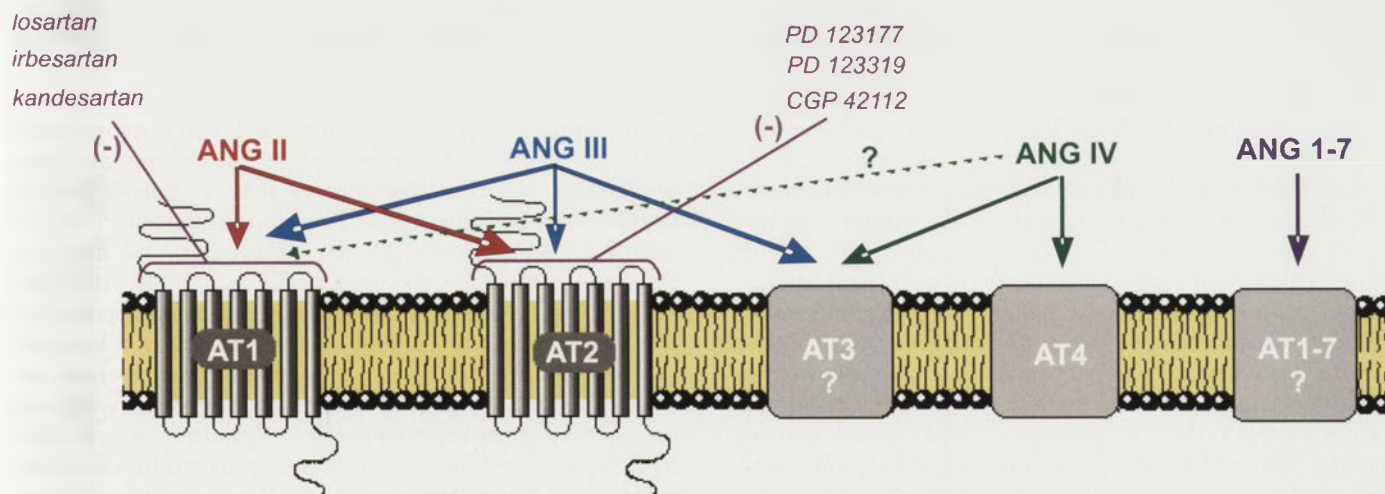
#### RECEPTORY ANGIOTENSYNOWE

W najbardziej znanych efektach działania Ang II, *in vitro*, pośredniczą dwa klasyczne receptory AT1 i AT2, które zostały sklonowane i farmakologicznie scharakteryzowane. Receptory te należą do klasy receptorów związanych z białkami G i są zbudowane z siedmiu domen zlokalizowanych błonowo. Wiadomo, że receptory AT1 po związaniu z ligandem są internalizowane, natomiast receptory AT2 nie ulegają endocytozie, dzięki czemu pozostają dłużej dostępne w błonie plazmatycznej [10,11]. Receptor AT2 obecny jest głównie w tkankach płodowych.

Natomiast we wczesnym okresie noworodkowym następuje szybkie zmniejszenie się jego liczby do niewielkiego poziomu lub nawet jego całkowity zanik. Dominującym receptorem staje się wówczas AT1 [10,12]. Należy jednak podkreślić, że gęstość receptorów AT1 i AT2 w poszczególnych narządach i tkankach może ulegać modyfikacji, przede wszystkim pod wpływem Ang II, jak również wielu innych czynników, np. adrenaliny czy insuliny.

Homologia sekwencyjna między receptorami AT1 i AT2 jest niska i wynosi 32–34%. Receptory Ang II mogą być rozróżniane za pomocą hamujących je specyficznych peptydowych i niepeptydowych antagonistów. Receptor AT1 jest wybiórczo hamowany przez difenylimidazole, takie jak np. losartan, podczas gdy tetrahydroimidazole-pirydydy hamują receptor AT2. Farmakologia innych typów receptorów: AT3 i AT4 oraz receptora dla Ang 1-7 nie została dotychczas w pełni scharakteryzowana, dlatego receptory te nie są włączone do klasycznych receptorów angiotensynowych ssaków [10-12] (Ryc. 2).

Receptor AT1 najczęściej związany jest z proliferacją komórek. Działanie receptora AT2 jest przeciwstawne i polega głównie na hamowaniu wzrostu komórek oraz indukcji apoptozy. Istnieją jednak pośrednie dowody, pochodzące z badań *in vitro*, sugerujące, że Ang II w pewnych warunkach może stymulować wzrost, działając poprzez receptor AT2. Wyniki eksperymentalne dowodzą, że działanie receptora AT2 jest niejednoznaczne. Wstępne badania pozwalają przypuszczać, że przeciwwzrostowe działanie receptora AT2 jest uzależnione od poziomu jego syntezy w stosunku do receptora AT1 [12]. Albowiem wpływ receptorów AT1 i AT2 może wynikać nie tylko z aktywacji odmiennych szlaków sygnałowych, ale również z heterodimeryzacji AT1/AT2, która powoduje zmianę konformacji i zablokowanie receptora AT1 [13-15]. Liczba receptorów angiotensynowych oraz krzyżowe relacje między nimi niewątpliwie modulują fizjologiczne efekty angiotensyn na komórkę. Zmiany w poziomie syntezy tych receptorów wpływają więc na funkcjonowanie układu renina-angiotensyna i mogą przyczyniać się do występowania w nim nieprawidłowości.



**Rycina 2.** Schemat przedstawiający możliwość oddziaływań Ang II, III, IV i 1-7 z różnymi typami receptorów dla angiotensyn, z uwzględnieniem inhibitorów stosowanych dla klasycznych receptorów – AT1 i AT2.

RECEPTORY ANGIOTENSYNOWE AT1 I AT2

Na podstawie badań immunocytochemicznych i RT-PCR, zaobserwowano, że gen kodujący receptor AT1 ulega ekspresji, często wzmożonej, w wielu nowotworach człowieka, w tym: płaskokomórkowym raku skóry, raku trzustki, raku krtani. Obecność AT1 stwierdzono także w nowotworach będących istotnym problemem epidemiologicznym: raku prostaty, raku piersi, czy raku płuc [2,3].

W przypadku łagodnej hyperplazji piersi obserwowana jest ciągła syneza genu kodującego receptor AT1, która zanika dopiero w komórkach inwazyjnych raka piersi. Natomiast w raku gruczołu krokowego stwierdzono wyższy poziom ekspresji genu receptora AT1 w porównaniu z siłą jego wyrazu w zdrowej prostatie człowieka [17]. Jednak inne badanie wykazuje, że w stadium łagodnej hyperplazji prostaty (BPH) efektywność wiązania receptora AT1 zostaje zredukowana. Możliwe jednak, że obniżenie wrażliwości AT1 w BPH jest spowodowane przez bardzo wysoki poziom angiotensyny II w tkance. Jak już wcześniej wspomniano, receptory AT1 są internalizowane po związaniu z ligandem, co wiąże się z ich czasową niedostępnością. Nadmiar ligandu może powodować więc względne obniżenie ilości receptorów AT1 [18].

W komórkach nowotworowych szyjki macicy [19] i jajników [21] człowieka, poziom AT1 jest związany z inwazyjnością guza. Natomiast w łagodnym torbielakogruczolakujajnika ekspresja AT1 jest prawie nieobecna, ale dramatycznie wzrasta w momencie przekroczenia granicy uzłośliwienia i inwazyjności. Stwierdzono, że AT1 jest obecny w 85% raków jajnika i gen ulega ciągłej ekspresji w 55% przypadków [2]. Ponadto, poziom AT1 wykazuje, w wielu przypadkach, pozytywny związek z poziomem VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) i wyższą zawartością mikronaczyń w tkankach nowotworowych [2,3]. Z kolei poziom drugiego głównego receptora dla angiotensyn – AT2 jest niższy w prawidłowych tkankach, ale wzrasta w hyperplazji i inwazyjnym raku piersi [21,22]. Wzrost ekspresji genu receptora AT2 został również zaobserwowany w guzach endokrynnych trzustki oraz w raku jelita grubego, podczas gdy w raku nerki stosunek receptora AT1 do AT2 wynosił 60:40% [2,3]. Uwzględniając fakt, że działanie AT2 jest głównie proapoptotyczne, jego nadmierna produkcja w inwazyjnym raku sutka może stanowić mechanizm obronny, mający na celu indukcję programowanej śmierci w komórkach nowotworowych. Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych i izolowanych komórkach wykazały, że zastosowanie antagonistów receptora AT1 może zmniejszać wielkość guzów trzustki, nerki, jajnika, prostaty oraz hamować rozwój mięsaków, włókniakomięsaków oraz raka płuc [4,16,17]. Znane są również pierwsze wyniki badań klinicznych, testujące wpływ np. kandesartanu na hormonoopornego raka prostaty. Połowa z 23 badanych pacjentów wykazała obniżenie wartości PSA (ang. *prostate specific antygen*) po traktowaniu ARB (ang. *angiotensin II receptor blockers*). Tylko u jednego z

pacjentów zaobserwowano skutek uboczny w postaci nadciśnienia tętniczego [23].

INNE ELEMENTY RAS

Wzmożoną syntezę angiotensynogenu obserwujemy w glejakach, a jego nadprodukcja jest często obserwowana w endokrynnych guzach trzustki [2]. Ponadto, wyższa ekspresja genu ACE została zauważona w guzach naczyń, a także raku żołądka, zarówno w stadium wczesnym, jak i w obecności przerzutów [24]. Różnice w ekspresji genu ACE w tkankach mogą być związane z występowaniem polimorfizmów w obrębie wyżej wspomnianego genu. U człowieka stwierdzono np. występowanie trzech genotypów D/D, I/I, I/D, wynikające z obecności (I) lub braku (D) 287 pary zasad tego genu w chromosomie 17q23. Genotyp DD charakteryzuje się zwiększoną o blisko 100% aktywnością ACE w porównaniu do genotypu I/I. Polimorfizm I/D jest co prawda tylko jednym z wielu poznanych miejsc polimorficznych genu ACE, jednakże wyjaśnia blisko ponad 27% zmienności aktywności enzymu przekształcającego [3,25]. Ostatnie doniesienia wskazują, że polimorfizm ACE może być jednym z istotnych czynników w powstawaniu oraz rozwoju raka endometrium czy raka prostaty [26,27]. Badania przesiewowe wykazały również, że kobiety z wrodzoną niską ekspresją genu ACE mają 50% mniejsze ryzyko wystąpienia nowotworu piersi [28]. Pośrednie dowody sugerują, że drugi z enzymów przekształcających – ACE2, może być zaangażowany w powstawanie raka jajnika [29]. Lever i wsp. jako pierwsi zasugerowali ochronną rolę inhibitorów ACE (ACEi) w walce z nowotworami. Stwierdzili oni zmniejszoną zachorowalność na raka piersi i płuc u pacjentów poddawanych długoterminowemu leczeniu kaptoprylem, lizynoprylem i enadoprylem [30]. Jednakże inne badania epidemiologiczne nie potwierdziły tej tendencji, wskazując na brak zależności między stosowaniem ACEi a kancerogenezą [31,32]. Być może różnice wynikały z faktu krótszego czasu traktowania inhibitorami, jak również bardziej zaawansowanego wieku pacjentów. Obecnie wiele badań wskazuje, że ACEi mają właściwości hamujące zarówno w stosunku do nowotworów *in vitro*, jak i *in vivo*. Przypisuje się im zdolność osłabiania proliferacji wielu linii komórek nowotworowych, jak również hamowania angiogenezy oraz wzrostu guzów w modelach zwierzęcych [2,3].

Jak widać z powyższych badań, w wielu nowotworach człowieka potwierdzono zmiany w funkcjonowaniu poszczególnych elementów układu RAS w porównaniu z tkankami prawidłowymi. Co więcej, antagoniści ACE i receptora AT1, będący lekami o udowodnionej skuteczności w leczeniu nadciśnienia tętniczego i niewydolności serca, coraz częściej rozpatrywani są jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. Mechanizm związany z korzystnym wpływem ACEi i ARB na walkę z nowotworami nie został do końca poznany. Najprawdopodobniej wiąże się on z zahamowaniem tych ścieżek sygnalizacyjnych układu renina-angiotensyna, które sprzyjają proliferacji oraz migracji komórek, czy też wzmagają progresję guzów nowotworowych.



Choroby nowotworowe oparte są zwykle na patologicznym procesie, w którym prawidłowe komórki przestają podlegać normalnym mechanizmom kontrolującym ich wzrost i różnicowanie. Badania *in vitro* i *in vivo* dostarczają wiarygodnych dowodów, że Ang II wpływa na wzrost komórkowy i apoptozę. W zależności od rodzaju komórek i obecności innych czynników wzrostowych Ang II, zwykle poprzez receptor AT1, może indukować proliferację lub też hamować cykl komórkowy w fazie G1. Nadmierne pobudzenie ekspresji genów kodujących inhibitory CDK (ang. *cyclin-dependent kinases*), takich jak p27<sup>Kip1</sup>, prowadzi do przestopu komórki. Wprawdzie aktywacja AT2 również prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego w fazie G1, ale proces ten w efekcie indukuje apoptozę lub różnicowanie się komórek. Należy jednak podkreślić, że relacje między klasycznymi receptorami angiotensynowymi w regulacji cyklu komórkowego nie są do końca jasne i klarowne. Znane są bowiem przypadki indukcji apoptozy poprzez receptor AT1, jak również w pewnych warunkach Ang II może stymulować wzrost, działając poprzez receptor AT2 [33] (Ryc. 3).

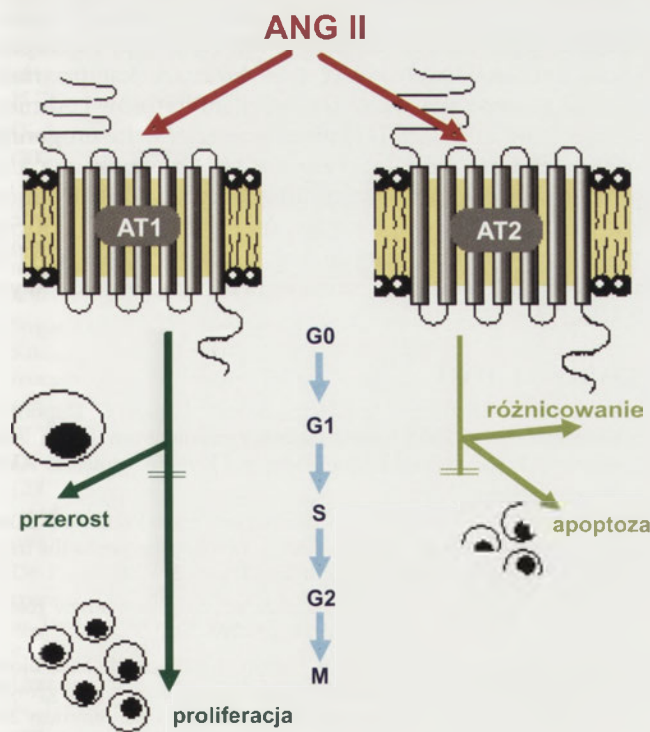
Mechanizmy proliferacyjnego i proapoptotycznego działania angiotensyn najprawdopodobniej związane są z aktywacją śródkomórkowych kaskad białkowych kinaz tyrozynowych. Wśród nich wyróżniamy kinazy tyrozynowe receptorowe: EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*), PDGFR (ang. *platelet-derived growth factor receptor*) i IGF1R (ang. *insulin-like growth factor receptor*) oraz niereceptorowe,

czyli cytoplazmatyczne: PLC- $\gamma$  (ang. *phospholipase C*), rodzina kinaz Src, rodzina JAK (ang. *Janus kinase*), FAK (ang. *focal adhesion kinase*), zależne od Ca<sup>2+</sup> kinazy tyrozynowe (np. Pyk2 – ang. *proline-rich tyrosine kinase 2*), p130Cas (ang. *Crk associated substrate*), PI3K (ang. *phosphoinositide 3-kinase*) [6,10-12]. Obie grupy działają jako katalizatory reakcji przeniesienia reszty fosforanowej z ATP na grupę hydroksylową reszt tyrozynowych w sekwencji docelowych białek komórkowych. Nadmierna indukcja kontrolowanych przez nie dróg sygnałowych związana jest ze wzrostem i rozwojem oraz inwazyjnością licznych procesów nowotworowych [34]. Przykładowo, w komórkach raka piersi i prostaty stwierdzono, że AT1 pośredniczy w transaktywacji EGFR, w efekcie prowadząc do fosforylacji drogi MAPK/ERK (ang. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinases*) i wzrostu komórek. Odnotowano również, że aktywacja drogi PI3K/Akt odgrywa istotną rolę w antyapoptotycznym efekcie Ang II (przez receptor AT1) chociażby w raku jelita czy w komórkach nabłonka kosmówkowego złośliwego [2].

Liczne badania potwierdzają, że receptor AT1 indukuje procesy wzrostu komórek przez aktywację drogi sygnalizacyjnej powiązanej z ERK. Dystrybucja ścieżki ERK wiąże się ściśle z procesami nowotworowymi, szczególnie poprzez białka Ras, c-Raf czy receptory, takie jak HER2 (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*). Stymulacja ERK1/2 jest również powiązana ze wzrostem ekspresji takich genów jak c-fos, c-myc i c-jun, syntezą DNA, komórkowym wzrostem, reorganizacją cytoszkieletu [12]. Receptor AT2 natomiast promuje apoptozę poprzez stymulację MKP-1 (ang. *MAP kinase phosphatase-1*), co wiąże się z defosforylacją i zahamowaniem MAPK i Bcl-2. Białko Bcl-2 należy do grupy białek antyapoptotycznych, jego nadprodukcja może powodować oporność nowotworów na chemio- i radioterapię przez hamowanie apoptozy w komórkach guza [11,12].

#### PROCES ZAPALNY I STRES OKSYDACYJNY

Często powtarzające się lub przewlekłe procesy zapalne zaliczane są do czynników ryzyka, wpływających na podwyższoną skłonność osób do zachorowania na niektóre typy nowotworów [35], np. raka płuc, okrężnicy, macicy czy prostaty. W prozapalnych właściwościach Ang II pośredniczy receptor AT1. W monocytach człowieka indukuje on migrację poprzez aktywację kinaz Src, ERK1/2 i p38 oraz fosforylację Pyk2 i paksyliny [3,36]. Aktywacja receptora AT1 pobudza również neutrofile na drodze fosforylacji kinaz MAPK (np. ERK1/2, p38) oraz na drodze aktywacji ROS (reaktywne formy tlenu) i NF- $\kappa$ B (ang. *nuclear factor-kappa B*) [3,37]. W efekcie następuje wzmożone uwalnianie wielu cytokin i chemokin (np. IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor a*) oraz czynników adhezyjnych (selektyny np.: P-, E-, L-selektyna, podrodzina immunoglobulin, np.: ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecule 1*), VCAM-1 (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*), integryny np.  $\beta_2$ ,  $\alpha_1$ -integryna), będących mediatorami procesu zapalnego [38,39]. Badania pokazują, że Ang II uznawana jest za ważny czynnik wpływający na aktywność oksydazy NAD(P)H i w efekcie – produkcję H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub><sup>-</sup>, funkcjonujących jako międzykomórkowe i wewnątrzkomórkowe wtórne przekaźniki. Wiadomo, że ROS modyfikują działalność kinaz



Rycina 3. Wpływ Ang II na cykl komórkowy biorąc pod uwagę typ receptora uczestniczącego w przekazywaniu sygnału.

tyrozyowych (np. Src, Ras, JAK2, Pyk2, PI3K, EGFR) oraz MAPK (np. p38, JNK, ERK5), oraz nasilają aktywację czynników transkrypcyjnych, w tym czynnika NF $\kappa$ B, AP-1 (ang. *activating protein 1*), HIF-1 (ang. *hypoxia-inducible factor 1*), jak również produkcję wielu molekuł prozapalnych i czynników wzrostu [12,39,40]. Zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu, przekraczająca wydolność fizjologicznych układów przeciwutleniających, prowadzi do wystąpienia stresu oksydacyjnego. Badania kliniczne potwierdzają wzrost markerów stresu oksydacyjnego, m.in. metabolitów oksydacyjnego uszkodzenia DNA, produktów utleniania lipidów i prostaglandyn, obniżenia stężenia grup tiolowych w białkach u pacjentów z rozpoznaną chorobą nowotworową [41]. Dlatego reaktywne formy tlenu uznawane są za istotne czynniki rozwoju nowotworów.

## ANGIOGENEZA

Angiogeneza (neowaskularyzacja, naczyniotworzenie) jest wieloetapowym procesem tworzenia nowych naczyń włosowatych na bazie istniejących naczyń krwionośnych. Towarzyszy ona zarówno zjawiskom fizjologicznym, jak i patologicznym. Badania doświadczalne dowodzą, że rozwój guza zwykle związany jest z wytworzeniem nowej sieci naczyń krwionośnych, umożliwiającej dostarczenie mu substancji odżywczych, czynników wzrostu i tlenu. Ostatnie badania donoszą, że Ang II zaangażowana jest w indukcję angiogenezy poprzez aktywację różnorodnych czynników wzrostu, takich jak: VEGF, PDGF, TGF- $\beta$  (ang. *transforming growth factor  $\beta$* ), IGF-1, bFGF (ang. *basic fibroblast growth factor*) [2,39].

Proangiogenywny efekt AT1 wynika przeważnie z wpływu na ekspresję genu VEGF, najsilniejszego i najbardziej swoistego czynnika wzrostu komórek śródbłonna naczyń pochodzących z tętnic, żył i naczyń limfatycznych. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu wpływa na neowaskularyzację na drodze bezpośredniej, poprzez pobudzenie namnażania i migracji EC (komórki śródbłonna) przy jednoczesnym hamowaniu ich apoptozy oraz pośredniej – poprzez formowanie macierzy zewnątrzkomórkowej [42]. Badania potwierdzają pozytywną zależność między poziomem receptora AT1 a ekspresją VEGF i wyższą zawartością mikronaczyń w tkankach raka jajnika. W raku trzonu macicy detekcja AT1 i Ang II jest również skorelowana z wysokim poziomem VEGF i z gorszymi danymi prognostycznymi dla pacjentów [2]. Co ciekawe, w badaniach *in vitro* stwierdzono, że agoniści GPCRs (ang. *G protein-coupled receptors*), tacy jak Ang II, zdecydowanie silniej indukują syntezę HIF-1 niż wywołuje to sam proces niedotlenienia narządów. Wynika to z faktu, że Ang II łącząc się do receptora AT1, wywołuje wzrost poziomu reaktywnych form tlenu poprzez aktywację oksydazy NAD(P)H. Z kolei ROS, poprzez indukcję HIF-1 $\alpha$ , wywołuje silny wzrost poziomu syntezy VEGF [43,44].

Badania *in vivo* również wskazują na powiązanie układu Ang II-AT1 z procesem angiogenezy w rozwoju nowotworów. Mianowicie u myszy AT1-null zaobserwowano wyraźną redukcję syntezy VEGF w porównaniu z typem dzikim. Dodatkowo stwierdzono, że oddziaływanie układu Ang II-AT1 skojarzone jest z infiltracją makrofagów w okolicie

guza, czego rezultatem jest wzrost tkankowego poziomu VEGF. Można zatem założyć, że receptor AT1 może brać udział w tworzeniu nowych naczyń guza w powiązaniu z procesem zapalnym [45]. Należy jednak podkreślić, że Ang II najprawdopodobniej może również hamować wzrost komórek śródbłonna, gdy jej mediatorem jest drugi receptor efektorowy, AT2. Stwierdzono bowiem, że pobudzenie receptora AT2 hamuje fosforylację przy udziale kinazy Akt i syntezę NO [46]. Uruchamianie, poprzez receptory angiotensynowe, torów sygnalizacyjnych PI3K/Akt i eNOS/NO (śródbłonkową syntazę tlenu azotu, ang. *endothelial NO synthase*) jest niewątpliwie kluczowe dla angiogenezy indukowanej przez VEGF.

## PODSUMOWANIE

Odkrycia dokonane w ciągu ostatnich lat spowodowały duży postęp w poznaniu budowy i funkcji układu renina-angiotensyna. Zlokalizowano lokalne, tkankowe RAS działające jednocześnie z układem osoczym. Okazało się, że angiotensyna, w tym Ang II, mogą działać nie tylko w sposób endokryny, ale również autokryny czy parakryny. Ustalono, że droga sygnalizacji Ang II-AT1 odgrywa istotną rolę nie tylko w patogenezie nadciśnienia tętniczego, ale również w progresji wielu typów nowotworów. Stwierdzono zaangażowanie lokalnych RAS, między innymi, we wzrost guzów, inwazyjność, metastazę oraz angiogenezę. Ponieważ antagoniści ACE i AT1 już od wielu lat wykorzystywani są jako leki na nadciśnienie tętnicze, pojawiło się pytanie czy manipulowanie systemem renina-angiotensyna może stać się nową strategią leczenia przeciwnowotworowego. Zdania na ten temat są podzielone. Wyniki eksperymentów prowadzonych *in vitro*, jaki i *in vivo* nie dają jasnej odpowiedzi w tej kwestii. Przeprowadzone badania epidemiologiczne również nie są jednoznaczne. Przyczyn w rozbieżnych wynikach należy szukać zapewne w różnorodności stosowanych blokerów dla ACE (np. kaptopryl, lizynopryl, enalapryl) i AT1 (np. losartan, kandesartan), różnego zakresu stosowanych dawek inhibitorów i odmienności samych komórek nowotworowych. Czas pokaże na ile potwierdzą się optymistyczne lub sceptyczne opinie o możliwości zastosowania blokerów ACE [48,49], AT1 [50,51], czy enzymów degradujących Ang II (np. APA, A-LAP) [52] jako potencjalnych terapeutów przeciwnowotworowych [2,3,35,53].

## PIŚMIENNICTWO

1. Vauquelin G, Michotte Y, Smolders I, Sarre S, Ebinger G, Dupont A, Vanderheyden P (2002) Cellular targets for angiotensin II fragments: pharmacological and molecular evidence. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 3: 195-204
2. Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Nawa A, Nomura S, Kikkawa F (2006) Manipulating the angiotensin system – new approaches to the treatment of solid tumours. *Expert Opin Biol Ther* 6: 243-255
3. Deshayes F, Nahmias C (2005) Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab* 16: 293-299
4. Fujita M, Hayashi I, Yamashina S, Itoman M, Majima M (2002) Blockade of angiotensin AT1a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 441-447
5. Haulica I, Bild W, Serban DN (2005) Angiotensin peptides and their pleiotropic actions. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 6: 121-131

6. Hunyady L, Catt KJ (2006) Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol* 20: 953-970
7. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S (2000) A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 87: E1-E9
8. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ (2000) A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 275: 33238-33243
9. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P (2002) Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 277: 14838-14843
10. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52: 415-472
11. Berry C, Touyz R, Dominiczak AF, Webb RC, Johns DG (2001) Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H2337-H2365
12. Touyz RM, Berry C (2002) Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* 35: 1001-1015
13. AbdAlla S, Lother H, Abdel-Tawab AM, Qwitterer U (2001) The Angiotensin II AT2 Receptor Is an AT1 Receptor Antagonist. *J Biol Chem* 276: 39721-39726
14. Miura S, Saku K, Karnik SS (2003) Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertens Res* 26: 937-943
15. Reudelhuber TL (2005) The continuing saga of the AT2 receptor: a case of the good, the bad, and the innocuous. *Hypertension* 46: 1261-1262
16. Fujimoto Y, Sasaki T, Tsuchida A, Chayama K. (2001) Angiotensin II type 1 receptor expression in human pancreatic cancer and growth inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist. *FEBS Lett* 495: 197-200
17. Uemura H, Ishiguro H, Nakaigawa N, Nagashima Y, Miyoshi Y, Fujinami K, Sakaguchi A, Kubota Y (2003) Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: a possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor. *Mol Cancer Ther* 2: 1139-1147
18. Dinh DT, Frauman AG, Sourial M, Casley DJ, Johnston CI, Fabiani ME (2001) Identification, distribution, and expression of angiotensin II receptors in the normal human prostate and benign prostatic hyperplasia. *Endocrinology* 142: 1349-1356
19. Kikkawa F, Mizuno M, Shibata K, Kajiyama H, Morita T, Ino K, Nomura S, Mizutani S (2004) Activation of invasiveness of cervical carcinoma cells by angiotensin II. *Am J Obstet Gynecol* 190: 1258-1263
20. Suganuma T, Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Nagasaka T, Mizutani S, Kikkawa F (2005) Functional expression of the angiotensin II type 1 receptor in human ovarian carcinoma cells and its blockade therapy resulting in suppression of tumor invasion, angiogenesis, and peritoneal dissemination. *Clin Cancer Res* 11: 2686-2694
21. De Paepe B, Verstraeten VL, De Potter CR, Vakaet LA, Bullock GR (2001) Growth stimulatory angiotensin II type-1 receptor is upregulated in breast hyperplasia and in situ carcinoma but not in invasive carcinoma. *Histochem Cell Biol* 116: 247-254
22. De Paepe B, Verstraeten VM, De Potter CR, Bullock GR (2002) Increased angiotensin II type-2 receptor density in hyperplasia, DCIS and invasive carcinoma of the breast is paralleled with increased iNOS expression. *Histochem Cell Biol* 117: 13-19
23. Uemura H, Hasumi H, Kawahara T, Sugiura S, Miyoshi Y, Nakaigawa N, Teranishi J, Noguchi K, Ishiguro H, Kubota Y (2005) Pilot study of angiotensin II receptor blocker in advanced hormone-refractory prostate cancer. *Int J Clin Oncol* 10: 405-410
24. Röcken C, Lendckel U, Dierkes J, Westphal S, Carl-McGrath S, Peter B, Krüger S, Malfertheiner P, Roessner A, Ebert MP (2005) The number of lymph node metastases in gastric cancer correlates with angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism. *Clin Cancer Res* 11: 2526-2530
25. Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM, Witteman JC (2006) ACE polymorphisms. *Circ Res* 12: 1123-1133
26. Freitas-Silva M, Pereira D, Bicho M, Lopes C, Medeiros R (2004) Angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and endometrial human cancer in normotensive and hypertensive women. *Cancer Genet Cytogenet* 155: 42-46
27. Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Lobo F, Morais A, Oliveira J, Lopes C (2004) Linkage of angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism to the progression of human prostate cancer. *J Pathol* 202: 330-335
28. Greco S, Muscella A, Elia MG, Salvatore P, Storelli C, Mazzotta A, Manca C, Marsigliante S (2003) Angiotensin II activates extracellular signal regulated kinases *via* protein kinase C and epidermal growth factor receptor in breast cancer cells. *J Cell Physiol* 196: 370-377
29. Senkel S, Lucas B, Klein-Hitpass L, Ryffel GU (2005) Identification of target genes of the transcription factor HNF1beta and HNF1alpha in a human embryonic kidney cell line. *Biochim Biophys Acta* 20: 179-190
30. Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, MacKinnon PL, Meredith PA, Murray LS, Reid JL, Robertson JW (1998) Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* 352: 179-184
31. Lindholm LH, Anderson H, Ekblom T, Hansson L, Lanke J, Dahlöf B, de Faire U, Forsén K, Hedner T, Linjer E, Scherstén B, Wester P, Möller T (2001) Relation between drug treatment and cancer in hypertensives in the Swedish trial in old patients with hypertension 2: a 5-year, prospective, randomised, controlled trial. *Lancet* 358: 539-544
32. Friis S, Sørensen HT, Mellempkjaer L, McLaughlin JK, Nielsen GL, Blot WJ, Olsen JH (2001) Angiotensin-converting enzyme inhibitors and the risk of cancer: a population-based cohort study in Denmark. *Cancer* 92: 2462-2470
33. Wolf G, Wenzel UO (2004) Angiotensin II and cell cycle regulation. *Hypertension* 43: 693-698
34. Paul MK, Mukhopadhyay AK (2004) Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *Int J Med Sci* 1: 101-115
35. Smith GR, Missailidis S (2004) Cancer, inflammation and the AT1 and AT2 receptors. *J Inflamm (Lond)* 1: 3
36. Kintscher U, Wakino S, Kim S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE (2001) Angiotensin II induces migration and Pyk2/paxillin phosphorylation of human monocytes. *Hypertension* 37: 587-593
37. El Bekay R, Alvarez M, Monteseirin J, Alba G, Chacon P, Vega A, Martin-Nieto J, Jimenez J, Pintado E, Bedoya FJ, Sobrino F (2003) Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF-kappaB. *Blood* 102: 662-671
38. Das UN (2005) Is angiotensin-II an endogenous pro-inflammatory molecule? *Med Sci Monit* 11: RA155-RA162
39. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E (2005) Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit* 11: RA194-RA205
40. Harrison DG, Cai H, Landmesser U, Griendling KK (2003) Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 4: 51-61
41. Sgambato A, Zannoni GF, Faraglia B, Camerini A, Tarquini E, Spada D, Cittadini A (2004) Decreased expression of the CDK inhibitor p27Kip1 and increased oxidative DNA damage in the multistep process of cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 92: 776-783
42. Ferrara N (1999) Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 56: 794-814
43. Richard DE, Vouret-Craviari V, Pouyssegur J (2001) Angiogenesis and G-protein-coupled receptors: signals that bridge the gap. *Oncogene* 20: 1556-1562
44. Richard DE, Berra E, Pouyssegur J (2000) Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275: 26765-26771

45. Egami K, Murohara T, Shimada T, Sasaki K, Shintani S, Sugaya T, Ishii M, Akagi T, Ikeda H, Matsuishi T, Imaizumi T (2003) Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest* 112: 67-75
46. Benndorf R, Boger RH, Ergun S, Steenpass A, Wieland T (2003) Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells. *Circ Res* 93: 438-447
47. Sica DA, Ichihara A (2006) The Renin Report. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 7: 247-251
48. Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, Fukui H (2004) Angiotensin-I converting enzyme inhibitors as potential anti-angiogenic agents for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 4: 555-567
49. Koh WP, Yuan JM, Van Den Berg D, Lee HP, Yu MC (2005) Polymorphisms in angiotensin II type 1 receptor and angiotensin I-converting enzyme genes and breast cancer risk among Chinese women in Singapore. *Carcinogenesis* 26: 459-464
50. Kosugi M, Miyajima A, Kikuchi E, Horiguchi Y, Murai M (2006) Angiotensin II type 1 receptor antagonist candesartan as an angiogenic inhibitor in a xenograft model of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 12: 2888-2893
51. Imai N, Hashimoto T, Kihara M, Yoshida S, Kawana I, Yazawa T, Kitamura H, Umemura S (2007) Roles for host and tumor angiotensin II type 1 receptor in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. *Lab Invest* 87: 189-198
52. Nanus DM (2003) Of peptides and peptidases: the role of cell surface peptidases in cancer. *Clin Cancer Res* 9: 6307-6309
53. Escobar E, Rodriguez-Reyna TS, Arrieta O, Sotelo J (2004) Angiotensin II, cell proliferation and angiogenesis regulator: biologic and therapeutic implications in cancer. *Curr Vasc Pharmacol* 2: 385-399

## The involvement of the renin-angiotensin system (RAS) in cancerogenesis

Kamila Domińska , Agnieszka Lachowicz-Ochędalska 

Department of Comparative Endocrinology, Medical University of Lodz, 3 Sterlinga St., 91-425 Lodz, Poland

 e-mail: kamila-107107@wp.pl

**Key words:** angiotensin II, AT1, AT2, RAS, cancerogenesis

### ABSTRACT

The family of angiotensin peptides was connected mainly with cardiovascular system and water-electrolytic balance. During the last decade it has been established that, apart from its classical actions, Ang II is involved in the regulation of cell growth, proliferation, cell migration, apoptosis, inflammation, differentiation, angiogenesis and gene expression, which suggests that this peptide might also play role in a cancer. This review focuses on the role of the RAS in tumors and present clinical potential of manipulating the angiotensin system as a novel and promising strategy for cancer treatment.

# Procesy transportu zwrotnego cholesterolu i ich rola w regresji miażdżycy

## STRESZCZENIE

Miażdżycy jest procesem dynamicznym, wykazującym, przynajmniej okresowo, tendencję do cofania się. Choć istnienie zjawiska regresji miażdżycy zostało udokumentowane zarówno na modelach zwierzęcych, jak i u ludzi, mechanizmy regresji są niezbyt dobrze poznane i często hipotetyczne. Regresja polega na zmniejszaniu wielkości płytki miażdżycowej poprzez usuwanie z niej lipidów drogą transportu zwrotnego cholesterolu i, być może, poprzez takie mechanizmy, jak: migracja makrofagów i komórek piankowatych z blaszki miażdżycowej, zahamowanie procesu zapalnego w ścianie tętnic, regeneracja śródbłonna. Artykuł przedstawia aktualne poglądy na temat regresji miażdżycy, zwłaszcza warunkującego ją procesu transportu zwrotnego cholesterolu.

## WPROWADZENIE

Zjawisko regresji miażdżycy wydaje się być niedoceniane przez współczesnych badaczy. W przeciwieństwie do mechanizmów tworzenia, regresja blaszki miażdżycowej nie jest przedmiotem intensywnych badań. Regresja zachodzi, gdy przewagę uzyskują mechanizmy prowadzące do usuwania elementów płytki miażdżycowej (cholesterolu, makrofagów, komórek piankowatych, limfocytów) i odnowienia śródbłonna.

„Pseudoregresja” może prowadzić do nieprawidłowej interpretacji obrazu angiograficznego. Może być ona rezultatem kilku procesów. Głównym jej mechanizmem jest poszerzenie tętnicy (łac. *ectasia*), innymi – relaksacja skurczu tętnicy, rozpuszczenie zakrzepu przyściennego lub obecnego w ścianie tętnicy. Poszerzenie tętnicy może być związane ze starzeniem się organizmu albo zjawiskiem kompensacji średnicy światła naczynia objętego miażdżycą [1]. Kompensacyjne poszerzenie światła tętnicy zachodzi zarówno we wczesnej blaszce miażdżycowej, jak i w zaawansowanej. W blaszce wczesnej polega na dodatniej przebudowie ściany naczynia i poszerzeniu tej części ściany tętnicy, która nie jest objęta miażdżycą. W blaszce zaawansowanej polega na ścięczeniu warstwy środkowej ściany tętnicy w części objętej miażdżycą [2].

Zjawisko regresji miażdżycy jest warunkowane przez transport zwrotny cholesterolu. Inne mechanizmy regresji są mniej poznane lub pozostają w sferze hipotez. Istnienie procesu regresji miażdżycy zostało udokumentowane w wielu badaniach na modelach zwierzęcych, w których indukowano rozwój miażdżycy poprzez bogatocholesterolową dietę lub metodami inżynierii genetycznej, np. przez usunięcie genu apoproteiny E [3], a następnie obserwowano ustępowanie zmian miażdżycowych pod wpływem zmian dietetycznych lub pod wpływem terapii, w tym genetycznych [3-5]. Doniesień o regresji miażdżycy u ludzi jest mniej. Najczęściej donoszono o niej w badaniach, w których agresywnie obniżano poziom cholesterolu we krwi, a regresję oceniano angiograficznie [6-11] lub za pomocą badania ultrasonograficznego [12,13]. Interesujące jest to, że progresja i regresja zmian miażdżycowych była obserwowana zarówno w grupach intensywnie leczonych, jak i w grupach kontrolnych [14]. Obecne strategie terapeutyczne w leczeniu miażdżycy polegają głównie na zmniejszeniu transportu cholesterolu do ściany tętnic poprzez obniżanie poziomu frakcji LDL (ang. *low density lipoprotein*, lipoproteina o niskiej gęstości) cholesterolu we krwi [15]. Jednakże, nawet przy znacznym obniżeniu poziomu LDL, śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych nadal pozostaje istotna [16]. Poznanie mechanizmów regresji miażdżycy daje nadzieję na nowe interwencje terapeutyczne, polegające na wzmacnianiu procesów usuwania elementów zmian miażdżycowych.

Angelika Chachaj✉

Katarzyna Drożdż

Andrzej Szuba

Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego Akademii Medycznej, Wrocław

Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego, Akademia Medyczna, ul. Pasteura 4, 50-367 Wrocław; tel. (071) 784 25 28, e-mail: angelika\_chachaj@wp.pl

Artykuł otrzymano 5 listopada 2007 r.  
Artykuł zaakceptowano 26 lutego 2008 r.

**Słowa kluczowe:** regresja miażdżycy, transport zwrotny cholesterolu, apoproteina

**Wykaz skrótów:** ABCA1 (ang. *ATP binding cassette transporter A1*) – białowe białko transportujące; apo (A-I, apoA-I<sub>M</sub>, A-II, A-IV, B, E) – apoproteina (A-I, A-I Milano, A-II, A-IV, B, E); CETP (ang. *cholesterol ester transfer protein*) – białko osocza transportujące estry cholesterolu; HDL (ang. *high density lipoprotein*) – lipoproteina o wysokiej gęstości; LDL (ang. *low density lipoprotein*) – lipoproteina o niskiej gęstości; VLDL (ang. *very low density lipoprotein*) – lipoproteina o bardzo niskiej gęstości

## MORFOLOGIA BLASZEK MIAŻDŻYCOWYCH ULEGAJĄCYCH REGRESJI

Płytką miażdżycowa ma gładką powierzchnię, wyraźne odgraniczenie oraz wklęsły środek w stosunku do brzegu; zmiany są uważane za histologiczne cechy regresji [17]. Innymi cechami regresji są: zmniejszenie ilości cholesterolu w ścianie tętnicy, zarówno poza-, jak i wewnątrzkomórkowego, zmniejszenie liczby komórek piankowatych oraz zwiększenie ilości komórek mięśni gładkich i włókien kolagenowych typu IV [18]. Wykazano, że procesy regresji zachodzą w każdym stadium zaawansowania miażdżycy. We wczesnej blaszce miażdżycowej regresja prowadzi do całkowitego jej ustąpienia. W blaszce zaawansowanej, w niewielkim stopniu ulegającej resorpcji, wyrazem regresji jest zwiększony poziom kolagenu typu IV w obrębie zmiany oraz odnowienie komórek śródbłonna na jej powierzchni [19].

## TRANSPORT ZWROTNY CHOLESTEROLU

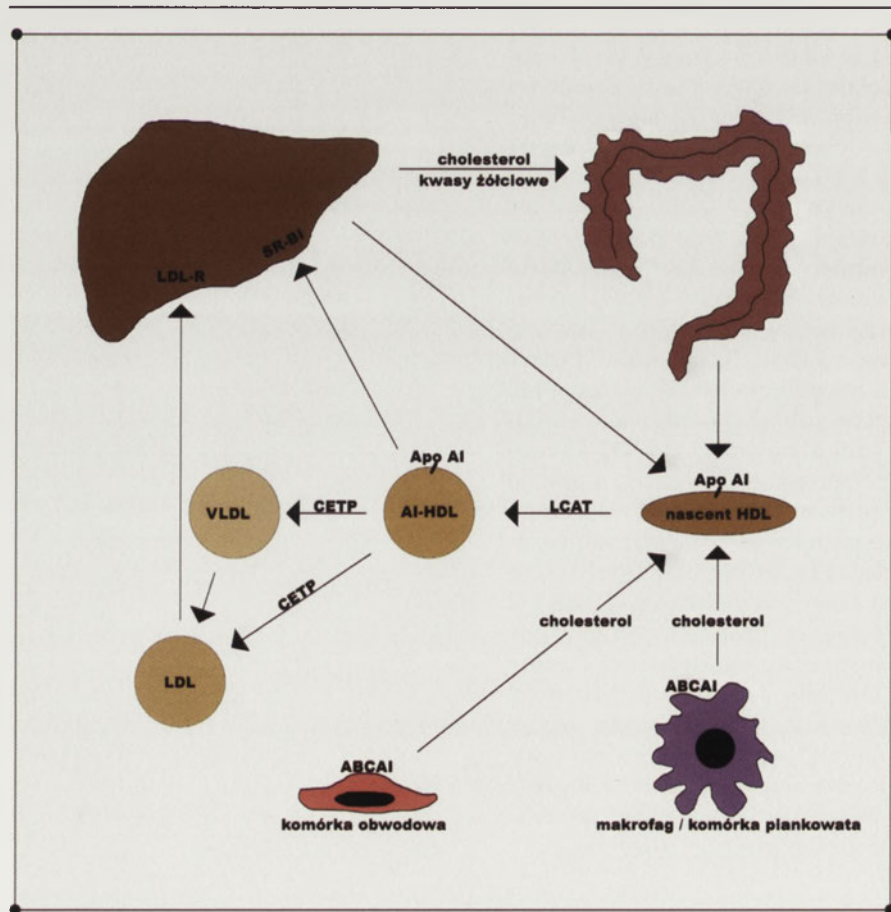
Cholesterol syntetyzowany lub gromadzony w tkankach obwodowych jest z nich usuwany w procesie tzw. transportu zwrotnego cholesterolu. Polega on na przekazywaniu cholesterolu z błon komórkowych na akceptory cholesterolu obecne w przestrzeni pozakomórkowej, a następnie, drogą naczyń chłonnych i krwionośnych, doprowadzeniu go do wątroby i wydzieleniu do żółci (Ryc. 1).

Głównym akceptorem cholesterolu w przestrzeni pozakomórkowej jest apoproteina A-I (apoA-I), wolna, bądź

stanowiąca część HDL (ang. *high density lipoprotein*, lipoproteina o wysokiej gęstości). Znaczenie mają również apoproteina A-II (apoA-II), apoA-IV oraz apoproteina E (apoE) [20,21]. Apoproteiny obecne w przestrzeni pozakomórkowej pochodzą z osocza, przy czym apoE w blaszce miażdżycowej częściowo jest syntetyzowana *de novo* przez makrofagi i komórki piankowate [20,21].

HDL, syntetyzowana w wątrobie i jelicie i wydzielana w formie dyskoidalnej, nazywanej „nascent HDL”, zawiera jedynie fosfolipidy i apoA-I. Nascent HDL wnika z osocza do ściany tętnicy i łączy się z nowymi cząsteczkami cholesterolu z komórek na drodze trzech mechanizmów: w następstwie oddziaływań zawartych w HDL fosfolipidów z receptorem scavenger B1 (SR-B1) na błonie komórkowej [22], na drodze dyfuzji biernej lub transportu biernego. Cholesterol i fosfolipidy są również przekazywane wolnym apoproteinom, przede wszystkim apoA-I, ale również apoE.

ApoA-I jest syntetyzowana i wydzielana przez komórki jelita i wątroby. W osoczu wolna od cholesterolu apoA-I może być uwalniana z cząsteczki HDL przez białko osocze transportujące estry cholesterolu CETP (ang. *cholesterol ester transfer protein*), w trakcie przekazywania przez CETP cholesterolu z HDL do lipoprotein zawierających apolipoproteinę B (apoB), takich jak LDL i VLDL (ang. *very low density lipoprotein*, lipoproteina o bardzo niskiej gęstości) [23]. Dzięki małemu rozmiarowi cząsteczki wolna apoA-I wchodzi do przestrzeni podśródbłonkowej ściany tętnicy, a następnie, łącząc się z fosfolipidami błony komórkowej i tworząc kompleks białko-fosfolipidy, łączy się z cholesterolem [24] i staje się częścią cząsteczki nascent HDL [25]. Proces przekazywania cholesterolu z błony komórkowej na apoA-I zachodzi za pomocą aktywnego transportu z udziałem błonowego białka transportującego ABCA1 (ang. *ATP binding cassette transporter A1*), przy czym dla aktywności ABCA1 obecność apoA-I jest obligatoryjna [22,26]. Opisano również łączenie się wolnych cząsteczek apoA-I z fosfolipidami i wolnym cholesterolem w procesie zwanym mikrosolubilizacją [27]. Przekazywanie cholesterolu z udziałem błonowego białka transportującego ABCA1 jest najprawdopodobniej główną drogą usuwania cholesterolu z makrofagów [26,28]. Wykazano także, że wolna apoA-I usuwa cholesterol z makrofagów efektywniej niż cząsteczka HDL [24,29].



Rycina 1. Schemat procesu transportu zwrotnego cholesterolu.

Z przestrzeni pozakomórkowej cholesterol drogą chłonki dostaje się do krwi. Wolny cholesterol w nascent HDL jest estryfikowany przez obecną w osoczu acylotransferazę lecytynowo-cholesterolową (LCAT, ang. *lecithin:cholesterol acyltransferase*), która jest aktywowana przez apoA-I. Prowadzi to do przejścia hydrofobowych estrów do rdzenia cząsteczki HDL, co przekształca tym samym

dyskoidalną nascent HDL w sferyczną, dojrzałą AI-HDL [30]. Estry cholesterolu z HDL są następnie usuwane przez wątrobę z udziałem receptora scavenger klasy B typu 1 (SR-BI) na komórkach wątroby, będącego receptorem dla HDL, lub też są przekazywane przez CETP do LDL i VLDL, a następnie usuwane przez wątrobę z udziałem wątrobowego receptora dla LDL. W wątrobie cholesterol jest wydzielany do krwi jako element nowo syntetyzowanych lipoprotein, albo jest usuwany do żółci jako wolny cholesterol lub kwas żółciowy [30].

## **ROLA MAKROFAGÓW W TRANSPORCIE ZWROTNYM CHOLESTEROLU**

Makrofagowy transport zwrotny cholesterolu (ang. *macrophage cholesterol efflux*) [26] dotyczy przede wszystkim tych płytek miażdżycowych, do których dotarcie lipoprotein jest utrudnione. Cholesterol jest usuwany z makrofagów i z komórek piankowatych z udziałem białka ABCA1 i przekazywany na apoA-I. Proces usuwania cholesterolu z makrofagów i komórek piankowatych może zachodzić również, choć w mniejszym stopniu, przy braku obecności osoczowego akceptora [31]. Odbywa się to dzięki apoE, syntetyzowanej przez makrofagi i komórki piankowate. ApoE łączy się z cholesterolem pozakomórkowym lub cholesterolem błony komórkowej makrofaga i transportuje go do wątroby [32]. Ponieważ ilość apoE oraz innych apoprotein w płytce miażdżycowej jest ograniczona, pozostała część cholesterolu jest usuwana i gromadzona w postaci wielowarstwowych lipidowych liposomów i pęcherzykowatych lipoprotein, posiadających białko wielkości 22,000 Da. Rola tych cząsteczek w procesie aterogenezy nie została jednak jeszcze dokładnie określona [31,32].

## **REGULACJA TRANSPORTU ZWROTNEGO CHOLESTEROLU**

Na modelach zwierzęcych wielokrotnie wykazano, że rozwój miażdżycy wiąże się z niskim poziomem lub zmniejszoną aktywnością wielu molekuł biorących udział w procesie usuwania cholesterolu z komórek. Jak dotąd jednak bardzo mało wiadomo o regulacji tego procesu.

### **ZNACZENIE HDL**

W procesie transportu zwrotnego cholesterolu szczególne znaczenie nadano frakcji HDL. Na modelu zwierzęcym wykazano, że iniekcje HDL nie tylko hamują progresję miażdżycy, ale również prowadzą do jej regresji [33]. Jednakże, w badaniach, w których starano się określić wskaźnik nasilenia transportu zwrotnego cholesterolu, stwierdzono, że poziom frakcji HDL cholesterolu nie wpływa na nasilenie tego procesu [34]. Coraz większe znaczenie dla przeciwmiażdżycowego działania HDL przypisuje się innym, tzw. pozalipidowym, właściwościom tej lipoproteiny [30].

### **ZNACZENIE APOA-I**

Transport zwrotny cholesterolu jest również warunkowany przez apoA-I. W genetycznie wrodzonym defekcie apoA-I stwierdza się niskie poziomy HDL oraz wcześniej rozwijającą się i szybko postępującą miażdżycę [35]. Bada-

nia nad transgenicznymi myszami i królikami dowiodły, że nadekspresja genu kodującego apoA-I przeciwdziała powstawaniu płytki miażdżycowej, a w rozwiniętej miażdżycy prowadzi do zahamowania jej progresji. Dożylna iniekcja apoA-I lub somatyczny transfer genów apoA-I do wątroby, jelita czy mięśni zwierząt powodowały regresję istniejących zmian miażdżycowych [4]. Jednakże, chociaż iniekcja apoA-I wpływa na pierwszy etap transportu zwrotnego cholesterolu i zmniejsza ilość cholesterolu w komórkach piankowatych, a tym samym powoduje usuwanie cholesterolu z płytek miażdżycowych [26], nie można zapominać, że proces ten nie dotyczy jedynie komórek piankowatych w ścianach tętnic. Problem ten unaoczniono w związku z badaniem, w którym oceniano wpływ iniekcji kompleksu apoA-I z fosfolipidami na ostatni etap transportu zwrotnego cholesterolu, tzn. na zwiększenie wydalania cholesterolu do żółci. Badanie wykazało, że po podaniu apoA-I z fosfolipidami, w porównaniu do dużego wzrostu wydalania steroli do żółci, poziom frakcji HDL (który świadczy o zwiększonym usuwaniu cholesterolu z komórek), wprawdzie zwiększył się, ale nieznacznie. Fakt przekazywania cholesterolu z HDL na LDL/VLDL z udziałem CETP, a następnie oddawanie cholesterolu w wątrobie po połączeniu LDL z receptorem dla LDL, mogłyby tłumaczyć wzrost wydalania steroli do żółci bez towarzyszącego wysokiego wzrostu poziomu HDL. Jednakże stwierdzono, że iniekcja wzbogaconej w cholesterol frakcji LDL+HDL powoduje zwiększenie magazynowania w wątrobie estrów cholesterolu oraz wzrost wydzielania przez wątrobę VLDL, a nie wzrost wydzielania cholesterolu do żółci [36]. Wysunięto przypuszczenie, że podanie apoA-I spowodowało zwiększenie usuwania cholesterolu ze wszystkich komórek, również z wątroby. W większości komórek nie występuje nagromadzenie estrów cholesterolu, więc zwiększone oddawanie cholesterolu apoA-I mogłoby skutkować zwiększoną syntezą cholesterolu w komórkach, również w wątrobie, i to mogło spowodować zwiększenie wydalania cholesterolu do żółci [37,38].

W transporcie zwrotnym cholesterolu jeszcze silniejsze działanie niż apoA-I ma jej naturalnie występujący wariant – apolipoproteina A-I Milano (apoA-I<sub>M</sub>). W wariacie tym występuje zamiana jednej reszty aminokwasowej (argininy na cysteinę), co powoduje, że apoA-I<sub>M</sub> tworzy homodimery (apoA-I<sub>M</sub>/apoA-I<sub>M</sub>) lub heterodimery z apoproteina-II (apoA-I<sub>M</sub>/apo-II). Wykazano, że chociaż u osób z wariantem apoA-I<sub>M</sub> stwierdza się niskie poziomy HDL i wysoki poziom trójglicerydów, ryzyko rozwoju miażdżycy jest mniejsze. Na modelu zwierzęcym oraz u ludzi wykazano również, że iniekcje apoA-I<sub>M</sub> powodują regresję zmian miażdżycowych [39].

### **ZNACZENIE CETP**

Znaczenie CETP w transporcie zwrotnym cholesterolu i ochronie przed miażdżycą jest niejasne. Z uwagi na wysoki poziom HDL u osób z deficytem CETP duże nadzieje zaczęto wiązać z inhibitorami CETP, jako lekami powodującymi regresję miażdżycy [40]. Jednakże, w badaniach oceniających efektywność torcetrapibu, inhibitora CETP (trzy perspektywne, randomizowane badania kliniczne: RADIANCE, RADIANCE 2 oraz ILLUMINATE) nie wykazano cofania się zmian miażdżycowych pod wpływem leku, pomimo

znacznego zwiększenia przez niego poziomu HDL i, w mniejszym stopniu, obniżenia poziomu LDL. W badaniach tych stwierdzono również, że torcetrapib powoduje istotne podwyższenie wartości ciśnienia tętniczego oraz zwiększoną śmiertelność z powodu zdarzeń sercowo-naczyniowych. To spowodowało, że dalsze badania nad torcetrapibem zostały wstrzymane [41-43]

#### STAN METABOLICZNY ORGANIZMU

Transport zwrotny cholesterolu jest w dużym stopniu warunkowany ogólnym stanem organizmu. Zarówno ilość poszczególnych lipoprotein, jak i stosunek apoprotein tworzonych *de novo* przez komórki i wydzielanych do przestrzeni pozakomórkowej do apoprotein pochodzących z osocza nie są stałe i zmieniają się zależnie od stanu metabolicznego organizmu [44,45]. Stosowanie diety niskokalorycznej wydaje się „przestawiać” metabolizm na taki, który zwiększa transport cholesterolu z komórek do wątroby [46]. Podobny wpływ na metabolizm ma wysiłek fizyczny [47]. Natomiast dieta z ograniczeniem spożywania tłuszczów zwierzęcych, jeżeli nie wiąże się jednocześnie z ograniczeniem kalorycznym, wydaje się nie mieć znaczenia, gdyż wątroba i tak syntetyzuje trzy do pięciu razy więcej cholesterolu niż ilość dostarczana do organizmu z pożywieniem. Co więcej, produkcja cholesterolu zwiększa się podczas ograniczenia podaży cholesterolu w diecie. To wyjaśnia, dlaczego dieta uboga w cholesterol (jeżeli jednocześnie nie jest niskokaloryczna) obniża poziom cholesterolu o nie więcej niż kilka procent [48].

#### NASILENIE PROCESU ZAPALNEGO

Na natężenie procesu usuwania cholesterolu ze zmiany miażdżycowej wpływa również nasilenie procesu zapalnego w jej obrębie. Wykazano np., że wydzielany w procesie zapalnym interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) zmniejsza ekspresję genu białka transportującego ABCA1 [49], zmniejszając tym samym usuwanie cholesterolu z makrofagów. Wykazano również, że proces zapalny w obrębie blaszki miażdżycowej aktywuje w niej metaloproteinazy, które wiążą i rozkładają apoproteiny apoA-I [50] i apoE [51]. To tłumaczy dużą ilość apoprotein w obrębie blaszki miażdżycowej. Zmniejszenie syntezy aktywności metaloproteinaz umożliwi swobodniejsze wychodzenie apoprotein ze ściany tętnic, a tym samym efektywniejsze usuwanie cholesterolu z komórek [3].

#### MIGRACJA MAKROFAGÓW Z PŁYTEK MIAŻDŻYCOWYCH

W blaszkach miażdżycowych ulegających regresji zmniejsza się nie tylko ilość lipidów, ale również komórek piankowatych. Komórki piankowe opuszczają ścianę naczynia i wędrują naczyniami chłonnymi do węzłów chłonnych [52-54], usuwając przy tym cholesterol z komórek i przekazując go na HDL [55]. Na modelu ściany naczyniowej *in vivo* oraz *in vitro* stwierdzono, że kwas lizofosfatydowy (ang. *lysophosphatidic acid*) oraz czynnik aktywujący płytki (PAF, ang. *platelet-activating factor*), których duże ilości stwierdza się w płytce miażdżycowej, blokują przekształcenie monocytów w komórki migracyjne, sprzyjając ich pozostawianiu podśródbłonkowemu, a tym samym sprzyjają progresji

sji miażdżycy [53]. Badania *in vivo* wykazały, że migracja makrofagów z płytek miażdżycowych wiąże się z regresją miażdżycy, natomiast jej ograniczenie nasila proces miażdżycowy [53,54]. Interwencje, których celem byłoby zwiększenie migracji makrofagów ze ściany tętnicy, mogłyby stać się nowymi narzędziami terapeutycznymi w leczeniu miażdżycy. W zaawansowanej blaszce miażdżycowej makrofagi fagocytują nie tylko zmodyfikowane LDL, ale również elementy ściany komórkowej. Wędrując do węzłów chłonnych [55], prezentują antygeny płytki miażdżycowej limfocytom B [56]. Aktywacja komórek odpornościowych wobec blaszki miażdżycowej teoretycznie może prowadzić do zmniejszenia zmiany miażdżycowej, ale, z drugiej strony, nasilona, może prowadzić do wytworzenia tętniaka tętnicy [57].

Migracja makrofagów oraz transport z płytek miażdżycowych lipoprotein bogatych w cholesterol może odbywać się drogą naczyń chłonnych przydanki [21]. Wzrost gęstości naczyń limfatycznych zaopatrujących ścianę tętnic może wiązać się ze wzrostem transportu cholesterolu ze ściany naczyń. Stąd hipoteza, że im większa liczba naczyń limfatycznych w ścianie tętnicy, a przez to efektywniej zachodzące procesy „oczyszczania”, tym większa ochrona przed rozwojem miażdżycy. Przypuszcza się, że przyspieszona miażdżycy tętnic wieńcowych po allogenicnej transplantacji serca wynika nie tylko z reakcji układu immunologicznego biorcy w stosunku do ściany tętnic dawcy, ale również z upośledzenia drenażu limfatycznego tych naczyń. Co więcej, tak często występująca miażdżycy naczyń wieńcowych u człowieka może wynikać z genetycznie nieadekwatnie rozwiniętego układu limfatycznego nasierdza oraz z pionizacji i wiążącego się z nią czynnika grawitacyjnego, upośledzającego odpływ limfy z serca. Analogicznie, fakt rzadko występującej miażdżycy w obrębie tętnicy piersiowej wewnętrznej tłumaczy się bliskością splotu limfatycznego [58]. Z drugiej strony, rozwój miażdżycy może stymulować limfangiogenezę w obrębie ściany tętnic (badania własne). Pozostaje nierozwiązaną kwestia, czy zachodzący w ścianie tętnicy objętej procesem miażdżycowym proces limfangiogenezy jest czynnikiem sprzyjającym regresji.

#### STRATEGIA WIELOCZYNNIKOWEGO WZMACNIANIA MECHANIZMÓW REGRESJI MIAŻDŻYCY

Płytki miażdżycowe nie są prostym nagromadzeniem lipidów i komórek piankowatych w ścianie tętnicy. Proces miażdżycowy jest przewlekłym procesem zapalnym, w którym utrata funkcji śródbłonna, proliferacja komórek mięśni gładkich, aktywacja komórek odpornościowych, procesy angiogenezy i limfangiogenezy odgrywają równie ważną rolę w patogenezie choroby. Właściwości przeciwmiażdżycowe HDL oraz apoE wynikają z wpływu tych cząsteczek na wiele ogniw patogenetycznych miażdżycy.

Wykazano, że oprócz udziału HDL w transporcie zwrotnym cholesterolu, działanie przeciwmiażdżycowe tej lipoproteiny dotyczy również wszystkich etapów powstawania i rozwoju blaszki miażdżycowej. Różne składniki cząsteczki HDL, tj.: apoproteiny, enzymy, fosfolipidy, wykazują właściwości przeciwtleniające, przeciwzapalne, przeciwagregacyjne, przeciwkrzepliwie, profibrynolityczne, hamujące apoptozę oraz chroniące śródbłonek [30,59]. Ochronę ściany



tętnic przez apoE początkowo wiązano jedynie z jej wpływem na zwiększenie usuwania wysoce aterogennych remnantów lipoprotein przez wątrobę i w końcowym efekcie – obniżeniu poziomu lipidów we krwi [60]. Działanie przeciwmiażdżycowe apoE wynika jednak również z jej udziału w początkowym etapie transportu zwrotnego cholesterolu, z właściwości przeciwutleniających oraz przeciwzapalnych. Wykazano ponadto, że apoE hamuje proliferację limfocytów T oraz komórek mięśni gładkich naczyń, których udział w progresji miażdżycy został dobrze udokumentowany [32,61]. Myszy pozbawione możliwości syntezy apoE rozwijają ciężką miażdżycę tętnic, a podanie takim myszom apoE, bądź genetyczny transfer genu dla apoE, wywołuje regresję istniejących już, zaawansowanych zmian [3,5].

Aktywność przeciwmiażdżycowa statyn również wynika z ich wielokierunkowego działania. Po pierwsze, intensywne obniżanie poziomu cholesterolu we krwi sprzyja regresji blaszek miażdżycowych. Ponadto, z uwagi na to, że statyny zmniejszają syntezę kwasu miewalonowego, obniżają we krwi poziom nie tylko produktu końcowego – cholesterolu, ale również powstających w pośredniej syntezie izoprenoidów, które regulują wiele sygnalizacyjnych szlaków w komórce, m.in. tych, które decydują o podziale i aktywności komórek. Dzięki temu statyny normalizują funkcję śródbłonna, m.in. przez zwiększenie syntezy i zmniejszenie degradacji NO, zmniejszenie proliferacji komórek mięśni gładkich, aktywności płytek krwi oraz działanie przeciwzapalne [62,63].

Duże nadzieje na efektywniejsze leczenie miażdżycy budzą badania nad receptorami jądrowymi PPAR (ang. *peroxisome proliferator activator receptor*), które regulują w organizmie metabolizm glukozy i lipidów, cykl komórkowy i procesy zapalne. Każdy z trzech rodzajów tych receptorów: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  i PPAR $\delta$ , wydaje się być ważny jako potencjalny cel terapeutyczny leczenia miażdżycy. Jednak w chwili obecnej największe nadzieje terapeutyczne wiąże się z receptorami PPAR $\gamma$ , których aktywacja powoduje zwiększenie wrażliwości komórek obwodowych na insulinę, a tym samym zmniejsza powikłania cukrzycy t.2 i nietolerancji glukozy oraz obniża ciśnienie tętnicze [64]. Agonistami PPAR $\gamma$  są, stosowane w leczeniu cukrzycy, tiazolidinediyny (TZD). Wykazano, że pobudzenie receptorów PPAR $\gamma$  wiąże się z zahamowaniem wzrostu i migracji komórek śródbłonna, mięśni gładkich i monocytów/makrofagów w ścianie tętnicy, co wiąże się z działaniem przeciwmiażdżycowym [65]. Oprócz tego, w badaniach na zwierzętach wykazano, że agoniści receptorów PPAR $\gamma$  wykazują również wiele innych właściwości kluczowych dla zahamowania procesu aterogenezy. PPAR $\gamma$  zmniejszają syntezę czynnika wzrostu śródbłonna (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*), co prowadzi do zahamowania procesu angiogenezy [66]. Nie tylko zmniejszają migrację monocytów do ściany tętnicy, ale również zmniejszają syntezę czynników adhezyjnych VCAM, co zmniejsza przyleganie monocytów do śródbłonna [67]. Zmniejszają wydzielanie przez makrofagi interleukiny (IL)-1, IL-6, czynnika martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), co zmniejsza nasilenie procesów zapalnych w płytce miażdżycowej [68]. Zwiększają na powierzchni makrofagów i komórek piankowatych poziom receptora CD36, co prowadzi do zwiększenia fago-

cytowania utlenionej LDL [69]. Aktywują jądrowy receptor LXR $\alpha$ , co zwiększa aktywność ABCA1 na błonie komórkowej makrofagów, prowadząc tym samym do nasilenia procesu transportu zwrotnego cholesterolu [70]. Właściwości agonistów PPAR powodują, że agoniści tych receptorów mogą stać się ważnymi lekami w leczeniu miażdżycy, nie tylko u pacjentów z zespołem metabolicznym i cukrzycą. Potrzebne są jednak dalsze badania tych receptorów, również dotyczące efektów niepożądanych ich aktywacji.

## INDYWIDUALIZACJA LECZENIA MIAŻDŻYCY

Strategia stosowania leków przeciwmiażdżycowych działających plejotropowo, wiążąca się z występowaniem wielu działań niepożądanych, w dużej mierze wynika ze słabego poznania mechanizmów powstawania i regresji miażdżycy. Ilość lipidów w ścianie tętnicy jest warunkowana przewagą wnikania lipidów do ściany, bądź przewagą ich z niej usuwania. Koncepcja wzmacniania procesu transportu zwrotnego cholesterolu, a tym samym zmniejszenia ilości cholesterolu w płytkach miażdżycowych, stanowi atrakcyjną strategię terapeutyczną w leczeniu miażdżycy.

Nadzieję budzą również badania nad uwarunkowaniem genetycznym miażdżycy. Jak dotąd podłoże genetyczne miażdżycy zostało poznane w niewielkim zakresie. Spowodowane jest to trudnością w identyfikacji dużej liczby genów warunkujących tę chorobę [71]. Molekularne metody pozwalają obecnie zidentyfikować geny odpowiedzialne za występowanie miażdżycy uwarunkowanej mutacjami rzadko wstępującymi, dziedziczonymi według praw Mendla (m.in. rodzinnej hipercholesterolaemii, choroby Tangierskiej, hiperhomocysteinemii). Prowadzone są jednak badania na modelach zwierzęcych, które pozwalają określać mutacje genetyczne prowadzące do chorób uwarunkowanych wielogenowo [72,73]. Stanowią one wstęp do badań nad genomem człowieka, którego poznanie dałoby możliwość stosowania indywidualizowanej i celowanej terapii, zapobiegającej tworzeniu płytek miażdżycowych, a w rozwiniętej chorobie – stymulowania procesu regresji miażdżycy.

## PIŚMIENNICTWO

1. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Cayatte AJ, Mowery J (1992) Atherosclerosis. Potential targets for stabilization and regression. *Circulation* 86 (6 Suppl.): III117-123
2. de Feyter PJ, Serruys PW, Davies MJ, Richardson P, Lubsen J, Oliver MF (1991) Quantitative coronary angiography to measure progression and regression of coronary atherosclerosis. Value, limitations, and implications for clinical trials. *Circulation* 84: 412-423
3. Desurmont C, Caillaud JM, Emmanuel F, Benoit P, Fruchart JC, Castro G, Branellec D, Heard JM, Duverger N (2000) Complete atherosclerosis regression after human ApoE gene transfer in ApoE-deficient/nude mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 435-442
4. Miyazaki A, Sakuma S, Morikawa W, Takiue T, Miake F, Terano T, Sakai M, Hakamata H, Sakamoto Y, Natio M, et al. (1995) Intravenous injection of rabbit apolipoprotein A-I inhibits the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1882-1888
5. Tangirala RK, Pratico D, FitzGerald GA, Chun S, Tsukamoto K, Maugeais C, Usher DC, Pure E, Rader DJ (2001) Reduction of isoprostanes and regression of advanced atherosclerosis by apolipoprotein E. *J Biol Chem* 276: 261-266
6. Brown G, Albers JJ, Fisher LD, Schaefer SM, Lin JT, Kaplan C, Zhao XQ, Bisson BD, Fitzpatrick VF, Dodge HT (1990) Regression of coro-

- nary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N Engl J Med* 323: 1289-1298
7. Brown BG, Zhao XQ, Sacco DE, Albers JJ (1993) Lipid lowering and plaque regression. New insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation* 87: 1781-1791
  8. Ormiston JA, Stewart FM, Roche AH, Webber BJ, Whitlock RM, Webster MW (1997) Late regression of the dilated site after coronary angioplasty: a 5-year quantitative angiographic study. *Circulation* 96: 468-474
  9. de Feyter PJ, Vos J, Deckers JW (1995) Progression and regression of the atherosclerotic plaque. *Eur Heart J* 16 Suppl I: 26-30
  10. Erikson U, Helmius G, Hemmingsson A, Ruhn G, Olsson AG (1988) Repeat femoral arteriography in hyperlipidemic patients. A study of progression and regression of atherosclerosis. *Acta Radiol* 29: 303-309
  11. Oliver MF (1992) Coronary atheroma regression trials. MAAS Steering Committee. *Lancet* 339: 1241; author reply 1242
  12. Byington RP, Evans GW, Espeland MA, Applegate WB, Hunninghake DB, Probstfield J, Furberg CD (1999) Effects of lovastatin and warfarin on early carotid atherosclerosis: sex-specific analyses. Asymptomatic Carotid Artery Progression Study (ACAPS) Research Group. *Circulation* 100: e14-17
  13. Byington RP, Furberg CD, Crouse JR, 3rd, Espeland MA, Bond MG (1995) Pravastatin, Lipids, and Atherosclerosis in the Carotid Arteries (PLAC-II). *Am J Cardiol* 76: 54C-59C
  14. Blankenhorn DH, Hodis HN (1993) Atherosclerosis—reversal with therapy. *West J Med* 159: 172-179
  15. (2001) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III) *Jama* 285: 2486-2497
  16. Libby P (2005) The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction. *J Am Coll Cardiol* 46: 1225-1228
  17. Ohni S, Oinuma T, Yamada T, Sakurai I, Matsumoto T, Ueno T, Saito E, Fujioka T, Tochihiro T (1996) Atherosclerosis regression in the elderly — correlation between centrally depressed lesions and risk factors. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 33: 923-927
  18. Oinuma T, Ohni S, Yamada T, Takashi K, Sakurai I, Matsumoto T, Ueno T, Saito E, Fujioka T, Tochihiro T (1997) [Regression of atherosclerosis and centrally depressed lesions in rabbit aortas]. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 34: 555-559
  19. Kakiuchi H, Oinuma T, Yamada T (1995) Study of atherosclerosis regression in the elderly -central depression and its correlation to ulcerated plaques. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 32: 503-510
  20. Sloop CH, Dory L, Roheim PS (1987) Interstitial fluid lipoproteins. *J Lipid Res* 28: 225-237
  21. Nanjee MN, Cooke CJ, Wong JS, Hamilton RL, Olszewski WL, Miller NE (2001) Composition and ultrastructure of size subclasses of normal human peripheral lymph lipoproteins: quantification of cholesterol uptake by HDL in tissue fluids. *J Lipid Res* 42: 639-648
  22. Oram JF (2003) HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 720-727
  23. Liang HQ, Rye KA, Barter PJ (1994) Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *J Lipid Res* 35: 1187-1199
  24. Yancey PG, Bielicki JK, Johnson WJ, Lund-Katz S, Palgunachari MN, Anantharamaiah GM, Segrest JP, Phillips MC, Rothblat GH (1995) Efflux of cellular cholesterol and phospholipid to lipid-free apolipoproteins and class A amphipathic peptides. *Biochemistry* 34: 7955-7965
  25. Forte TM, Goth-Goldstein R, Nordhausen RW, McCall MR (1993) Apolipoprotein A-I-cell membrane interaction: extracellular assembly of heterogeneous nascent HDL particles. *J Lipid Res* 34: 317-324
  26. Tall AR, Wang N, Mucksavage P (2001) Is it time to modify the reverse cholesterol transport model? *J Clin Invest* 108: 1273-1275
  27. Chroni A, Liu T, Gorshkova I, Kan HY, Uehara Y, Von Eckardstein A, Zannis VI (2003) The central helices of ApoA-I can promote ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated lipid efflux. Amino acid residues 220-231 of the wild-type ApoA-I are required for lipid efflux *in vitro* and high density lipoprotein formation *in vivo*. *J Biol Chem* 278: 6719-6730
  28. Vaughan AM, Oram JF (2003) ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions. *J Lipid Res* 44: 1373-1380
  29. Tangirala RK, Tsukamoto K, Chun SH, Usher D, Pure E, Rader DJ (1999) Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice. *Circulation* 100: 1816-1822
  30. Skoczynska A (2006) *Patogeneza miażdżycy*, Elsevier Urban & Partner, Wrocław
  31. Kruth HS, Skarlatos SI, Gaynor PM, Gamble W (1994) Production of cholesterol-enriched nascent high density lipoproteins by human monocyte-derived macrophages is a mechanism that contributes to macrophage cholesterol efflux. *J Biol Chem* 269: 24511-24518
  32. Zhang WY, Gaynor PM, Kruth HS (1996) Apolipoprotein E produced by human monocyte-derived macrophages mediates cholesterol efflux that occurs in the absence of added cholesterol acceptors. *J Biol Chem* 271: 28641-28646
  33. Badimon JJ, Badimon L, Fuster V (1990) Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest* 85: 1234-1241
  34. Woollett LA, Kearney DM, Spady DK (1997) Diet modification alters plasma HDL cholesterol concentrations but not the transport of HDL cholesteryl esters to the liver in the hamster. *J Lipid Res* 38: 2289-2302
  35. Matsunaga T, Hiasa Y, Yanagi H, Maeda T, Hattori N, Yamakawa K, Yamanouchi Y, Tanaka I, Obara T, Hamaguchi H (1991) Apolipoprotein A-I deficiency due to a codon 84 nonsense mutation of the apolipoprotein A-I gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2793-2797
  36. Stone BG, Schreiber D, Alleman LD, Ho CY (1987) Hepatic metabolism and secretion of a cholesterol-enriched lipoprotein fraction. *J Lipid Res* 28: 162-172
  37. Eriksson M, Carlson LA, Miettinen TA, Angelin B (1999) Stimulation of fecal steroid excretion after infusion of recombinant proapolipoprotein A-I. Potential reverse cholesterol transport in humans. *Circulation* 100: 594-598
  38. Spady DK (1999) Reverse cholesterol transport and atherosclerosis regression. *Circulation* 100: 576-578
  39. Calabresi L, Sirtori CR, Paoletti R, Franceschini G (2006) Recombinant apolipoprotein A-I-Milano for the treatment of cardiovascular diseases. *Curr Atheroscler Rep* 8: 163-167
  40. Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, Maruhami Y, Mabuchi H, Tall AR (1990) Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med* 323: 1234-1238
  41. Kastelein JJ, van Leuven SI, Evans GW, Riley WA, Revkin JH, Shear CL, Bots ML (2007) Designs of RADIANCE 1 and 2: carotid ultrasound studies comparing the effects of torcetrapib/atorvastatin with atorvastatin alone on atherosclerosis. *Curr Med Res Opin* 23: 885-894
  42. Bots ML, Visseren FL, Evans GW, Riley WA, Revkin JH, Tegeler CH, Shear CL, Duggan WT, Vicari RM, Grobbee DE, Kastelein JJ (2007) Torcetrapib and carotid intima-media thickness in mixed dyslipidemia (RADIANCE 2 study): a randomised, double-blind trial. *Lancet* 370: 153-160
  43. Nissen SE, Tardif JC, Nicholls SJ, Revkin JH, Shear CL, Duggan WT, Ruzyllo W, Bachinsky WB, Lasala GP, Tuzcu EM (2007) Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med* 356: 1304-1316
  44. Sloop CH, Dory L, Krause BR, Castle C, Roheim PS (1983) Lipoproteins and apolipoproteins in peripheral lymph of normal and cholesterol-fed dogs. *Atherosclerosis* 49: 9-21
  45. Sloop CH, Dory L, Hamilton R, Krause BR, Roheim PS (1983) Characterization of dog peripheral lymph lipoproteins: the presence of a disc-shaped „nascent“ high density lipoprotein. *J Lipid Res* 24: 1429-1440
  46. Dattilo AM, Kris-Etherton PM (1992) Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 56: 320-328

47. Thompson PD, Cullinane EM, Sady SP, Flynn MM, Chenevert CB, Herbert PN (1991) High density lipoprotein metabolism in endurance athletes and sedentary men. *Circulation* 84: 140-152
48. Ramsay LE, Yeo WW, Jackson PR (1991) Dietary reduction of serum cholesterol concentration: time to think again. *BMJ* 303: 953-957
49. Santamarina-Fojo S, Remaley AT, Neufeld EB, Brewer HB, Jr. (2001) Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J Lipid Res* 42: 1339-1345
50. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE, Sukhova GK, Libby P (1998) Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation* 97: 2433-2444
51. Salomon RN, Underwood R, Doyle MV, Wang A, Libby P (1992) Increased apolipoprotein E and c-fms gene expression without elevated interleukin 1 or 6 mRNA levels indicates selective activation of macrophage functions in advanced human atheroma. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2814-2818
52. Pataki M, Lusztig G, Robenek H (1992) Endocytosis of oxidized LDL and reversibility of migration inhibition in macrophage-derived foam cells *in vitro*. A mechanism for atherosclerosis regression? *Arterioscler Thromb* 12: 936-944
53. Llodra J, Angeli V, Liu J, Trogan E, Fisher EA, Randolph GJ (2004) Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11779-11784
54. Ludewig B, Laman JD (2004) The in and out of monocytes in atherosclerotic plaques: Balancing inflammation through migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11529-11530
55. Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat GH, Rader DJ (2003) Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces *in vivo*. *Circulation* 108: 661-663
56. Nagornev VA, Pigarevskii PV, Ogurtsov RP, Denisenko AD (1985) Atherosclerosis and the system of immunity. *Arkh Patol* 47: 15-21
57. Shimizu K, Shichiri M, Libby P, Lee RT, Mitchell RN (2004) Th2-predominant inflammation and blockade of IFN-gamma signaling induce aneurysms in allografted aortas. *J Clin Invest* 114: 300-308
58. Miller AJ, DeBoer A, Palmer A (1992) The role of the lymphatic system in coronary atherosclerosis. *Med Hypotheses* 37: 31-36
59. Calabresi L, Gomaschi M, Villa B, Omoboni L, Dmitrieff C, Franceschini G (2002) Elevated soluble cellular adhesion molecules in subjects with low HDL-cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 656-661
60. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS (1994) The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4431-4435
61. Ishigami M, Swertfeger DK, Granholm NA, Hui DY (1998) Apolipoprotein E inhibits platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation by suppressing signal transduction and preventing cell entry to G1 phase. *J Biol Chem* 273: 20156-20161
62. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F (2000) Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 6: 1399-1402
63. Ehrenstein MR, Jury EC, Mauri C (2005) Statins for atherosclerosis – as good as it gets? *N Engl J Med* 352: 73-75
64. Savage DB, Tan GD, Acerini CL, Jebb SA, Agostini M, Gurnell M, Williams RL, Umpleby AM, Thomas EL, Bell JD, Dixon AK, Dunne F, Boiani R, Cinti S, Vidal-Puig A, Karpe F, Chatterjee VK, O'Rahilly S (2003) Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* 52: 910-917
65. Hsueh WA, Law RE (2001) PPARgamma and atherosclerosis: effects on cell growth and movement. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1891-1895
66. Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 274: 9116-9121
67. Jackson SM, Parhami F, Xi XP, Berliner JA, Hsueh WA, Law RE, Demmer LL (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2094-2104
68. Jiang C, Ting AT, Seed B (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391: 82-86
69. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM (1998) PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93: 241-252
70. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P (2001) A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 7: 161-171
71. Stoll M, Kwitek-Black AE, Cowley AW, Jr., Harris EL, Harrap SB, Krieger JE, Printz MP, Provoost AP, Sassard J, Jacob HJ (2000) New target regions for human hypertension via comparative genomics. *Genome Res* 10: 473-482
72. Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407: 233-241
73. Villa-Colinayo V, Shi W, Araujo J, Lusis AJ (2000) Genetics of atherosclerosis: the search for genes acting at the level of the vessel wall. *Curr Atheroscler Rep* 2: 380-389

## Reverse cholesterol transport processes and their role in atherosclerosis regression

Angelika Chachaj<sup>✉</sup>, Katarzyna Drożdż, Andrzej Szuba

Department of Internal Medicine, Wrocław Medical University, 4 Pasteur St., 50-367 Wrocław, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: angelika\_chachaj@wp.pl

**Key words:** atherosclerosis regression, reverse cholesterol transport, apoprotein

### ABSTRACT

Atherosclerosis represents dynamic process with periodic tendency to reverse. Although animal experiments and human studies have provided considerable evidence of atherosclerosis regression, our understanding of this phenomenon remains still incomplete. Atherosclerosis regression depends on removal of cholesterol deposits from atherosclerotic plaque in the process of reverse cholesterol transport and possibly other mechanisms including migration of macrophages and foam cells, inhibition of inflammation and endothelial regeneration. Our paper reviews available data on the process of atherosclerosis regression with special attention to the reverse cholesterol transport.

Łukasz Sobkowiak

Bogna Szarzyńska

Zofia Szweykowska-Kulińska✉

Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

✉Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań; tel.: (061) 829 27 30, e-mail: zofszwey@amu.edu.pl

Artykuł otrzymano 19 grudnia 2007 r.  
Artykuł zaakceptowano 26 lutego 2008 r.

**Słowa kluczowe:** biogeneza mikro RNA, DCL1, HYL1, SE, HEN1, HASTY

**Wykaz skrótów:** AGO1 (ang. *Argonaute 1*) – białko z rodziny Argonaute; BiFC (ang. *bimolecular fluorescence complementation*) – dwucząsteczkowa komplementacja fluorescencji; DCL1 (ang. *Dicer Like Protein 1*) – białko podobne do Dicer; dsRBD (ang. *double stranded RNA Binding Domain*) – domena wiążąca dwuniciowe cząsteczki RNA; dsRNA (ang. *double stranded RNA*) – dwuniciowy RNA; GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*) – białko zielonej fluorescencji; HEN1 (ang. *HUA Enhancer 1*) – białko HEN1; HYL1 (ang. *Hyponastic Leaves*) – białko HYL1; miRNA (ang. *micro RNA*) – mikro RNA; MIR – gen mikro RNA; npcRNA (ang. *non-protein-coding RNA*) – RNA niekodujący białka; NPC (ang. *Nuclear Pore Complex*) – kompleks poru jądrowego; pri-miRNA (ang. *primary micro RNA*) – pierwotny transkrypt genu MIR; SAM (ang. *S-adenosyl Methionine*) – S-adenozylometionina; SE (ang. *SERRATE*) – białko SERRATE; siRNA (ang. *small interfering RNA*) – krótkie interferujące RNA; T-DNA (ang. *transferred DNA*) – DNA obszaru T w plazmidzie Ti oraz Ri

**Podziękowania:** Praca wykonana w ramach grantu promotorskiego MNiSW nr N N301 3378 33, grantu Wydziału Biologii UAM w Poznaniu nr: PBWB 804/2007 oraz działalności statutowej Zakładu Ekspresji Genów UAM w Poznaniu

## STRESZCZENIE

Mikro RNA to cząsteczki kwasu rybonukleinowego o długości 21-24 nt, zaangażowane w regulację ekspresji genów na poziomie matrycowego RNA. Dojrzałe cząsteczki miRNA, wchodzące w skład kompleksu RISC, uczestniczą w ukierunkowanej degradacji cząsteczek matrycowego RNA lub są odpowiedzialne za blokowanie translacji. U roślin ukierunkowana degradacja cząsteczek mRNA w szlaku zależnym od miRNA jest procesem powszechnym, zachodzącym częściej niż blokowanie translacji. Transkrypty genów *MIR*, tzw. pri-miRNA, podlegają złożonemu procesowi dojrzewania, podczas którego z cząsteczek prekursorowych uwalniane są dojrzałe miRNA. W proces dojrzewania miRNA u roślin zaangażowane są białka DCL1, HYL1, SE, HEN1 oraz HASTY. W pracy analizujemy udział tych białek w biogenezie roślinnych miRNA.

## WPROWADZENIE

Roślinne mikro RNA (miRNA) to małe (długości 21-24 nt), niekodujące cząsteczki RNA zaangażowane w regulację ekspresji genów na poziomie mRNA, głównie poprzez selektywne rozpoznawanie transkryptów i wyznaczanie miejsca ich cięcia przez białko AGO1 [1]. Wiadomo jednak, że miRNA u roślin mogą również brać udział w hamowaniu translacji [2,3]. Cząsteczki miRNA i mRNA stanowiące cel ich działania tworzą skomplikowaną sieć regulatorową: określony miRNA może regulować poziom transkryptów grupy genów kodujących białka i odwrotnie – miRNA należące do różnych rodzin mogą wspólnie kontrolować poziom transkryptu danego genu [4-7]. Dodatkowo, niektóre roślinne miRNA regulują poziom mRNA kodujących kluczowe białka zaangażowane w biogenezę oraz funkcjonowanie miRNA – w ten sposób zwrótnie kontrolują poziom miRNA i pośrednio wpływają na efekty ich działania [8-10].

Skoordynowane działanie miRNA warunkuje harmonijny wzrost i rozwój roślin – wpływa na prawidłowe różnicowanie się tkanek i powstawanie organów (liści, korzeni, łodyg, kwiatów), a także stanowi kontrolę przejścia rośliny z fazy rozwoju wegetatywnego w generatywny [2,3,11-18]. Ponadto, roślinne miRNA biorą udział w regulacji metabolizmu, przekazywaniu sygnałów i odpowiedzi na działanie różnorodnych czynników stresowych (m.in. zasolenia, niedoboru soli mineralnych, ataku patogenów) [19-22]. W ten sposób miRNA biorą udział w realizacji złożonego planu budowy wielokomórkowego organizmu roślinnego i jego oddziaływań ze środowiskiem. Znaczący wpływ na efektywność systemu zarządzania transkryptomem ma regulacja ekspresji genów *MIR* oraz działanie białek zaangażowanych w dojrzewanie i transport miRNA.

## ORGANIZACJA I EKSPRESJA ROŚLINNYCH GENÓW miRNA (MIR)

Udział miRNA w regulacji kluczowych procesów zachodzących w roślinie wymaga ścisłej kontroli ich powstawania. Ze względu na odmienne funkcje poszczególnych miRNA, ekspresja kodujących je genów zachodzi w sposób czasowo- i tkankowo-specyficzny, podlega kontroli fitohormonalnej i/lub jest zależna od warunków środowiska [13,19,20,23]. Przykładowo, miRNA z rodziny miR156/157 występują na wysokim poziomie w siewkach, natomiast w tkankach dojrzałych roślin są syntetyzowane w stosunkowo niewielkiej ilości [24]. Z kolei geny miRNA z rodziny miR172 ulegają najsilniejszej ekspresji w dojrzałych łodygach, liściach łodygowych i kwiatostanach, podczas gdy ich ekspresja w początkowych stadiach rozwoju rośliny jest znikoma. Nierzadko specyfika ekspresji genów miRNA dotyczy nie tylko różnych organów, ale określonych tkanek, czy wręcz poszczególnych typów komórek, a jej analiza wymaga zastosowania technik o wysokiej rozdzielczości przestrzennej, np. hybrydyzacji *in situ* [25]. Przestrzenne i czasowe zróżnicowanie występowania określonych miRNA jest ściśle skorelowane z obecnością transkryptów stanowiących cel ich działania.



**Rycina 1.** A. Budowa genu *MIR162a* *A. thaliana* (At5g08185). Pola szare reprezentują egzony, czarne – introny, a białe pole w obrębie trzeciego intronu odpowiada fragmentowi DNA kodującemu dojrzałą cząsteczkę miRNA. B. Alternatywne formy splicingowe (1-4) transkryptów genu At5g08185. Funkcja transkryptów 1-3 nie jest znana. Jedyne w formie 4 zachowany zostaje intron zawierający sekwencję miR162a. W liściach rozetkowych *A. thaliana* transkrypt 4 jest najczęściej, a transkrypt 3 najrzadziej występującą formą [wg 26].

U roślin sekwencje kodujące miRNA stanowią najczęściej niezależne jednostki transkrypcyjne. Nietypowy przykład stanowi jeden z dwóch znanych genów *MIR162* *A. thaliana* – *MIR162a* [26] (Ryc. 1). W tym przypadku o powstaniu dojrzałego miRNA decyduje alternatywny splicing niekodującego RNA (npcRNA; ang. *non protein coding RNA*). Prekursorem miR162a, stanowiącym substrat dla endorybonukleazy DCL1, jest tylko jeden spośród czterech wariantów splicingowych tego RNA. Wariant ten pomiędzy 3 i 4 egzonom zawiera intron, w którym zlokalizowana jest sekwencja dojrzałego miRNA. W tym przypadku splicing pierwotnego transkryptu wyklucza, a brak splicingu umożliwia powstanie dojrzałej cząsteczki miRNA.

Niekiedy geny roślinnych miRNA są zorganizowane w zespoły i mogą wspólnie ulegać transkrypcji, w wyniku której powstaje policistronowy prekursor [9,27,28]. Ponadto, nieliczne geny miRNA są zlokalizowane w obrębie *loci* kodujących białka (najczęściej w intronach, ale również w egzonomach – zarówno w orientacji sens, jak i antysens) [29]. Jedyne u mchów miRNA pochodzące z *loci* kodujących białka stanowią większość dotąd poznanych cząsteczek [9].

Badania przeprowadzone na komórkach HeLa wykazały, iż większość genów kodujących miRNA jest transkrybowana przez polimerazę RNA II [30]. Najprawdopodobniej roślinne geny miRNA nie różnią się pod tym względem od genów miRNA zwierząt. Pośrednio świadczy o tym fakt, iż dotychczas scharakteryzowane pierwotne transkrypty (pri-miRNA) zawierają na końcu 5' strukturę kap, a na końcu 3' - ogon poli(A) [29]. Znane są geny miRNA człowieka, których transkrypcja przebiega z udziałem polimerazy RNA III [31]. Dotyczy to licznej rodziny miRNA tworzących zespół i zlokalizowanych w rejonie bogatym w sekwencje powtórzone zdefiniowane jako elementy rodziny Alu. Jak dotąd brak podobnych doniesień dotyczących genomów roślinnych, nie można jednak wykluczyć, iż również u roślin część transkryptów genów miRNA powstaje przy udziale polimerazy RNA III.

Analiza sekwencji genów miRNA pozwoliła ustalić motywy charakterystyczne dla regionów promotorowych [29,32–39]. Sekwencje promotorów genów miRNA *A. thaliana* oraz *O. sativa* zawierają kasetę TATA. W regionach promotorowych genów miRNA *A. thaliana*, *O. sativa*, *C. elegans* oraz człowieka wykazano również obecność ciągów CT, po-

dobnych do tych, które obserwowane są u roślin, ssaków oraz u *D. melanogaster* w promotorach genów kodujących białka. W przypadku genów miRNA u *A. thaliana* trakty te położone są w odległości około 100 pz od miejsc startu transkrypcji. Ze strukturalnego punktu widzenia,

sekwencje zbudowane z dipirymidynowych powtórzeń CT mogą tworzyć w DNA rejony odmienne od B-DNA i z tego powodu mają znaczenie w procesie inicjacji transkrypcji.

Ppt_156a	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Ppt_156b	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Ppt_156c	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Smo_156a	: -CGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Smo_156b	: CUGACAGAAGAUAAGAGAGCAC--- : 21
Smo_156c	: UUGACAGAAGAAAGAGAGCAC--- : 21
Smo_156d	: UUGACAGAAGACAGGGAGCAC--- : 21
Pta_156a	: ----CAGAAGAUAAGAGAGCACAU : 20
Pta_156b	: ----CAGAAGAUAAGAGAGCACAA : 20
Sbi_156a	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Sbi_156b	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Sbi_156c	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Sbi_156d	: -UGACAGAAGAGAGAGAGCAC-- : 21
Sbi_156e	: -UGACAGAAGAGAGCGAGCAC--- : 20
Ptc_156a	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Ptc_156b	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Ptc_156c	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Ptc_156d	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Ptc_156e	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Ptc_156f	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Ptc_156g	: UUGACAGAAGAUAAGAGAGCAC--- : 21
Ptc_156h	: UUGACAGAAGAUAAGAGAGCAC--- : 21
Ptc_156i	: UUGACAGAAGAUAAGAGAGCAC--- : 21
Ptc_156j	: UUGACAGAAGAUAAGAGAGCAC--- : 21
Ptc_156k	: -UGACAGAAGAGAGGGAGCAC--- : 20
Pth_156a	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Pth_156b	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Pth_156c	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Pth_156d	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Pth_156e	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Ath_156f	: -UGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Ath_156g	: -CGACAGAAGAGAGUGAGCAC--- : 20
Ath_156h	: -UGACAGAAGAAAGAGAGCAC--- : 20

**Rycina 2.** Porównanie sekwencji dojrzałych cząsteczek miRNA z rodziny 156 wybranych przedstawicieli różnych grup systematycznych roślin (Ppt – *Physcomitrella patens*, Smo – *Selaginella moellendorffii*, Pta – *Pinus taeda*, Sbi – *Sorghum bicolor*, Ptc – *Populus trichocarpa*, Ath – *Arabidopsis thaliana*). Rodzina miRNA 156 wykazuje dużą ewolucyjną zachowawczość. Po prawej stronie podano długość dojrzałej cząsteczki miRNA (nt).

Niektóre geny *MIR* posiadają więcej niż jedno miejsce inicjacji transkrypcji [29]. Ponadto, geny *MIR* nierzadko zawierają introny, a ich transkrypty mogą ulegać alternatywnemu splicingowi poprzez wycięcie egzonu, zachowanie intronu i/lub wybór alternatywnego miejsca splicingowego (Szarzyńska, Sobkowiak, Jarmołowski, Szweykowska-Kulińska, dane nie opublikowane). W dodatku w transkryptach genów *MIR* często obecnych jest kilka alternatywnych sygnałów poliadenylacji. Z tych względów w wyniku transkrypcji genów *MIR* powstaje całe spektrum pri-miRNA, różniących się długością i/lub sekwencją. Różnorodność puli pierwotnych prekursorów określonego miRNA jest dodatkowo potęgowana przez dużą liczbę członków poszczególnych rodzin genów miRNA (nawet do 32). Niemniej jednak, w wyniku dojrzewania prekursorów na drodze kilkuetapowego ich „przycinania” powstają takie same (lub wykazujące niewielkie różnice w długości i /lub sekwencji) cząsteczki miRNA (Ryc. 2).

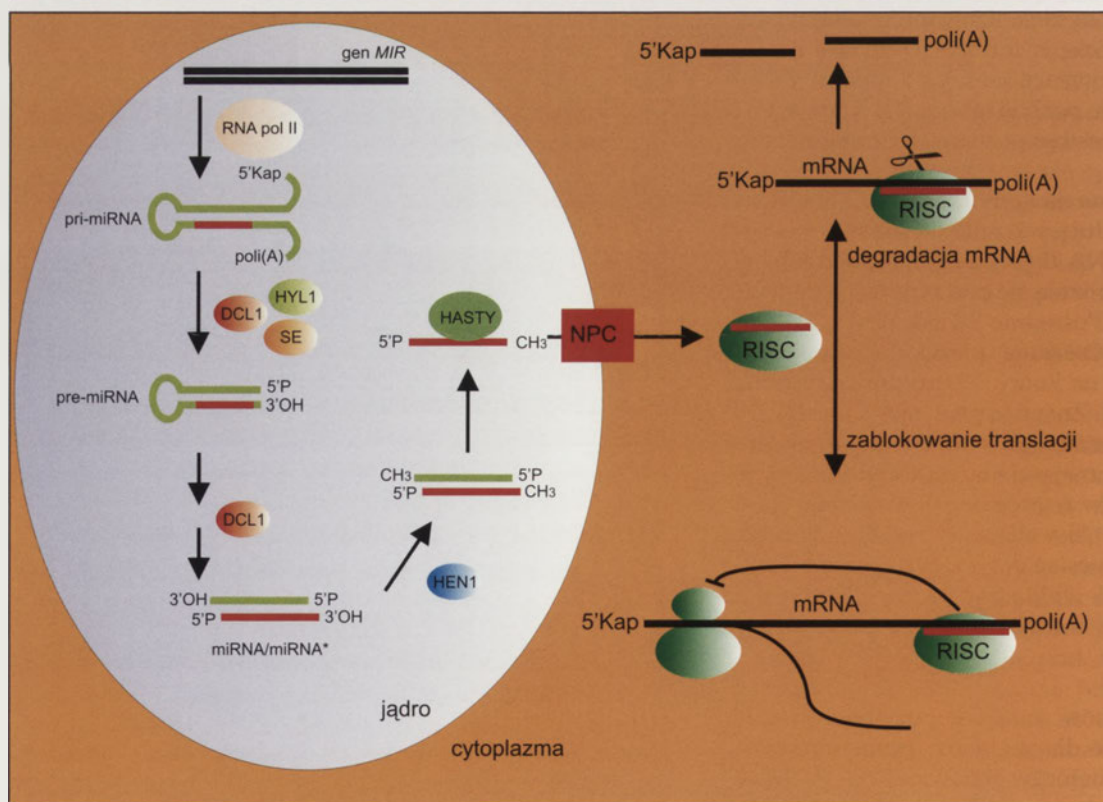
W 2002 roku opublikowano pracę opisującą po raz pierwszy roślinne miRNA na przykładzie *A. thaliana* [40]. Od tego czasu zidentyfikowano ponad 1000 cząsteczek miRNA występujących u kilkudziesięciu gatunków roślin (w tym 184 u *A. thaliana*) i wciąż poznawane są nowe [4,9,28,41,42]. Część rodzin roślinnych miRNA scharakteryzowanych u *A. thaliana* występuje również u innych roślin okrytonasiennych (jedno- i dwuliściennych) oraz u nagonasiennych; funkcjonalne cząsteczki niektórych miRNA wykryto także u niższych roślin lądowych: mszaków, paprotników i widłakowych (Ryc. 2). Wykazano ponadto, że zachowane w ewolucji roślinne miRNA (np. miR156/157, miR160,

miR159/319, miR168, miR165/166, miR170/171, miR172) są zaangażowane w rozcinanie transkryptów homologicznych do tych, które stanowią cel działania miRNA u *A. thaliana*, co pozwala sądzić, że regulacja ekspresji genów z ich udziałem zachodziła już u ostatniego wspólnego przodka roślin naczyniowych [24,41]. Niemniej jednak znane są również miRNA specyficzne dla poszczególnych grup (rodzin bądź nawet gatunków) roślin, można więc przypuszczać, że kodujące je geny pojawiły się w toku ewolucji stosunkowo niedawno. Przynajmniej część z tych genów powstała poprzez duplikację i inwersję sekwencji kodującej białko, dzięki czemu ich transkrypt może przyjmować charakterystyczną dla prekursorów miRNA strukturę spinki [7,43]. Niektóre z miRNA o takim rodowodzie są zaangażowane w regulację ekspresji rodziny genów, z której się wywodzą, nie jest to jednak zasadą.

### LOKALIZACJA KOMÓRKOWA BIAŁEK ZAANGAŻOWANYCH W DOJRZEWANIE CZĄSTECZEK miRNA

W procesie dojrzewania miRNA u roślin wyróżnia się etap jądrowy oraz cytoplazmatyczny (Ryc. 3). Transkrypty genów miRNA tworzą strukturę typu spinka do włosów, zawierającą krótką pętlę oraz odcinek dwuniciowy, w którym często występują niesparowania. W jądrze komórkowym dochodzi do rozcięcia pri-miRNA przez endonukleazę DCL1, w wyniku czego powstają skrócone cząsteczki prekursorowe, tzw. pre-miRNA. Wiadomo, że w reakcji tej bierze również udział białko HYL1 (najprawdopodobniej we współpracy z białkiem SE). Cząsteczki pre-miRNA stanowią substraty w kolejnej reakcji cięcia katalizowanej przez

endonukleazę DCL1. W jej wyniku z cząsteczki pre-miRNA uwalniany jest dwuniciowy fragment RNA zawierający sekwencję miRNA oraz sekwencję do niej komplementarną, określaną jako miRNA\*. Dupleks miRNA / miRNA\* jest następnie specyficznie metylowany przez metylotransferazę HEN1. W kolejnym etapie następuje jego rozplecenie i transport cząsteczki miRNA z udziałem eksportyny HASTY z jądra do cytoplazmy [69]. Dojrzała miRNA powstaje zazwyczaj tylko z jednego ramienia cząsteczki prekursorowej. Znane są jednak i takie prekursorzy, w przypadku których



Rycina 3. Szlak biogenezy miRNA u roślin oraz dwa możliwe mechanizmy regulacji ekspresji genów na poziomie mRNA w szlaku zależnym od dojrzałych cząsteczek miRNA.

dojrzałe cząsteczki miRNA mogą powstawać z każdego z ramion (np. miR172b *A. thaliana*) [4].

Powyższy model biogenezy roślinnych miRNA jest zgodny z wynikami obserwacji mikroskopowych fuzyjnych białek fluorescencyjnych. Białko DCL1 występuje w jądrze komórkowym w pobliżu jąderka [44]. Ponadto, część cząsteczek DCL1 jest rozproszona w nukleoplazmie. HYL1 również ulega akumulacji przede wszystkim w jądrze komórkowym [45]. Niewielką frakcję białka HYL1 zaobserwowano także w cytoplazmie. Białko SE, podobnie jak DCL1 oraz HYL1, jest zlokalizowane w obrębie jądra komórkowego [44–46]. Wspomniane białka znajdują się w jądrze komórkowym w tzw. ciałkach D (ang. *nuclear dicing bodies*) – kompleksach białkowych uznawanych za miejsce dojrzewania cząsteczek miRNA. Ciałka D, typowe dla komórek roślinnych, tworzą w jądrze komórkowym struktury podobne do ciałek Cajala. Eksperymenty oparte na metodzie BiFC wykazały, iż białka DCL1, HYL1 oraz SE oddziałują ze sobą w ciałkach D. Ponadto, w ciałkach D wykazano również obecność prekursorów miRNA [44,47,48]. W dalszej części artykułu opisano doświadczenia, w których udowodniono bezpośrednie oddziaływania białek DCL1-HYL1 oraz HYL1-SE.

## DOJRZEWANIE CZĄSTECZEK miRNA

### BIAŁKO DCL1

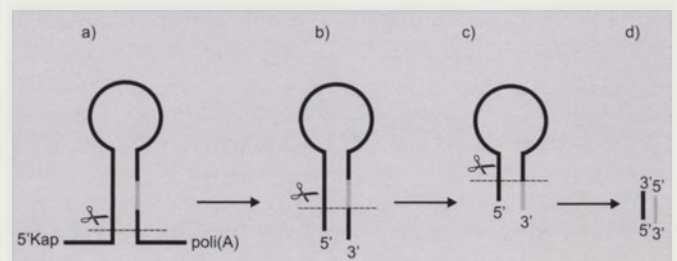
Transkrypty genów miRNA podlegają złożonemu procesowi dojrzewania, podczas którego z cząsteczki prekursorowej zostaje uwolniona dojrzała forma miRNA. W metabolizm niskocząsteczkowych RNA u ssaków zaangażowana jest endorybonukleaza Dicer. U roślin występują cztery paralogi tego białka: DCL1, DCL2, DCL3 i DCL4. Białka te pełnią różne funkcje i występują w różnych kompartmentach komórkowych. Białko DCL1 występuje w jądrze komórkowym i jest zaangażowane w biogenezę miRNA. Endorybonukleaza DCL2 jest zlokalizowana w cytoplazmie i rozcina wirusowe oraz transgeniczne prekursor si-RNA. DCL3 jest białkiem jądrowym; tnie zasocjowane z heterochromatyną cząsteczki prekursorowe siRNA, tzw. ha-siRNA. Natomiast białko DCL4, także zlokalizowane w jądrze komórkowym, uczestniczy w szlaku biogenezy krótkich interferujących RNA, działających *in trans*, tzw. ta-siRNA [49–51].

Białko DCL1 zbudowane jest z 1909 reszt aminokwasowych i zawiera kilka domen funkcjonalnych: dwie domeny NLS, domenę o aktywności helikazy, domenę o nieznannej funkcji DUF (ang. *domain of unknown function*), zachowaną w ewolucji domenę PAZ (występującą w białkach Piwi/Argonaute/Zwille u *D. melanogaster* i *A. thaliana*), dwuczęściową domenę o aktywności RNazy III oraz dwie domeny dsRBD. Białko to jest zaangażowane w uwalnianie cząsteczki pre-miRNA z pierwotnego prekursora, tzw. pri-miRNA (Ryc. 3). Rozcinanie pri-miRNA przez endorybonukleazę DCL1 następuje u podstawy struktury spinki do włosów i prowadzi do powstania cząsteczki pre-miRNA. Cząsteczki pre-miRNA posiadają strukturę spinki do włosów; na końcu 5' zawierają resztę kwasu fosforanowego, natomiast na końcu 3' występują dwa niesparowane nukleotydy z wolną grupą hydroksylową (jest to cecha charakterystyczna dla

produktów powstających w wyniku działania RNaz klasy III). Białko DCL1 najprawdopodobniej uczestniczy również w wycięciu dupletu miRNA/miRNA\* z cząsteczki pre-miRNA. Na tym etapie dojrzewania miRNA rozcięcie endonukleolityczne prekursora wyznacza końce sekwencji dojrzałego miRNA. Również w tym przypadku produkty reakcji posiadają na końcu 5' resztę kwasu fosforanowego, a na końcu 3' znajduje się niesparowany dinukleotyd z wolną grupą hydroksylową.

Szczegółowy przebieg dojrzewania roślinnych cząsteczek miRNA poznano, analizując biogenezę miRNA 163 *A. thaliana* [52]. Proces ten obejmuje trzy reakcje katalizowane przez endorybonukleazę DCL1. Pierwsza reakcja prowadzi do uwolnienia z cząsteczki pri-miRNA tzw. długiego pre-miRNA (343 nt). Cięcie zachodzi w rejonie dwuniciowym struktury spinki do włosów, w miejscu oddalonym o kilka nacięć nukleotydów od punktu wyznaczającego koniec 3' nici miRNA i koniec 5' nici miRNA\*. W kolejnym etapie biogenezy miRNA 163 cząsteczka długiego pre-miRNA zostaje przycięta do postaci tzw. krótkiego pre-miRNA o długości 301 nt. W tej reakcji białko DCL1 nacina cząsteczkę prekursora w miejscach wyznaczających koniec 3' nici miRNA oraz koniec 5' nici miRNA\*. Trzecia reakcja katalizowana przez endonukleazę prowadzi do uwolnienia dupletu miRNA/miRNA\* oraz fragmentu RNA o strukturze spinki do włosów o długości 253 nt, który ulega degradacji (Ryc. 4).

Najprawdopodobniej sposób działania DCL1 decyduje o długości dojrzałych cząsteczek miRNA. Obserwacja ta jest zgodna z wcześniej opisanym mechanizmem działania białka Dicer w procesie biogenezy miRNA u zwierząt [52]. Rybonukleaza Dicer ma podobną budowę jak białko DCL1. Model reakcji katalizowanej przez Dicer zakłada, że 21 nt fragment RNA jest odmierzany jako odległość pomiędzy domeną PAZ a miejscem aktywnym białka utworzonym przez pseudodimeryzację domen wykazujących aktywność RNazy III [53,54]. Badania przeprowadzone na mutancie insercyjnym T-DNA *dcl1-9 A. thaliana* z uszkodzoną drugą domeną dsRBD (insercja T-DNA wprowadzająca kodon stop w 19 egzonie genu kodującego białko DCL1) wykazały, iż w przypadku białka DCL1 również ta domena jest zaangażowana w precyzyjne wyznaczenie miejsca cięcia prekursorowych cząsteczek miRNA [52]. Uszkodzenie białka DCL1 spowodowane insercją T-DNA w rejonie kodującym drugą domenę dsRBD uniemożliwia przebieg pełnego cyklu życiowego rośliny – homozygotyczny mutant *dcl1-9* jest letalny w stadium zarodka. Mutacja *dcl1-9* dziedziczona jest w sposób recesywny.



Rycina 4. Dojrzewanie cząsteczki mikro RNA na przykładzie miR163. 4a) pri-miRNA, 4b) długi pre-miRNA, 4c) krótki pre-miRNA, 4d) duplet miRNA/miRNA\*. Szczegółowy opis znajduje się w tekście.

Działanie endonukleazy DCL1 ma kluczowe znaczenie dla rozwoju rośliny. W mutancie *dcl1-7 A. thaliana*, charakteryzującym się substytucją prolina/seryna w domenie o aktywności helikazy, poziom dojrzałych cząsteczek miRNA jest znacznie obniżony w stosunku do roślin typu dzikiego, co prowadzi do szeregu zmian fenotypowych. Mutacja *dcl1-7* dziedziczona jest w sposób recesywny. Homozygotyczny mutant *dcl1-7* charakteryzuje się obniżoną płodnością [55-58].

## BIAŁKO HYL1

Niektóre białka wiążące dwuniciowe fragmenty kwasu rybonukleinowego oddziałują z enzymami należącymi do RNaz klasy III. Wykazano, iż oddziaływanie pomiędzy HYL1 a DCL1 odgrywają istotną rolę w procesie dojrzewania cząsteczek miRNA [59,60]. Białko HYL1 *A. thaliana* (419 aa) zawiera dwie domeny dsRBD (ang. *double-stranded RNA Binding Domain*), zlokalizowane przy N-końcu łańcucha polipeptydowego. Każda z nich zbudowana jest z około 70 reszt aminokwasowych i przyjmuje strukturę  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ , charakterystyczną dla tego typu domen. Ponadto, w środkowej części białka HYL1 znajduje się sygnał lokalizacji jądrowej (NLS), a rejon C-końcowy tworzy 6 niemal identycznych 28-aminokwasowych fragmentów. [61].

Mutacje unieczynnające gen *HYL1* wywołują efekty plejotropowe, polegające na zmianie wielu na pozór nie związanych ze sobą cech fenotypowych [61]. Liście mutantu *hyl1* są mniejsze i mają charakterystyczny hyponastychny kształt. Mutant *hyl1* charakteryzuje się również nadwrażliwością na działanie kwasu absycynowego – ABA. Nasiona roślin typu dzikiego poddane działaniu ABA o stężeniu 0.5  $\mu$ M kiełkują wolniej niż nasiona w próbie kontrolnej, natomiast kiełkowanie nasion mutantu *hyl1* traktowanych ABA o tym samym stężeniu jest niemal całkowicie zahamowane. Wykazano również, iż mutant *hyl1* charakteryzuje się obniżoną wrażliwością na działanie auksyn. U roślin typu dzikiego wzrost korzeni jest hamowany przez kwas indoliloctowy (IAA) o stężeniu 1  $\mu$ M, natomiast u mutantu *hyl1* podobny efekt obserwowany jest dopiero przy stężeniu hormonu wynoszącym 5  $\mu$ M. Mutacja w genie *HYL1* powoduje również zmienioną wrażliwość na działanie inhibitorów transportu auksyn, obniżoną wrażliwość na działanie cytokinin, mniejszą płodność, opóźnienie czasu kwitnienia i zaburzenia reakcji grawitropowej korzeni. Ponadto, w mutantach *hyl1* obserwuje się obniżony poziom cząsteczek pre-miRNA i dojrzałych miRNA oraz akumulację pri-miRNA, jak również cząsteczek mRNA, których poziom jest regulowany z udziałem miRNA [62,63]. Białko HYL1 jest zaangażowane w wyznaczanie miejsca cięcia pri-miRNA przez endorybonukleazę DCL1 [60]. W mutancie *hyl1*, podobnie jak w heterozygotycznych mutantach *dcl1-9*, „docinanie” pri-miRNA do formy pre-miRNA zachodzi w sposób nieprecyzyjny. Oddziaływanie HYL1-DCL1 są kluczowe dla dokładnego i wydajnego rozcina pri-miRNA, przy czym koniecznym warunkiem ich występowania jest obecność w białku DCL1 dwóch funkcjonalnych domen dsRBD, gdyż białko HYL1 nie ulega immunoprecypitacji wspólnie z DCL1 pochodzącym z ekstraktu z mutantów *dcl1-9*.

Wykazano doświadczalnie, iż w przypadku białka HYL1 obecność domen dsRBD jest niezbędna, ale i wystarczająca do prawidłowego przebiegu procesu biogenezy miRNA *A. thaliana* [62]. Do genomu mutantu *hyl1*, drogą transformacji z udziałem *Agrobacterium tumefaciens*, wprowadzono kasetę ekspresyjną kodującą N-końcowy fragment białka HYL1, zawierający dwie domeny dsRBD (białko HYL1D12). U transformowanych roślin zaobserwowano powrót do fenotypu dzikiego: prawidłowy kształt liści, obniżony poziom mRNA genów *REV* (ang. *REVOLUTA*) oraz *ARF17* (ang. *AUXIN RESPONSE FACTOR 17*) przy jednoczesnym wzroście akumulacji cząsteczek miRNA165 i miRNA160 regulujących poziom tych mRNA. Wykazano tym samym, iż prawidłowy rozwój rośliny nie wymaga białka HYL1 o pełnej długości. Obserwacje te są zgodne z wynikami badań przeprowadzonych na komórkach epidermalnych *Allium cepa*, według których białko fuzyjne HYL1D12-GFP ulega transportowi do jądra komórkowego, pomimo iż nie zawiera w swej sekwencji sygnału lokalizacji jądrowej. Prawdopodobnie jest to możliwe dzięki oddziaływaniom N-końcowego fragmentu białka HYL1 z białkami DCL1 oraz SE, które zawierają sekwencję aminokwasową odpowiedzialną za lokalizację jądrową. W ten sposób pewna frakcja białka HYL1D12 jest transportowana poprzez kompleks poru jądrowego (NPC) do jądra komórkowego, gdzie uczestniczy w procesie biogenezy cząsteczek miRNA.

## BIAŁKO SE

W biogenezę cząsteczek miRNA u *A. thaliana* zaangażowane jest również białko SERRATE. Białko to, zbudowane z 720 reszt aminokwasowych, kodowane jest przez gen AT2G27100 położony na chromosomie 2 *A. thaliana*. Otwarta ramka odczytu (ORF, ang. *Open Reading Frame*) o długości 3770 pz zawiera 12 egzonów. Mutacja recesywna *se-1*, spowodowana delecją sekwencji 7 nt (5'-CAAGATC-3') w jednym z egzonów genu kodującego białko SE, powoduje częściową utratę aktywności SE i prowadzi m.in. do zaburzenia procesu embriogenezy (podobnie jak u mutantu *short integument 1-2 (sin1-2)*), nadwrażliwości na działanie na ABA (tak jak w przypadku mutantu *hyl1*), nieprawidłowości w funkcjonowaniu merystemu wierzchołkowego oraz zmian w liczbie i kształcie liści [64]. U mutantów insercyjnych *se-2* oraz *se-3* (insercja T-DNA odpowiednio w 10 oraz 1 egzonie genu kodującego białko SE) zaobserwowano ponadto poważne zaburzenia w budowie anatomicznej liści, co jest związane z występującą u tych roślin podwyższoną ekspresją genu *PHABULOSA (PHB)* przy jednocześnie obniżonym poziomie cząsteczek miR165 oraz miR166. Homozygotyczny mutant insercyjny *se-4* jest letalny w stadium zarodkowym.

Analiza ekspresji genów z wykorzystaniem techniki mikromacierzy, przeprowadzona na mutancie *se-1*, wykazała zmiany w poziomie ekspresji 303 genów [64]. Zaobserwowano wzrost ekspresji 135 genów natomiast w przypadku pozostałych 168 genów poziom ekspresji uległ obniżeniu w porównaniu z roślinami typu dzikiego. Poziom transkryptów 20 spośród 135 genów o podwyższonej ekspresji regulowany jest w sposób zależny od działania cząsteczek miRNA oraz ta-siRNA. Należą do nich m.in.: gen *PHV*, zaangażowany w



rozwój i morfogenezę liści, gen *ATHB15*, należący do rodziny HD ZIP III, geny aktywatorów transkrypcji GRF1 (*AtGRF1*) oraz GRF3 (*AtGRF3*), geny kodujące czynniki odpowiedzi na zmiany poziomu auksyn: ARF3/*ETTIN* oraz ARF4. W eksperymentach wykorzystujących metodę hybrydyzacji typu Northern blot wykazano, iż poziom dojrzałych cząsteczek miR156, miR165, miR167, miR163, miR164, miR168, miR171 oraz miR319 (*mir-JAW*) w mutantach *se* jest obniżony w porównaniu z roślinami typu dzikiego.

Akumulacja cząsteczek pri-miRNA, przy jednocześnie obniżonym poziomie dojrzałych miRNA, wskazuje, iż białko SE jest zaangażowane w proces dojrzewania cząsteczek miRNA na etapie uwalniania cząsteczek pre-miRNA z pierwotnego prekursora pri-miRNA [46,64]. Potwierdzają to wyniki uzyskane przy wykorzystaniu drożdżowego systemu dwuhybrydowego. Zgodnie z nimi białko SE oddziałuje z białkiem HYL1, przy czym niezbędne jest pełnej długości białko SE oraz N-końcowy fragment białka HYL1 zawierający obie domeny dsRBD [64]. Wiadomo wprawdzie, że mutacja *se* prowadzi także do nieznacznego obniżenia poziomu niektórych endogennych cząsteczek siRNA (np. 1003), jednakże efekt ten nie jest tak silny jak w przypadku zmian poziomu miRNA. W kontekście oddziaływań SE z białkiem HYL1 – cząsteczką specyficzną dla szlaku biogenezy miRNA – wydaje się, że główna funkcja SE (jakkolwiek dotąd nie poznana) związana jest z powstawaniem miRNA oraz zależnych od nich ta-siRNA.

#### BIAŁKO HEN1 – METYLACJA CZĄSTECZEK miRNA

W procesie dojrzewania miRNA u roślin dupleksy miRNA/miRNA\* ulegają metylacji z udziałem metylotransferazy HEN1 (etap ten nie występuje w szlaku biogenezy cząsteczek miRNA w komórkach zwierząt). HEN1 dokonuje transferu grupy metylowej z S-adenozylometioniny (SAM) w pozycję 2'OH rybozy ostatniego rybonukleotydu na końcu 3' cząsteczek RNA [65,66]. Substratami w reakcji katalizowanej przez metylotransferazę HEN1 są dupleksy miRNA/miRNA\* zawierające na końcach 3' dwa niesparowane (wystające) rybonukleotydy. Ponadto, wykazano w warunkach *in vitro*, iż długość substratu znacząco wpływa na przebieg procesu metylacji. Białko HEN1 posiada zdolność do metylowania substratów o długości 21-24 nt; cząsteczki RNA o długości spoza tego przedziału nie podlegają metylacji [65,66]. Proces metylacji jest wysoce specyficzny, albowiem metylotransferaza HEN1 nie metyluje jednoniciowych cząsteczek miRNA, jednoniciowych cząsteczek miRNA\*, cząsteczek pre-miRNA, jak również dsDNA o długości i sekwencji identycznej jak jej właściwy substrat – miRNA/miRNA\*. Wykazano, iż metylacja końców 3' RNA chroni cząsteczki miRNA oraz siRNA przed aktywnością enzymatyczną o charakterze terminalnej transferazy bądź polimerazy RNA, powodującą dodawanie do 3' końców cząsteczek RNA dodatkowych reszt U. Wyniki eksperymentów na mutancie *hen1* wskazują, iż obecność dodatkowych reszt U w niemetylowanych cząsteczkach miRNA prowadzi do ich degradacji. W mutantach *hen1* obserwuje się zatem obniżony poziom dojrzałych cząsteczek miRNA; ponadto cząsteczki te posiadają heterogenne końce 3'. Metylacja końców 3' miRNA uniemożliwia również ich udział jako starterów w reakcji syntezy dsRNA na matrycy docelowej

wego mRNA przez RNA zależną RNA polimerazę (RdRP) [67]. Dokładny mechanizm oddziaływania białka HEN1 z substratami RNA nie został poznany. Jedyne informacje na temat budowy domenowej pochodzą z analiz bioinformatycznych [68].

#### BIAŁKO HASTY – TRANSPORT miRNA Z JĄDRA DO CYTOPLAZMY

Badania metodą hybrydyzacji typu Northern wykazały, że u roślin dojrzałe (jednoniciowe) miRNA są obecne w jądrze komórkowym, choć większość z nich gromadzi się w obrębie cytoplazmy [69]. Jednocześnie u roślin typu dzikiego nie wykazano obecności nici miRNA\*, a w komórkach roślin charakteryzujących się nadprodukcją miRNA zarówno w jądrze komórkowym, jak i w cytoplazmie wykryto jedynie nieznaczne ilości cząsteczek miRNA\*. Oznacza to, iż funkcjonalne cząsteczki miRNA powstają w przeważającej mierze już w jądrze komórkowym i są eksportowane do cytoplazmy w postaci jednoniciowej. Jedyne niewielka część cząsteczek miRNA jest transportowana z jądra do cytoplazmy w postaci dwuniciowej lub też transport nici miRNA\* zachodzi w sposób niezależny od eksportu funkcjonalnych nici miRNA.

Transport roślinnych miRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy zachodzi z udziałem białka HASTY. Należy ono do rodziny  $\beta$ -importyn – transporterów nukleoplazmatycznych. U zwierząt podobną funkcję w biogenezie miRNA pełni Eksportyna 5, z tą jednak różnicą, że białko to transportuje miRNA w postaci prekursorów i dodatkowo jest zaangażowane w eksport cząsteczek tRNA i siRNA. [69, 70]. Tworzenie kompleksu HASTY-RNA oraz jego ukierunkowany transport przez pory jądrowe są zależne od działania GTPazy RAN1 [69,71]. Mutacja w genie *HST*, uniemożliwiająca oddziaływanie białka HASTY z RAN1 prowadzi do obniżenia poziomu dojrzałych miRNA zarówno w jądrze komórkowym, jak i w cytoplazmie [69]. Można więc przypuszczać, iż HASTY bierze udział nie tylko w eksporcie cząsteczek miRNA z jądra komórkowego, ale również w ich dojrzewaniu (np. poprzez stabilizację jednoniciowych form). Należy jednak podkreślić, że brak funkcjonalnego białka HASTY nie eliminuje całkowicie dojrzałych miRNA z frakcji jądrowej czy cytoplazmatycznej, a jedynie zmniejsza udział tych cząsteczek w obu pulach RNA. Ponadto, stopień obniżenia poziomu miRNA jest zróżnicowany w zależności od rodziny miRNA i analizowanych tkanek. Pozwala to sądzić, że u roślin istnieją alternatywne, niezależne od działania HASTY, szlaki transportu miRNA z jądra do cytoplazmy.

#### miRNA U ROŚLIN I ZWIERZĄT – PODOBIENSTWA I RÓŻNICE

Najprawdopodobniej miRNA funkcjonowały już u ostatniego wspólnego przodka roślin i zwierząt [1]. Niemniej jednak w przebiegu procesu dojrzewania prekursorów miRNA u przedstawicieli obu królestw zaznacza się szereg różnic, mogących wynikać z późniejszych zmian zachodzących niezależnie w każdej z tych dwóch linii ewolucyjnych. Przede wszystkim powstawanie roślinnych miRNA zachodzi w całości w obrębie jądra komórkowego, podczas gdy

dojrzwianie miRNA u zwierząt rozpoczyna się w jądrze komórkowym, następnie pre-miRNA są eksportowane przez pory otoczki jądrowej do cytoplazmy, gdzie mają miejsce dalsze etapy biogenezy.

Roślinne pre-miRNA są zwykle dłuższe niż prekursor miRNA u zwierząt [42]. Przycinanie transkryptów miRNA u roślin jest katalizowane przez endorybonukleazę DCL1, która (przynajmniej na pierwszym etapie działania) oddziałuje z wiązającym dwuniciowe cząsteczki RNA białkiem HYL1 oraz z białkiem SE. Natomiast u zwierząt dojrzwianie miRNA zachodzi z udziałem dwóch nukleaz: jądrowego białka Drosha oraz zlokalizowanego w cytoplazmie białka Dicer. Obie endorybonukleazy oddziałują ze specyficznymi dla komórek zwierzęcych białkami wiązającymi dsRNA: partnerem Drosha jest Pasha (u *D. melanogaster* i *C. elegans*) lub DGCR8 (u ssaków), natomiast Dicer *D. melanogaster* tworzy kompleks z białkiem Loquacious [72]. Proces metylacji końca 3' dojrzałych miRNA zachodzący z udziałem metylotransferazy HEN1 jest charakterystyczny tylko dla roślin [1].

Z kolei obecność tzw. mirtronów, czyli intronów kodujących pre-miRNA jest najprawdopodobniej specyficzna dla zwierząt [73]. Brak również doniesień na temat funkcjonowania u roślin miRNA wywodzących się z transpozono-nych odwróconych sekwencji powtórzonych. Geny miRNA tworzone przez elementy transpozono- we zlokalizowane w rejonie aktywnym transkrypcyjnie wykryto dotychczas jedynie w genomie człowieka, szympansa i makaka [74]. Co więcej, jak dotąd nie zidentyfikowano żadnej rodziny miRNA wspólnej dla roślin i zwierząt, choć miRNA w obrębie każdego z tych królestw wykazują wysoką zachowawczość [24,29,75]. Brak podobieństwa sekwencji dojrzałych miRNA występujących u obu grup eukariontów może wynikać z odmiennych sekwencji mRNA, które stanowią cel ich działania. Interesujący jest również fakt, iż dotychczas nie wykazano obecności sekwencji kodujących miRNA w genomach wirusów roślinnych, choć w przypadku wirusów kręgowców scharakteryzowano łącznie ponad 100 takich loci [4].

Różnice pomiędzy miRNA funkcjonującymi u roślin i zwierząt dotyczą także mechanizmu ich działania. Większość roślinnych miRNA jest zaangażowanych w rozcinanie docelowego transkryptu. Ponadto wykazano, iż część roślinnych miRNA uczestniczy w procesie biogenezy krótkich interferujących RNA działających *in trans* (ta-siRNA) [76]. Z kolei u zwierząt główny mechanizm regulacji ekspresji genów z udziałem miRNA polega na hamowaniu syntezy białka. Stopień komplementarności roślinnych miRNA i ich docelowych mRNA jest wyższy niż w przypadku miRNA zwierząt. Wiadomo, że przynajmniej niektóre pre-miRNA u zwierząt ulegają redagowaniu (A→I), co może wpływać na siłę oddziaływania miRNA z transkryptem stanowiącym cel działania, bądź alternatywny wybór docelowego mRNA; jak dotąd nie zaobserwowano takiego zjawiska u roślin [77].

## PODSUMOWANIE

Wysoki stopień złożoności eukariontów, zwłaszcza zwierząt i roślin wyższych, wynika w dużej mierze z poddania

genów działaniu licznych mechanizmów regulatorowych (wpływających na formę ostatecznych produktów ekspresji oraz czas, miejsce, warunki i poziom ich powstawania) [78]. Odkrycia ostatnich lat wyraźnie pokazują, iż niezmiernie ważną rolę w regulacji ekspresji informacji genetycznej odgrywają małe cząsteczki RNA.

Pod względem ogólnej struktury genów i przebiegu transkrypcji, geny *MIR* przypominają geny kodujące białka. Jednakże transkrypty genów *MIR* nie zawierają długiej otwartej ramki odczytu, a peptydy potencjalnie przez nie kodowane nie wykazują znaczącego podobieństwa do znanych białek. Trudno zatem wytłumaczyć znaczenie długich sekwencji oskrzydlaających miRNA w cząsteczce prekursorowej oraz ich dużej heterogenności. Intrygujące jest również funkcjonowanie w genomach roślinnych kilku, kilkunastu, czy nawet kilkudziesięciu genów *MIR*, których ekspresja prowadzi do powstania wysoce jednorodnej puli dojrzałych cząsteczek miRNA. Na podstawie wyników dotychczasowych badań można przypuszczać, iż miRNA bardzo podobne lub nawet identyczne pod względem sekwencji nukleotydowej mogą pełnić w roślinie odrębne funkcje [17]. Z tego względu niezwykle ważna dla prawidłowego rozwoju rośliny jest precyzyjna regulacja ekspresji genów miRNA w różnych organach, na poszczególnych etapach wzrostu rośliny oraz w zależności od warunków środowiska.

## PIŚMIENNICTWO

1. Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57: 19-53
2. Aukerman MJ, Sakai H (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA-like target genes. *Plant Cell* 15: 2730-2741
3. Chen X (2004) A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. *Science* 303: 2022-2025
4. miRBase: Sequences 10.0 <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>; Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34: D140-D144
5. *Arabidopsis thaliana* Small RNA Project Database <http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/>; Gustafson AM, Allen E, Givan S, Smith D, Carrington JC, Kasschau KD (2005) ASRP: The *Arabidopsis* Small RNA Project Database. *Nucleic Acids Res* 33: D637-D640
6. Schwab R, Palatnik J, Rieger M, Schommer C, Schmid M, Weigel D (2005) Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* 8: 517-527
7. Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan ChM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangl JL, Carrington JC (2007) High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: Evidence for frequent birth and death of *MIRNA* genes. *Plos ONE* 2: e219
8. Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2003) Negative feedback regulation of *Dicer-Like1* in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol* 13: 784-789
9. Axtell MJ, Snyder JA, Bartel DP (2007) Common functions for diverse small RNAs in land plants. *Plant Cell* 19: 1750-1769
10. Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP (2006) A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 20: 3407-3425
11. Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL (2003) Radial pattering of *Arabidopsis* shoots by class III HP-ZIP and *KANADI* genes. *Curr Biol* 13: 1768-1774
12. Juarez MT, Kui JS, Thomas J, Heller BA, Timmermans MC (2004) MicroRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature* 428: 84-88

13. Kidner CA, Martienssen RA (2004) Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature* 428: 81-84
14. Laufs P, Peaucelle A, Morrin H, Traas J (2004) MicroRNA regulation of the *CUC* genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Dev* 131: 4311-4322
15. Mallory AC, Dugas DV, Bartel DP, Bartel B (2004) MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr Biol* 14: 1035-1046
16. McHale NA, Koning RE (2004) MicroRNA-directed cleavage of *Nicotiana sylvestris* *PHAVOLUTA* mRNA regulates the vascular cambium and structure of apical meristems. *Plant Cell* 16: 1730-1740
17. Baker CC, Sieber P, Wellmer F, Meyerowitz EM (2005) The *early extra petals1* mutant uncovers a role for microRNA 164c in regulating petal number in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 15: 303-315
18. Millar AA, Gubler F (2005) The *Arabidopsis* *GAMYB-like* genes, *MYB33* and *MYB65*, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *Plant Cell* 17: 705-721
19. Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell* 14: 787-799
20. Sunkar R, Zhu J-K (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.104.022830
21. Chiou T-J, Aung K, Lin S-L, Wu Ch-Ch, Chiang S-F, Su Ch-L (2006) Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 412-421
22. Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JDG (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signalling. *Science* 312: 436-439
23. Reyes JL, Chua N-H (2007) ABA induction of miR159 control transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *Plant J* 49: 592-606
24. Axtell MJ, Bartel DP (2005) Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *Plant Cell* 17: 1658-1673
25. Wheeler G, Valoczi A, Havelda Z, Dalmay T (2007) *In situ* detection of animal and plant microRNAs. *DNA & Cell Biol*. 26: 251-255
26. Hirsch J, Lefort V, Vankersschaver M, Boualem A, Lucas A, Thermes C, d'Aubenton-Carafa Y, Crespi M (2006) Characterization of 43 non-protein-coding mRNA genes in *Arabidopsis*, including the *MIR162a*-derived transcripts. *Plant Physiol* 140: 1192-1204
27. Chuck G, Cigan AM, Saeteurn K, Hake S (2007) The heterochronic maize mutant *corngrass1* results from overexpression of tandem microRNA. *Nat Genetics* 39: 544-549 doi:10.1038/ng2001
28. Zhang B, Wang Q, Wang K, Pan X, Liu F, Guo T, Cobb GP, Anderson TA (2007) Identification of cotton microRNAs and their targets. *Gene* 397: 26-37
29. Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC (2005) Expression of *Arabidopsis* *MIRNA* genes. *Plant Physiol* 138: 2145-2154
30. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23: 4051-4060
31. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13: 1097-1101
32. Zhou X, Ruan J, Wang G, Zhang W (2007) Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS Computational Biology* 3: e37 doi:10.1371/journal.pcbi.0030037
33. Fujimori S, Washio T, Higo K, Ohtomo Y, Murakami K, Matsubara K, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Kikuchi S, Tomita M (2003) A novel feature of microsatellites in plants: A distribution gradient along the direction of transcription. *FEBS Lett* 554: 17-22
34. Morgante M, Hanafey M, Powell W (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet* 30: 194-200
35. Molina C, Grotewold E (2005) Genome wide analysis of *Arabidopsis* core promoters. *BMC Genomics* 6: 25
36. Hoffman E, Trusko S, Murphy M, George D (1990) An S1 nuclease-sensitive homopurine/homopyrimidine domain in the c-Ki-ras promoter interacts with a nuclear factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2705-2709
37. Johnson A, Jinno Y, Merlino G (1988) Modulation of epidermal growth factor receptor proto-oncogene transcription by a promoter site sensitive to S1 nuclease. *Mol Cell Biol* 8: 4174-4184
38. Mavrothalassitis G, Watson D, Papas T (1990) Molecular and functional characterization of the promoter of *ETS2*, the human c-ets-2 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1047-1051
39. Lu Q, Wallrath LL, Allan BD, Glaser RL, Lis JT, Elgin SCR (1992) Promoter sequence containing (CT)<sub>n</sub>(GA)<sub>n</sub> repeats is critical for the formation of the DNase I hypersensitive sites in the *Drosophila hsp26* gene. *J Mol Biol* 225: 985-998
40. Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. *Genes and Dev* 16: 1616-1626
41. Zhang B, Pan X, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA (2006) Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant J* 46: 243-259
42. Fattash I, Voß B, Reski R, Hess WR, Frank W (2007) Evidence for rapid expansion of microRNA-mediated regulation in early land plant evolution. *BMC Plant Biology* 7: 13 doi:10.1186/1471-2229-7-13
43. Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Sung G-H, Spatafora JW, Carrington JC (2004) Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* doi:10.1038/ng1478
44. Fang Y, Spector DL (2007) Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants. *Curr Biol* 17: 818-823
45. Han M-H, Goud S, Song L, Fedoroff N (2004) The *Arabidopsis* double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1093-1098
46. Yang L, Liu Z, Lu F, Dong A, Huang H (2006) SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *Plant J* 47: 841-850
47. Song L, Han MH, Lesicka J, Fedoroff N (2007) *Arabidopsis* primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 5437-5442
48. Fujioka Y, Utsumi M, Ohba Y, Watanabe Y (2007) Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 48: 1243-1253
49. Bouche N, Laressesergues D, Gascioli V, Vaucheret H (2006) An antagonistic function for *Arabidopsis* DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *EMBO J* 25: 3347-3356
50. Kurihara Y, Watanabe Y (2004) *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12753-12758
51. Xie Z, Allen E, Wilken A, Carrington JC (2005) DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 12984-12989
52. Chen X (2005) MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett* 579: 5923-5931
53. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118: 57-68
54. Hammond SM (2005) Dicing and slicing. The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett* 579: 5822-5829
55. Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke DW, Ray A (2002) DICER-LIKE1: Blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci* 7: 487-491
56. Jacobsen SE, Running M P, Meyerowitz EM (1999) Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Dev* 126: 5231-5243
57. Kasschau KD, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington JC (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev Cell* 4: 205-217

58. Finnegan EJ, Margis R, Waterhouse PM (2003) Posttranscriptional gene silencing is not compromised in the *Arabidopsis* CARPEL FACTORY (DICER-LIKE1) mutant, a homolog of Dicer-1 from *Drosophila*. *Curr Biol* 13: 236–240
59. Hiraguri A, Itoh R, Kondo N, Nomura Y, Aizawa D, Murai Y, Koiwa H, Seki M, Shinozaki K, Fukuhara T (2005) Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRBfamily dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 57: 173–188
60. Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y (2006) The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* 12: 206–212
61. Lu Ch, Fedoroff N (2000) A mutation in the *Arabidopsis* HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell* 12: 2351–2365
62. Wu F, Yu L, Cao W, Mao Y, Liu Z, He Y (2007) The N-terminal double-stranded RNA binding domains of *Arabidopsis* HYPONASTIC LEAVES1 are sufficient for pre-microRNA processing. *Plant Cell* 19: 914–925
63. Vazquez F, Gascioli V, Cr  t   P, Vaucheret H (2004) The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr Biol* 14: 346–351
64. Lobbes D, Rallapalli G, Schmidt D, Martin C, Clarke J (2006) SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Reports* 7: 1052–1058
65. Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X (2005) Methylation as a crucial step in plant miRNA biogenesis. *Science* 307: 932–935
66. Yang Z, Ebright YW, Yu B, Chen X (2006) HEN1 recognizes 21–24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2'OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res* 34: 667–675
67. Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X (2005) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3' end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 15: 1501–1507
68. Tkaczuk K, Obarska A, Bujnicki JM (2006) Molecular phylogenetics and comparative modeling of HEN1, a methyltransferase involved in plant miRNA biogenesis. *BMC Evolutionary Biology* 6: 6
69. Park MY, Wu G, Gonzales-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3691–3696
70. Gwizdek C, Ossareh-Nazari B, Brownawell AM, Doglio A, Bertrand E, Macara A, Dargemont C (2003) Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J Biol Chem* 278: 5505–5508
71. Rout MP, Aitchison JD (2001) The nuclear pore complex as transport machine. *J Biol Chem* 276: 16593–16596
72. Saito K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC (2005) Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS Biol* 3: e235
73. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* doi:10.1038/nature05983
74. Piriyaopongsa J, Jordan IK (2007) A family of human microRNA genes from miniature inverted-repeat transposable elements. *PLoS ONE* 2: e203
75. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Dangan B, M  ller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408: 86–89
76. Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC (2005) MicroRNA-directed phasing during acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207–221
77. Luciano DJ, Mirsky H, Vendetti NJ, Maas S (2004) RNA editing of a miRNA precursor. *RNA* 10: 1174–1177
78. Gingeras TR (2007) Origin of phenotypes: genes and transcripts. *Genome Research* 17: 682–690

## Plant micro RNA biogenesis

Łukasz Sobkowiak, Bogna Szarzyńska, Zofia Szweykowska-Kulińska 

Department of Gene Expression, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Adam Mickiewicz University, 5 Miedzichodzka St., 60 – 371 Poznan, Poland

 e-mail: zofszwey@amu.edu.pl

**Key words:** micro RNA biogenesis, DCL1, HYL1, SE, HEN1, HASTY

### ABSTRACT

Micro RNAs are 21–24 nt long RNA molecules involved in the regulation of gene expression on mRNA level. Mature miRNA molecules associated with the RNA – induced silencing complex (RISC) guide specifically mRNA cleavage or inhibit the translation. In plants selective mRNA degradation in miRNA-dependent pathway is a widespread mechanism that occurs more frequently than translation inhibition. miRNA precursors, known as pri-miRNA, are processed in several steps to produce mature miRNA molecules. There are several plant proteins involved in miRNA processing: DCL1, HYL1, SE, HEN1 and HASTY. The role of these proteins is discussed.

# Pozacytoplazmatyczny system kontroli jakości u bakterii *Escherichia coli* – rola proteaz i czynników wspomagających zwijanie białek

## STRESZCZENIE

**P**rawidłowe funkcjonowanie pozacytoplazmatycznych białek wymaga ich właściwego zwinięcia po procesie przeniesienia i ulokowania ich w odpowiednim miejscu w obrębie struktur ściany komórkowej. Proces ten jest kontrolowany przez czynniki wspomagające zwijanie i proteazy, stanowiące razem system kontroli jakości. Ich skoordynowane działanie zapewnia właściwe funkcjonowanie komórki w warunkach fizjologicznych i umożliwia przeżycie w warunkach stresowych dla bakterii. W obecnej pracy przedstawiamy zwięzłą charakterystykę funkcjonowania pozacytoplazmatycznego systemu kontroli jakości białek ze szczególnym uwzględnieniem roli proteolizy w zachowaniu komórkowej homeostazy.

## WPROWADZENIE

Proces zwijania białek nie zachodzi spontanicznie w żywych organizmach, lecz jest katalizowany enzymatycznie przez grupę białek określanych łącznie jako czynniki wspomagające zwijanie (ang. *foldin factors*). Do tej grupy należą białka opiekuńcze (ang. *chaperones*), izomerazy peptydyloprolinowe (PPI-azy) oraz oksydoreduktazy disiarczkowe [1]. Ponadto, w zwijaniu niektórych białek błony zewnętrznej mogą uczestniczyć cząsteczki lipopolisacharydu (LPS). W warunkach fizjologicznych te czynniki prowadzą do osiągnięcia przez białko prawidłowej struktury, a błędy występują relatywnie rzadko. Nieprawidłowo zwinięte białka mogą się jednak pojawić w komórce w wyniku następujących zjawisk: (1) spontanicznych lub indukowanych mutacji, które wpływają na zwijanie się polipeptydów; (2) działania na komórkę czynników wywołujących stres (np. podwyższenia temperatury, zmian osmolarności środowiska, zmian pH, czynników redoks); (3) nadmiernej ekspresji zrekombinowanych genów [2]. Obecność białek o błędnej strukturze jest często bardzo szkodliwa dla komórki. W związku z tym organizmy wytworzyły mechanizmy zapobiegające wystąpieniu toksycznych efektów wysokiego poziomu nieprawidłowo zwiniętych białek. Jednym z nich jest odkładanie tego typu białek w formie ciał inkluzyjnych, które, jako element nierozpuszczalny, nie wpływają znacząco na zakłócenia metabolizmu komórki. Przede wszystkim jednak pojawienie się białek o błędnej strukturze jest sygnałem do syntezy białek stresowych, których zadaniem jest przywrócenie prawidłowej struktury (białka opiekuńcze) lub usunięcie nieodwracalnie uszkodzonych białek na drodze proteolizy [2,3].

W cytoplazmie bakterii *Escherichia coli*, modelowej bakterii gramujemnej, kontrola jakości zwijanych polipeptydów jest przeprowadzana przede wszystkim przez białka opiekuńcze oraz proteazy należące do grupy białek stresowych, określanych jako białka szoku termicznego, Hsp (ang. *heat shock proteins*). Główni przedstawiciele tej rodziny białek, białka opiekuńcze DnaK (Hsp70) i GroEL (Hsp60) oraz proteazy Lon i ClpAP, funkcjonują w oparciu o energię uzyskiwaną z hydrolizy ATP. Działanie cytoplazmatycznych białek Hsp zostało obszernie omówione w pracy przeglądowej [4].

Bakteryjne osłony komórkowe składają się u bakterii gramujemnych z błony wewnętrznej (cytoplazmatycznej), periplazmy wraz z mureiną oraz błony zewnętrznej. Ponadto, na zewnątrz ściany komórkowej znajdują się składniki adhezyjne i inwazyjne, pozwalające w sposób specyficzny kolonizować określone nisze ekologiczne. Jest to obszar pierwszego kontaktu komórki z otaczającym środowiskiem i z tego względu stanowi pierwszą barierę ochronną, broniącą bakterię przed czynnikami stresowymi. Z drugiej strony przestrzeń periplazmatyczna, w odróżnieniu od cytoplazmatycznej, jest szczególnie narażona na działanie czynników środowiska, ze względu na relatywnie małą selektywność porowatej błony zewnętrznej. Dlatego też pozacytoplazmatyczna kontrola jakości białek jest niezmiernie istotnym procesem zapewniającym prawidłowe funkcjonowanie komórki i przetrwanie warunków niekorzystnych dla bakterii. Równocześnie periplazma jest przedziałem komórkowym znacznie różniącym

Joanna Skórko-Glonek 

Anna Sobiecka-Szkatuła

Katedra Biochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet Gdański, Gdańsk

Katedra Biochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; tel.: (058) 523 63 85, e-mail: glonek@biotech.ug.gda.pl

Artykuł otrzymano 27 września 2007 r.  
Artykuł zaakceptowano 14 grudnia 2007 r.

**Słowa kluczowe:** periplazma, zwijanie białek, kontrola jakości, warunki stresowe, białka opiekuńcze, proteazy

**Wykaz skrótów:** Ar – aromatyczna reszta aminokwasowa; OMP (ang. *outer membrane protein*) – białko błony zewnętrznej; PDZ (ang. PSD95, DLG, ZO1) – domena występująca m. in. w białkach PSD95, Dlg, ZO1; PPI-azy (ang. *peptidyl prolyl isomerase*) – izomerazy peptydyloprolinowe; X – dowolna reszta aminokwasowa

**Podziękowania:** Autorki pragną podziękować Pani prof. dr hab. Barbarze Lipińskiej za cenne uwagi podczas pisania niniejszej pracy. Praca powstała w trakcie realizacji grantu badawczego BW 1460-5-0107-7

się od cytoplazmy. Podstawowe różnice obejmują: (1) brak ATP, (2) wyższy potencjał utleniający w stosunku do cytoplazmy, (3) ograniczoną ruchliwość białek [5]. W związku z tym w periplazmie zostały wykształcone odrębne systemy zwijania białek i kontroli jakości, dopasowane do specyficznych warunków panujących w tym obszarze.

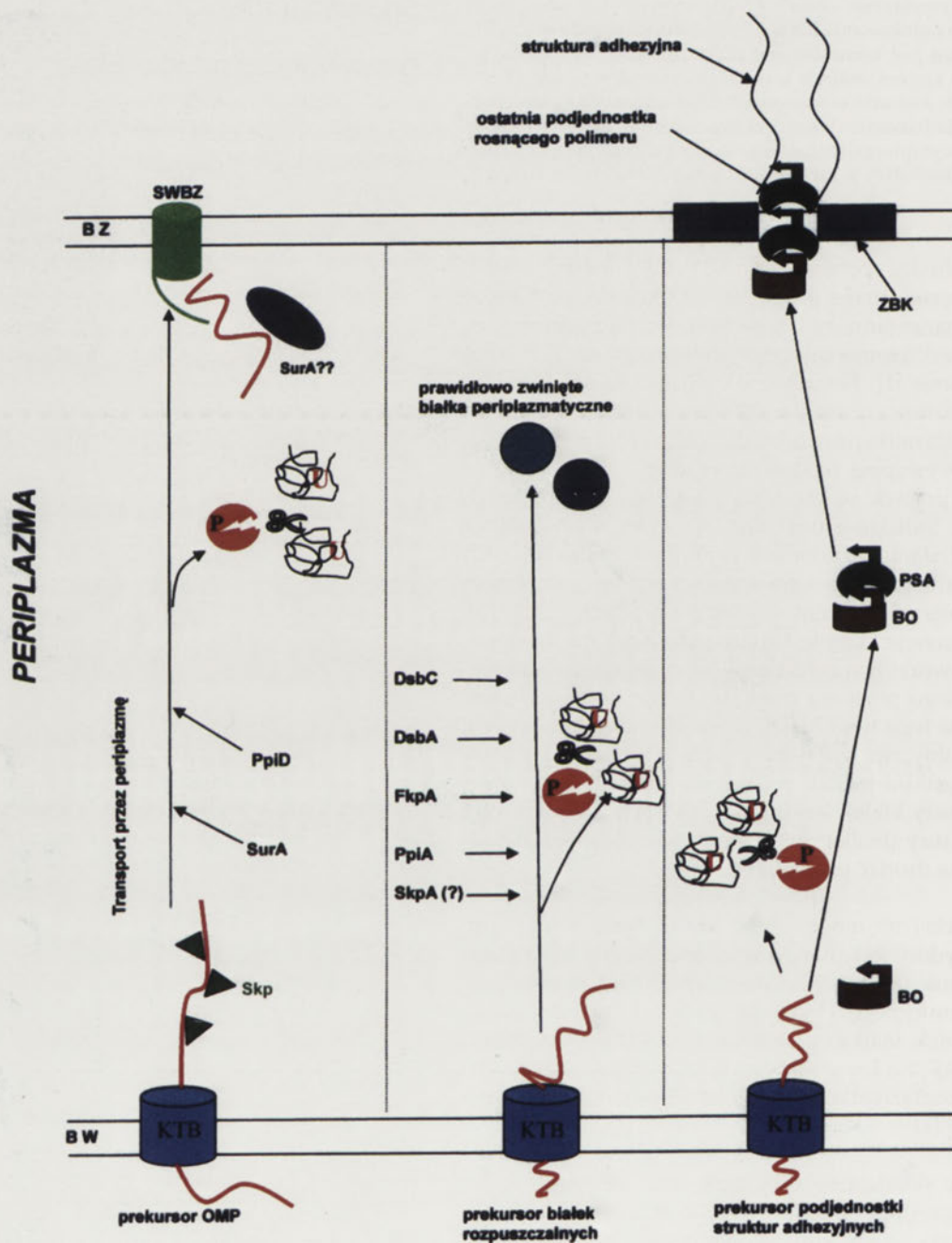
## PERIPLAZMATYCZNE CZYNNIKI WSPOMAGAJĄCE FAŁDOWANIE

Polipeptydy, które zostały przetransportowane przez błonę cytoplazmatyczną, muszą uzyskać prawidłową strukturę, odpowiednie modyfikacje potranslacyjne i ewentualnie utworzyć odpowiednie struktury czwartorzędowe. Po usunięciu peptydu sygnałowego

polipeptyd staje się substratem czynników wspomagających zwijanie (Ryc. 1). Do tej grupy u bakterii *Escherichia coli* należą: (1) oksydoreduktazy disiarczkowe, odpowiedzialne za wprowadzanie prawidłowych mostków disiarczkowych w białkach (DsbA, DsbC, DsbG), (2) izomerazy peptydyloprolinowe (PPI-azy), przeprowadzające izomeryzację *cis-trans* wiązań peptydowych poprzedzających reszty proliny (SurA, PpiA, PpiD, FkpA) oraz (3) białka o charakterze opiekuńczym (Skp, superrodzina PapD) [1]. Oksydoreduktazy disiarczkowe zostały uprzednio obszernie omówione [6], w związku z tym ten aspekt zwijania pozacytoplazmatycznych białek nie będzie w obecnej pracy poruszany.

## IZOMERAZY PEPTYDYLOPROLINOWE

Wiązania peptydowe poprzedzające w polipeptydzie resztę proliny (X-Pro; X-dowolna reszta aminokwasowa) mogą występować jako izomery *cis* lub *trans*. Jednakże w natywnym białku wszystkie wiązania X-Pro muszą przybrać prawidłową formę izomeryczną. Proces ten przeprowadzają enzymy określane jako izomerazy peptydyloprolinowe *cis/trans* (inne nazwy: PPI-azy, rotamerazy). Wszystkie znane PPI-azy można podzielić na trzy klasy: (1) cyklofiliny (białka wrażliwe na cyklosporyny lub białka homologiczne do znanych PPI-az wrażliwych na cyklosporyny); (2) FKBP (białka wiążące lek immunosupresyjny FK506); (3) parwuliny (białka homologiczne do PPI-azy



Rycina 1. Funkcjonowanie pozacytoplazmatycznego systemu kontroli jakości [1,34,67]. Prekursory białek eksportowanych z cytoplazmy są transportowane w poprzek błony wewnętrznej (BW) dzięki działaniu błonowego kompleksu transportującego białka (KTB). W przestrzeni periplazmatycznej stają się one substratami dla czynników wspomagających zwijanie, które zapobiegają agregacji i niespecyficznym oddziaływaniom rozwiniętych polipeptydów (białka o aktywności opiekuńczej, np. Skp, SurA), wprowadzają prawidłowe mostki disiarczkowe (DsbA, DsbC) i przeprowadzają izomeryzację *cis/trans* wiązań X-Pro (PPI-azy). W przypadku białek błony zewnętrznej (OMP) oraz podjednostek struktur adhezyjnych typu „chaperone-usher” (PSA) czynniki te pośredniczą także w transporcie przez periplazmę do błony zewnętrznej (BZ), utrzymując polipeptydy w odpowiedniej strukturze, a następnie przekazują je białkom odpowiedzialnym za ich odpowiednie docelowe umiejscowienie w błonie zewnętrznej (system wprowadzający do błony zewnętrznej – SWBZ) lub dołączenie ich do rosnącego polimeru struktury adhezyjnej (zewnątrz błonowe białko kanałotwórcze – ZBK). Białka, które nie uzyskały prawidłowej struktury mogą zostać zdegradowane przez proteazę (P). Szczegóły opisano w tekście. Pozostałe skróty: BO – białko opiekuńcze specyficzne względem PSA, ?? – znaki zapytania oznaczają, że udział danego białka w przedstawionym procesie nie został w pełni udokumentowany.

z cytoplazmy *E. coli*) [7]. W periplazmie *E. coli* zidentyfikowano cztery PPI-azy: SurA, FkpA, PpiA i PpiD. Poza swoją katalityczną aktywnością, część z tych białek wykazuje cechy białek opiekuńczych i wspomaga proces zwijania polipeptydów, zwłaszcza białek błony zewnętrznej (OMP) [1].

### Białko SurA

SurA jest białkiem należącym do klasy parwulin, wykazującym aktywność PPI-azy i opiekuńczą. Bakterie pozbawione genu *surA* odznaczają się obniżonym poziomem prawidłowo zwiniętych białek błony zewnętrznej, takich jak: LamB, OmpA, OmpC i OmpF, co wskazuje na udział SurA w zwijaniu i oligomeryzacji białek OMP [8,9]. Jednakże nie zaobserwowano żadnego pozytywnego wpływu na zwijanie rozpuszczalnych periplazmatycznych białek, np. białka wiążącego maltozę lub litycznej transglikozylazy [8], co sugerowałoby specyficzność SurA względem OMP. Ostatnio został zidentyfikowany motyw rozpoznawany przez SurA: Ar-X-Ar (Ar-aromatyczna reszta aminokwasowa) [10]. Tego typu sekwencja występuje o wiele częściej w białkach OMP niż w białkach rozpuszczalnych. Dzięki temu powinowactwo SurA do rozwiniętego białka OmpG, zawierającego 13 motywów Ar-X-Ar, i OmpF (7 motywów Ar-X-Ar), jest o rząd wielkości wyższe niż względem nienatywnych białek rozpuszczalnych; białka natywne nie wiążą się z SurA [11]. Specyficzność względem motywu Ar-X-Ar może też tłumaczyć brak wpływu SurA na zwijanie białek błony zewnętrznej innego typu: TolC i autotransportera AIDA. Te białka różnią się znacznie budową od poryn i OmpA i zawierają jedynie jeden lub dwa motywy Ar-X-Ar [1].

W zwijaniu białek OMP najprawdopodobniej główny udział ma aktywność opiekuńcza SurA. W układzie *in vitro* aktywność PPI-azy nie jest wysoka [9]. Bakterie zawierające zmutowaną formę SurA, pozbawioną aktywności PPI-azy, lub nawet SurA z prawie całkowicie usuniętymi domenami PPI-azowymi, nie wykazują istotnych defektów w biogenezie białek OMP. Aktywności PPI-azowa i opiekuńcza są zlokalizowane w odrębnych rejonach białka. Aktywność opiekuńcza przypisana jest dwóm krańcowym domenom: N i C-końcowym, pomiędzy którymi znajdują się dwie 100-aminokwasowe domeny PPI-azowe [12]. Analiza struktury krystalicznej wykazała, że cząsteczka SurA przyjmuje kształt niesymetrycznego dzwonka, w którym I domena PPI-azowa oraz domeny N i C-końcowe tworzą rdzeń, natomiast II domena PPI-azowa jest eksponowana na zewnątrz („trzonek dzwonka”) (Ryc. 2A). Rdzeń zawiera podłużne zagłębienie o wymiarze dobrze dostosowanym do wiązania wydłużonych polipeptydów [13].

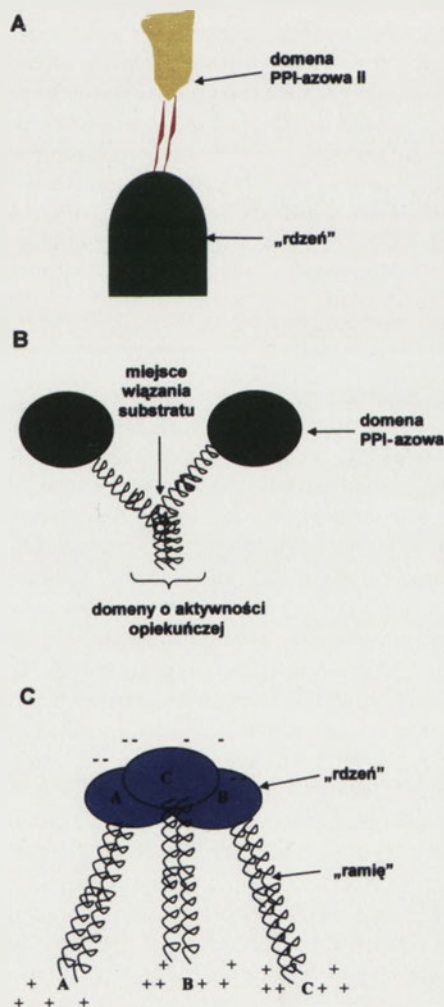
### Białko PpiA

PpiA (RotA) była pierwszą PPI-azą zidentyfikowaną w periplazmie *E. coli*. Jest homologiem cyklofiliny, niewrażliwym na działanie cyklosporyny A [14]. Do chwili obecnej nie wykazano udziału PpiA w zwijaniu białek ściany komórkowej. W przeciwieństwie do fenotypów obserwowanych u bakterii pozbawionych jednego z genów poprzednio omawianych PPI-az, mutacje w genie *ppiA* nie wpływają na poziom białek periplazmatycznych ani błonowych. Także

kinetyka zwijania tych białek nie ulega zaburzeniu w mutantach *ppiA* [15]. Najprawdopodobniej funkcja pełniona przez PpiA jest łatwo zastępowana przez inne periplazmatyczne PPI-azy.

### Białko PpiD

PpiD jest to białko należące do klasy parwulin. Gen *ppiD* został zidentyfikowany jako wielokopijny supresor mutacji typu *null* w genie *surA*. Nadprodukcja PpiD znosi plejotropowe efekty braku SurA. Komórki pozbawione funkcjonalnego genu *ppiD* wykazują zwiększoną wrażliwość na hydrofobowe antybiotyki i detergenty (np. SDS), a także zawierają obniżony poziom białek OMP (OmpF, OmpC, OmpA i LamB). Usunięcie obu genów, *ppiA* i *surA*, jest dla komórki letalne, podczas gdy podwójne mutacje *fkpA ppiD*, *skp ppiD* oraz *ppiA ppiD* są przez bakterie tolerowane [16]. Wskazuje to, że PpiA i SurA pełnią funkcje wzajemnie się zastępujące (ang. *redundant function*). Do chwili obecnej nie wykazano jednak bezpośredniego udziału PpiD w zwijaniu



Rycina 2. Periplazmatyczne czynniki wspomagające zwijanie – schematy budowy. Rysunki wykonano w oparciu o dane zawarte w pikach pdb 1m5y (A), 1q6u, 1q6h (B), 1sg2, 1u2m (C) zawartych w bazie danych NCBI ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). W schemacie budowy białka Skp (C) literami A, B, C oznaczono poszczególne podjednostki budujące trimer.

białek. Nie jest też wiadomo, czy PpiD posiada aktywność opiekuńczą, niezależną od aktywności izomerazy.

### Białko FkpA

Jest to kolejne periplazmatyczne białko zaangażowane w zwijanie polipeptydów. FkpA nie jest niezbędne do przeżycia bakterii, jednakże komórki *E. coli fkp* odznaczają się zwiększoną przepuszczalnością błony zewnętrznej względem antybiotyków i detergentów [17]. FkpA wykazuje dwie niezależne aktywności: opiekuńczą i PPI-azową, zlokalizowane w odrębnych rejonach polipeptydu. W formie natywnej białko to jest homodimerem w kształcie litery V, w którym N-końcowe domeny o aktywności opiekuńczej tworzą złącze, a PPI-azowe domeny C-końcowe są ekspozycyjne na zewnątrz (Ryc. 2B). Zagłębienie utworzone pomiędzy podjednostkami stanowi najprawdopodobniej miejsce wiązania substratu [18]. W przeciwieństwie do SurA, FkpA przejawia aktywność opiekuńczą względem białek rozpuszczalnych i, jak dotąd, nie wykazano jego udziału w biogenezie OMP. Aktywność ta jest niezależna od funkcji PPI-azy, gdyż FkpA wpływa pozytywnie na zwijanie substratów nie zawierających w formie natywnej *cis*-prolin [19]. Także delecja C-końcowej domeny PPI-azowej nie pozbawia FkpA aktywności opiekuńczej [18,20]. FkpA wydajnie przeciwdziała agregacji nadprodukowanych w periplazmie zmutowanych białek lub białek zrekombinowanych [20,21]. Oddziaływanie pomiędzy FkpA a substratami jest najprawdopodobniej przejściowe, gdyż nie wyizolowano stabilnych kompleksów FkpA-substrat [21]. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że FkpA funkcjonuje we wczesnych etapach zwijania periplazmatycznych białek [21,22].

### PERIPLAZMATYCZNE BIAŁKA OPIEKUŃCZE

W periplazmie bakterii gramujemnych nie zostały zidentyfikowane klasyczne białka opiekuńcze, takie jak DnaK lub GroEL. Ze względu na brak ATP w periplazmie, pozycytoplazmatyczne białka opiekuńcze muszą funkcjonować w oparciu o inny mechanizm niż ich cytoplazmatyczne odpowiedniki, w przypadku których hydroliza ATP napędza cykle wiązania i uwalniania substratów. Do chwili obecnej poznano szereg periplazmatycznych białek zaangażowanych w proces zwijania i oligomeryzacji polipeptydów. Wśród nich wyróżniamy białka opiekuńcze specyficzne względem podjednostek budulcowych powierzchniowych adhezyn typu „chaperone-usher” (np. PapD, FimC, DraB) [23], białka opiekuńcze funkcjonujące w niskim pH (HdeA i HdeB) [24,25] oraz białko wykazujące ogólną aktywność opiekuńczą: Skp [1]. Ponadto, stwierdzono aktywność opiekuńczą u innych białek biorących udział w biogenezie periplazmatycznych białek. Należy tu wymienić omawiane uprzednio PPI-azy SurA i FkpA, a także oksydoreduktazy DsbC i DsbG i proteazę HtrA, której charakterystykę przedstawimy w dalszej części pracy [2].

### Białko Skp

Skp (białko 17 kDa) jest to najlepiej scharakteryzowane periplazmatyczne białko opiekuńcze. Jego obecność nie jest niezbędna do przeżycia komórki, jednakże w mutantach

*skp* występuje obniżony poziom prawidłowo zwiniętych białek OMP [26]. Bakterie pozbawione dodatkowo genu *htrA*, kodującego proteazę, wykazują żywotność jedynie w temperaturach poniżej 37°C i gromadzą w periplazmie nietypowe OMP [27]. Szereg badań w układzie *in vivo* i *in vitro* wskazuje na istotną rolę Skp we wczesnych etapach szlaku zwijania białek błony zewnętrznej (Ryc. 1). Najprawdopodobniej białko to oddziałuje z OMP zaraz po ich transporcie, o czym świadczy możliwość usieciowania Skp z białkami OmpA, LamB i PhoE po periplazmatycznej stronie błony wewnętrznej [27,28]. Skp w układzie *in vitro* tworzy stabilne kompleksy z OmpA, dzięki czemu utrzymuje to białko w formie rozpuszczalnej i przeciwdziała jego agregacji lub przedwczesnemu, błędnemu zwijaniu. W procesie zwijania Skp może współdziałać z innym czynnikiem wspomaganym – lipopolisacharydem (LPS). W obecności LPS-u kompleks Skp-OmpA zostaje przekształcony w formę gotową do zwijania, z której OmpA jest w stanie wnikać do pęcherzyków fosfolipidowych [29]. Wynik ten sugeruje udział Skp także w późnych etapach biogenezy OMP, jednakże brak jest danych *in vivo* potwierdzających tę hipotezę. Bakterie pozbawione genu *skp* wykazują jedynie nieznaczne obniżenie poziomu prawidłowo zwiniętych białek OMP w błonie zewnętrznej [26], w związku z tym wykazanie udziału Skp w etapach biogenezy OMP, związanych z ich oligomeryzacją i wnikaniem do błony zewnętrznej, wymaga przeprowadzenia dalszych badań. Skp oddziałuje także z białkami rozpuszczalnymi. Między innymi wydajnie przeciwdziała agregacji lizozymu i fragmentów jednołańcuchowych przeciwciał [30,31].

Budowa Skp odpowiada jego biochemicznym właściwościom. Jest to białko rozpuszczalne występujące w formie trimeru. Jego struktura przypomina „meduzę” z trzema helikalnymi „ramionami” wystającymi z części rdzeniowej o strukturze  $\beta$ -baryłki (Ryc. 2C). Ramiona tworzą komorę, która prawdopodobnie zawiera miejsce wiązania substratu. Rozkład ładunku w cząsteczce Skp nie jest równomierny: wg obliczeń domena rdzeniowa posiada wypadkowy ładunek ujemny, podczas gdy ramiona, a zwłaszcza ich końce i rejon zewnętrzny, odznaczają się pozytywnym ładunkiem. Wnętrze komory zawiera rejon o charakterze hydrofobowym [31,32]. Dipolowy charakter trimeru pozwala mu uzyskać prawidłową orientację i przyłączyć się do ujemnie naładowanej powierzchni błony wewnętrznej, a także ułatwia dostarczenie substratu do błony zewnętrznej. „Ramiona” trimeru nie kontaktują się ze sobą i są dość giętkie, dzięki czemu substraty o różnych rozmiarach mogą się zmieścić wewnątrz komory [1].

Białka opiekuńcze specyficzne względem białek strukturalnych adhezyjnych typu „chaperone-usher” (superrodzina PapD)

Organelle adhezyjne są białkowymi strukturami wyeksponowanymi poza powierzchnię bakterii. Są one homopolimerami, złożonymi z jednego typu podjednostki białkowej (np. fimbrie Dr, antygen F1) lub heteropolimerami zbudowanymi z kilku różnych typów podjednostek białkowych (pile typu 1, pile P). Podjednostki nie są zdolne do spontanicznego zwijania się i nie mogą same uzyskać struktury zdolnej do tworzenia polimeru; do tego procesu wymagają



obecności specjalnego białka opiekuńczego, należącego do superrodziny PapD, selektywnego względem podjednostek struktur adhezyjnych. Bezpośrednio po przeniesieniu do periplazmy podjednostka tworzy rozpuszczalny kompleks z białkiem opiekuńczym (Ryc. 1). Dzięki temu nie dochodzi do agregacji, proteolizy lub niespecyficznej asocjacji podjednostek. W kompleksie z białkiem opiekuńczym podjednostka uzyskuje strukturę gotową do tworzenia polimeru [23,33]. Badania struktury krystalicznej kompleksów podjednostka-białko opiekuńcze oraz podjednostka-podjednostka wykazały, że podjednostki adhezyn typu „chaperone-usher”: pile, fimbrie i układy amorficzne posiadają strukturę immunoglobulinopodobną (ang. *immunoglobulin-like fold*), w której brakuje jednej nici  $\beta$ . W kompleksie białko opiekuńcze-podjednostka ten brak jest uzupełniany przez segment pochodzący od białka opiekuńczego, określany jako nić donorowa (Ryc. 1). W funkcjonalnym układzie adhezyn funkcję nici donorowej pełni wydłużony odcinek N-końcowy przyległej podjednostki [34]. Białko opiekuńcze dostarcza podjednostkę do miejsca tworzenia polimeru i w kontakcie z zewnątrzblonowym białkiem kanałotwórczym (ang. *usher*) dochodzi do uwolnienia podjednostki. Zewnątrzblonowe białko kanałotwórcze umożliwia składanie polimeru i pośredniczy w przeniesieniu podjednostek na powierzchnię komórki [35]. Podczas tworzenia polimeru wydłużony odcinek N-końcowy przybywającej podjednostki zastępuje nić donorową białka opiekuńczego, uzupełniając strukturę immunoglobulinopodobną w ostatniej podjednostce rosnącego polimeru. Opisany proces nosi nazwę mechanizmu wymiany nici donora, jest termodynamicznie korzystny i najprawdopodobniej stanowi siłę napędzającą proces tworzenia polimeru [23].

### Białka opiekuńcze funkcjonujące w niskim pH

Bakterie enteropatogenne w trakcie przemieszczania się w układzie pokarmowym ssaków muszą przetrwać w środowisku soków żołądkowych o wartościach pH w zakresie 1-3. W związku z tym wykształciły one mechanizmy umożliwiające im przeżycie nawet kilku godzin w tych niesprzyjających warunkach. Polegają one na wprowadzeniu zmian metabolicznych, prowadzących do alkalizacji periplazmy i cytoplazmy oraz na indukcji białek pełniących funkcje opiekuńcze. W periplazmie zidentyfikowano dwa białka o charakterze opiekuńczym, HdeA i HdeB, funkcjonujące w zakresie pH odpowiadającym zakwaszeniu soku żołądkowego. Oba białka są wymagane do zapewnienia ochrony komórki bakteryjnej w niskim pH, a bakterie pozbawione genu *hdeA* lub *hdeB* wykazują znaczne obniżenie przeżywalności w pH poniżej 3. Funkcja HdeA i HdeB polega najprawdopodobniej na zapobieganiu agregacji białek w periplazmie w tych warunkach stresowych, ale efektywność ich działania w tym procesie zależy od konkretnych wartości pH środowiska. W pH 2 HdeA jest głównym białkiem opiekuńczym zaangażowanym w utrzymywanie periplazmatycznych białek w formie rozpuszczalnej; w tych warunkach HdeB jest znacznie mniej wydajne. W pH 3 HdeB funkcjonuje bardziej efektywnie niż HdeA. Jednakże w przypadku niektórych substratów do skutecznej ochrony jest wymagane współdziałanie obu białek Hde. Po alkalizacji otoczenia HdeA i HdeB uwalniają substraty, które mogą

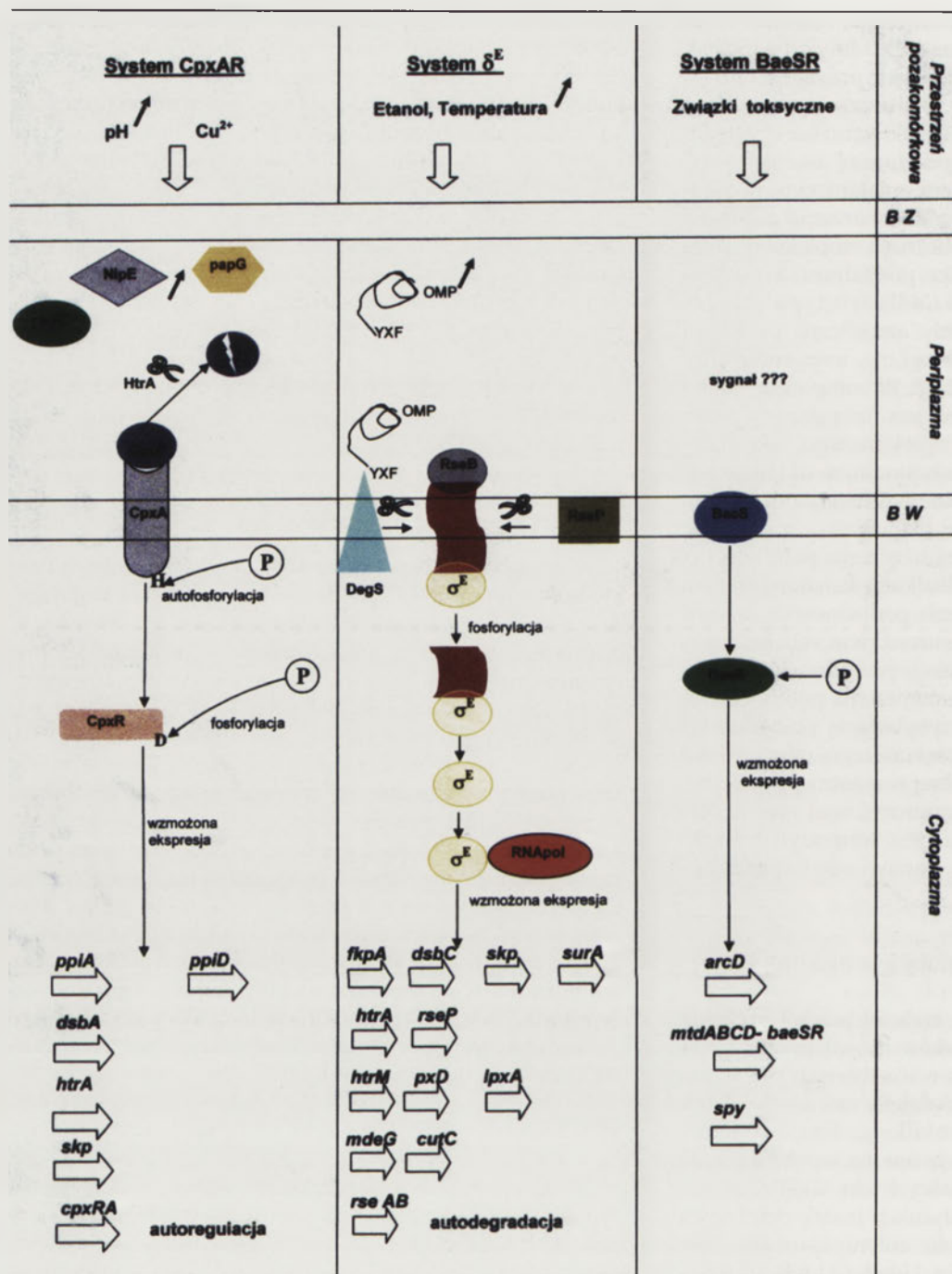
być następnie przejęte przez białka opiekuńcze lub proteazy funkcjonujące w fizjologicznym zakresie pH. W warunkach fizjologicznych HdeA i HdeB nie wykazują aktywności opiekuńczej. Białka Hde odznaczają się wysoce uporządkowaną strukturą, a ich hydrofobowość powierzchniowa jest niewielka. Wskutek zakwaszenia środowiska do wartości pH poniżej 3 białka zmieniają strukturę na nieuporządkowaną, a ich hydrofobowość powierzchniowa znacznie wzrasta. Dopiero w tej formie uzyskują zdolność do wiązania substratów. Ponadto, w środowisku o odczynie zbliżonym do neutralnego oba białka występują w formie dimeru. W wyniku obniżenia pH dochodzi do monomeryzacji. W pH 3 proces ten jest już zakończony w przypadku HdeB, podczas gdy monomeryzacja HdeA jest jeszcze niekompletna. Fakt ten może częściowo wyjaśniać lepsze funkcjonowanie HdeB niż HdeA w pH 3 [24,25].

### SYSTEMY ODPOWIEDZI NA STRES POZACYTOPLAZMATYCZNY

W sytuacji, gdy w periplazmie pojawi się nadmierna ilość błędnie zwiniętych białek, dochodzi do indukcji odpowiedzi stresowej, zaangażowane w ochronę i adaptację struktur ściany komórkowej w warunkach stresogennych: Cpx,  $\sigma^E$  oraz BaeSR [36] (Ryc. 3). W przeciwieństwie do stresu cytoplazmatycznego, gdzie detekcja stresu i odpowiedź zachodzą w tym samym przedziale komórkowym, stres pozacytoplazmatyczny wymaga przekazania sygnału w poprzek błony cytoplazmatycznej. W wyniku działania kaskad przekazujących sygnał dochodzi do wzmożonej ekspresji grupy genów, których produkty są białkami wspomagającymi fałdowanie lub proteazami, a także genów, których produkty są zaangażowane w metabolizm lipidów i lipopolisacharydów. Każdy z wymienionych systemów jest indukowany w odpowiedzi na inny zestaw sygnałów. Razem umożliwiają one prawidłową biogenezę struktur ściany komórkowej poprzez przeciwdziałanie zakłóceniom w zwijaniu periplazmatycznych białek [2].

### SYSTEM CPX

Jest to typowy dwuskładnikowy system przekazywania sygnału, składający się z sensora (CpxA) i regulatora odpowiedzi (CpxR) (Ryc. 3). CpxA jest kinazą histydynową zlokalizowaną w błonie wewnętrznej. Składa się z domeny periplazmatycznej oraz sygnałowej domeny cytoplazmatycznej, oddzielonych od siebie dwiema transbłonowymi helisami. Po odebraniu sygnału stresowego CpxA ulega autofosforylacji, a następnie przenosi resztę fosforanową na resztę asparaginianu w N-końcowej domenie CpxR. Ufosforylowany CpxR aktywuje transkrypcję genów, których produktami są białka zaangażowane w fizjologię ściany komórkowej. Należą do nich: (1) izomerazy peptydyloprolinowe PpiA, PpiD, (2) oksydoreduktaza DsbA, (3) proteaza HtrA, (4) białko opiekuńcze Skp. Szlak Cpx jest aktywowany przez podwyższenie pH, wzrost ciśnienia osmotycznego środowiska, jony miedzi, zmieniony skład błony wewnętrznej i nadprodukcję pewnych białek ściany komórkowej (np. lipoproteiny błony zewnętrznej NlpE lub podjednostek pilin PapE lub PapG) lub w wyniku zaburzeń w biogenezie pili (np. mutacja genu *papD*) [37]. Działanie tego systemu



Rycina 3. Systemy odpowiedzi na stres pozacytoplazmatyczny [1,7,36,44]. Czynniki stresowe oddziałujące na struktury ściany komórkowej indukują trzy różne systemy odpowiedzi: CpxAR,  $\sigma^E$  oraz BaeSR. W obrębie tych systemów można wyróżnić błonowe białko sensorowe, przekazujące sygnał z periplazmy (CpxA, RseA, BaeS), oraz odpowiednie cytoplazmatyczne białko regulacyjne (CpxR,  $\sigma^E$  lub BaeR), odpowiedzialne za wzmoczenie ekspresji określonej grupy genów. Każdy z tych systemów jest indukowany przez różne typy warunków stresowych i reaguje na określony zestaw sygnałów z periplazmy. W przypadku systemu BaeSR czynnik aktywujący kinazę BaeS nie jest znany. Wzrost poziomu białek lub wzrost wartości czynników fizycznych został oznaczony ukośną pogrubioną strzałką. Szczegółowe opisy mechanizmów działania zostały umieszczone w tekście. Oznaczenia skrótów: BZ – błona zewnętrzna, BW – błona wewnętrzna, RNAPol – rdzeń polimerazy RNA, P – reszta fosforanowa.

jest dodatkowo regulowane przez CpxP, małe periplazmatyczne białko. W warunkach fizjologicznych CpxP hamuje działanie systemu Cpx poprzez oddziaływanie z periplazmatyczną sensorową domeną CpxA. W warunkach stresowych dochodzi do uwolnienia CpxA, najprawdopodobniej wskutek hydrolizy CpxP przez proteazę HtrA. CpxP nie jest czynnikiem niezbędnym do przekazywania sygnału, gdyż zarówno przy braku CpxP, jak i przy jego nadprodukcji,

może zachodzić indukcja szlaku Cpx. W związku z tym proponowana funkcja inhibitora CpxP polega na zabezpieczeniu domeny sensorowej CpxA przed przedwczesną aktywacją przy niskim poziomie sygnałów stresowych [38].

#### SYSTEM $\sigma^E$

Jest to system odpowiedzi na stres pozacytoplazmatyczny zależny od alternatywnej podjednostki o polimerazy RNA ( $\sigma^E$ ), indukowany przede wszystkim przez szok termiczny, zakłócenia w zwijaniu białek błony zewnętrznej, a także przez etanol. W komórkach pozbawionych białek zaangażowanych w biogenezę OMP (SurA, Skp, FkpA) lub nadprodukujących OMP (zwłaszcza LamB lub OmpF), obserwuje się wzrost ekspresji regulonu  $\sigma^E$  [1]. W warunkach fizjologicznych aktywność  $\sigma^E$  jest negatywnie regulowana przez czynnik anty-sigma, białko błony wewnętrznej RseA oraz przez białko periplazmatyczne RseB. W momencie pojawienia się sygnału (błędnie zwinięte OMP) RseA ulega degradacji przez proteazę DegS oraz proteazę RseP (YaeL, EcfE), co skutkuje uwolnieniem  $\sigma^E$ . Umożliwia to połączenie się z rdzeniem polimerazy RNA i kierowanie transkrypcją własnego regulonu. Proteaza DegS uważana jest za sensor „wyczuwający” obecność błędnie zwiniętych OMP. Jest to transbłonowe białko, zbudowane z N-końcowej domeny błonowej, centralnej domeny proteolitycznej i C-końcowej domeny PDZ eksponowanej do periplazmy. W warunkach fizjologicznych aktywność proteolityczna tego białka jest hamowana przez domeny PDZ, najprawdopodobniej wskutek bezpośredniego oddziaływania między domeną proteolityczną a PDZ. Domeny PDZ rozpoznają także i wiążą peptydy zawierające C-końcowe sekwencje aminokwasowe Y-X-F. Wskutek tego oddziaływania dochodzi do zmian strukturalnych w

olitycznej i C-końcowej domeny PDZ eksponowanej do periplazmy. W warunkach fizjologicznych aktywność proteolityczna tego białka jest hamowana przez domeny PDZ, najprawdopodobniej wskutek bezpośredniego oddziaływania między domeną proteolityczną a PDZ. Domeny PDZ rozpoznają także i wiążą peptydy zawierające C-końcowe sekwencje aminokwasowe Y-X-F. Wskutek tego oddziaływania dochodzi do zmian strukturalnych w

rejonie centrum katalitycznego, prowadzących do aktywacji proteazy [39]. Motyw Y-X-F jest charakterystyczny dla końca C poryn błony zewnętrznej i w prawidłowo zwiniętych OMP jest niedostępny, gdyż stanowi część struktury  $\beta$ -baryłki, zanurzonej w dwuwarstwowej lipidowej. Pojawienie się wyeksponowanych sekwencji Y-X-F świadczy więc o zaburzeniach w biogenezie białek OMP, co stanowi sygnał do indukcji systemu  $\sigma^E$ . Aktywna proteaza DegS przecina RseA, które jest następnie trawione przez RseP, co prowadzi do uwolnienia z błony kompleksu  $\sigma^E$ -cytoplazmatyczna domena RseA. Do uwolnienia  $\sigma^E$  dochodzi po całkowitym strawieniu cytoplazmatycznego fragmentu RseA przez cytoplazmatyczną proteazę, np. ClpXP [1,40]. Dodatkowym elementem regulującym indukcję systemu  $\sigma^E$  jest białko RseB. Oddziałuje ono z periplazmatyczną domeną RseA i w ten sposób hamuje degradację RseA zarówno przez DegS, jak i przez RseP [41]. Dokładna rola, jaką odgrywa RseB w aktywacji systemu  $\sigma^E$ , nie została jeszcze poznana. Zmutowane bakterie *E. coli rseB* wykazują jedynie nieznaczny wzrost ekspresji genów, które są zależne od  $\sigma^E$ . Ponadto, mechanizm prowadzący do uwolnienia RseA od oddziaływania z RseB nie został wyjaśniony. Przeprowadzone badania sugerują, że ani wzrost temperatury do 50°C, ani obecność błędnie zwiniętych białek w periplazmie nie zapobiega wiązaniu RseB do RseA. Być może pojawienie się innych cząsteczek, np. periplazmatycznych lipidów, lipoprotein lub zmodyfikowanego lipolisacharydu jest sygnałem regulującym aktywność RseB [41]. Regulon  $\sigma^E$  obejmuje co najmniej 40 genów, których produkty są, między innymi, białkami zaangażowanymi w zwijanie białek ściany komórkowej (FkpA, DsbC, Skp, SurA) i biogenezę lipolisacharydu (HtrM, LpxD, LpxA), proteazami (HtrA, RseP), białkami sensorowymi (MdoG, CutC) i regulatorowymi (RseA, RseB) oraz regulatorami transkrypcji ( $\sigma^{32}$ ,  $\sigma^E$ ) [42,43]. Trzeba jednakże zaznaczyć, że fizjologiczna rola wielu genów regulonu  $\sigma^E$  nie została jeszcze poznana.

#### SYSTEM BaeSR

Jest to najpóźniej odkryty i najmniej poznany system odpowiedzi na stres pozacytoplazmatyczny. W jego skład wchodzi dwa błonowe białka: kinaza histydynowa BaeS i regulator odpowiedzi BaeR. System ten zapewnia bakteriom zwiększoną odporność na pewne typy toksycznych związków, takich jak: nowobiocyna, antybiotyki laktamowe, a także indol, poprzez indukcję syntezy przynajmniej dwóch typów pomp usuwających z komórki trucizny [36]. System BaeSR bezpośrednio reguluje ekspresję trzech regulonów: *arcD*, *mdtABCD-baeSR* oraz *spy*. ArcD i MdtABC należą do rodziny białek transportujących (ang. *multidrug transporters*), odgrzewającej główną rolę w zapewnianiu bakteriom gramujemnym odporności na szeroki zakres szkodliwych substancji. Funkcja białka Spy, indukowanego podczas sferoplastyzacji, jest nieznana. Ponadto, nadprodukcja białka BaeR powoduje aktywację około 50 innych genów, jednakże ich produkty nie są bezpośrednio zaangażowane w periplazmatyczny system kontroli jakości białek [44].

Każdy z omawianych systemów odpowiedzi stresowej pełni w periplazmie odrębną funkcję i zasadniczo jest in-

dukowany przez inny rodzaj sygnału stresowego. Funkcjonowanie tych szlaków nakłada się jedynie w niewielkim stopniu i prawdopodobnie służy lepszej ochronie bakterii przed skutkami pojawiającego się stresu.

#### PROTEOLIZA JAKO ELEMENT SYSTEMU KONTROLI JAKOŚCI

Białka, które ulegają przeniesieniu do przestrzeni periplazmatycznej, muszą szybko uzyskać prawidłową strukturę lub związać się z białkami opiekuńczymi. W przeciwnym razie mogą związać się z niewłaściwymi partnerami (co często jest toksyczne dla komórki) lub ulec agregacji. Procesom tym przeciwdziałają enzymy proteolityczne (Ryc. 1). Podobnie jak periplazmatyczne białka opiekuńcze, proteazy funkcjonują w oparciu o mechanizmy niezależne od hydrolizy ATP i są różne od cytoplazmatycznych proteaz, takich jak Lon lub Clp, które wymagają energii zmagazynowanej w ATP do swojego działania. W periplazmie zidentyfikowano ponad 10 proteaz, wśród których wiodącą rolę w usuwaniu błędnie zwiniętych białek odgrywa HtrA. Dokładna charakterystyka białka HtrA została przedstawiona w pracy przeglądowej [45], w związku z tym w obecnej pracy skupimy się jedynie na udziale HtrA w periplazmatycznym systemie kontroli jakości.

#### PROTEAZA HtrA

HtrA (DegP, Do) jest proteazą serynową zlokalizowaną po periplazmatycznej stronie błony wewnętrznej [46]. Jest to białko indukowane w warunkach stresowych, obejmujących szok termiczny [47], stres utleniający [48], stres redukujący [49] oraz inne czynniki powodujące powstawanie błędnie zwiniętych białek w osłonach komórkowych. Główną funkcją HtrA jest usuwanie nieodwracalnie uszkodzonych białek. W mutantach *htrA* dochodzi do stabilizacji białek fuzyjnych lub zrekombinowanych, eksportowanych do periplazmy [50]. Ponadto, nadprodukcja pewnych zmutowanych białek (np. OmpF niezdolnego do insercji do błony zewnętrznej) jest letalna w komórkach pozbawionych HtrA [51]. Komórki bakteryjne *E. coli htrA* poddane szokowi termicznemu zawierają znacznie wyższy poziom zagregowanych termicznie białek w porównaniu ze szczepem niezmutowanym. Ponadto, brak HtrA znacznie wydłuża czas usuwania agregatów białkowych po powrocie bakterii do warunków fizjologicznych. W szczepie niezmutowanym zagregowane białka są usuwane w ciągu 10 minut, podczas gdy w *E. coli htrA* agregaty pozostają nawet po 30-minutowym okresie inkubacji [52].

HtrA jest endoproteazą, hydrolizującą przede wszystkim wiązania peptydowe następujące po resztach hydrofobowych aminokwasów Val lub Ile [53]. Reszty te najczęściej są zlokalizowane w hydrofobowym rdzeniu zwiniętego białka. W związku z tym polipeptyd może stać się substratem dla HtrA dopiero po częściowym rozwinięciu. Proteaza HtrA zbudowana jest z N-końcowej domeny proteolitycznej i dwóch C-końcowych domen PDZ. HtrA rozpoznaje swoje substraty najprawdopodobniej za pomocą domeny PDZ1 [54].

Ostatnio opublikowane wyniki badań wskazują, że HtrA oprócz aktywności proteolitycznej posiada także

aktywność opiekuńczą. Wykazano, że w niskich temperaturach (28°C i poniżej) HtrA może uczestniczyć w zwijaniu periplazmatycznej  $\alpha$ -amylazy MalS. W wyższej temperaturze (37°C i powyżej) przeważa aktywność proteolityczna HtrA, a zwijanie MalS jest zależne od oksydoreduktazy DsbA [55]. Zaproponowano temperaturowo zależny mechanizm przełączania aktywności opiekuńczej i proteolitycznej. W niskich temperaturach aktywność proteolityczna HtrA jest bardzo niska, natomiast obecna jest aktywność opiekuńcza i białko to może uczestniczyć w zwijaniu polipeptydów. W temperaturach powyżej 37°C dominuje aktywność proteolityczna i HtrA degraduje białka o nieprawidłowej strukturze [56]. Brak aktywności proteolitycznej w niskich temperaturach można wytłumaczyć w oparciu o analizę struktury krystalicznej HtrA. Okazuje się, że dostęp do centrum katalitycznego jest w tych warunkach ograniczony przez trzy oddziałujące ze sobą pętle, ponadto dziura oksyanionu jest niekompletna. Uaktywnienie proteazy wymaga więc zmian strukturalnych, wywoływanych najprawdopodobniej wzrostem temperatury [57]. Aktywność opiekuńcza HtrA jest niezależna od jego aktywności proteolitycznej. Pozbawienie HtrA aktywności proteolitycznej wskutek mutacji w centrum katalitycznym (HtrAS210A) nie ma wpływu na jego zdolność do zwijania MalS *in vivo* i *in vitro* [55]. Wiązanie substratu w przypadku aktywności opiekuńczej odbywa się w innym rejonie białka niż w przypadku aktywności proteolitycznej i nie wymaga obecności domen PDZ. Białko HtrA pozbawione obu domen PDZ nadal wykazuje aktywność opiekuńczą [54].

Zdolność HtrA do aktywnego zwijania białek została wykazana *in vivo* jak dotąd jedynie wobec MalS (jedyny fizjologiczny substrat dla HtrA jako białka opiekuńczego). Więcej jest doniesień opisujących inną funkcję opiekuńczą HtrA – zapobieganie agregacji białek o nieprawidłowej strukturze. Wysoki poziom proteolitycznie nieaktywnego HtrAS210A zapewnia przeżywalność bakteriom nadprodukcującym zmutowane białka Omp (OmpC, OmpF). HtrA nie zwiększa jednak efektywności zwijania białek OMP, lecz zapobiega toksyczności tych białek poprzez ich wiązanie [51,58]. Uzyskane ostatnio wyniki wskazują, że HtrA może wykazywać aktywność opiekuńczą także w warunkach szoku termicznego. Wysoki poziom HtrAS210A znosi fenotyp temperaturowrażliwości mutantu *htrA* i równocześnie skutecznie zapobiega tworzeniu agregatów białek zdenaturowanych termicznie [59]. W związku z tym wydaje się, że rola HtrA w ochronie bakterii przed skutkami szoku termicznego może polegać nie tylko na degradowaniu zdenaturowanych białek, lecz także na eliminowaniu polipeptydów, wykazujących tendencję do agregacji, poprzez ich wiązanie. Dzięki temu nie dochodzi do nasilenia się procesu agregacji do poziomu szkodliwego dla komórki.

## INNE PROTEAZY

Pozostałe proteazy periplazmatyczne i błonowe są znacznie mniej poznane i ich fizjologiczne funkcje nie zostały w pełni określone. Potencjalnie zaangażowane w kontrolę jakości mogą być białka Prc, Ptr i OmpT, gdyż proteoliza zrekombinowanych białek jest znacznie obniżona w szczepie *htrA prc ptr ompT* w stosunku do szczepu niosącego mutację jedynie w genie *htrA* [60].

## Proteaza Tsp

Tsp (ang. *tail specific protease*) (Prc) jest to endoproteaza selektywna względem białek eksponujących niepolarne odcinki C-końcowe, a zwłaszcza sekwencję: A (lub L)-A (lub Y)-A. Tego typu sekwencje nie występują naturalnie w białkach, mogą natomiast być do nich dołączone w wyniku działania systemu znakującego te polipeptydy, które są produktami translacji uszkodzonych mRNA. W tym systemie do końca C nieprawidłowego białka są dołączane peptydy zawierające sekwencję AANDENYALAA [61]. Dojrzałe białko Tsp jest polipeptydem składającym się z 660 reszt aminokwasowych (75 kDa). W formie natywnej jest ono monomerym [62]. Centrum katalityczne zawiera Ser<sub>430</sub> odpowiedzialną za nukleofilowy atak na wiązanie peptydowe, oraz Lys<sub>455</sub> i Asp<sub>441</sub>. Najprawdopodobniej Tsp przeprowadza hydrolizę wiązania peptydowego w oparciu o mechanizm analogiczny do opisanego dla LexA i peptydaz sygnałowych typu I [63]. Reszty aminokwasowe 217-301 tworzą domenę PDZ, która jest odpowiedzialna za wiązanie się z C-końcowymi resztami aminokwasowymi substratu. Ponieważ domena PDZ nie kontaktuje się bezpośrednio z centrum katalitycznym, zaproponowano dwuetapowy mechanizm proteolizy: (1) substrat jest najpierw wiązany przez domenę PDZ, (2) trawienie następuje dopiero wtedy, gdy wiązanie peptydowe substratu jest odpowiednio dostępne dla centrum aktywnego [64].

Tsp jest proteazą istotną dla prawidłowego funkcjonowania komórki bakteryjnej, zwłaszcza w warunkach stresowych. Bakterie zmutowane w genie *prc* nie tworzą kolonii na pożywce bogatej w sól (stres osmotyczny) w 42°C i w tych warunkach filamentują. Wykazują ponadto osłabioną odpowiedź na stres termiczny i wyciekanie białek z periplazmy. Tsp jest także wymagane do dojrzewania białka wiążącego penicylinę (PB3), polegającego na usuwaniu 11-aminokwasowego odcinka z końca C białka [64].

## Proteaza Ptr

Ptr (Pi, proteaza III) jest metaloproteazą, wykazującą aktywność względem niewielkich polipeptydów (np. insuliny, glukagonu, fragmentów  $\beta$ -galaktozydazy). Wyniki badań wskazują, że Prc rozpoznaje także większe białka o nie naturalnej strukturze, gdyż jest zdolne do degradacji białka fuzyjnego (białko A- $\beta$ -laktamaza) w układzie *in vivo*. Usunięcie genu *ptr* nie powoduje wyraźnych zaburzeń wzrostu bakterii; funkcja pełniona przez tę proteazę może być więc łatwo przejmowana przez inne białko [5].

## Proteaza OmpT

Jest to proteaza błony zewnętrznej, specyficzna względem wiązań peptydowych łączących dwie reszty aminokwasów zasadowych (np. R-R, R-K). Dokładna funkcja biologiczna OmpT nie została poznana, są jednak doniesienia wskazujące, że dostęp do centrum katalitycznego OmpT znajduje się od strony pozakomórkowej błony zewnętrznej [65]. W związku z tym udział OmpT w periplazmatycznym systemie kontroli jakości jest dyskusyjny. Uważa się raczej, że OmpT jest elementem mechanizmu adaptacyjnego bakterii podczas patogenezy oraz pełni funkcje obronne

poprzez degradację przeciwbakteryjnych peptydów (np. protaminy) [66].

## UWAGI KOŃCOWE

Prawidłowo funkcjonujący pozacytoplazmatyczny system kontroli jakości zapewnia bakteriom przeżywalność w stale zmieniających się warunkach zewnętrznych, zapewnia zdobywanie różnorodnych środowisk, umożliwia wirulencję i wytworzenie biofilmu. Mimo tak istotnej roli system ten jest ciągle stosunkowo mało poznany. Nadal nie są znane źródła energii napędzające reakcje związania białek ściany komórkowej lub reakcje rozwijania białek z agregatów. Dokładne poznanie funkcjonowania elementów tego systemu może pomóc w zrozumieniu mechanizmów patogenyzy i ułatwić opracowanie skuteczniejszych sposobów walki ze szkodliwymi bakteriami.

## PIŚMIENNICTWO

1. Mogensen JE, Otzen DE (2005) Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol Microbiol* 57: 326-346
2. Miot M, Betton JM (2004) Protein quality control in the bacterial periplasm. *Microbial Cell Fact* 3: 4-15
3. Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286: 1888-1893
4. Kędzierska S (2005) Rola białek opiekuńczych *Escherichia coli* w ochronie komórki bakteryjnej przed nieodwracalną agregacją białek indukowaną termicznie. *Postepy Biochem* 51: 146-153
5. Oliver DB (1996) *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt FC, Curtiss R (red) Periplasm, ASM Press, Washington DC, USA, str 88-101
6. Skórko-Głonek J, Sobiecka A (2005) Periplazmatyczne oksydoreduktazy disiarczkowe bakterii *Escherichia coli* – budowa i funkcja. *Postepy Biochem* 51: 459-67
7. Duguay A, Silhavy TJ (2004) Quality control in the bacterial periplasm. *Biochim Biophys Acta* 1694: 121-134
8. Lazar SW, Kolter R (1996) SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J Bacteriol* 178: 1770-1773
9. Rouvière PE, Gross CA (1996) SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev* 10: 3170-3182
10. Bitto E, McKay DB (2003) The periplasmic molecular chaperone protein SurA binds a peptide motif that is characteristic of integral outer membrane proteins. *J Biol Chem* 278: 49316-49322
11. Bitto E, McKay DB (2004) Binding of phage-display-selected peptides to the periplasmic chaperone protein SurA mimics binding of unfolded outer membrane proteins. *FEBS Lett* 568: 94-98
12. Behrens S, Maier R, de Cock H, Schmid FX, Gross CA (2001) The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions *in vivo* and has chaperone activity. *EMBO J* 20: 285-294
13. Bitto E, McKay DB (2002) Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins. *Structure* 10: 1489-1498
14. Liu J, Walsh CT (1990) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase from *Escherichia coli*: a periplasmic homolog of cyclophilin that is not inhibited by cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4028-4032
15. Kleerebezem M, Heutink M, Tomassen J (1995) Characterization of an *Escherichia coli* rotA mutant, affected in periplasmic peptidyl-prolyl cis/trans isomerase. *Mol Microbiol* 18: 313-320
16. Dartigalongue C, Raina S (1998) A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J* 17: 3968-3980
17. Missiakas D, Betton JM, Raina S (1996) New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Mol Microbiol* 21: 871-884
18. Saul FA, Arie JP, Vulliez-le Normand B, Kahn R, Betton JM, Bentley GA (2004) Structural and functional studies of FkpA from *Escherichia coli*, a cis/trans peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity. *J Mol Biol* 335: 595-608
19. Bothmann H, Pluckthun A (2000) The periplasmic *Escherichia coli* peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. I. Increased functional expression of antibody fragments with and without cis-prolines. *J Biol Chem* 275: 17100-17105
20. Arie JP, Sassoon N, Betton JM (2001) Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 39: 199-210
21. Ramm K, Pluckthun A (2000) The periplasmic *Escherichia coli* peptidyl-prolyl cis,trans-isomerase FkpA. II. Isomerase-independent chaperone activity *in vitro*. *J Biol Chem* 275: 17106-17113
22. Ramm K, Pluckthun A (2001) High enzymatic activity and chaperone function are mechanistically related features of the dimeric *E. coli* peptidyl-prolyl-isomerase FkpA. *J Mol Biol* 310: 485-498
23. Piątek R, Zalewska B, Bury K, Kur J (2005) The chaperone-usher pathway of bacterial adhesion biogenesis – from molecular mechanism to strategies of anti-bacterial prevention and modern vaccine design. *Acta Biochim Polon* 52: 639-646
24. Hong W, Jiao W, Hu J, Zhang J, Liu C, Fu X, Shen D, Xia B, Chang Z (2005) Periplasmic protein HdeA exhibits chaperone-like activity exclusively within stomach pH range by transforming into disordered conformation. *J Biol Chem* 280: 27029-27034
25. Kern R, Malki A, Tagourt JAJ, Richarme G (2007) *Escherichia coli* HdeB is an acid stress chaperone. *J Bacteriol* 189: 603-610
26. Chen R, Henning U (1996) A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively binds a class of outer membrane proteins. *Mol Microbiol* 19: 1287-1294
27. Schafer U, Beck K, Muller M (1999) Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J Biol Chem* 274: 24567-24574
28. Harms N, Koningstein G, Dontje W, Muller M, Oudega B, Luirink J, de Cock H (2001) The early interaction of the outer membrane protein PhoE with the periplasmic chaperone Skp occurs at the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* 276: 18804-18811
29. Bulieris PV, Behrens S, Holst O, Kleinschmidt JH (2003) Folding and insertion of the outer membrane protein OmpA is assisted by the chaperone Skp and by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 278: 9092-9099
30. Bothmann H, Pluckthun A (1998) Selection for a periplasmic factor improving phage display and functional periplasmic expression. *Nat Biotechnol* 16: 376-380
31. Walton TA, Sousa MC (2004) Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation. *Mol Cell* 15: 367-374
32. Korndorfer IP, Dommel MK, Skerra A (2004) Structure of the periplasmic chaperone Skp suggests functional similarity with cytosolic chaperones despite differing architecture. *Nat Struct Mol Biol* 11: 1015-1020
33. Barnhart MM, Pinkner JS, Soto GE, Sauer FG, Langermann S, Waxman G, Frieden C, Hultgren SJ (2000) PapD-like chaperones provide the missing information for folding of pilin proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7709-7714
34. Vetsch M, Puorger C, Spirig T, Grauschopf U, Weber-Ban E, Glockshuber R (2004) Pilus chaperones represent a new type of protein-folding catalyst. *Nature* 431: 329-332
35. Saulino ET, Bullitt E, Hultgren SJ (2000) Snapshots of usher-mediated protein secretion and ordered pilus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9240-9245
36. Raivio TL (2005) Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol* 56: 1119-1128
37. Dorel C, Lejeune P, Rodrigue A (2006) The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? *Res Microbiol* 157: 306-314

38. Buelow DR, Raivio TL (2005) Cpx signal transduction is influenced by a conserved N-terminal domain in the novel inhibitor CpxP and the periplasmic protease DegP. *J Bacteriol* 187: 6622-6630
39. Kim DY, Kim KK (2005) Structure and function of HtrA family proteins, a key players in protein quality control. *J Biochem Mol Biol* 38: 266-274
40. Akiyama Y, Kanehara K, Ito K (2004) RseP (YaeL), an *Escherichia coli* RIP protease, cleaves transmembrane sequences. *EMBO J* 23: 4434-4442
41. Cezairliyan BO, Sauer RT (2007) Inhibition of regulated proteolysis by RseB. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 3771-3776
42. Dartigalongue C, Missiakas D, Raina S (2001) Characterization of the *Escherichia coli*  $\sigma^F$  regulon. *J Biol Chem* 276: 20866-20875
43. Redford P, Welch RA (2006) Role of sigma E-regulated genes in *Escherichia coli* uropathogenesis. *Infect Immun* 74: 4030-4038
44. Nishino K, Honda T, Yamaguchi A (2005) Genome-wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system. *J Bacteriol* 187: 1763-1772
45. Żurawa-Janicka D, Narkiewicz J, Lipińska B (2007) Charakterystyka białek z rodziny HtrA. *Postepy Biochem* 53: 27-36
46. Skórko-Głonek J, Lipińska B, Krzewski K, Zolese G, Bertoli E, Tanfani F (1997) HtrA heat-shock protease interacts with phospholipid membranes and undergoes conformational changes. *J Biol Chem* 272: 8974-8982
47. Lipińska B, Fayet O, Baird L, Georgopoulos C (1989) Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli* htrA gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J Bacteriol* 171: 1574-1584
48. Skórko-Głonek J, Żurawa D, Kuczwała E, Woźniak M, Wypych Z, Lipińska B (1999) *Escherichia coli* heat shock HtrA protease participates in the defense against oxidative stress. *Mol Gen Genet* 262: 342-350
49. Skórko-Głonek J, Żurawa D, Tanfani F, Scire A, Wawrzynów A, Narkiewicz J, Lipińska B (2003) The N-terminal region of HtrA heat shock protease from *Escherichia coli* is essential for stabilization of HtrA primary structure and maintaining of its oligomeric structure. *Biochim Biophys Acta* 1649: 171-182
50. Pallen BW, Wren MJ (1997) The HtrA family of serine proteases. *Mol Microbiol* 26: 209-221
51. Misra R, CastilloKeller M, Deng M (2000) Overexpression of protease-deficient DegP(S210A) rescues the lethal phenotype of *Escherichia coli* OmpF assembly mutants in a degP background. *J Bacteriol* 182: 4882-4888
52. Laskowska E, Kuczyńska-Wiśnik D, Skórko-Głonek J, Taylor A (1996) Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA of *Escherichia coli* proteins intracellularly aggregated by heat shock: HtrA protease action *in vivo* and *in vitro*. *Mol Microbiol* 22: 555-571
53. Kolmar H, Waller PRH, Sauer RT (1996) The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrates conformation. *J Bacteriol* 178: 5925-5929
54. Iwanczyk J, Damjanovic D, Kooistra J, Leong V, Jomaa A, Ghirlando R, Ortega J (2007) Role of the PDZ domains in *Escherichia coli* DegP protein. *J Bacteriol* 189: 3176-3186
55. Spiess C, Beil A, Ehrmann M (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97: 339-347
56. Clausen T, Southan C, Ehrmann M (2002) The HtrA Family of Proteases: Implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell* 10: 443-455
57. Krojer T, Garrido-Franco M, Huber R, Ehrmann M, Clausen T (2002) Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature* 416: 455-459
58. CastilloKeller M, Misra R (2003) Protease-deficient DegP suppress lethal effect of a mutant OmpC protein by its capture. *J Bacteriol* 185: 148-154
59. Skórko-Głonek J, Laskowska E, Sobiecka-Szkatuła A, Lipińska B (2007) Characterization of the chaperone-like activity of HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* under the conditions of heat shock. *Arch Biochem Biophys* 464: 80-89
60. Meerman HJ, Georgiou G (1994) Construction and characterization of a set of *E. coli* strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Biotechnology (NY)* 12: 1107-1110
61. Keiler KC, Sauer RT (1996) Sequence determinants of C-terminal substrate recognition by the Tsp protease. *J Biol Chem* 271: 2589-2593
62. Silber KS, Keiler KC, Sauer RT (1992) Tsp: a tail specific protease that selectively degrades proteins with nonpolar C termini. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 295-299
63. Keiler KC, Sauer RT (1995) Identification of active site residues of the Tsp protease. *J Biol Chem* 270: 28864-28868
64. Keiler KC, Sauer RT (2004) Tsp protease, W: Barret AJ, Rawlins ND, Woessner JF (red) Handbook of proteolytic enzymes, t II. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, str. 2027-2028
65. Kramer RA, Vandeputte-Rutten L, de Roon GJ, Gros P, Dekker N, Egmont MR (2001) Identification of essential acidic residues of outer membrane protease OmpT supports a novel active site. *FEBS Lett* 505: 426-430
66. Dekker N (2004) Omptin, W: Barret AJ, Rawlins ND, Woessner JF (red) Handbook of proteolytic enzymes. t II. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, str. 2027-2028
67. Bos MP, Tommassen J (2004) Biogenesis of the Gram-Negative bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol* 6: 610-616

## The extracytoplasmic protein quality control in bacterium *Escherichia coli*; the role of proteases and the folding factors

Joanna Skórko-Głonek<sup>✉</sup>, Anna Sobiecka-Szkatuła

University of Gdansk, Insitute of Biology, Department of Biochemistry, 24 Kładki St., 80-822 Gdansk, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: glonek@biotech.ug.gda.pl

**Key words:** periplasm, protein folding, quality control, stress conditions, chaperones, proteases

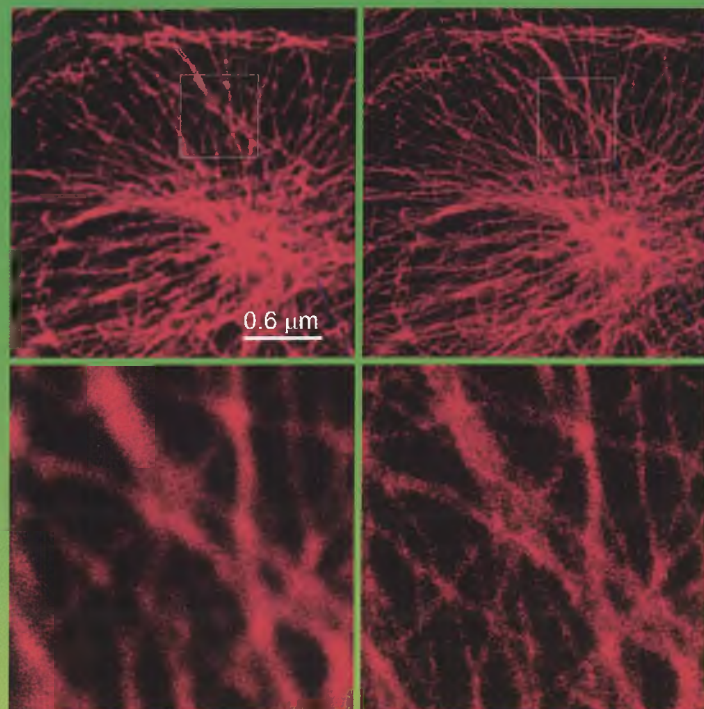
### ABSTRACT

The proper functioning of extracytoplasmic proteins requires their correct folding after translocation and reaching a proper destination within the cellular envelope. This process is supervised by the folding factors and proteases, which comprise the protein quality control system. The coordinated action of its components maintains the proper functioning of the cell under physiological conditions and enables the survival of bacteria under stress conditions. In the present work we provide the concise characteristics of the protein quality control system within the cellular envelope with the particular emphasize on the role of proteolysis in maintaining the cellular homeostasis.

Kilkuletnie starania o pozyskanie środków finansowych z funduszy strukturalnych UE w okresie 2004-2006 zakończyły się wielkim sukcesem **Centrum Zaawansowanych Technologii „Biotechnologii, Informatyki Stosowanej i Medycyny - Kampus Ochota”**. W ramach projektu **Wyposażenie Laboratorium Obrazowania Biologicznego i Medycznego**, koordynowanego przez Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, a realizowanego wspólnie z Akademią Medyczną i Uniwersytetem Warszawskim, zrealizowane zostaną inwestycje aparaturowe o wartości ponad 15 milionów złotych. Jest to największy tego typu projekt realizowany w ramach SPO WKP 1.4 w Polsce.

konwencjonalny mikroskop  
konfokalny

mikroskop konfokalny  
z systemem STED



mikrotubule w komórce nabłonkowej wyznakowane przeciwciałami skoniugowanymi z barwnikiem Atto 647

W ramach projektu zostanie m.in. zakupiony nowoczesny mikroskop konfokalny wyposażony w unikatową technikę STED (ang. *stimulated emission-depletion*) (Leica), pozwalającą na obserwacje z rozdzielczością 90 nm, tzn. 2.5 raza lepszą niż tzw. limit Abbego - wartość od ponad 100 lat uznawana za nieprzekraczalną. Ten przełomowy wynalazek jest dziełem niemieckiego naukowca, Prof. Stefana Hella, pioniera mikroskopii „superrozdzielczej”. Urządzenie, które zostanie zakupione przez Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, jest jednym z pierwszych na świecie. Mikroskop będzie przystosowany do prowadzenia badań przyżyciowych, obrazowania grubych preparatów ( $> 200 \mu\text{m}$ ) oraz badań z zastosowaniem technik FRET i FRAP.

## W ramach projektu zostaną również zakupione:

- zestaw do badań metodą Tomografii Rezonansu Magnetycznego: pierwszy w Polsce system MRI wykorzystujący 32-kanalową technologię RF
- mikroskop elektronowy transmisyjny z systemem umożliwiającym obrazowanie rozkładu pierwiastków w preparacie biologicznym
- stanowisko umożliwiające archiwizację danych obrazowych w formie cyfrowej oraz zaawansowane przetwarzanie informacji wizualnej w rozproszonym systemie gridowym



**UNIA DLA PRZEDSIĘBIORCZYCH**

PROGRAM KONKURENCYJNOŚĆ



Projekt współfinansowany przez  
UNIĘ EUROPEJSKĄ  
ze środków  
Europejskiego Funduszu  
Rozwoju Regionalnego

**bim**  
CZT  
KAMPUS - OCHOTA

<http://rcin.org.pl>



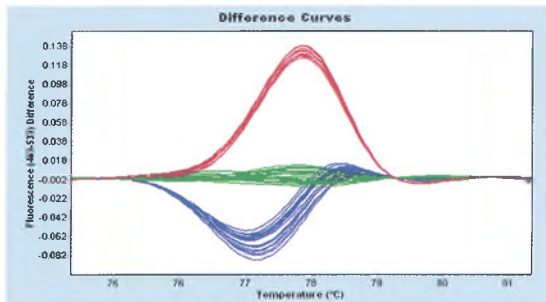
[www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)



## LightCycler® 480 Real-Time PCR System

### Poluj na nowe cele:

*Topnienie wysokiej rozdzielczości  
i wysokiej wydajności PCR w jednym*



Oprogramowanie LightCycler® 480 Gene Scanning Software pozwala na wykrycie różnic pomiędzy próbkami prezentującymi typ dziki i warianty, poprzez grupowanie krzywych HRM. Fragment ludzkiego genu LPLH3 z krwi został poddany amplifikacji z zastosowaniem LightCycler® 480 High Resolution Melting Master. Analiza różnic krzywych umożliwia rozróżnienie pomiędzy próbkami prezentującymi typ dziki (zielony), homozygot mutantów G do T (czerwony) i heterozygot (niebieski).

System LightCycler® 480 oferuje nowe narzędzie do analizy mutacji oparte na pomiarze topnienia wysokiej rozdzielczości (HRM). To wysoce czuła metoda po PCR umożliwia badania SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu) w szerokim formacie po znacznie mniejszym koszcie.

- **Odkrywaj zmienność genetyczną** – szybko: wybierz pierwsze w pełni zintegrowane rozwiązanie PCR/HRM dla płytek 96- i 384-dołowych.
- **Poszerzaj zakres swoich badań:** korzystaj z innowacyjnego oprogramowania oraz nowej mieszanki reakcyjnej HRM o niezrównanej uniwersalności.
- **Unikaj niepotrzebnego sekwencjonowania:** zwiększ efektywność swoich badań dzięki nowej, wysokowydajnej i wygodnej metodzie badania mutacji.

**Przenieś poziom swojego PCR na nowe szczyty.**

**Dowiedz się więcej na stronie [www.lightcycler480.com](http://www.lightcycler480.com)**

Tylko do użytku laboratoryjnego. Produkt nie jest przeznaczony do diagnostyki.

Purchase of this product is accompanied by a limited license to use it in the PCR process, including homogeneous PCR methods described in U.S. Patents Nos. 5,594,066; 6,171,705; 6,569,927 and corresponding patents outside the United States, for life science research in conjunction with a thermal cycler whose use in the automated performance of the PCR process is covered by the up-front license fee, i.e., an authorized thermal cycler. No real-time apparatus or system patent rights or any other patent rights owned by Applied Biosystems are conveyed expressly, by implication or by estoppel. No rights for any other application, including any *in vitro* diagnostic application, are conveyed expressly, by implication or by estoppel under U.S. Patents Nos. 6,174,070 and 6,245,514 and corresponding patent claims outside the United States, or any other patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd, claiming real-time amplification and detection methods. The product is covered in-part by US 5,871,868, co-exclusively licensed from Evotec OAI AG. Parts of the Software used for the LightCycler® 480 System are licensed from Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA.

LIGHTCYCLER is a trademark of Roche. Other brands or product names are trademarks of their respective holders. © 2007 Roche Diagnostics GmbH. All rights reserved.

Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.  
ul. Wybrzeże Gdynskie 6B  
01-531 Warszawa  
[www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)  
tel. 022 481 55 70  
fax 022 481 55 92



<http://rcin.org.pl>