

# POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
WARSZAWA 2009  
TOM 55  
NUMER 4

Syntetazy aminoacylo-tRNA  
Kalretikulina  
Białka opiekuńcze  
Metabolizm skrobi w ziemniakach



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

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

<http://rcin.org.pl>

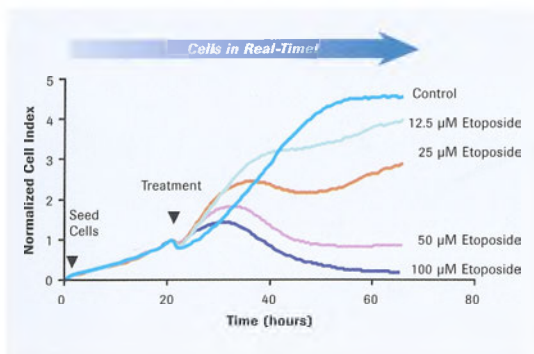


[www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)

**xCELLigence**  
Aparat RTCA SP

**xCELLigence system analizy komórek  
w czasie rzeczywistym**

## Głębsze spojrzenie, prawdziwe zrozumienie



**Ryc. 1: monitorowanie w czasie rzeczywistym cytotoksyczności poprzez degradację DNA.**  
Etoposyd to czynnik niszczący DNA, który w wysokim stężeniu indukuje apoptozę, a w niższych stężeniach prowadzi do przejścia w fazę S lub G2.

Doświadcz potęgi dynamiki analizy komórkowej w czasie rzeczywistym, bez użycia barwników przy użyciu nowego systemu xCELLigence. Uzyskaj dane z całych eksperymentów, które przy użyciu dotychczasowych metod nie były osiągalne. Pracuj bez użycia barwników by zapewnić pełną fizjologiczną wiarygodność danych. Wybierz z elastycznych opcji formatów by dostosować system do swoich potrzeb: 48, 96 lub 576 (6 x 96) dołków.

- **Zbieraj dane z całego przebiegu eksperymentu**
- **Otrzymuj fizjologiczną wiarygodność danych i eliminuj konieczność stosowania obcych barwników i reporterów**
- **Maksymalizuj wszechstronność: analizuj komórki w szerokim zakresie dynamicznym oraz wykonuj różne rodzaje analiz (np. proliferację i cytotoksyczność, ryc. 1)**

System xCELLigence to głębsze spojrzenie dla prawdziwego zrozumienia

Odwiedź naszą stronę internetową [www.xcelligence.roche.com](http://www.xcelligence.roche.com) w celu uzyskania dodatkowych informacji lub skontaktuj się z naszym lokalnym przedstawicielem.

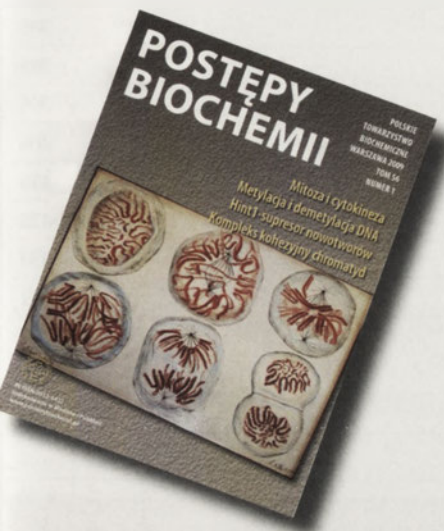


xCELLIGENCE jest zastrzeżonym znakiem towarowym Roche.  
© 2008 Roche Diagnostics GmbH. Wszystkie prawa zastrzeżone.

<http://rcin.org.pl>

Roche Diagnostics Polska sp. z o.o.  
Ul. Wybrzeże Gdyni 6B  
01-531 Warszawa  
[www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)  
[biologia.molekularna@roche.com](mailto:biologia.molekularna@roche.com)  
tel. 022 481-55-55  
fax. 022 481-55-92





## W NASTĘPNYM NUMERZE:

**Mitoza i cytokineza**Janina Kaczanowska,  
Andrzej Kaczanowski**Metylacja i demetylacja DNA**Jolanta Guz, Marek Foksiński,  
Ryszard Oliński**Hint1-supresor nowotworów**

Magdalena Ozga

**Kompleks kohezyjny chromatyd**

Agata Cena, Anna Kurlandzka

**Rysunek na okładce:**

To ensure continuing worldwide availability of this valuable food staple, potato plant breeders must unite desirable processing and fresh-market characteristics with late blight resistance. Photo by Scott Bauer. United States Department of Agriculture, Agricultural Research service (<http://www.ars.usda.gov/is/graphics/photos/k5454-17.htm>)

## WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

<b>XLIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Łodzi</b> Ludmiła Żylińska, Marek Mirowski	357
<b>Rozstrzygnięcie konkursu Doktoraty 2008</b> Sylwetka naukowa dr Katarzyny Kubiak	360
<b>Wiadomości krajowe</b> pod red. Teresy Wesołowskiej	363
<b>Wspomnienie o profesorze Janie Steffenie</b> Magdalena Chechlińska	367
<b>Konferencja im. Jakuba Karola Parnasa w Jałcie</b> Jolanta Barańska	370

## ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

<b>Znaczenie syntetaz aminoacylo-tRNA w patologich i perspektywa ich wykorzystania w diagnostyce i terapii</b> Mirosława Skupińska, Agnieszka Belter, Małgorzata Giel-Pietraszuk, Leszek Rychlewski, Jan Barciszewski	373
<b>Kluczowe znaczenie nośnika GLUT 2 w transporcie glukozy w komórkach jelit</b> Ewa Stelmańska	385
<b>Endomorfiny – endogenne ligandy receptora opioidowego <math>\mu</math></b> Renata Perlikowska, Jakub Fichna, Anna Janecka	388
<b>Leukotrieny cysteinyłowe i ich receptory</b> Karolina Wódz-Naskiewicz, Rafał Pawliczak	395
<b>Kalretikulina – budowa, lokalizacja komórkowa oraz proponowane funkcje u zwierząt i roślin</b> Marta Lenartowska, Jakub Walczewski, Robert Lenartowski	406
<b>Białka chaperonowe siateczki śródplazmatycznej</b> Marzanna Cechowska-Pasko	416
<b>Zmiany kształtu erytrocytów i czynniki je wywołujące</b> Maria Stasiuk, Grzegorz Kijanka, Arkadiusz Kozubek	425
<b>Mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) w badaniach biologicznych i medycznych</b> Jarosław Korczyński, Jakub Włodarczyk	434
<b>Metabolizm skrobi w bulwach ziemniaka</b> Dominika Czyżewska, Waldemar Marczewski	441
<b>Mobilizacja białek zapasowych ziarniaków zbóż</b> Adam Drzymała, Beata Prabucka, Wiesław Bielawski	447
<b>Cytometria przepływowa</b> BD Biosciences, San Jose, CA	457
<b>Wybór odczynników do wielokolorowej cytometrii przepływowej</b> Holden Maecker, Joe Trotter BD Biosciences, San Jose, CA	461

Events/Opinions/Comments	357
<b>REVIEWS</b>	
aaRS – The etiological factor and the attractive target of many disorders	373
The important role of GLUT2 in intestinal sugar absorption	385
Endomorphins – endogenous ligands of the $\mu$ -opioid receptor	388
Cysteinyl leukotrienes and their receptors	395
Calreticulin – the structure, cell localizations and functions in animals and plants	406
Endoplasmic reticulum chaperones	416
Transformation of erythrocyte shape and its regulation	425
Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) in biological and medical research	434
Starch metabolism in potato tubers	441
Mobilization of storage proteins in cereal grains	447
BD Flow cytometry	457
Selecting Reagents for Multicolor BD Flow Cytometry	461

## V edycja konkursu na najlepszą pracę doktorską z biochemii w 2009 roku

Polskie Towarzystwo Biochemiczne i firma Merck Sp. z o.o. ogłaszają piątą 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 2009 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 2010 roku. Nagrodę przyznaje Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w porozumieniu z firmą Merck. Zgłoszenia kandydatów do Nagrody mogą dokonywać pracownicy naukowi ze stopniem doktora habilitowanego lub tytułem profesora.

Zgłoszenia w formie listu przewodniego wraz z pracą doktorską w formacie pdf należy przesyłać w nieprzekraczalnym terminie do 31 maja 2010 roku tylko drogą elektroniczną na adres:

**[j.redowicz@nencki.gov.pl](mailto:j.redowicz@nencki.gov.pl)**

Rozstrzygnięcie konkursu nastąpi do 31 sierpnia 2010 roku, a uroczyste wręczenie Nagrody odbędzie się na dorocznym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego we wrześniu 2010 roku.

Patronat medialny nad konkursem sprawuje redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”. Pytania dotyczące konkursu można uzyskać kierując je pod następujący adres poczty elektronicznej: [j.redowicz@nencki.gov.pl](mailto:j.redowicz@nencki.gov.pl).

M. Jolanta Rędownicz

Sekretarz Zarządu Głównego 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](http://www.mitonet.pl)

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

Redaktor działu krajowego: Teresa Wesolowska; e-mail: [redbioch@sci.pam.szczecin.pl](mailto:redbioch@sci.pam.szczecin.pl), Redaktor działu „Forum Młodych Biochemików”: Grzegorz Bartosz; e-mail: [gbartos@biol.uni.lodz.pl](mailto:gbartos@biol.uni.lodz.pl)

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

Skład i łamanie: Małgorzata Basaj; e-mail: [biochem@nencki.gov.pl](mailto:biochem@nencki.gov.pl)

Korekta językowa: Marta Magdalena Izdebska; e-mail: [marta.izdebska@gmail.com](mailto:marta.izdebska@gmail.com)

Adres redakcji: „Postępy Biochemii”, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: [postepy@nencki.gov.pl](mailto: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](mailto: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.

# XLIV ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA BOCHEMICZNEGO ŁÓDŹ, 16-19 WRZEŚNIA 2009 R.

W dniach 16-19 września 2009 roku Łódź gościła uczestników XLIV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Obrady odbywały się na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, zaś w organizacji Zjazdu uczestniczyły: Polskie Towarzystwo Biochemiczne oraz trzy szkoły wyższe – Politechnika Łódzka, Uniwersytet Łódzki i Uniwersytet Medyczny. Honorowy patronat Zjazdu objęli Wojewoda Łódzki – Jolanta Chelmińska, Marszałek Województwa Łódzkiego – Włodzimierz Fisiak oraz Prezydent Miasta Łodzi – Jerzy Kropiwnicki. Udziałem w Komitecie Honorowym zaszczylicili Zjazd Rektorzy łódzkich uczelni – prof. Stanisław Bielecki (PŁ), prof. Paweł Górski (UM) oraz prof. Włodzimierz Nykiel (UŁ), a także prof. Czesław Cierniewski (Prezes Oddziału PAN w Łodzi), prof. Jerzy Duszyński (Podsekretarz Stanu w MNiSW), prof. Andrzej Dżugaj (Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego), prof. Maria

Koter-Michalak (Prezes Polskiego Towarzystwa Biofizycznego), prof. Andrzej Legocki (Przewodniczący Wydziału II PAN), prof. Stanisław Liszewski (Prezes Łódzkiego Towarzystwa Naukowego), prof. Maciej Żylicz (Prezes Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej), dr hab. Alicja Józko-wicz (Prezes Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki) oraz Honorowi Członkowie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego – prof. Edward Bańkowski, prof. Jolanta Barańska, prof. Jerzy Chmielowski, prof. Mieczysław Chorąży, prof. Aleksander Koj, prof. Hilary Koprowski, prof. Janina Kwiatkowska-Korczak, prof. Zygmunt Machoy, prof. Bronisława Morawiecka, prof. Włodzimierz Ostrowski, prof. Konstancja Racyńska-Bojanowska, prof. David Shugar, prof. Lech Wojtczak, prof. Zofia Zielińska i prof. Mariusz Żydowo.

W łódzkim spotkaniu udział wzięło ponad 550 osób, wśród nich goście ze Stanów Zjednoczonych,

Kanady, Niemiec, Szwajcarii oraz – jak co roku – liczna grupa zaprzyjaźnionych biochemików z Białorusi. Warto podkreślić, że przeważającą liczbę uczestników Zjazdu stanowili młodzi naukowcy, studenci oraz doktoranci.

Ceremonia inauguracji Zjazdu odbyła się 16 września 2009 r. w Sali Filharmonii Łódzkiej. Uroczystość poprowadzili przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego dr hab. Ludmiła Żylińska i przewodniczący Łódzkiego Oddziału PTBioch prof. Marek Mirowski. Uczestników Zjazdu powitali prof. Zbigniew Klajnert, doradca Prezydenta Miasta Łodzi ds. Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz rektorzy uczelni łódzkich. Otwarcia Zjazdu dokonał prezes Towarzystwa prof. Andrzej Dżugaj, który następnie wręczył nagrody laureatom dorocznych konkursów PTBioch. Nagrodę im. Prof. Bolesława Skarżyńskiego w Konkursie na najlepszy artykuł opublikowany w Postęпах Biochemii w roku 2008 otrzymali Lech Wojtczak i Krzysztof Zabłocki za publikację „Mitochondria w życiu, chorobie i śmierci komórki”. Nagrodę Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Firmy Sigma-Aldrich Polska – za najlepszą pracę doświadczalną lub teoretyczną z zakresu chemii i biochemii kwasów nukleinowych, wykonaną głównie w Polsce – przyznano prof. Andrzejowi Legockiemu z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Nagroda im. prof. Antoniego Dmochowskiego za osiągnięcia w nauczaniu biochemii, biologii molekularnej i biotechnologii przypadła zespołowi: Krzysztof Kulka, Jerzy Strzeżek, Stanisław Weidner, Adam Zięćik za podręcznik pt.: „Biochemia kręgowców” (PWN, 2007) pod redakcją Wacława Minakowskiego i Stanisława Weidnera. Wyróżnienie przyznano Henrykowi Koroniakowi i Janowi Barciszewskiemu za redakcję cyklu pt. „Na pograniczu chemii



Fot. 1. Inauguracja XLIV Zjazdu PTBioch w Łodzi. Od lewej: prof. Czesław Cierniewski, prof. Zbigniew Klajnert, prof. Paweł Górski, prof. Włodzimierz Nykiel, prof. Stanisław Bielecki, prof. Frank Lyko, prof. Jan Barciszewski, prof. Andrzej Dżugaj, prof. Jolanta Barańska.

i biologii", opublikowanemu przez Wydawnictwo Naukowe UAM w latach 1999–2008. Nagrodę w konkursie za najlepszą rozprawę doktorską otrzymała dr Katarzyna Kubiak za dysertację pt. „Modulacja zdolności krótkich interferencyjnych RNA do wyciszania ekspresji genów”. Promotorem pracy była prof. Barbara Nawrot, a Fundatorem Nagrody Firma Merc Polska. W zmienionej od bieżącego roku wersji konkursu im. prof. Janiny Opieńskiej-Blauth Zarząd Główny Towarzystwa przyznał stypendia umożliwiające udział w Zjeździe trzem osobom: Mateuszowi Labudzie, Miłoszowi Dałkowi i Adamowi Pomorskiemu.

Wyjątkowym gościem Zjazdu był prof. Piotr Chomczyński, biochemik, biotechnolog, genetyk, przedsiębiorca, kolekcjoner malarstwa i mecenas sztuki. Absolwent Uniwersytetu Warszawskiego, współautor najczęściej cytowanej pracy (> 50 000 razy) „Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction” opublikowanej w *Analytical Biochemistry* w 1987.

Od 1983 r. przebywa w USA, gdzie pracował w renomowanych uczelniach w Bethesda oraz w Cincinnati. Jest właścicielem i prezesem firmy Molecular Research Center, zaś wygłoszony wykład inauguracyjny pt. „Nauka czy biznes” (treść dostępna w serwisie [http://biotechnologia.pl/info/biotechnologia/28\\_artykuly-opinie/8473](http://biotechnologia.pl/info/biotechnologia/28artykuly-opinie/8473)) zawierała wiele cennych rad i wskazówek przydatnych w dobie poszukiwania jak najskuteczniejszego przejścia od nauki do praktycznego zastosowania. Warto nadmienić, że prof. Piotr Chomczyński od 1997 roku jest fundatorem głów-

nej nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego im. prof. Jakuba Parnasa za najlepszą pracę wykonaną w polskim laboratorium. W tym roku nagrodę wraz z Prezesem PTBioch wręczał także prof. Chomczyński, zaś laureatami byli Paweł Grzechnik i Joanna Kufel za pracę pt. „Polyadenylation linked to transcription termination directs the processing of snoRNA precursors in yeast” opublikowaną w *Molecular Cell* (2008). W tej szczególnej atmosferze dr hab.



Fot. 2. Prof. Piotr Chomczyński.

Joanna Kufel bardzo barwnie i żywiłowo zreferowała uzyskane w pracy wyniki.

W trakcie inauguracji odbyło się Nadzwyczajne Walne Zebranie członków Towarzystwa, na którym z sukcesem przegłosowano proponowaną przez Zarząd Główny zmianę treści Statutu, umożliwiająca

sprawniejsze funkcjonowanie Towarzystwa. Tradycyjnie, uczestnicy Zjazdu zostali zaproszeni na kolejne spotkanie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Prof. Ewa Birkner z Oddziału PTBioch w Katowicach przedstawiła uroki Wisły, gdzie w 2010 r. odbędzie się XLV Zjazd Towarzystwa. Uroczystość inauguracji zakończył koncert łódzkiego Big Bandu Akademii Muzycznej pod dyktando Pawła Deląga, po którym goście Zjazdu spotkali się przy lampce wina.

Motywnym przewodnim tego rocznego Zjazdu była epigenetyka

i jej poświęcone były trzy wykłady plenarne. Sponsorowany w ramach FEBS National Lecture wykład prof. Franka Lyko z Division of Epigenetics, German Cancer Research Center, Heidelberg, pt. „Dnmt2: an evolutionary link between RNA and DNA methylation”, wykład prof. Andrzeja Jerzmanowskiego z Laboratorium Biologii Molekularnej Roślin, Uniwersytetu Warszawskiego i Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, pt. „Chromatin remodeling in control of plant development” oraz wykład prof. Terumi Kohwi-Shigematsu z Life Sciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, University of California, Berkeley, California, USA pt. „Genome organization by SATB1 committed to Brest cancer metastasis and T cell activation”.

W ramach 11 sesji tematycznych wystąpiło 90 naukowców, doktorantów i studentów, zaprezentowano także ponad 300 prac w sesjach plakatowych. Poszczególne sesje poświęcone były tematom:

- Organizacja chromatyki i mechanizmy epigenetyczne (Andrzej Jerzmanowski, Piotr Widłak)
- Biochemia hemostazy (Barbara Wachowicz, Cezary Watała)

- Biochemia kwasów nukleinowych (Jan Barciszewski, Ryszard Oliński)

- Biochemia nowotworów (Mieczysław Chorąży, Zofia Kiliańska, Wanda Krajewska, Anna Lipińska)

- Biochemia roślin (Andrzej Konończak, Przemysław Wojtaszek)

- Biochemia stresu komórkowego (Grzegorz Bartosz, Stanisław Przystański, Jolanta Tarasiuk)

- Biochemiczna specyfika tkanek (Leszek Kaczmarek, Elżbieta Rębas)

- Biotechnologia i komercjalizacja badań (Stanisław Bielecki, Tomasz Twardowski)

- Mitochondria: od biochemii do medycyny (Adam Szewczyk, Lech Wojtczak)

- Patobiochemia (Edward Bańkowski, Janusz Greger)

- Dydaktyka biochemii (Piotr Laidler, Julian Świerczyński)



Fot. 4. Prof. Frank Lyko – FEBS National Lecturer.



Fot. 3. Laureatka nagrody im. J. Parnasa – dr hab. Joanna Kufel.

Dużym zainteresowaniem cieszyły się wykłady i warsztaty zorganizowane przez firmy Precoptic Co., Witko Sp. z o.o., Bio-Rad Polska Sp. z o.o., Roche oraz MP Biomedicals, SAS. Nowością na Zjeździe był konkurs Forum Młodych, zorganizowany z inicjatywy Łódzkiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego dla młodych naukowców, którzy nie ukończyli 35 lat i legitymowali się znaczącym dorobkiem naukowym. Przedmiotem konkursu były wyniki badań przeprowadzonych w pol-



Fot. 5. Laureatki Forum Młodych – Beata Pajak i Halina Woś.

dwie I-sze nagrody: Beacie Pajak z Zakładu Ultrastruktury Komórki, Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie za doniesienie pt. "Metabolic inhibitors modulate epigallocatechin gallate-induced clusterin expression in human colon adenocarcinoma COLO 205 cells" oraz Halinie Woś z Zakładu Biotechnologii Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie za doniesienie pt. "Heme oxygenase-

Wyróżniono również prezentacje Justyny Jakubowskiej, Szymona Ciesielskiego oraz Joanny Bidzińskiej.

Streszczenia wszystkich wystąpień i doniesień, wydrukowane dzięki wsparciu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, dostępne są w suplemencie *Acta Biochimica Polonica* (także on line). Na stronie Zjazdu można obejrzeć i pobrać bogatą kolekcję zdjęć, dokumentującą wydarzenia zjazdowe. Chcielibyśmy podkreślić, że dzięki wsparciu przez władze miasta, regionu, uczelni łódzkich, wystawców i głównego sponsora – firmy SIGMA-ALDRICH możliwe było przygotowanie łódzkiego spotkania biochemików, które – mamy nadzieję – spełniło oczekiwania wszystkich. Dziękujemy także za znakomitą współpracę pozostałym naszym koleżankom i kolegom z Komitetu Organizacyjnego – prof. dr hab. Jackowi Bartkowiakowi, dr Jackowi Drobnikowi, mgr Paulinie Kępie, dr Annie Krześlak, dr Violetcie Macioszek, dr hab. Jolancie Niewiarowskiej, dr hab. Pawłowi Pomorskiemu, dr Jackowi Polakowi, dr Małgorzacie Rogalińskiej, dr Teresie Wesołowskiej oraz dr hab. Halinie Żbikowskiej.



Fot. 6. Przedstawiciele Komitetu Organizacyjnego Zjazdu z członkami Zarządu Głównego. Od lewej stoją: prof. Marek Mirowski, doc. Jolanta Rędowicz, dr hab. Elżbieta Rębas, dr Jacek Polak, prof. Jolanta Barańska, prof. Zofia Kiliańska, prof. Andrzej Dżugaj, prof. Wanda Krajewska, dr Anna Krześlak, prof. Anna Lipińska. Od lewej siedzą: dr hab. Ludmiła Żylińska, prof. Małgorzata Czyż, dr hab. Jolanta Niewiarowska.

skiej placówce naukowej i nie opublikowanych w chwili zgłoszenia. W trakcie zakończenia zjazdu Komisja Konkursowa w składzie – prof. Małgorzata Czyż (przewodnicząca jury oraz pomysłodawca), członkowie – prof. Mieczysław Chorąży, prof. Wanda Krajewska, prof. Anna Lipińska, prof. Stanisław Przestalski, prof. Jolanta Tarasiuk – przyznała

1 overexpression Leeds to melanoma de-differentiation". Wyróżnienia otrzymały Agnieszka Łóboda i Marta Rybicka. Wręczono także nagrodę w konkursie im. prof. Włodzimierza Mozołowskiego, której laureatką została Emilia Białopiotrowicz za prezentację pracy „Disturbances of cell cycle and apoptosis in lymphocytes from Alzheimer's dementi patients”.

Wyjątkowo piękny początek jesieni jako towarzyszył Zjazdowi, choć kusił, to nie wywabił uczestników z sal obrad. Za to uroki Łodzi można było bodaj fragmentarycznie podziwiać przy okazji spotkania towarzyskiego w klubie Elektrownia, w przeuroczej scenerii Łódzkiej Manufaktury.

Łódzki Zjazd PTBioch przeszedł do historii. Nie sposób wymienić wszystkich, którzy go przygotowali, organizowali, wspierali materialnie oraz intelektualnie i którym pragniemy bardzo serdecznie podziękować. Szczególnie zaś gorąco dziękujemy naszym Gościom za przyjęcie zaproszenia do Łodzi i uczestniczenie w tym wyjątkowym wydarzeniu.

**Dr hab. Ludmiła Żylińska** – przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego XLIV Zjazdu PTBioch  
**Prof. dr hab. Marek Mirowski** – przewodniczący Łódzkiego Oddziału PTBioch

# ROZSTRZYGNIĘCIE KONKURSU POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO I FIRMY MERCK SP. Z O.O. NA NAJLEPSZĄ PRACĘ DOKTORSKĄ Z BIOCHEMII W 2008 ROKU

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, na podstawie opinii komisji w składzie: prof. Edward Bańkowski, prof. Grzegorz Bartosz, dr Karina Błachnio (Merck), prof. Adam Dubin, prof. Jacek Kuźnicki, prof. Tomasz Twardowski, prof. Sławomir Pikula (przewodniczący) ogłasza, że wśród zgłoszonych na konkurs prac doktorskich nagrodę w wysokości 4 500 zł otrzymała Pani dr Katarzyna Kubiak za pracę doktorską p.t. „Modulacja zdolności krótkich interferujących RNA do wyciszenia ekspresji genów” wykonaną w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Nawrot. Wręczenie nagrody odbyło się 16.09.2009 r. podczas uroczystości inauguracji XXX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Łodzi.

## SYLWETKA KATARZYNY KUBIAK



Katarzyna Kubiak (z d. Sipa) ukończyła studia na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej w 2003 roku, uzyskując dyplom magistra inżyniera o specjalności biotechnologia molekularna i biochemia techniczna. Już od etapu pracy dyplomowej („Konstrukcja i zastosowanie plazmidów kodujących krótkie, interferujące RNA skierowane na mRNA białka BACE”) pracowała w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, w zespole prowadzo-

nym przez prof. dr hab. Barbarę Nawrot, późniejszą promotorkę pracy doktorskiej. W Centrum Katarzyna Kubiak ukończyła również studium doktoranckie. W latach 2003–2008 brała udział w realizacji trzech projektów badawczych (Grant ICGB CPR/04/20, projekt Dwustronny Polsko-Włoski z zespołem prof. Sandro Sorbi oraz projekt zamawiany MNiI 059/T09/09), dotyczących konstrukcji różnorodnych krótkich cząsteczek kwasów nukleinowych, obniżających ekspresję genu białka BACE1 (ang. *β-site APP Cleaving Enzyme*). W 2006 roku Katarzyna Kubiak została laureatką VI edycji konkursu L'Oréal Polska dla kobiet i nauki przy wsparciu polskiego komitetu UNESCO i otrzymywała roczne stypendium doktoranckie.

Publiczna obrona jej rozprawy doktorskiej odbyła się 1 lipca 2008 r. Na wniosek obydwu recenzentów, którymi byli prof. dr hab. Czesław Cierniewski (Uniwersytet Medyczny, Łódź) i prof. dr hab. Leszek Kaczmarek (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa), praca doktorska została wyróżniona przez Radę Naukową Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN.

Katarzyna Kubiak jest współautorką 5 publikacji oryginalnych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz 4 artykułów przeglądowych (w tym jednego w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym). Publikacja, w której dr Kubiak jest pierwszą autorką (RNA, 2007, 13: 1–16) została wyróżniona przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne w zeszłym roku, jako najlepsza praca w dziedzinie kwasów nukleinowych powstała w polskim laboratorium.


Od lipca 2008 dr Kubiak pracuje w zespole prof. dr hab. inż. Stanisława Bieleckiego w Instytucie Biochemii Technicznej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódz-

kiej, w którym jest odpowiedzialna za badania w obszarze biologii molekularnej bakterii *Gluconacetobacter xylinus*. Ze względu na jej wcześniejsze doświadczenie, zainteresowania badawcze dr Kubiak skupione są wokół bakterierynych regulatorowych RNA (*short RNA*, sRNA) i ich udziału w procesie tworzenia biofilmów przez mikroorganizmy.

## Modulacja zdolności krótkich interferujących RNA do wyciszenia ekspresji genów

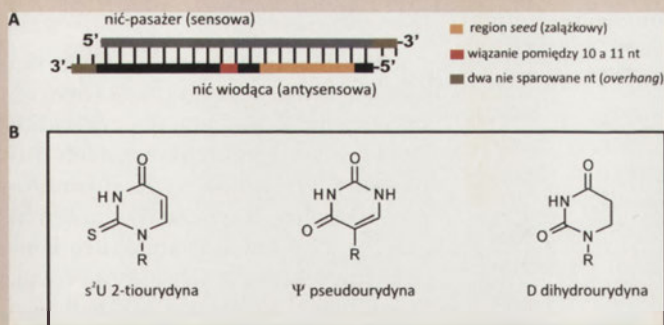
### STRESZCZENIE PRACY

Katarzyna Kubiak 

 Instytut Biochemii Technicznej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, ul Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź; e-mail: katarzyna.kubiak@p.lodz.pl

Wyciszenie genów, których produkty są zidentyfikowanymi celami terapeutycznymi, jest jedną ze strategii rozwijaną w ramach szeroko pojętej terapii genowej. Pomysł obniżania ekspresji na poziomie potranskrypcyjnym za pomocą tzw. oligonukleotydów antysensowych narodził się w latach osiemdziesiątych XX wieku. Do pionierskich badań w tym obszarze należy także dorobek Zakładu Chemii Bioorganicznej CBMiM PAN w Łodzi. Kilkanaście lat badań nad rozwojem metod chemicznej syntezy i modyfikacji kwasów nukleinowych w celu nadania im pożądaných cech, zakończyło się wprowadzeniem na rynek farmaceutyczny dwóch leków oligonukleotydowych. Ponad 10 lat temu nastąpił przełom na drodze do wykorzystania kwasów nukleinowych w medycynie dzięki odkryciu zjawiska interferencji RNA (RNAi) [1]. W przeciągu ostatnich kilku lat dokonano ogromnego postępu w zrozumieniu roli, jaką spełniają małe RNA w rozmaitych procesach regu-





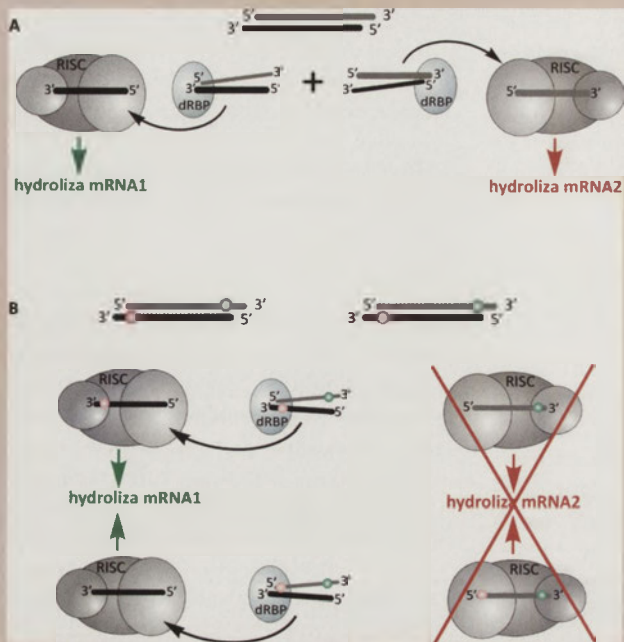
**Rycina 1.** A. Schemat budowy dupleksów siRNA (także stosowanych w niniejszej pracy); B. Struktura modyfikowanych zasad azotowych, wprowadzanych do siRNA, badanych w ramach omawianego projektu. R = reszta rybozy. Przedstawione symbole modyfikowanych zasad są także używane w tekście.

lacji ekspresji genów we wszystkich organizmach żywych. Krótkie interferujące RNA (ang. *short interfering RNA*, siRNA, Ryc. 1A), dupleksy pełniące centralną funkcję w mechanizmie RNAi, są obecnie narzędziem powszechnie używanym do badań funkcji genów organizmów eukariotycznych (zarówno zwierząt jak i roślin). Mechanizm wyciszenia jest już powszechnie znany i polega na tworzeniu nukleoproteinowego kompleksu RISC (ang. *RNA induced silencing complex*), w którego skład wchodzi jedna z nici dupleksu siRNA (tzw. nić wiodąca, ang. *guide strand*) służąca jako sonda do odnalezienia komplementarnej sekwencji w cząsteczce mRNA. Po związaniu z docelowym transkrypcyjnym kompleks RISC katalizuje hydrolizę jednego wiązania fosfodiesterowego w obrębie rozpoznawanej sekwencji, znajdującego się dokładnie w centrum dupleksu, utworzonego przez mRNA z nicią wiodącą siRNA. Powstające w ten sposób dwa fragmenty mRNA, pozbawione na nowoutworzonych końcach ochronnych sekwencji (cap'u i ogona poliadenylogowego) zostają uwolnione z kompleksu RISC (który katalizuje kolejne reakcje ukierunkowanej nukleolizy) i zdegradowane przez egzozom. W efekcie uruchomienia szlaku RNAi następuje zatem wyciszenie ekspresji genu na poziomie potranskrypcyjnym. Mechanizm ten może być wywołany przez siRNA dostarczane z zewnątrz komórki, ponieważ w organizmach wyższych funkcjonuje podobny do RNAi mechanizm kontroli ekspresji genów, angażujący te same składniki białkowe, ale oparty o regulatorowe RNA kodowane w genomie, tzw. mikro RNA. Pełne zrozumienie roli tych

cząsteczek potrwa zapewne jeszcze wiele lat, jednak już dziś trwają próby ingerencji w poziom ekspresji genów, będących uznanymi celami terapeutycznymi, z zastosowaniem dupleksów siRNA. Intensywne prace nad nadaniem tym cząsteczkom cech pożądaných z farmakokinetycznego punktu widzenia spowodowały istotny postęp w obszarze ich przyszłego wykorzystania w medycynie. Dzięki wiedzy o chemii i termodynamice kwasów nukleinowych, zdobytej podczas rozwoju strategii antysensowej, ograniczenia związane z niską trwałością tych biomolekuł w żywym organizmie zostały w znacznym stopniu przezwyciężone. W ciągu ostatnich kilkunastu lat pojawiły się także bardzo interesujące możliwości wydajnego dostarczenia tych związków do komórek. Znane są rozwiązania, zapewniające transport tkankowo-specyficzny a nawet przekroczenie bariery krew-mózg [2]. Jednakże ciągle palącym problemem pozostaje kwestia zmniejszenia skutków ubocznych, wywoływanych przez krótkie interferujące RNA. Źródłem tych niepożądanych efektów są zarówno stymulacja systemu immunologicznego [3], jak i niespecyficzne wyciszenia (tzw. *off-target silencing*) [4]. Przyczyn powstawania tych niezaplanowanych zmian ekspresji wielu genów na skutek podania siRNA może być kilka. Przede wszystkim, w niektórych przypadkach wystarczy komplementarność tylko części regionu *seed* (nukleotydy w pozycjach 2-8, Ryc. 1A) nici wiodącej dupleksu siRNA aby wywołać degradację mRNA. Znależenie unikalnej sekwencji o długości 7 nt w genomie człowieka jest praktycznie niemożliwe. Inną istotną przyczyną efektów ubocznych wywołanych przez siRNA jest włączanie do efektorowego kompleksu RISC nici sensowej siRNA (zwanej też nicią-pasażerem, komplementarnej do oryginalnie zaprojektowanej, jako nić wiodąca). Sytuacji tej może w pewnym stopniu zapobiegać dobieranie sekwencji siRNA

w sposób gwarantujący ich tzw. termodynamiczną asymetryczność, czyli lokalizując słabsze wiązania typu Watsona-Cricka w pobliżu 5'-końca nici projektowanej jako wiodąca [5]. Jednak wybieranie układu nukleotydów w nici siRNA jest ograniczone przez warunek jej komplementarności tylko do jednego mRNA. Przesunięcia w obrębie wybranej sekwencji docelowej nie są możliwe, zwłaszcza w przypadku allelo-specyficznych siRNA. Kolejną przyczyną powstawania efektów ubocznych, po wywołaniu interferencji RNA w organizmach ssaków, jest ryzyko wysycenia enzymów uczestniczących w procesie regulacji ekspresji genów na drodze mikro RNA. Zbyt duże zaangażowanie takich białek jak np. eksportyna 5 w transport „obcych” shRNA, może spowodować zakłócenie szlaków propagacji naturalnych pre-miRNA. Regulatorowe RNA są zaangażowane w wiele podstawowych procesów komórkowych, zatem zaburzenie ich działania prowadzi do bardzo poważnych, negatywnych skutków w całym organizmie. Ponieważ zakres niepożądanych efektów, niezależnie od ich źródła, koreluje w znacznym stopniu ze wzrostem zastosowanego stężenia siRNA [6], przezwyciężenie omówionego problemu powinno być osiągalne poprzez udoskonalanie tych cząsteczek (np. na drodze modyfikacji chemicznych) w taki sposób, aby osiągnąć wysoką skuteczność działania przy minimalnej dawce.

Głównym celem badań podjętych w ramach pracy doktorskiej było poszukiwanie modyfikacji, prowadzących do zwiększenia potencjału wyciszającego siRNA. Jako obiekt zainteresowań wybrano modyfikowane zasady azotowe, występujące w funkcjonalnych cząsteczkach RNA, takich jak tRNA. Były nimi trzy nukleozydy: 2-tiourydyna ( $s^2U$ ), pseudourydyna ( $\Psi$ ) i dihydrourydyna (D), których wzory strukturalne przedstawiono na Ryc. 1B. Wszystkie oligorybonukleotydy składowe do badanych dupleksów siRNA syntetyzowano w ZChB CBMiM PAN i oczyszczono stosując procedurę odblokowania ORN i oddzielenia krótszych produktów syntezy, opracowaną w ramach niniejszej rozprawy (amidofosforyny  $s^2U$  i D otrzymano z laboratorium prof. dr hab. E. Sochackiej z Wydzia-



**Rycina 2.** Schemat predefiniowania nici wiodącej siRNA zastosowanego w rozprawie doktorskiej. A. W przypadku niemodyfikowanych siRNA istnieje ryzyko włączenia do kompleksu RISC obu nici dupleksu; B. Wprowadzenie modyfikacji na końcu siRNA indukuje asymetrię termodynamiczną dupleksów, co definiuje nść wiodącą - degradacji ulega tylko mRNA zaprojektowane jako docelowe. Symbole na dupleksie siRNA: czerwona kulka = modyfikacja stabilizująca dupleks (np. s<sup>2</sup>U); zielona kulka = modyfikacja destabilizująca dupleks (np. D).

tu Chemicznego PŁ). Pierwsze dwa z wymienionych analogów urydyny (s<sup>2</sup>U i Ψ) mają właściwości wzmacniające trwałość struktury dwuniciowej RNA, a ostatnia (D) przeciwnie – występuje w obszarach jednoniciowych. Rozprawa doktorska zawiera pełną charakterystykę wpływu tych modyfikacji na strukturę i aktywność siRNA, zawierających badane nukleozydy w centrum i na końcach dupleksów. Badania termodynamiczne (widma dichroizmu kołowego, krzywe mięknięcia i wyznaczone z nich parametry termodynamiczne) pozwoliły udowodnić silny wpływ pojedynczych modyfikacji zasad na strukturę i stabilność siRNA. Zgodnie z oczekiwaniami 2-tio-urydyna wpływała wyraźnie stabilizująco na strukturę typu A dupleksów, nawet, gdy w jej sąsiedztwie występowała silnie destabilizująca para wahadłowa (G : U) [7].

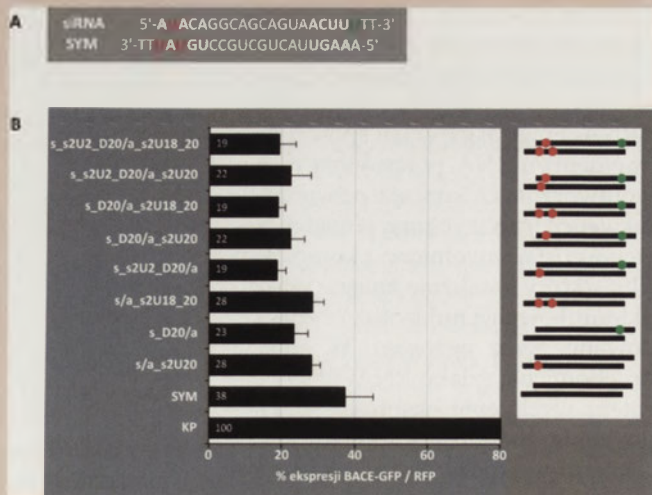
Najważniejszym osiągnięciem tej części rozprawy było znalezienie możliwości zwiększenia aktywności cząsteczek siRNA (niezależnie od ich sekwencji docelowej) poprzez predefiniowanie jednej z nici dupleksu jako wiodącej (Ryc. 2). Efekt ten osiągnięto

SYM, którego sekwencja (skierowana na mRNA białka BACE1) została dobrana w taki sposób, aby na końcach znajdowały się pary zasad tworzące tę samą liczbę wiązań wodorowych (Ryc. 3A). Modyfikację destabilizującą strukturę dupleksu (dihydrourydyne) wprowadzono w pozycję 20 nici sensowej, natomiast 1, 2 lub 3 jednostki 2-tio-urydyny (stabilizującej dupleks) w pobliżu końca 3' nici wiodącej (Ryc. 3A). Obecność już pojedynczych modyfikowanych zasad nukleinowych (dupleksy: s\_s2U2\_D20/a i s\_D20/a\_s2U20) spowodowało dwukrotnie wzrost aktywności (obniżenie do 20% wyjściowej ekspresji genu docelowego) w porównaniu do

po wprowadzeniu jednostki dihydrourydyny (D) na końcu 5' dupleksu (zgodnie z orientacją nici wiodącej) oraz reszty 2-tiourydyny (s<sup>2</sup>U) na końcu przeciwnego (Ryc. 3) [7]. Badania aktywności wyciszającej wszystkich otrzymanych dupleksów siRNA przeprowadzono w opracowanym do tego celu układzie modelowym w komórkach HeLa. Był on oparty o przejściową ekspresję białek fluorescencyjnych, z których jedno pełniło funkcję wewnętrznej kontroli wydajności transfekcji (RFP, *red fluorescence protein*) a mRNA drugiego było docelowym dla badanych cząsteczek siRNA (GFP lub BACE1) [7]. Tu prezentowany jest przykład analizy aktywności serii siRNA

dupleksu niemodyfikowanego (40%) (Ryc. 3B).

Otrzymane wyniki aktywności siRNA potwierdzono dla 3 różnych sekwencji docelowych w przypadku każdej z serii modyfikowanych dupleksów. Pozwoliło to na sformułowanie ogólnych wniosków na temat zależności pomiędzy strukturą końców dupleksów a ich aktywnością. Decydujący wpływ na asymetrię, a co za tym idzie, zdolność wyciszającą siRNA, mają siły wiązań utworzonych jedynie przez dwie skrajne pary zasad w dupleksie. Warty podkreślenia jest fakt, że badane modyfikowane zasady azotowe występują naturalnie w komórkach ludzkich, zatem proponowane zmiany w składzie chemicznym siRNA nie powodują zwiększenia toksyczności tych potencjalnych terapeutyków (co potwierdziły przeprowadzone testy cytotoxyczności) [7]. Ponadto, w trakcie realizacji niniejszego projektu ukazały się publikacje dokumentujące brak stymulacji receptorów TLR (ang. *Toll like receptor*) przez cząsteczki RNA, zawierające modyfikowane zasady azotowe (m.in. s<sup>2</sup>U) [8]. Receptory TLR są odpowiedzialne za indukcję odpowiedzi immunologicznej organizmu po podaniu dupleksów siRNA. Zatem proponowane modyfikacje siRNA mogą ograniczać wywołane



**Rycina 3.** A. Sekwencja siRNA SYM. Wytluszczoneym drukiem zaznaczono 3'-i 5'-końcowe pary Watsona-Cricka, które tworzą taką samą liczbę wiązań wodorowych. Podkreślono miejsca wprowadzania modyfikacji: kolorem zielonym oznaczono pozycję dihydrourydy, czerwonym – 2-tiourydyn. B. Aktywność siRNA SYM, modyfikowanych na końcach dupleksów. Wykres względnej poziomu ekspresji białka BACE-GFP w komórkach HeLa transfekowanych plazmidami pBACE-EGFP i pDsRed2-N1 oraz siRNA wyróżnionymi na wykresie (w stężeniu 1 nM). Słupki błędów odpowiadają odchyleniom standardowym wyników z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Na palnie z prawej strony – schematyczne przedstawienie pozycji wprowadzonych modyfikacji.

przez nie efekty uboczne zarówno dzięki definiowaniu nici wiodącej, zwiększeniu ich potencjału wyciszającego, jak i prawdopodobnie poprzez ograniczenie odpowiedzi odpornościowej organizmu.

## PIŚMIENNICTWO

1. Fire A, Xu SiQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-813
2. Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung K-E, Kim MH, Davidson BL, Lee SK, Shankar P,

Manjunath N (2007) Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448: 39

3. Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I (2005) Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23: 457-462
4. Jackson AL, Linsley PS (2004) Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet* 20: 521-524
5. Kvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115: 209-216

6. Persengiev SP, Zhu X, Green MR (2004) Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* 10: 12-18
7. Sipa K, Sochacka E, Kaźmierczak-Barańska J, Maszewska M, Janicka M, Nowak G, Nawrot B (2007) Effect of base modifications on structure, thermodynamic stability, and gene silencing activity of short interfering RNA. *RNA* 13: 1301-1316
8. Kariko K, Buckstein M, Ni H, Weissman D (2005) Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 23: 165-175

## WIADOMOŚCI KRAJOWE

**Prof. Bogdan Marciniak, prof. Roman Kaliszan i prof. Romuald Będziński** zostali uhonorowani nagrodami ministra nauki i szkolnictwa wyższego za wybitne osiągnięcia naukowe oraz naukowo-techniczne w czwartej edycji nagród ministra nauki. Nagrodę w kategorii badań na rzecz rozwoju nauki otrzymał specjalista z zakresu chemii i katalizy metaloorganicznej, prof. Bogdan Marciniak z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza. Zainteresowania badawcze Profesora koncentrują się na poszukiwaniu nowych reakcji katalitycznych, przede wszystkim w chemii krzemu, boru, germanu i zastosowaniu ich w produkcji bio- czy nanomateriałów, wykorzystywanych m.in. w medycynie, farmacji, przemyśle elektronicznym.

W kategorii badań na rzecz rozwoju społeczeństwa nagrodę otrzymał bioinformatyk prof. Roman Kaliszan (Fot. 1), który wraz z zespołem z Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku opracował m.in. nowoczesne, nieinwazyjne metody diagnozowania nowotworów na podstawie chemiinformacyjnej analizy próbek moczu. Bioinformatyka jest jednym z podstawowych zainteresowań naukowych prof. Kaliszana. Metoda oparta na biosensorach do testowania potencjalnych leków przeciw chorobie Alzheimera także jest wynikiem pracy naukowej Laureata.

Prof. Roman Kaliszan ukończył studia w Akademii Medycznej w Gdańsku w 1968 roku, a w rok póź-

niej rozpoczął naukę na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Tytuł profesora uzyskał w 1994 r. Przez trzy lata do 2008 roku pełnił funkcję rektora Akademii Medycznej w Gdańsku. Jest członkiem korespondentem PAN i PAU. W uczelni kieruje Katedrą Biofarmacji i Farmakodynamiki.

W kategorii badań na rzecz rozwoju gospodarki nagrodę otrzymał prof. Romuald Będziński z Politechniki Wrocławskiej. Jego fascynacja budową organizmu człowieka doprowadziła do wielu rozwiązań technicznych stosowanych w praktyce klinicznej, zwłaszcza w ortopedii.

Laureaci nagród ministra nauki zostali wybrani spośród kandydatów przez specjalnie powołany zespół interdyscyplinarny pod przewodnictwem specjalisty w zakresie automatyki i robotyki prof. Henryka Góreckiego. Kandydatów do nagrody zgłaszały m.in. komitety naukowe instytutów badawczych, władze uczelni, organizacje naukowe. Tegoroczna edycja rozdania nagród

odbyła się tuż przed rządową debatą nad projektowanymi zmianami w szkolnictwie wyższym, które mają pomóc polskim naukowcom, promując najlepszych badaczy, i podnieść przez to prestiż polskiej nauki na świecie. W trakcie uroczystości wręczenia nagród Pani minister Kudrycka zapowiedziała, że od stycznia 2010 r. resort nauki stworzy **Wirtualną Bibliotekę Nauki**, dzięki której studenci i naukowcy w Polsce będą mieli bezpłatny dostęp do najbardziej aktualnych periodyków naukowych na świecie. (wg PAP).

**Krakowski Klaster LifeScience** jest jednym z filarów sieciowej organizacji non – profit „Global Innovation Network” (GIN) – międzynarodowego porozumienia mającego na celu połączenie powstających regionów nauk biomedycznych we wspólną sieć

tak, by mogły one skutecznie współzawodniczyć z najbardziej rozwiniętymi ośrodkami life science na świecie. Stronami porozumienia, podpisanego w maju b.r. w Atlancie, i partnerami w tym przedsięwzięciu są: Jagiellońskie Centrum Innowacji (JCI) – zarządcą krakowskiego Klastra Life Scien-



Fot. 1. Profesor Roman Kaliszan (drugi od lewej).

ce, North Carolina's Eastern Region (NCER) oraz Bioaratec Region of Saragossa z Hiszpanii. Naczelnym celem porozumienia jest wzmocnienie konkurencyjności bio-regionów w rywalizacji na rynku przemysłu biotechnologicznego, przyciąganie ciekawych inwestycji, tworzenie nowych firm biotechnologicznych oraz transfer technologii i wyników badań. Podmiotami w projekcie mogą być regionalne organizacje ds. rozwoju, organizacje typu non profit wspierające nauki biomedyczne oraz wybrane jednostki naukowe, które zostaną zaproszone do uczestnictwa. Ich zadaniem w ramach sieci jest dostarczanie określonych usług, kapitału oraz wiedzy. Dzięki GIN możliwe będzie tworzenie nowych firm o zasięgu światowym, łączenie projektów badawczych, innowacyjnych, i technologii oraz wspólne występowanie w negocjacjach z firmami z sektora farmaceutycznego i biotechnologicznego.

Spółka Jagiellońskie Centrum Innowacji (JCI) jest koordynatorem krakowskiego Klastra Life Science – sieci 57 instytucji biomedycznych z regionu Małopolski, reprezentowanych przez przemysł biomedyczny i biotechnologiczny, projekty badawczo-rozwojowe, Akademię Medyczną, szpitale, oraz Uniwersytet Jagielloński. Centrum zarządza też powstającym Parkiem LifeScience, którego celem ma być usprawnienie współpracy przedsiębiorstw działających w sektorze nauk o życiu.

**Dyskusja „Powrót Kolumba” odbyła się 6 października b.r. w Warszawie.** FNP przyznała w tym roku wybitnym młodym naukowcom 11 stypendiów na zagraniczne staże podoktorskie w najlepszych ośrodkach na świecie, a jednocześnie 16 młodych badaczy otrzymało od FNP subsydia, które mają umożliwić im kontynuowanie pracy badawczej po powrocie z długoterminowego pobytu naukowego za granicą. Uroczystość wręczenia stypendiów FNP wspomagających obydwie kierunki (wyjazdy i powroty) migracji młodych polskich badaczy, była okazją do dyskusji o ich sytuacji w realiach krajowych, tzn. w zderzeniu z biurokracją administracji i złymi relacjami międzyludzkimi w środowisku ich

pracy. W dyskusji panelowej „Powrót Kolumba” wzięli udział młodzi naukowcy, którzy pracowali w wiodących światowych instytucjach badawczych i wrócili do Polski, by tu kontynuować swoje kariery naukowe, a jednym z gości był prof. Tadeusz Luty, były rektor Politechniki Wrocławskiej i honorowy przewodniczący Konferencji Rektorów Akademickich Szkół Polskich. W dyskusji prowadzonej przez preza FNP prof. Macieja Żylicza wzięł udział m.in. prof. Bogusław Smólski, dyrektor Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR).

Według prof. Tadeusza Luty, powrót ze stażu podoktorskiego oznacza dotkliwie zderzenie z polską administracją na uczelniach i w instytutach badawczych. Zakres administracji, jaka jest potrzebna w instytucjach naukowych, jest taki sam, jak w Stanach Zjednoczonych, Japonii i w Polsce, lecz kultura urzędnicza jest zasadniczo inna, a to w Polsce nie ułatwia życia naukowcom. Nie wspominając już o konieczności funkcjonowania w systemie ograniczeń finansowych w Polsce. W debacie prof. Smólski podkreślał iż działania FNP mogą być wzorem dla innych agencji. Elitarna rola FNP w systemie nauki polega na wypracowaniu zbioru dobrych wzorców z ograniczonym polem działania i ograniczonymi środkami. Bazując na tej opinii NCBiR ogłosiło w lutym 2009 roku program LIDER korespondujący z działaniami FNP. Program ten jest kierowany do badaczy po stażach podoktorskich, umiejących przedstawić dobry projekt badawczy z trzyletnią perspektywą realizacji. Program ten dla młodych ludzi jest szansą wyjścia z hierarchicznego systemu poprzez aktywność i negocjacje. (Nauka w Polsce).

**W dziewiątej edycji akcji „Zostańcie z nami” tygodnik „Polityka” i jego fundacja nagrodziły 16 wybitnych młodych naukowców**

stypendiami po 25 tysięcy, przeznaczonych na kontynuowanie pracy badawczej. Ubieganie się o różne formy pomocy finansowej są obecnie istotną częścią kariery naukowej młodych naukowców. I to oni są prężni, nie macierzyste jednostki w ubieganiu się o granty, staże, stypendia. Laureatami w dziedzinie nauk matematyczno-fizycznych i biologicznych zostali: dr hab. Tadeusz Andruniów z Wydziału Chemicznego Politechniki; Wrocławskiej; prowadzi badania w dziedzinie fotobiologii, jest współautorem ważnych odkryć dotyczących fotochemii procesu widzenia. Planuje prace nad fotoizomeryzacją rodopsyny, a także syntezą przełączników molekularnych, czyli cząstek, które zamieniają energię chemiczną na mechaniczną, czyli światło na pracę np. ruch mięśni; dr inż. Jarosław Domaradzki z Wydziału Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki

Wrocławskiej; bada możliwości wytwarzania i zastosowania nanokrystalicznych materiałów tlenkowych na potrzeby nowoczesnej elektroniki i fotoniki. Planuje prace nad aktywnymi powłokami optycznymi, które mogą pełnić jednocześnie funkcję wyświetlacza, ogniwa słonecznego, szyby o sterowanym zaciemnieniu, są odporne na zarysowania i czynniki atmosferyczne, a ponadto mają zdolność samooczyszczania; dr Agnieszka Łoboda (Fot. 2) z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ; bada geny uczestniczące w procesach zapalnych i regulujących powstawanie naczyń krwionośnych. Ma nadzieję, że badania m.in. w ramach kierowanego przez nią projektu, finansowanego przez MNiSW, pomogą w opracowaniu nowych terapii antynowotworowych, bowiem przez zahamowanie tworzenia naczyń krwionośnych można powstrzymać rozwój nowotworu. Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, odniosła sukces podczas



Fot. 2. Doktor Agnieszka Łoboda (w środku).

Forum Młodych w trakcie Zjazdu Towarzystwa, we wrześniu b.r. w Łodzi; **dr inż. Marcin Magdziarz** z Instytutu Matematyki i Informatyki Politechniki Wrocławskiej zajmuje się matematycznym opisem i badaniem zjawisk przyrodniczych o charakterze losowym, we współpracy z ośrodkami w Cambridge, Monachium, Tel Awiwie; **dr inż. Marcin Sikora** z Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH; prowadzi badania na pograniczu fizyki materiałów, chemii i medycyny. Zajmuje się fizyką ciała stałego.



Fot. 3. Doktor Izabela Szczerbal.

Doświadczenia zdobyte w Europie i USA chce wykorzystać w Polsce przy budowie synchrotronu oraz w Akademickim Centrum Materiałów i Nanotechnologii; **dr Izabela Szczerbal** (Fot. 3) z Katedry Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu; zajmuje się biologią molekularną i cytogenetyką, w tym epigenetyką, czyli badaniem dziedziczności pozagenowej, i genomiką. Obecnie jej badania dotyczą kontroli genetycznej różnicowania się komórek tkanki tłuszczowej świnii, będącej gatunkiem modelowym w badaniach nad otyłością



Fot. 4. Doktor habilitowany Lucjan Wyrwicz.

człowieka; **dr Jakub Szymanik** pracę doktorską z informatyki obronił i opublikował w Amsterdamie. Studiował filozofię, psychologię, lingwistykę i matematykę na UW w ramach Kolegium MISH oraz jako stypendysta Collegium Invisible. Jego badania są wszechstronne, a w ich centrum jest złożona semantyka języka naturalnego. Bada go z perspektywy matematycznej i filozoficznej, biorąc jednocześnie pod uwagę właściwości ludzkiej psychiki. Zajmuje się przykładowo teorią widzenia i semantyką zdań, opisujących doświadczenia wizualne; **dr hab. Lucjan Wyrwicz** (Fot. 4) z Centrum Onkologii - Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie kieruje pracami Sa-

modzielnej Pracowni Bioinformatyki i Biologii Systemowej. Dzięki grantowi z MNiSW opracował cykl siedmiu publikacji na temat budowy białek, odpowiadających za zjadliwość herpeswirusów (znany przedstawiciel tej rodziny jest m. in. wirus opryszczki wargowej).

W wyborze najzdolniejszych młodych naukowców pomagają organizatorom konkursu grupa wybitnych naukowców. W Kapitulę zasiadają m.in. prof. Katarzyna Chałasińska-Macukow, rektor Uniwersytetu Warszawskiego i prof. Michał Kleiber, prezes PAN. Fundatorami nagród są: AEGON TU na Życie, AEGON PTE S.A., PKO Bank Polski, Fundacja J&S Pro Bono Poloniae, Provident Polska SA, Polkomtel SA, AXA Życie TU SA, Electric Power Research Institute, Fundacja Polskiego Godła Promocyjnego „Teraz Polska” oraz czytelnicy „Polityki” przekazujący 1% podatku dochodowego na fundusz stypendialny.

Wśród młodych naukowców wyróżnionych przez „Politykę” stypendiami „Zostańcie z nami” są, także stypendyści FNP Start, K o l u m b i P o w r o-

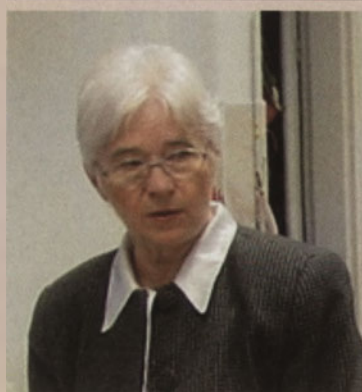
ty/Homing: **Aleksandra Cisłak** z Instytutu Psychologii PAN i SWPS, **Dariusz Jemielniak** z Akademii Leona Koźmińskiego, **Marcin Magdziarz** z Instytutu Matematyki i Informatyki PWr, **Anna Matysiak** z Instytutu Statystyki i Demografii SGH, **Agnieszka Łoboda** z Wydziału Biochemii i Biofizyki UJ, **Jakub Momro** z Wydziału Polonistyki UJ, **Izabela Szczerbal** z Katedry Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, **Jakub Szymanik** z Uniwersytetu Warszawskiego, **Lucjan Wyrwicz** z Centrum Onkologii - Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie oraz **Wojciech Załuski** z Wydziału Prawa i Administracji UJ.

**Projekt produkcji odczynników do rozróżniania grup krwi.** Uniwersytet Jagielloński i Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Katowicach (RCKiK) zawiązały konsorcjum, którego celem jest opracowanie pierwszych w Polsce nowoczesnych odczynników do diagnostyki serologicznej. Prace badawcze grupy **dr hab. Joanny Berety** dadzą szansę na tańsze leczenie pacjentów. Autorzy projektu ubiegają się o uzyskanie dofinansowania w ramach programu „IniTech” z MNiSW.

Do oznaczania grup krwi używane są odczynniki absolutnie specyficzne oparte na przeciwciałach monoklonalnych rozpoznających tylko jeden rodzaj antygenów. Nie są one wytwarzane w Polsce, a jedynie konfekcjonowane. **Grupa badawcza dr hab. Joanny Berety** z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ jest jedynym zespołem w Polsce, w którym wytwarza się nowe linie komórek produkujących przeciwciała monoklonalne. UJ posiada specjalistyczne laboratorium umożliwiające naukowcom rozwijanie projektów tego typu, a RCKiK w Katowicach jest jedynym w Polsce centrum krwiodawstwa, które na tę skalę zajmuje się wytwarzaniem odczynników serologicznych. Konsorcjum tych dwóch jednostek ma na celu opracowanie technologii oraz wdrożenie jej do produkcji. Dzięki projektowi i współpracy nauki oraz przemysłu powstanie zestaw polskich, tańszych odczynników do rozpoznawania grup krwi (0, A, B i AB) oraz antygeny D (czynnika Rh). Kierownikiem konsorcjum jest **dr hab. Joanna Bereta**. Ze strony RCKiK w Katowicach uczestniczą **dr Katarzyna Rothkegel** – kierownik Działu Produkcji Odczynników Serologicznych oraz **dr Stanisław Dyląg**, dyrektor naczelny tej jednostki. Zaplanowany na 4 lata projekt ma być realizowany w dwóch fazach. Faza pierwsza, badawcza, będzie realizowana w całości w Krakowie. Faza przygotowań do wdrożenia obejmie certyfikację tych odczynników, ich standaryzację i dopuszczenie do obrotu. Następnie RCKiK będzie zajmowało się wytwarzaniem odczyn-

ników w swoich laboratoriach w Katowicach (wg Nauka w Polsce).

W Gdańsku na budynku Międzyuczelnianego Instytutu Biotechnologii odsłonięta została 27 października tablica upamiętniająca Profesorów, Annę J. Podhajską (Fot. 5), Karola Taylora i Wacława Szybalskiego (Fot. 6). Zaraz po uroczystości, w sali im. Karola Taylora, prof. Wacław Szybalski z University



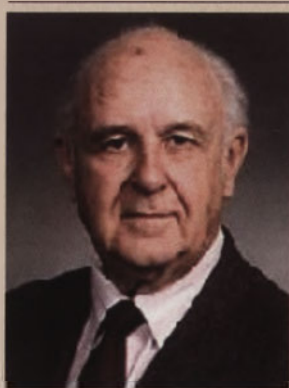
Fot. 5. Profesor Anna J. Podhajská.

of Wisconsin – Madison przedstawił wykład "ALEXANDER ZAWADZKI (1798–1868) of Lwów University, Poland, GREGOR MENDEL'S mentor and inspirer of the Genetics".

Z inicjatywy naukowców z Uniwersytetu Nawarry z Pampeluny w Hiszpanii, miasta zaprzyjaźnionego z Toruniem, odbywać się będą co miesiąc, przez rok akademicki 2009/2010 „Dysputy Nawarryjskie”. Nawiązujące do średnio-wiecznych tradycji uniwersyteckich spotkania otwarte dla publiczności rozpoczął 27 października wykład profesora Uniwersytetu Nawarra

Jesus Tanco Lerga na temat: „W obliczu kryzysu dziennikarstwa tradycyjnego: poszukiwanie i przekaz prawdy jako wymogi dobrej informacji”. Wykład odbył się w Dworze Artusa w Gdańsku. Inicjatorami wydarzenia są rektor Uniwersytetu Nawarry profesor Angel Jose Gomez Montoro, który objął patronatem honorowym całość przedsięwzięcia i wyraża gotowość do wzięcia

udziału w jednym z wykładów, oraz konsul honorowy RP w Pampelunie Angel Tellechea Goyena. W Dysputach Nawarryjskich wezmą udział pracownicy naukowcy, profesorowie różnych dziedzin Uniwersytetu Nawarry. Wykłady obejmują zagadnienia związane z naukami ścisłymi,



Fot. 6. Profesor Wacław Szybalski.

przyrodniczymi, zajmującymi się człowiekiem i jego wytworami kulturowo-duchowym oraz kierowane m.in. do pracowników naukowych uczelni, studentów i inteligencji nie zajmującej się pracą naukową. Każdy uczestnik będzie mógł wpływać na przebieg dysputy, stawiać tezy i szukać odpowiedzi na nurtujące go pytania. Kolejne wykłady w ramach Dysput Nawarryjskich w Toruniu będą okazją do spotkania z wielu profesorami Uniwersytetu Nawarra, m.in.: Juanem

Manuelem Mora (prof. dziennikarstwa, wicerektor ds. komunikacji instytucjonalnej UN), Jose Antonio Fernandezem (Katedra Camino de Santiago), Marią Iraburu (prof. biochemii i biologii molekularnej, wicerektor ds. wewnętrznych uniwersyteckich), Pedro Lozano Bartolozzim (prof. międzynarodowych relacji instytucjonalnych), Marią Eugenią López Jacoiste (Wydział Prawa, dyrektor Centrum Studiów Europejskich) czy Manuelem Casado (dyr. departamentu Lingwistyki Hiszpańskiej i Języków Nowożytnych). Wykłady będą odbywały się regularnie do czerwca 2010 roku.

Zespół dr hab. Doroty Gryko z Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie pracuje nad stworzeniem związków, które miałyby zastąpić albo uzupełnić leki stosowane dotychczas w chorobach naczyń wieńcowych. Rozkurczanie naczyń wieńcowych i ułatwienie przepływu krwi umożliwiają m.in. nitrogliceryna, wykorzystywana w terapii choroby wieńcowej. Po podaniu nitroglicery-

ny nasila się tworzenie tlenu azotu, a ten aktywuje cyklazę guanylową w cytosolu. W rezultacie następuje rozkurcz mięśni gładkich, skutkujący obniżeniem ciśnienia krwi. Przedłużone w czasie stosowanie leków wzmagających tworzenie tlenu azotu wymaga, wskutek przyzwyczajenia organizmu do stosowanego leku, zwiększania dawek tych leków u pacjentów. To powoduje, że dr hab. Dorota Gryko z zespołem pacjentów pragną stworzyć związki, które będzie można stosować zastępczo lub uzupełniająco m.in. z niedoskonałą nitrogliceryną. Wg autorki projektu mogą to być związki oparte na szkieletie protoporfiryny IX i pochodnych witaminy B12, które w sposób niezależny od tlenu azotu będą aktywowa-

ły odpowiedni enzym. Witamina B12, wykorzystując swoje szlaki metaboliczne transportowałyby protoporfirynę do naszego organizmu natomiast fragment porfirynewy aktywowałyby właściwy enzym. W sytuacji komfortu metabo-

licznego, nie trzeba by zwiększać dawek leku. Zamierzone uzyskanie modelowego związku wymaga przynajmniej 10 lat. Pieniądże na badania i utworzenie zespołu badawczego – niemal dwa miliony złotych – przyznała Fundacja na rzecz Nauki Polskiej, w ramach programu „Team”.

Polskie Stowarzyszenie Dziennikarzy Naukowych Naukowi.pl przyznali wyróżnienie Odkrywcy Roku 2009 profesorom Lechowi Mankiewiczowi (Fot. 7) z Centrum Fizyki Teoretycznej PAN, Grzegorzowi Wrochnie z Instytutu Problemów Jądrowych w Świerku oraz Aleksandrowi Filipowi Żarneckiemu z Wydziału Fizyki UW. Badacze zostali wyróżnieni za sfotografowanie „narodzin czarnej dziury”, czyli błysku światła widzialnego, towarzyszącego rozbłyskowi promieniowania gamma. Był to najjaśniejszy wybuch zaobserwowany kiedy-



Fot. 7. Profesor Lech Mankiewicz.

kolwiek przez człowieka. Można go było zobaczyć gołym okiem, choć miał miejsce 7,5 mld lat świetlnych od Ziemi. Odkrycie ogłoszono we wrześniu 2008 roku na łamach prestiżowego czasopisma naukowego „Nature”. Naukowi.pl przyznali także po raz drugi nagrodę dla „Naukowca przyjaznego mediom”. Otrzymał ją prof. Bogusław Pawłowski z Katedry Antropologii Uniwersytetu Wrocławskiego i z Zakładu Antropologii PAN we Wrocławiu.



Fot. 8. Doktor habilitowana Ewa Stachowska.

Dr hab. Ewa Stachowska (Fot. 8) jest kierownikiem projektu „Dietyk – poszukiwany specjalista w systemie promocji i ochrony zdrowia” współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach poddziałania 4.1.1 „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego uczelni”, Priorytetu IV „Szkolnictwo wyższe i nauka”, Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki. Celem ogólnym projektu jest utworzenie i realizacja nowego kierunku studiów – dietetyki – w Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie z równoczesnym przygotowaniem bazy dydaktycznej do pracy z osobami niedosłyszącymi lub/i dysfunkcją narządu ruchu w stopniu lekkim. Ponadto projekt proponuje rozszerzenie oferty edukacyjnej o kursy z zakresu zasad żywienia człowieka i

dietetyki dla osób spoza społeczności akademickiej, oraz podniesienie kompetencji akademickiej kadry dydaktycznej. Wszystkie działania mają na celu realizowanie promocji i edukacji zdrowotnej dla zwiększenia poziomu wykształcenia społeczeństwa w zakresie właściwych postaw zdrowotnych; są zgodne ze strategią rozwoju Uczelni i założeniami Strategii rozwoju kraju na lata 2007–2015. Dr hab.

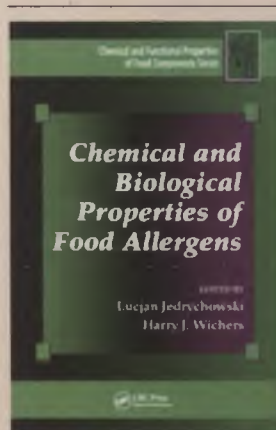
Ewa Stachowska kieruje Zakładem Biochemii i Żywienia Człowieka, integralnej jednostki Katedry Biochemii i Chemii Medycznej PAM w Szczecinie. Jest aktywnym członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Wydana przez CRC Press ukazała się we wrześniu b.r. publikacja książkowa „Chemical and Biological Properties of Food Allergens” (Fot. 9) pod redakcją: Lucjana Jedrychowskiego i Harry J. Wichers, z rozdziałem „Molecular, Cellular and Physiological Mechanisms of Immunological Hyporesponsiveness/Sensitization to Food, autorstwa szczecińskich autorów Elżbiety Kucharskiej, Joanny Bober, i Tadeusza Ogońskiego. Dwoje ostatnich autorów należy

do Polskiego Towarzystwa Biochemicznego; dr hab. Joanna Bober jest aktualnie przewodniczącą Oddziału w Szczecinie, a dr Tadeusz Ogoński był przewodniczącym Oddziału w latach 1996–2002. W rozdziale autorzy poruszają zagadnienia fascynującej własności układu pokarmowego, jaką jest umiejętność reagowania odpowiedzią immunologiczną na bakterie i fragmenty składników żywności, mogących zagrażać człowiekowi. W stanie zdrowia reakcja odpornościowa adekwatna do stopnia zagrożenia jakie antygeny niosą dla ustroju. Naruszenie równowagi immunologicznej ustroju może być powodem rozwoju alergii. W opracowaniu autorzy omawiają najczęstsze mechanizmy immunologiczne leżące u podstaw alergii pokarmowej. Poruszają zagadnienia obejmujące molekularne i biochemiczne uwarunkowania

alergii pokarmowej, role supresji, tolerancji i apoptozy; uwarunkowania genetyczne, środowiskowe, sposoby ekspozycji, drogi wnikania, częstości podania i dawki alergenu; naruszenia lub przywrócenia równowagi pomiędzy pobudzeniem a tolerancją immunologiczną; aplikacji funkcjonalnej genomiki i proteomiki w alergologii. (wg info prof. E. Kucharskiej).

pod redakcją Teresy Wesołowskiej

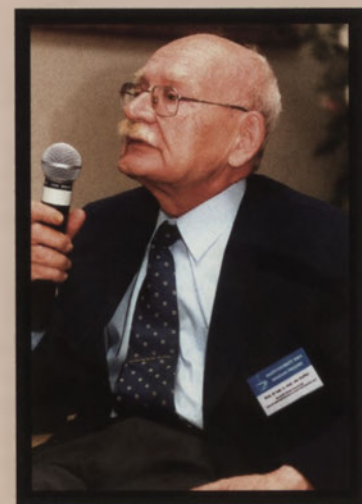


Fot. 9.

## WSPOMNIENIE O PROFESORZE JANIE STEFFENIE (1936–2009)

Dnia 10 sierpnia 2009 roku zmarł w Warszawie prof. dr hab. med. Jan Steffen, wieloletni kierownik Zakładu Immunologii Centrum Onkologii-Instytutu w Warszawie, onkolog, immunolog, genetyk, naukowiec bez reszty oddany sprawom nauki.

Profesor Jan Steffen, urodził się 1936 roku w Poznaniu jako syn Wiktora Steffena, wybitnego filologa klasycznego i hellenisty, profesora na Uniwersytecie Wrocławskim i na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W roku 1958



Profesor Jan Steffen ukończył studia medyczne na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Poznaniu i uzyskał dyplom lekarza medycyny z wyróżnieniem. W czasie studiów i stażu podyplomowego pracował w II Klinice Chorób Wewnętrznych AM w Poznaniu. W tym czasie był członkiem trzosobowego zespołu lekarskiego, który przeprowadził w tej klinice pierwsze w Polsce zabiegi hemodializy pozaustrojowej.

W latach 1958-1963 był kolejno asystentem i starszym asystentem w Zakładzie Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, a w latach 1963-1969 pracował na stanowisku adiunkta w nowoutworzonym Zakładzie Genetyki Człowieka AM w Poznaniu. W Zakładzie Patologii rozwinął badania nad patofizjologią ostrej niewydolności nerek wywołanej metalami ciężkimi, co było przedmiotem jego rozprawy doktorskiej, na podstawie której w roku 1960 uzyskał stopień doktora medycyny, a następnie badania nad lokalizacją transportu cewkowego elektrolitów, kwasu moczowego i aminokwasów.

W latach 1961/62, podczas stypendium Fundacji Rockefellera w Zakładzie Biofizyki Centrum Medycznego Uniwersytetu w Colorado, Denver USA, uczestniczył w badaniach nad metodami analizy cyklu komórkowego i wpływem promieniowania jonizującego na cykl komórkowy. W roku 1963, jako pierwszy w kraju, Profesor Jan Steffen wprowadził metody analizy cytogenetycznej m.in. do badań nad patogenezą wad wrodzonych i zaburzeń różnicowania się płci. Przedmiotem prac były m.in. zaburzenia syntezy DNA w chromosomach X obciążonych aberracjami chromosomalnymi. W latach 1963-1969 prowadził wykłady i seminaria z zakresu genetyki człowieka dla studentów medycyny. Był też autorem pierwszego, wydanego w roku 1965, podręcznika genetyki dla studentów medycyny pt.: „Wstęp do Genetyki Człowieka”. Na podstawie badań nad kinetyką transformacji blastycznej, syntezą kwasów nukleinowych, charakterystyką cyklu życiowego limfocytów oraz wpływem inhibitorów syntezy DNA, RNA i białek na te procesy uzyskał już w wieku 29 lat stopień naukowy

doktora habilitowanego. W latach 1965-1966 podczas kilkumiesięcznego stażu w Instytucie Badań nad Komórką w Medicinska Nobelinstitutet w Sztokholmie, kontynuował swoje badania nad charakterystyką punktu kontrolnego G1/S w cyklu komórkowym.

W roku 1969 podjął pracę w Instytucie Onkologii w Warszawie, gdzie najpierw kierował Pracownią Biologii Komórki w Zakładzie Radiobiologii, a od 1974 roku Zakładem Immunologii. W roku 1976 uzyskał tytuł profesora. W Zakładzie Radiobiologii, a następnie w Zakładzie Immunologii Centrum Onkologii kontynuował m.in. swoje wcześniejsze prace nad metaboliczną synchronizacją komórek w punkcie G1/S cyklu komórkowego, prowadził badania nad promieniowrażliwością komórek, zróżnicowaniem funkcjonalnym limfocytów i roli cytokin w mechanizmach rozwoju nowotworów u ludzi. Zajmował się także problematyką zwalczania nowotworów.

W Polsce był Profesorem pomysłodawcą i prekursorem badań nad dziedzicznymi uwarunkowaniami chorób nowotworowych. Od roku 1995 do ostatnich tygodni życia prowadził badania populacyjne poświęcone tym zagadnieniom. Przedmiotem tych badań było m.in. ryzyko zachorowania na nowotwory heterozygotycznych nosicieli mutacji genu *NBS1*, struktura zachorowań na nowotwory u nosicielek mutacji genu *BRCA1* i genów *MMR*. Był współinicjatorem oraz współautorem założeń i programu realizacji Narodowego Programu Zwalczania Chorób Nowotworowych, a także członkiem Rady tego Programu. Był też inicjatorem i koordynatorem programów opieki nad rodzinami wysokiego, dziedzicznie uwarunkowanego ryzyka zachorowania na raka piersi, jajnika, jelita grubego i błony śluzowej trzonu macicy, które obecnie realizowane są w około dwudziestu onkologicznych poradniach genetycznych w Kraju jako jedno z zadań Narodowego Programu Zwalczania Chorób Nowotworowych.

Profesor Jan Steffen był autorem ponad 100 prac naukowych. Był też laureatem wielu nagród, m.in. na-

gród naukowych Miasta Poznania, Przewodniczącego Agencji Energii Atomowej, Rady Naukowej przy Ministrze Zdrowia, Sekretarza Naukowego Polskiej Akademii Nauk, Wydziału Nauk Medycznych PAN. Pięciokrotnie był uhonorowany nagrodami Ministra Zdrowia, w tym nagrodą specjalną. Był honorowym członkiem Polskiego Towarzystwa Onkologicznego, Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej i brytyjskiego Radiotherapy Club.

W latach 1976-1985 Profesor Jan Steffen był zastępcą dyrektora Instytutu Onkologii (przekształconego następnie w Centrum Onkologii-Institut) ds. organizacji i koordynacji prac badawczych, a w latach 1985-1991 dyrektorem Centrum Onkologii-Institutu. W latach 1976-1985 był członkiem Zespołu Koordynacyjnego, odpowiedzialnym za merytoryczną realizację Rządowego Programu Zwalczania Chorób Nowotworowych. Nadzorował również bezpośrednio finansowane przez ten program badania podstawowe. W latach 1986-1990 kierował Centralnym Programem Badawczo-Rozwojowym Zwalczanie Chorób Nowotworowych.

Od roku 1991, przez blisko 17 lat Profesor Jan Steffen przewodniczył Radzie Naukowej Centrum Onkologii - Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie. W latach 1984-1996 oraz od 2003 do 2008 roku był Przewodniczącym Rady Naukowej Zakładu (i późniejszego Instytutu) Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. W latach 1999-2003 był przewodniczącym Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu. Od roku 2003 był przewodniczącym Komisji Nauki Rady Naukowej Polskiej Unii Onkologii. Przez ponad 25 lat Profesor Jan Steffen był członkiem Centralnej Komisji ds. Tytułu Naukowego i Stopni Naukowych (wcześniej zwanej Centralną Komisją Kwalifikacyjną), w tym, w dwóch kadencjach wiceprzewodniczącym Sekcji Nauk Medycznych tej Komisji. W latach 1989-1991 był członkiem i przewodniczącym Zespołu ds. Zdrowia i Ochrony Środowiska w Komitecie Nauki i Postępu Technicznego, w latach 1994-2000 był



Członkiem Zespołu Nauk Medycznych i Komisji Badań Podstawowych KBN; w latach 2000-2004 przewodniczył Sekcji Biologii Medycznej KBN. W latach 1986-1999 był członkiem Rządowej Komisji Ludnościowej.

Od 1986 roku Profesor Jan Steffen był członkiem korespondentem, a od 2002 członkiem rzeczywistym Polskiej Akademii Nauk. W Polskiej Akademii Nauk był m.in. przewodniczącym Komisji Genetyki Człowieka i Komisji Biologii Nowotworów; w latach 1992-1998 był przez dwie kadencje członkiem Prezydium PAN, a w latach 1998-2000 – przewodniczącym Komisji ds. Współpracy PAN z Zagranicą. Od 1998 roku był członkiem Kolegium Doradczego Przewodniczącego Wydziału Nauk Medycznych PAN. W latach 1990-1991 był Przewodniczącym Komisji Programowej Europejskiej Organizacji Instytutów Onkologii. W latach 1998-2000 reprezentował PAN w Europejskiej Radzie Badań Medycznych (EMRC).

Profesor Jan Steffen był odznaczony Złotym Krzyżem Zasługi, Krzyżem Kawalerskim i Krzyżem Komandorskim Orderu Odrodzenia Polski.

Tę niezwykle aktywność naukową i społeczną Profesora Jana Steffena niespodziewanie przerwała choroba. Kiedy w maju ubiegłego roku wybierał się do szpitala był przekonany, że straci jedynie 3 tygodnie swojego cennego czasu...

Profesora Jana Steffena poznałam będąc jeszcze studentką i praktykantką, a następnie magistrantką Zakładu Immunologii. Potem Profesor był moim szefem przez całe moje życie zawodowe. Znałam Go 29 lat.

Był człowiekiem niezwyklej wiedzy i umysłowości. Nie będąc praktykującym lekarzem, tym bardziej zadziwiał swoją rozległą wiedzą na temat medycznych aspektów chorób nowotworowych, w tym ich objawów, przebiegu, klasycznych i najnowszych metod diagnostyki i leczenia. Był rzadkim typem naukowca, który potrafił błyskawicznie kojarzyć z pozoru odległe zjawiska biologiczne i analizować je w kontekście aspektów medycznych. Szerokie spojrzenie łączył ze zdolno-

ścią do stawiania niezliczonej ilości pytań i formułowania problemów badawczych. Lubił dzielić się swoimi pomysłami badawczymi. Wielu naukowców i lekarzy zawdzięcza Profesorowi Steffenowi swój rozwój naukowy.

Jego pasją była genetyka medyczna. To właśnie Profesor Jan Steffen był pomysłodawcą i prekursorem badań nad dziedzicznymi uwarunkowaniami chorób nowotworowych w Polsce.

Profesor miał szerokie horyzonty, interesował się polityką, gospodarką. Niezwykle odczytany potrafił zaskakiwać znajomością historii i geografii. Mało kto znał Go jako turystę, wielbiciela polskich gór i jezior, zapalonego kajakarza.

Onkologia polska zawdzięcza Profesorowi Steffenowi bardzo wiele. Nie tylko dlatego, że przewodniczył kilku Radom Naukowym, był członkiem CK, komisji PAN, KBN, i że wypromował wielu lekarzy i naukowców. Przede wszystkim dlatego, że Jego wiedza i szerokie spojrzenie na sprawy rozwoju onkologii w Polsce, wykraczające poza jakiegokolwiek interesy partykularne, czy to instytucji, grupy zawodowej, czy innych grup nacisku, pozwalały na rzetelną i obiektywną ocenę różnych rozwiązań, a Jego rozważne formułowanie myśli i autorytet pozwalały na godzenie różnych punktów widzenia. Potrafił całkowicie poświęcić się sprawie, co do słuszności której był przekonany i niejednokrotnie to czynił. Z takim właśnie oddaniem zabiegał o wdrożenie Narodowego Programu Zwalczania Chorób Nowotworowych, który współtworzył, był bowiem pewien, że bezpośrednie finansowanie onkologii pozwoli na bardziej efektywne wykorzystanie środków. Podobnie w trudnych czasach redukcji środków na naukę potrafił skutecznie przekonywać jak ważny dla postępu medycyny jest rozwój nauk podstawowych i ścisła współpraca lekarzy i naukowców.

Przez wiele lat miałam okazję obserwować Profesora podczas posiedzeń Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu, której przewodniczył. Znakomicie kierował tym gre-

mium, pozwalając wypowiedzieć się każdemu, jednocześnie utrzymując dyscyplinę dyskusji. Świetnie podsumowywał i pointował wypowiedzi, odróżniał kwestie ważne od pobocznych. Dobro Instytutu jako jednostki służącej nauce i pacjentom było dla Niego absolutnym priorytetem. W promowanych naukowcach starał się Profesor widzieć zawsze dobre strony, chwalił najlepszych, łagodził złe wrażenie, jakie pozostawiali słabsi, dbając przy tym o zachowanie dobrych standardów.

Profesor Jan Steffen wyróżniał się silną osobowością, był postacią bardzo wyrazistą. Nie znam nikogo, kto miałby do Niego stosunek obojętny. Wszyscy uznawali Jego autorytet.

Był człowiekiem pełnym uporu, niełatwym dla podwładnych. Wobec nas, swoich najbliższych współpracowników był najbardziej wymagający. Nasze prace naukowe musiały być najbardziej ambitne i spełniać wszystkie Jego oczekiwania.

Był człowiekiem bardzo skrytym, skupionym na sprawach zawodowych. Jednak potrafił słuchać problemów ludzkich, wyróżniając się wówczas dyskrecją i gotowością pomocy. Był bardzo wrażliwy na problemy zdrowotne innych ludzi, pomagał wszystkim, którzy zwracali się o pomoc.

Był też człowiekiem bardzo skromnym. Nawet w ostatnich miesiącach życia, będąc w prawdziwej potrzebie i mając wokół siebie wiele osób pomagających i gotowych nieść pomoc, często odmawiał przyjęcia tej pomocy, nie chcąc sprawiać kłopotu swoją osobą.

Wiele osób dowiedziawszy się o odejściu Profesora stwierdzało, że jest to koniec pewnej epoki. To prawda. Będzie Profesora brakowało. Pozostaje żywić nadzieję, aby wszystkie dobre standardy, które Profesor starał się wprowadzać, przetrwały.

### Cześć Jego pamięci!

#### Dr Magdalena Chechlińska

Zakład Immunologii, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

## VII KONFERENCJA IM. JAKUBA KAROLA PARNASA JAŁTA, 3-7 PAŹDZIERNIKA, 2009



VII Konferencja im. Jakuba Karola Parnasa (Parnas Conference on Biochemistry and Molecular Biology) odbyła się w Jałcie, na Krymie w dniach 3-7 października 2009 r. Konferencje im. Parnasa organizowane wspólnie przez Polskie i Ukraińskie Towarzystwa Biochemiczne odbywają się co dwa lata, naprzemiennie w Polsce i na Ukrainie. Pierwsza odbyła się we Lwowie w 1996 r., druga w Gdańsku w 1998 r., trzecia we Lwowie w 2000 r., a czwarta we Wrocławiu w 2002 r. Termin V Konferencji w Kijowie przesunięto na 2005 r., ponieważ w 2004 r. odbywał się w Warszawie Kongres FEBS. Następna VI Konferencja odbyła się w 2007 r. w Krakowie.

W skład Komitetu Organizacyjnego VII Konferencji im. Parnasa weszli Serhiy Komisarenko (współprzewodniczący, Prezes Ukraińskiego Towarzystwa Biochemicznego), Andrzej Dżugaj (współprzewodniczący, Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego), oraz Mykola Bagrov, Edward Bańkowski, Wanda Kłopocka, Serhiy Kosterin, Platon Kostyuk, Dymitro Melnychuk, Paweł Pomorski, Maria Jolanta Rędownicz, Andriy Sibirny i Adam Szewczyk. W skład Komitetu Naukowego weszli Jolanta Barańska, Jan Barciszewski, Stanisław Bielecki, Lyudmyla Drobot, Hanna El'ska, Leszek Karczmarek, Serhiy Komisarenko, Piotr Laidler, Aleksandr Minchenko, Aleksandr Reznikov, Svitlana Sidorenko, Marina Skok, Rostislav Stoika i Mykola Veliky. Jako Honorowi Goście zostali zaproszeni Stefan Angielski, Jerzy Duszyński, Janina Kwiatkowska-Korczak, Lech Wojtczak i Barbara Parnasowa. Niestety jedynie Jerzy Duszyński i Janina Kwiatkowska-Korczak wzięli udział w konferencji, pozostali

zaproszeni goście z przyczyn osobistych nie mogli na nią przybyć.

W konferencji uczestniczyło 245 osób, Wśród nich należy wymienić kolegów z Ukrainy (115), Polski (103), Rosji (9), Wielkiej Brytanii (5), Finlandii (3), USA (2), Włoch (2), Szwecji (2), Gruzji (2), Białorusi (1) oraz Chorwacji (1). Za wielkie osiągnięcie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego uważamy, że w licznej grupie uczestników z Polski więcej niż 50% stanowili doktoranci z różnych uczelni oraz instytutów naukowych.

Konferencję otworzyli Prezesi obu Towarzystw Biochemicznych – S. Komisarenko (Ukraina) i A. Dżugaj (Polska) oraz rektorzy Uniwersytetu Krymskiego (Vernadsky-Tavriysky National University – M. Bagrov) i Wyższej Szkoły Rolniczej (D. Melnychuk). Andrzej Dżugaj zaprosił zebranych na **następną Konferencję Parnasa**, która odbędzie w końcu sierpnia **2011 r. w Warszawie**. Po raz pierwszy w organizacji tej Konferencji będą miały równy udział trzy Towarzystwa Biochemiczne – polskie, ukraińskie i izraelskie. Jest to nawiązanie do organizacji Zakładu Chemii Fizjologicznej kierowanej w dwudziestolecie międzywojennym przez prof. Parnasa na Uniwersytecie Jana Kazimierza we Lwowie, gdzie wspólnie pracowali badacze o różnym pochodzeniu, polskim, ukraińskim i żydowskim, a także uhonorowanie zmarłego tragicznie we Lwowie, rokującego wielkie nadzieje ucznia Parnasa, dr Pawła Osterna. Następnie uczestnicy wysłuchali dwóch wykładów plenarnych – Sir Toma Blundella (University of Cambridge, UK) „Genomes, Structural Biology and Drug Discovery” oraz Konstantina Skryabina (Centrum Bioenergetyczne, Moskwa, Rosja) „Systems Biology: from microorganisms to Homo sapiens”. Po części oficjalnej odbyło się „get together party”. Zarówno rozpoczęcie obrad, wszystkie wykłady sympozjalne w kolejnych dniach Konferencji, sesje posterowe, a także spotkania nieoficjalne, np. „gala dinner” odbywały się w gmachu głównym kompleksu budynków Sanatorium

„Rossia” ulokowanych w przepięknym parku na brzegu Morza Czarnego w Jałcie.

Wykłady sympozjalne (37) wygłoszono na pięciu sesjach: sesji I „Receptors and Effectors in Cell Signalling”, sesji II “Biology of Extracellular Matrix”, sesji III “Nucleic Acids Technologies (RNA silencing, micro RNA, antisense NA, gene engineering, gene therapy and diagnostics, NA markers, DNA-test systems, GMO constructions), sesji IV “Molecular Medicine” i sesji V “Advances in Biotechnology, Biosafety and Biosecurity”. Sesji I przewodniczyły Jolanta Barańska (Polska) i Ludmyla Drobot (Ukraina), sesji II – Leszek Karczmarek (Polska) i Rostyslav Stoika (Ukraina), III – Hanna El'ska (Ukraina), IV – Piotr Laidler (Polska) i Aleksandr Reznikov (Ukraina), a Sesji V – Serhiy Komisarenko (Ukraina). Wykłady sympozjalne wygłosiło 13 osób z Ukrainy i 13 osób z Polski, ponadto 2 osoby z Rosji, 2 z Wielkiej Brytanii i 2 z Włoch, oraz po 1 osobie z Austrii, Finlandii, Gruzji, Szwecji i USA. Sesja I była sponsorowana przez Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Polskie Towarzystwo Biochemiczne serdecznie dziękuje za okazaną pomoc.

Dodatkowo, w przedostatnim dniu obrad odbyła się dyskusja Okrągłego Stołu (Round-table presentations and discussions on Biosafety, Biosecurity, Dual-Use and Scientific-Technical Cooperation). Prezentarami i moderatorami byli Serhiy Komisarenko (National Commission on Biosafety and Biosecurity, Kijów, Ukraina), Malcolm Dando (Wielka Brytania), Timo Korpela (Finlandia) i Sandor Vari (USA). Osoby te reprezentowały instytucje państwowe odpowiedzialne za omawianą tematykę.

Do Sesji Plakatowej zgłoszono 161 plakatów. Komisja konkursowa, na której czele stał Mykola Veliky wybrała sześć najlepszych. Ich autorzy, młodzi ludzie poniżej 35 lat, mieli następnie okazję przedstawić swoje wyniki na specjalnej Sesji Młodych Uczonych. Prezentacja wyników i udział w dyskusji pozwoliła Komisji Konkursowej

przyznać startującym w konkursie młodym ludziom pierwszą nagrodę, dwie równorzędne drugie nagrody oraz trzy wyróżnienia. Pierwsze miejsce (wraz z nagrodą pieniężną 400 Euro) uzyskał Anatoly Samoylenko z Instytutu Palladina Ukraińskiej Akademii Nauk (NASU) z Kijowa. Dwa drugie miejsca (wraz z nagrodą pieniężną 200 Euro) uzyskały: Dorota Wypych reprezentująca Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie oraz Alina Zamoshnikova z Instytutu Doświadczalnej Patologii, Onkologii i Radiobiologii NASU z Kijowa. Wśród wyróżnionych znalazła się Karolina Żwawa reprezentująca Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Konferencja odbywała się w niezwykle milej i serdecznej atmosferze.

Organizatorzy z Ukrainy zaprosili studencki zespół taneczny z Uniwersytetu na Krymie, którego występy uświetniły „gala diner”. Uczestnicy konferencji mogli brać udział w wycieczkach, między innymi do Pałacu Woroncowa czy Pałacu Livadia, w którym w 1945 r. Stalin, Churchill i Roosevelt podpisali umowę w sprawie powojennego układu stosunków międzynarodowych w Europie, wyznaczającej przyszłe granice Polski. Należy dodać, że prawie połowa (45 osób) polskich uczestników Konferencji przybyła do Jałty jadąc bezpośrednio z Warszawy autokarem wynajętym i opłaconym przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne. Trasa podróży biegła przez Żytomierz i Odessę. Wszyscy członkowie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego podróżujący autokarem byli zwolnieni z opłaty za

podróż. Jednak naszym głównym celem było umożliwienie uczestnictwa w Konferencji jak największej liczbie młodych ludzi. Cel ten został osiągnięty, bo doktoranci stanowili w autokarze 60% wszystkich podróżujących. Ponadto Polskie Towarzystwo Biochemiczne dofinansowało udział w Konferencji 14 młodym ludziom przed 30 rokiem życia. VII Konferencja Parnasa w opinii wszystkich uczestników była niezwykle udana. Poziom wykładów był oceniany jako wysoki. Nie można też nie wspomnieć o wspaniałym klimacie Jałty z ciepłym morzem w październiku i bujną roślinnością.

**Jolanta Barańska**  
Wiceprezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

#### SKŁADKI CZŁONKOWSKIE I PRENUMERATA „POSTĘPÓW BIOCHEMII”

Przypominamy, że składki członkowskie należy opłacać na bieżąco, to jest do 31 marca każdego roku. Przypominamy wszystkim, którzy zalegają ze składkami za rok 2008, by opłacili je nie później niż do końca 2009 r. W stosunku do osób, które nie uregulują opłat, w styczniu 2010 roku zostanie wszczęta procedura, przewidziana Statutem, zmierzająca do ich skreślenia z listy członków Towarzystwa. Prosimy o jak najszybsze opłacenie zaległych składek.

#### Składki członkowskie w 2010 roku

1. Pełna składka członkowska wynosi 100 zł rocznie (Uchwała Walnego Zgromadzenia Członków, Olsztyn, 9 września 2008 r.).
2. Członkowie, którym przyznano prawo do ulgowej składki, płacą składkę w wysokości 50 zł rocznie.
3. Małżeństwa opłacają składki w wysokości 100 + 50 zł lub 50 + 50 zł i otrzymują jeden egzemplarz „Postępów Biochemii”.
4. Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską do 31 marca każdego roku, mają zapewnioną bezpłatną prenumeratę kwartalnika „Postępy Biochemii”.
5. Członkowie, którzy opłacą składkę po tym terminie, będą otrzymywać kwartalnik do czasu wyczerpania zapasów magazynowych.
6. Członkowie honorowi zwolnieni są z opłacania składek członkowskich. Członkowie honorowi otrzymują bezpłatnie „Postępy Biochemii”.
7. Członkowie emeryci nie płacą składek członkowskich. Członkowie emeryci mogą zaprenumerować „Postępy Biochemii” po ulgowej cenie 50 zł rocznie.

W 2009 r. składki wynosiły 100 zł, a ulgowa 50 zł.

W 2008 r. składki wynosiły 80 zł, a ulgowa 40 zł.

W 2007 r. składki wynosiły 80 zł, a ulgowa 40 zł.

#### Prenumerata „Postępów Biochemii” w 2010 roku

1. Prenumeratorzy instytucjonalni płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” 180 zł rocznie.
2. Osoby fizyczne niebędące członkami Towarzystwa mogą zaprenumerować „Postępy Biochemii” w cenie 120 zł rocznie.
3. Studenci i doktoranci niebędący członkami Towarzystwa prenumerują „Postępy Biochemii” po ulgowej cenie 50 zł rocznie. Konieczne jest przy tym udokumentowanie statusu studenta lub doktoranta odpowiednim zaświadczeniem.

Opłaty należy wносить do banku PEKAO S.A.

Oddział Warszawa, ul. Krucza 24-26

na konto: 81 1240 6003 1111 0000 4947 2703

Opłaty z zagranicy: IBAN: PL81 1240 6003 1111 0000 4947 2703


SWIFT Code: PKOPPLPW

Koszt przelewu ponosi wpłacający.

Wątpliwości związane z opłacaniem składek można wyjaśniać codziennie w godzinach 10:00–15:00 w biurze Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, ul. Pasteura 3 (pok. 633), 02-093 Warszawa, tel. 022 5892 352 lub tel/fax 022 5892 499, e-mail: ptbioch@nencki.gov.pl

nagroda imienia

# artura rojszczaka



laureat w 2009 r.  
**dr Błażej Błażejowski**  
paleontolog i geolog  
popularyzator nauki wśród  
dzieci i nauczycieli;  
pokazuje, że nauka jest  
fascynująca, a jej poznanie  
jest przygodą intelektualną



laureatka w 2008 r.  
**dr Elżbieta Masiak**  
psycholog i muzyk  
prowadzi integracyjny, pro-  
fesjonalny zespół muzyczny  
*Syndrom*, gdzie osoby cho-  
rujące psychicznie mierzą  
się z prawdziwymi wyzwa-  
niami twórczymi



laureat w 2007 r.  
**dr inż. Zbigniew Chaniecki**  
informatyk  
opracował i prowadzi indy-  
widualny tok studiów w  
domu niepełnosprawnego  
studenta oraz pośredniczy  
w kontaktach z uczelnią



laureatka w 2006 r.  
**dr Ewa Kocój**  
etnolog  
pasjonatka przełamania  
stereotypów i animatorka  
kontaktów kulturowych  
między Polską a Rumunią

nagroda przyznawana corocznie młodym doktorom, którzy poza wybitnymi osiągnięciami naukowymi wyróżniają się humanistyczną postawą, szerokimi horyzontami, umiejętnością przełamywania barier i przekraczania ram wąskich specjalizacji naukowych

wysokość nagrody: 5000 zł  
termin zgłaszania kandydatur: 31 stycznia  
więcej informacji: [www.ksz-fnp.org](http://www.ksz-fnp.org)

przyznawana przez

**klub stypendystów zagranicznych  
fundacji na rzecz nauki polskiej**



# Znaczenie syntetaz aminoacylo-tRNA w patologiach i perspektywa ich wykorzystania w diagnostyce i terapii

## STRESZCZENIE

Powszechność występowania syntetaz aminoacylo-tRNA (aaRS) świadczy o ich niezwykle istotnej funkcji jaką pełnią w komórce. Od dawna wiadomo, że zapewniają one prawidłowy przebieg ekspresji informacji genetycznej zapisanej w DNA. Stosunkowo niedawno okazało się, że ich funkcja nie ogranicza się jedynie do katalizy syntezy aminoacylo-tRNA zdolnych do rozpoznawania specyficznych kodonów. aaRS są również zaangażowane w szereg innych istotnych procesów komórkowych. Zatem zaburzenia prawidłowego funkcjonowania aaRS często skutkują poważnymi dla organizmu dysfunkcjami. Stwierdzono udział syntetaz aminoacylo-tRNA w rozwoju chorób autoimmunologicznych (miopatii zapalne), szeregu chorób układu nerwowego (leukodystrofia, choroba Charcot-Marie-Tooth, Alzheimera i Parkinsona), nowotworzeniu oraz arteriosklerozie. W konsekwencji, aaRS są atrakcyjnym celem działania leków na te choroby. Co więcej, liczne inhibitory aaRS zwalczają zakażenia bakteryjne, grzybowe i pasożytnicze. Odkrywanie coraz większego znaczenia syntetaz aminoacylo-tRNA w sieci procesów komórkowych sprawia, że aaRS są i z pewnością jeszcze długo będą ważnym obiektem badań.

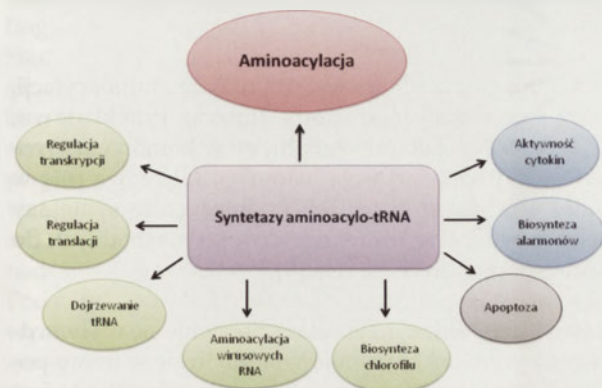
## WPROWADZENIE

Syntetazy aminoacylo-tRNA (EC 6.1.1.1-26) katalizują reakcje przyłączania aminokwasu do odpowiedniego tRNA. Produkt tej reakcji, aminoacylo-tRNA, pośredniczy w procesie tłumaczenia informacji zapisanej w postaci sekwencji nukleotydowej na sekwencję aminokwasową. Uważa się, że aaRS są jednymi z pierwszych enzymów jakie pojawiły się na Ziemi. Odzwierciedla się to w ich różnorodności zarówno pod względem wielkości, jak i struktury trzecio- i czwartorzędowej oraz ich zaangażowaniu w szereg różnorodnych procesów komórkowych [1]. aaRS oprócz tego, że pełnią fundamentalną funkcję w translacji, biorą również udział w regulacji transkrypcji, syntezie alarmonów i chlorofilu, dojrzewaniu RNA oraz rozwoju zarodkowym (Ryc. 1). Ich obecność stwierdzono zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze. Zatem zaburzenie funkcji aaRS powoduje zahamowanie nie tylko syntezy białka, ale również innych istotnych dla komórki procesów, co może być przyczyną wielu chorób. aaRS wykorzystywane są obecnie jako markery diagnostyczne wielu schorzeń. W przyszłości, prawdopodobnie, staną się celem działania terapeutyków [2,3].

## ROLA aaRS W ETIOLOGII CHORÓB U LUDZI

### CHOROBY AUTOIMMUNOLOGICZNE

W osoczu pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi stwierdzono obecność przeciwciał skierowanych przeciw niektórym aaRS. Są one swoiste dla miopatii zapalnych (MSA, ang. *myositis specific antibodies*), dzięki czemu stanowią dobre kryterium diagnostyczne dla tych chorób. Do grupy tej należą choroby tkanki łącznej, takie jak: toczeń rumieniowaty (SLE, ang. *systemic lupus erythematosus*), zespół Sjörgena (SS, ang. *Sjörgen syndrome*), reumatoidalne zapalenie stawów (RA, ang. *rheumatoid arthritis*), zapalenie mięśni (M, ang. *myositis*), zapalenie wielomięśniowe (PM, ang. *polymyositis*) i sklerodermia (SSc, ang. *systemic sclerosis*). Chorobom tym oprócz zapalenia mięśni i stawów często towarzyszy śródmiąższowe zapalenie płuc i innych narządów [4]. Do tej pory zidentyfikowano przeciwciała skierowane przeciw



Rycina 1. Schemat obrazujący funkcje aaRS.

Mirosława Skupińska<sup>1,2,3</sup>

Agnieszka Belter<sup>1,2,3</sup>

Małgorzata Giel-Pietraszuk<sup>1</sup>

Leszek Rychlewski<sup>2</sup>

Jan Barciszewski<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

<sup>2</sup>BioInfoBank Institute, Poznań

<sup>3</sup>pierwszy autor równorzędny

<sup>✉</sup>Institut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, tel.: (61) 852 89 19 wew.: 132, e-mail: jbarcisz@ibch.poznan.pl

Artykuł otrzymano 23 kwietnia 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 31 lipca 2009 r.

**Słowa kluczowe:** syntetazy aminoacylo-tRNA, aminoacylacja tRNA

**Wykaz skrótów:** aa – aminokwas; aa-AMP – aminoacylo-AMP; aa-tRNA – aminoacylo-tRNA; aaRS – syntetaza aminoacylo-tRNA; Hcy – homocysteina; IC<sub>50</sub> (ang. *half maximal inhibitory concentration*) – stężenie inhibitora powodujące 50% zahamowanie aktywności; K<sub>i</sub> (ang. *inhibition constant*) – stała hamowania; MIC<sub>90</sub> – minimalne stężenie hamujące w 90%; MSA (ang. *myositis specific antibodies*) – przeciwciała swoiste dla miopatii zapalnych; tRNA – przenośnikowy RNA

**Tabela 1.** Przeciwciała dla aaRS i ich procentowy udział w miopatiach [4].

aaRS	Anty-aaRS	Udział anty-aaRS w miopatiach
HisRS	Anty-Jo1	15-30% (PM) 5-10% (DM) >70% (M+IPF)
AlaRS	Anty-PL-12	3-4% (PM/DM)
ThrRS	Anty-PL-7	3-4% (PM/DM)
GlyRS	Anty-EJ	~1%
IleRS	Anty-OJ	~1%
AsnRS	Anty-KS	~1%

IPF – śródmiąższowe zapalenie płuc (ang. *interstitial pulmonary fibrosis*), M – zapalenie mięśni, PM – zapalenie wielomięśniowe, DM – zapalenie skórno-mięśniowe.

zostałe to anty-PL-12 (anty-AlaRS) i anty-PL-7 (anty-ThrRS) występujące w ok. 3% oraz anty-EJ (anty-GlyRS), anty-OJ (anty-IleRS), anty-KS (anty-AsnRS) – w ok. 1% przypadków (Tab. 1) [4,5]. Etiologia miopatii zapalnych nie została dotąd wyjaśniona. Przypuszcza się, że przyczyną rozwoju choroby może być mimikra poliprotein niektórych *Picornaviridae* (*Encephalomyocarditis virus* [EMCV], *Coxsackie B virus*) do HisRS człowieka. Prawdopodobnie większość aaRS wywołuje odpowiedź immunologiczną po uwolnieniu z komórki (np. jako skutek uszkodzenia tkanki). Część z nich, np. LysRS, AsnRS, pozostaje immunologicznie obojętna, a TyrRS dodatkowo musi ulec pewnym zmianom strukturalnym [4,6]. Przeciwciała anty-aaRS cechuje ogromna różnorodność. Niektóre z nich przyłączają się do enzymu w miejscach wiązania ATP i aminokwasu jako inhibitory kompetycyjne (anty-Jo-1). Inne, jak anty-KS, rozpoznają kompleks AsnRS-tRNA<sup>Asn</sup> i hamują aminylację. Anty-OJ są skierowane przeciw IleRS, mogą również oddziaływać z innymi aaRS. Co więcej, w surowicy zawierającej anty-aaRS obserwuje się również przeciwciała anty-tRNA. Obecność w krwi obwodowej limfocytów specyficznych zarówno do epitopów poszczególnych syntetaz, jak i tRNA oraz ich właściwości chemotaktyczne w stosunku do niedojrzałych komórek dendrytycznych (iDC) i limfocytów T wskazują na udział aaRS i cząsteczek tRNA w rozwoju chorób autoimmunologicznych [4].

Mimo ogromnego postępu w zrozumieniu molekularnych podstaw miopatii zapalnych oraz postępu w diagnostyce, w której wykorzystywane są m.in. anty-aaRS, ich leczenie nadal stanowi znaczny problem. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o eksperymentalnych terapiach wykorzystujących metale szlachetne lub aptamery (cząsteczki kwasu nukleinowego o niewielkiej masie cząsteczkowej lub małe peptydy specyficznie wiążące białko docelowe). Pierwsze podejście polega na zahamowaniu aktywności białka MHC klasy II i uniemożliwieniu prezentacji antygenów limfocytom. W drugim przypadku aptamery blokują epitopy aaRS lub przeciwciała anty-aaRS, zmieniając ich konformację, co powoduje utratę ich aktywności [4].

## CHOROBY UKŁADU NERWOWEGO

W 2003 roku opublikowano rejestr chorób będących skutkiem mutacji występujących w genach kodujących aaRS [7].

sześcioro syntetazom. Najpowszechniejsze są anty-Jo-1 (anty-HisRS) obserwowane u ponad 70% pacjentów cierpiących na zapalenie mięśni, w 15-30% przypadków zapalenia wielomięśniowego, a w 5-10% – zapalenia skórno-mięśniowego. Po-

większość z nich powoduje choroby układu nerwowego, głównie encefalopatie i ataksje. Istnieje wiele teorii wyjaśniających mechanizm rozwoju chorób układu nerwowego, których podłożem są mutacje w genach kodujących aaRS. Najbardziej prawdopodobne wydawało się, że w wyniku ekspresji zmutowanych genów powstają nieaktywne aaRS. Okazało się jednak, że tylko niewielka część znanych mutacji występujących w genach aaRS odpowiada za powstanie niefunkcyjnych białek. Znacznie częściej białka te wykazują obniżoną specyficzność w stosunku do poszczególnych aminokwasów, skutkiem czego jest błędna aminoacylacja tRNA, a ostatecznie – synteza nieprawidłowych białek. Znane są również przypadki aaRS, w których zmiana zaledwie jednego aminokwasu wpływa na dystrybucję enzymu w komórce bądź utratę innej, niezwiązanej z aminoacylacją funkcji [8]. Jednym z przykładów chorób związanych z mutacją genu kodującego aaRS jest leukodystrofia. Jest to choroba dziedziczna, objawiająca się demielinacją aksonów, a w konsekwencji – osłabieniem przekazu impulsów nerwowych. W mitochondriach pacjentów cierpiących na leukodystrofię występuje skrócona forma AspRS o znacznie obniżonej aktywności, będąca produktem genu niosącego mutację powodującą wcześniejsze zakończenie transkrypcji [9].

W przypadku neuronów translacja odbywa się w ciele komórki nerwowej i dendrytach skąd białka dostarczane są do aksonu [10]. Mutacje występujące w genach kodujących aaRS mogą powodować upośledzenie dystrybucji tych białek w komórce nerwowej. Przykładem jest choroba Charcot-Marie-Tooth, w której zmutowane GlyRS i TyrRS nie wiążą się z ciałami granularnymi, przez co ich transport do aksonu jest ograniczony. Objawia się to zaburzeniami funkcji motorycznych spowodowanych nieprawidłowym przekazem impulsów nerwowych oraz degradacją neuronów. Skutkiem mutacji w sekwencji kodującej peptyd sygnałny w genie GlyRS jest także nieprawidłowe kierowanie enzymu do mitochondriów, a efektem – zaburzenie procesów energetycznych w komórce [8,11]. Ponadto, mutacje w genach GlyRS i TyrRS w chorobie Charcot-Marie-Tooth oraz w AlaRS w przypadku ataksji powodują zmiany w strukturze przestrzennej enzymu. Takie niepoprawnie sfałdowane białka przejawiają tendencję do tworzenia agregatów toksycznych dla komórki. Co więcej, mogą one oddziaływać z innymi białkami, zaburzając ich prawidłowe funkcjonowanie [11]. Drugą przyczyną toksyczności aaRS może być skutkiem utraty ich specyficzności. W efekcie powstają nieprawidłowe aa-tRNA. Powoduje to syntezę białek toksycznych dla komórki bądź kierujących ją na drogę apoptozy [12].

aaRS katalizują przede wszystkim reakcję aminoacylacji, ale oprócz tego pełnią inne istotne funkcje. Przykładowo, GluRS i TyrRS są cząstkami sygnałnymi w komórce nerwowej. TyrRS i TrpRS odgrywają natomiast kluczową rolę w angiogenezie. Mutacje w genach kodujących te syntetazy mogą więc powodować utratę właściwości niezbędnych do pełnienia wspomnianych funkcji [8].

Pośredni udział jednej z syntetaz obserwuje się w stwardnieniu zanikowym bocznym, ujawniającym się w miarę postępującego zaniku neuronów ruchowych. Choroba ta jest skutkiem oligomeryzacji zmutowanej dysmutazy ponadtle-

nowej (SOD1). Zmutowana forma tego enzymu agregując, wiąże inne białka, w tym LysRS, prowadząc w ten sposób do zaburzeń w funkcjonowaniu komórek nerwowych, a ostatecznie kieruje je na drogę apoptozy. Nie ma obecnie dowodów, że tworzenie tego typu złożeń białkowych wpływa na aktywność LysRS. Przypuszcza się jednak, że proces ten w znacznym stopniu ogranicza dostępność syntetazy, a tym samym zmniejsza wydajność syntezy białka w komórce. To z kolei przyspiesza proces degradacji neuronów [12,13].

Odkładanie się w tkankach tzw. płytek starczych i tworzenie zwyrodnień włóknikowych towarzyszy wielu chorobom neurodegeneracyjnym, np. chorobie Alzheimera (AD) i Parkinsona (PD). W złożeń tych wykryto TrpRS. Odkładanie się tej syntetazy powiązane z wytrącaniem się jej cytotoksycznego kompleksu z tryptaminą (naturalnie powstający w organizmie produkt dekarboksylacji tryptofanu) [14,15]. W celu ograniczenia wpływu tryptaminy na przebieg reakcji można obniżyć jej stężenie albo zwiększyć stężenie tryptofanu. Drugi sposób ma jednak pewne ograniczenia. Tryptofan jest wprawdzie aminokwasem egzogennym i musi być dostarczony do organizmu z pożywieniem, jednak jego dostępność w pokarmie jest najmniejsza spośród wszystkich aminokwasów [16]. Dodatkowym ograniczeniem jest mało wydajny transport tryptofanu do mózgu. Spowodowane jest to obecnością innych aminokwasów w znacznie wyższym stężeniu i współzawodnictwo o miejsce wiązania do transporterów bariery krew-mózg [17]. Ponadto, nadmiar tego aminokwasu przesuwa równowagę reakcji w kierunku przeciwnym do tworzenia Trp-tRNA<sup>Trp</sup>. Już przy 50  $\mu$ M stężeniu Trp wydajność aminoacylacji zmniejsza się o 85%. Dla porównania – wyższe stężenie Glu (powyżej 500  $\mu$ M) nadal nie hamuje reakcji katalizowanej przez GluRS [14]. Zatem lepszym rozwiązaniem wydaje się być zmniejszenie w organizmie stężenia tryptaminy. Enzymami katalizującymi przemianę tryptaminy do kwasu indolilo-3-ocowego są monoaminooksydazy (MAOs). Obniżenie aktywności MAOs prowadzi do zwiększenia stężenia tryptaminy, co zaobserwowano u diabetyków i chorych na AD i PD. Optymalne wydaje się więc być utrzymanie aktywności tego enzymu na fizjologicznym poziomie [14].

#### EKSPRESJA aaRS W CHOROBACH NOWOTWOROWYCH

Cechą komórek nowotworowych jest podwyższona ekspresja wielu genów, w tym genów kodujących niektóre aaRS. W komórkach raka okrężnicy obserwuje się podwyższony poziom MetRS, a także białka CHOP (ang. *C/EBP homologous protein*). W sekwencji 3'UTR genu MetRS znajduje się 56 nt fragment komplementarny do 3'UTR genu białka CHOP. Stąd przypuszczenie, że transkrypty obu tych białek mogą się ze sobą łączyć. W niektórych komórkach rakowych aaRS tworzą białka fuzyjne, np. CysRS z kinazą chłoniaka anaplastycznego (ALK, ang. *anaplastic lymphoma kinase*). Z kolei u pacjentów z dziedzicznym rakiem jelita grubego niepolipowatego (HNPCC, ang. *hereditary non-polyposis colorectal cancer*) i z zespołem Turkota (ang. *Turcot syndrome*) stwierdzono nadekspresję IleRS spowodowaną mutacją w jej promotorze. Podwyższona ekspresja GluProRS i IleRS w komórkach raka wynika z faktu, że znajduje się ona pod kontrolą protoonkogenu *c-myc*. Podwyższony poziom niektórych aaRS zaobserwowano również w komórkach raka piersi (LysRS), raka tarczycy (GlyRS), raka płuc i w przewlekłej białaczce szpiko-

wej (ang. *chronic myeloid leukemia*) (podjednostka  $\alpha$  PheRS). Udowodniono na przykład, że TyrRS i TrpRS bezpośrednio, a GluProRS z udziałem czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego, regulują angiogenezę [8]. Jednak konsekwencje nadekspresji większości aaRS nie są znane.

aaRS wchodzi w skład kompleksów AIMP1/p43, AIMP2/p38, AIMP3/p18. AIMP1/p43 wpływa na fosforylację kinaz JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinase*) i aktywację kaspazy 3, co kieruje komórki na drogę apoptozy [18]. AIMP2/p38 po związaniu białka TGF- $\beta$  (ang. *transforming growth factor beta*) jest transportowany do jądra komórkowego. Tam wiąże białko FBS (ang. *FUSE-binding protein*) będące aktywatorem transkrypcji protoonkogenu *c-myc*, co stymuluje degradację białka FBS, a w konsekwencji – obniżenie poziomu produkcji białka *c-myc* [8]. AIMP3/p18 jest supresorem procesu nowotworzenia. Kompleks ten aktywowany jest w warunkach stresu komórki i transportowany do jądra, gdzie za pośrednictwem kinaz ATM (ang. *ataxia telangiectasia mutated*) i ATR (ang. *Rad-3 related*) aktywuje białko p53 hamujące rozwój nowotworu [19].

#### UDZIAŁ MetRS W ARTERIOSKLEROZIE

W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień potwierdzających postulowany w latach 70-tych minionego wieku związek pomiędzy poziomem homocysteiny (Hcy) i tiolaktonu homocysteiny a rozwojem miażdżycy. Homocysteina jest produktem pośrednim w biosyntezie metioniny, różni się od niej brakiem grupy metylowej i dlatego często jest błędnie rozpoznawana przez MetRS. Utworzony Hcy-AMP jest następnie edytowany z udziałem tej samej syntetazy do cyklicznego tiolaktonu homocysteiny, co zapobiega włączeniu homocysteiny w szlak biosyntezy białka. Synteza tiolaktonu homocysteiny zachodzi w każdej żywej komórce, a jej wydajność zależy m.in. od stężenia homocysteiny. Im wyższe stężenie homocysteiny, tym wyższe stężenie tiolaktonu i większe ryzyko rozwoju choroby. Cykliczny tiolakton jest reaktywną cząsteczką, która łatwo wiąże się z wolnymi grupami aminowymi lizyn w białkach. Modyfikowane białko traci swoje właściwości i staje się bardziej podatne na utlenienie i proteolizę niż niemodyfikowane (Ryc. 2) [20].

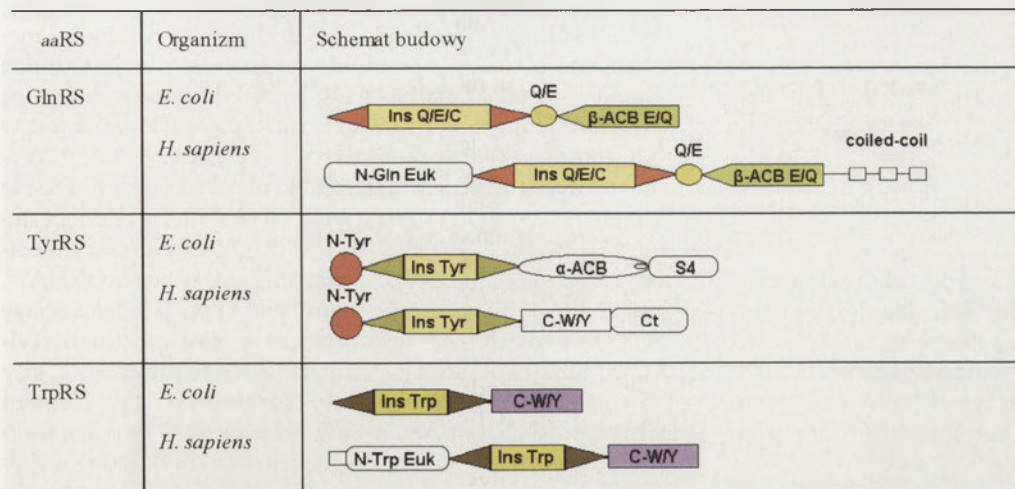
#### aaRS JAKO CEL MOLEKULARNY W TERAPII PRZECIWBAKTERYJNEJ

Znaczące różnice w budowie oraz mechanizmie działania aaRS prokariota i eukariota spowodowały, że zwrócono na nie uwagę jako na potencjalny cel w terapii zakażeń bakteryjnych. Za ich wyborem przemawiają następujące argumenty:

- 1) zapotrzebowanie na nowe leki w związku z pojawianiem się antybiotykooporności bakterii,
- 2) rozwój wiedzy w zakresie struktury i funkcji aaRS (obecnie w bazie danych syntetaz aminoacylo-tRNA, <http://bio-bases.ibch.poznan.pl/AARS/> znajduje się 1047 sekwencji aaRS i liczba ta stale rośnie [21]),
- 3) podobieństwo poszczególnych enzymów w obrębie gatunku i pomiędzy blisko spokrewnionymi bakteriami chorobotwórczymi, co umożliwi projektowanie antybiotyków o szerokim spektrum działania,







Rycina 3. Schemat budowy aaRS swoistych dla GlnRS, TyrRS i TrpRS *E. coli* i *H. sapiens*.

powodują błędną aminoacylację. Poprawność tego procesu zwiększa się dzięki dodatkowej domenie (poza miejscem aktywnym), posiadającej zdolność naprawiania pomyłek popełnianych w I i II etapie reakcji. Mechanizm rozpoznawania błędnie przyłączonych aminokwasów jest różny dla aaRS prokariotycznych i eukariotycznych, co stwarza unikalną szansę opracowania związku specyficznym oddziałującego tylko z enzymem bakteryjnym [25].

#### ROZSZERZENIE KODU GENETYCZNEGO

Tuż po odkryciu syntetaz aminoacylo-tRNA, Francis Crick postulował, że każdemu aminokwasowi spośród grupy 20 uniwersalnych dla każdej komórki odpowiada inna syntetaza aminoacylo-tRNA [26]. Jak się jednak okazało, tylko organizmy eukariotyczne i nieliczne bakterie posiadają 20 aaRS (Tab. 3). W genomach żadnego z poznanych archeonów oraz znacznej większości prokariotów nie znaleziono genów kodujących GlnRS. Bakterie bardzo często nie posiadają również AsnRS, a metanogenne archeony CysRS. W genomie *M. janashii* znajdują się geny kodujące jedynie

wykraczającej poza kanoniczny zestaw 20 aminokwasów. Z kolei dla drugiego z nich – pirolizyny (Pyl) – odkryto swoistą syntetazę aminoacylo-tRNA (Ryc. 4) [27-30]. Poznanie mechanizmu działania i struktury krystalograficznej PylRS pozwoliło zakwalifikować ją do syntetaz aminoacylo-tRNA klasy II [31].

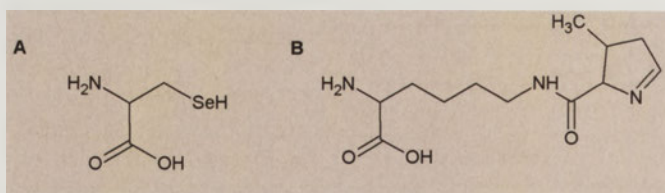
We wszystkich znanych archeonach, bakteriach czy chloroplastach, w których brak GlnRS, synteza Gln-tRNA<sup>Gln</sup> katalizowana jest przez GluRS o obniżonej specyficzności w stosunku do tRNA<sup>Glu</sup>, zdolnej również do wiązania tRNA<sup>Gln</sup>. W pierwszym etapie powstaje Glu-tRNA<sup>Gln</sup>, który poprzez amidację Glu do Gln katalizowaną przez amidotransferazę Glu-tRNA<sup>Gln</sup> (Glu-AdT), w obecności ATP i donora grupy amidowej zostaje przekształcony w Gln-tRNA<sup>Gln</sup> (Ryc. 5). Synteza Asn-tRNA<sup>Asn</sup> u organizmów nie posiadających AsnRS przebiega z udziałem AspRS. Asp-tRNA<sup>Asn</sup> przekształcany jest następnie przez odpowiednią amidotransferazę (Asp-AdT) w Asn-tRNA<sup>Asn</sup> (Ryc. 5). Co ciekawe, w mitochondriach wielu eukariotów stwierdzono obecność Glu-tRNA<sup>Gln</sup> i Glu-AdT. Wydaje się więc, że eukariotyczne amidotransferazy mogą również uczestniczyć w syntezie Gln-tRNA<sup>Gln</sup>. Zadziwiający jest zatem fakt, że mtGluRS tych organizmów nie są zdolne do aminoacylacji tRNA<sup>Gln</sup>. Jak do tego funkcja Glu-AdT i mechanizm powstawania Glu-tRNA<sup>Gln</sup> u eukariotów pozostają niewyjaśnione [29,30].

Tabela 2. Domeny wspólne dla aaRS i innych białek.

Nazwa domeny	Występowanie		Funkcja domeny w aaRS
	w aaRS	w innych białkach	
GAD	AspRS (bakterie), GluRS (archeony)	amidotransferaza Glu-tRNA <sup>Gln</sup>	specyficzne wiązanie tRNA
TGS	ThrRS (eukariota i niektóre bakterie)	RelA, SpoT, rodzina Wbg (GTPaza)	nieznana
HD	GlyRS (bakterie)	hydrolazy HD	tworzenie adenylatu Gly
HxxxH	ThrRS i AlaRS	CmaT, hydrolazy zależne od metali	aktywność hydrolityczna w błędnie zacylowanych tRNA
HTH (helix-turn-helix)	PheRS (eukariota, archeony, krętki) – na końcu N enzymu	białko pokswirusów wiążące dsRNA białko rybosomalne S10	wiązanie RNA (szczególnie dsRNA)
YbaK	ProRS	białko YbaK <i>E. coli</i>	nieznana

16 aaRS. Nie zidentyfikowano w nim genów dla GlnRS, AsnRS, LysRS oraz CysRS, mimo obserwowanej aktywności charakterystycznej dla tych enzymów. Gdy w komórce brak aaRS swoistych dla aminokwasów i tRNA, tworzenie odpowiednich aminoacylo-tRNA może odbywać się w dwustopniowym procesie: najpierw z udziałem nieswoistych syntetaz, a następnie amidotransferaz [1]. Podobny mechanizm tworzenia aminoacylo-tRNA obserwowany jest w przypadku selenocysteiny (Sec) – cząsteczki

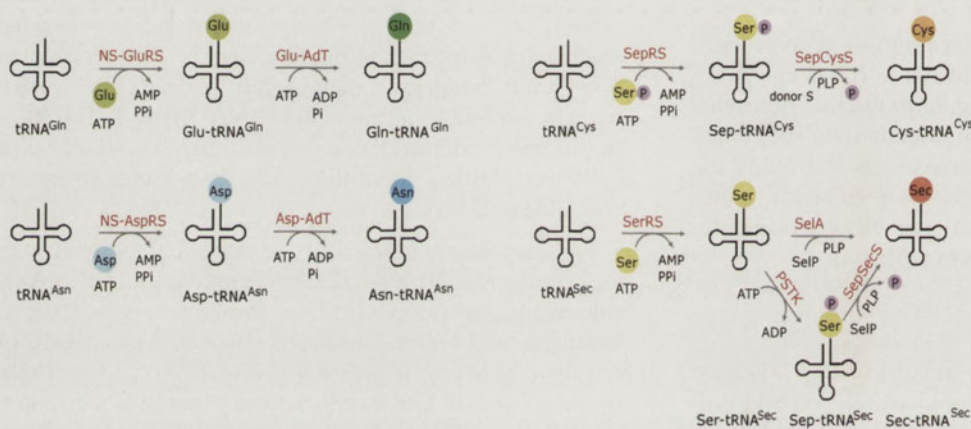
U archeonów metanogennych i redukujących siarczany, u których nie stwierdzo-



Rycina 4. Wzory strukturalne A) selenocysteiny i B) pirolizyny.

no CysRS w syntezie Cys-tRNA<sup>Cys</sup> biorą udział dwa dodatkowe enzymy: syntetaza O-fosfoserylo-tRNA (SepRS) i syntaza Sep-tRNA:Cys-tRNA (SepCysS) [27]. Pierwszy z nich, SepRS, jest syntetazą klasy II występującą w postaci homotetrameru ( $\alpha_4$ ). Odpowiada ona za tworzenie Sep-tRNA<sup>Cys</sup> przekształcanego do Cys-tRNA<sup>Cys</sup> w reakcji zależnej od fosforanu pirydoksalu (PLP) katalizowanej przez SepCysS. Szlak SepRS/SepCysS może współlistnieć z CysRS (Ryc. 5) [32]. W przypad-

Rozszerzenie kodu genetycznego o selenocysteinę (Sec) było możliwe tylko dzięki wykształceniu wydajnego mechanizmu syntezy Sec-tRNA<sup>Sec</sup>. Obecnie nie jest znana żadna syntetaza katalizująca bezpośrednio tworzenie tego związku. U niektórych roślin i bakterii Sec włączana jest w biosyntezę białka za pośrednictwem CysRS i tRNA<sup>Cys</sup>. Wydajność tej strategii jest niska dzięki niskiemu stężeniu Sec w komórce. Lepszym rozwiązaniem jest synteza selenocysteiny zależna od swoistego dla niej tRNA. W pierwszym etapie SerRS katalizuje reakcję wiązania reszty Ser do tRNA<sup>Sec</sup>. Następnie syntetaza selenocysteiny (SelA) przekształca resztę Ser w Sec. Sec-tRNA<sup>Sec</sup> włączany jest w sekwencję białka tylko w pozycji kodonu UGA (opal) i tylko w przypadku, gdy w jego sąsiedztwie znajduje się charakterystyczny element struktury RNA, tzn. SECIS (ang. *selenocysteine insertion sequence*) i specyficzny dla selenocysteiny czynnik elongacyjny (SecB) (Ryc. 5) [34]. U pewnych archeonów i eukariotów



Rycina 5. Pośrednie szlaki syntezy aa-tRNA (bez udziału specyficznych aaRS). Glu – kwas glutaminowy, Gln – glutamina, Asp – kwas asparaginowy, Asn – asparagina, Ser – seryna, Cys – cysteina, Sec – selenocysteina, NS-GluRS – GluRS wykazująca specyficzność zarówno do tRNA<sup>Gln</sup> jak i tRNA<sup>Glu</sup>, NS-AspRS – AspRS wykazująca specyficzność zarówno do tRNA<sup>Asn</sup>, jak i tRNA<sup>Asp</sup>, Glu-AdT – amidotransferaza Glu-tRNA<sup>Gln</sup>, Asp-AdT – amidotransferaza Asp-tRNA<sup>Asn</sup>, SepRS – syntetaza fosfoserylo-tRNA, SepCysS – syntaza Sep-tRNA:Cys-tRNA, SelA – syntetaza selenocysteiny, SepSecS – syntaza Sep-tRNA:Sec-tRNA, PSTK – kinaza O-fosfoserylo-tRNA, PLP – fosforan pirydoksalu.

ku archeonów metanogennych, takich jak np. *Methanococcus jannaschii*, jest jednak jedynym, w którym powstaje Cys. Nie stwierdzono u nich CysRS, nie kodują również enzymów uczestniczących w biosyntezie cysteiny [33].

magana jest do tego zgodność kodonu UAG z sekwencją antykodonu związanej z Pyl cząsteczki tRNA<sup>Pyl</sup> oraz obecność struktury określonej jako PYLIS (ang. *pyrrolysine insertion sequence*) [36].

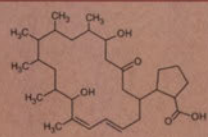
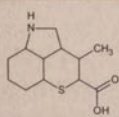
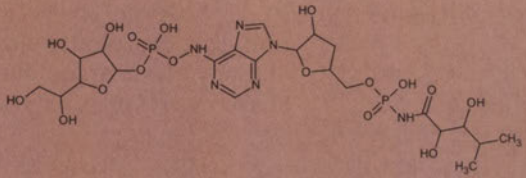
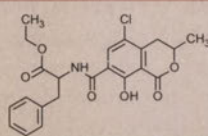
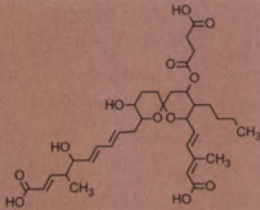
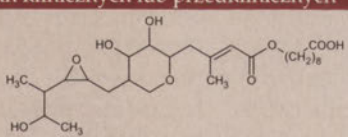
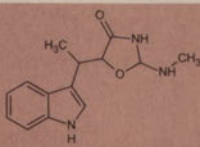
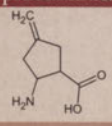
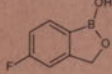
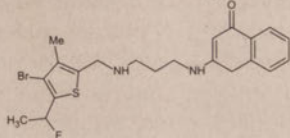
Tabela 3. Rozszerzenie kodu genetycznego.

aa-tRNA	Synteza aa-tRNA	Szlak pośredni	Szlak z udziałem swoistej aaRS
Gln-tRNA	Archeony, większość bakterii, chloroplasty		Eukariota, niektóre bakterie
Asn-tRNA	większość bakterii i archeonów		Eukariota, bakterie i archeony
Cys-tRNA	metanogenne archeony (z wyj. <i>Methanobrevibacter smithii</i> i <i>Methanosphaera stadtmanae</i> ) i <i>Archaeoglobus fulgidus</i>		Eukariota, bakterie i archeony
Sec-tRNA	Eukariota, archeony i bakterie wstawiające Sec w pozycję kodonu UAG swoistego dla tRNA <sup>Ser</sup>		żaden ze znanych organizmów
Pyl-tRNA			archeony metanogenne i niektóre bakterie Gramm (+)

#### KONSEKWENCJE HAMOWANIA AMINOACYLACJI tRNA

Rozważając aaRS jako cel dla potencjalnych leków, należy mieć również na uwadze negatywne skutki jakie niesie za sobą zahamowanie aktywności tych enzymów. Zahamowanie aminoacylacji prowadzi do nagromadzenia w komórce wolnych cząsteczek tRNA, które, wiążąc się do rybosomów, powodują zatrzymanie elongacji łańcucha peptydowego. Ciągły wzrost stężenia wolnego

Tabela 4. Naturalne inhibitory aaRS.

L.p.	Nazwa	Wzór	Cel działania	IC <sub>50</sub>	Piśmiennictwo
<b>Naturalne inhibitory aaRS</b>					
1.	Borelidyna		ThrRS	4,5 nM ( <i>E. coli</i> )	[39]
2.	Chuangksinmycyna		TrpRS	30 nM ( <i>E. coli</i> )	[40]
3.	Agrocyna		IleRS	<10 nM ( <i>A. tumefaciens</i> )	[41]
4.	Ochratoksyna A		PheRS	12 μM ( <i>B. subtilis</i> )	[25]
5.	Reweromycyna A		IleRS	12 nM ( <i>S. cerevisiae</i> )	[42]
<b>Naturalne inhibitory aaRS dopuszczone do badań klinicznych lub przedklinicznych</b>					
6.	Mupirocyna		IleRS	1,4 nM ( <i>S. aureus</i> )	[37]
7.	Indolmycyna		TrpRS	62 nM ( <i>E. coli</i> ) 12,2 nM ( <i>S. aureus</i> )	[43]
<b>Inne inhibitory aaRS dopuszczone do badań klinicznych lub przedklinicznych</b>					
8.	Icofungipen		IleRS	0,44 μM ( <i>C. albicans</i> )	[49]
9.	AN-2690		LeuRS	2,1 nM ( <i>S. cerevisiae</i> )	[50]
10.	REP8839		MetRS	20 nM ( <i>S. aureus</i> )	[44]

tRNA prowadzi do aktywacji enzymu relA. W wyniku przeniesienia grupy pirofosforanowej z ATP na pozycję 3' GTP powstaje guanozyna 5'-tri-3'-difosforan (pppGpp). Ten z kolei, po odłączeniu jednej grupy fosforanowej przez produkt genu *gpp*, jest przekształcany w ppGpp – główny

efektor kontroli ścisłej metabolizmu. Duże stężenie alarmonu ppGpp hamuje polimerazę RNA oraz drastycznie obniża wydajność wszelkich procesów wymagających energii, np. syntezę RNA, DNA, białek czy peptydoglikanu. Zatem zahamowanie jednej lub kilku aaRS może w bardzo krót-

kim czasie wywołać zmiany w metabolizmie komórki prowadzące w konsekwencji do jej śmierci [37].

## INHIBITORY SYNTETAZ AMINOACYLO-tRNA

### SUBSTANCJE POCHODZENIA NATURALNEGO

Obecnie znanych jest wiele naturalnych inhibitorów syntetaz aminoacylo-tRNA (Tab. 4). Wśród nich są mupirocyna, borelidyna, indolmycyna, chuangksinmycyna, agrocyna, ochratoksyna A, furanomycyna, granatycyna i reveromycyna A. Nie wszystkie z nich znalazły zastosowanie jako terapeutyki, głównie z powodu braku specyficzności w stosunku do aaRS prokariotycznych. Stanowią one jednak doskonały punkt wyjścia w projektowaniu nowych leków.

Mupirocyna (kwas pseudomonowy) jest najbardziej znanym naturalnym inhibitorem aaRS. Jest ona obecnie stosowana jako lek przeciwbakteryjny. Mupirocyna jest metabolitem wtórnym syntezowanym przez bakterie *Pseudomonas fluorescens*. Cząsteczka ta składa się z krótkiego kwasu tłuszczowego połączonego z kwasem monowym i przypomina adenylan izoleucynowy (Ile-AMP) [38]. Mupirocyna hamuje IleRS bakterii, archeonów i grzybów. Niektóre szczepy *P. fluorescens* posiadają dwa izoenzymy IleRS, co daje im oporność na mupirocynę. Jeden z nich (IleRS-R2), podobnie jak IleRS eukariotów, jest niewrażliwy na mupirocynę. Do tej pory nie odnotowano przypadków hamowania ortologów syntetaz ssaków, co zadecydowało o wpisaniu tego związku na listę leków przeciwbakteryjnych. Mupirocyna hamuje IleRS bakterii Gramm (+): *Staphylococcus aureus* w tym również opornych na metycylinę (MRSA – metycylin-resistant *S. aureus*), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium* i Gramm (-): *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* oraz grzybów *Candida albicans*. Niestety, mała stabilność tego związku we krwi, gdzie ulega on hydrolizie do kwasu monowego, powoduje że jego użycie jest ograniczone [39]. Powszechne użycie mupirocyny spowodowało pojawienie się szczepów bakterii opornych na ten związek. Umownie podzielono je na dwa fenotypy. Pierwszy z nich cechuje tzw. niski poziom oporności (MIC = 8–256 mg/ml) wykształcanej wskutek mutacji punktowej w genie *ileS* znajdującym się w chromosomie bakteryjnym. Drugi cechuje wyższa oporność (MIC > 256 mg/ml), która jest efektem pojawienia się genu *mupA* kodującego niewrażliwą na mupirocynę formę enzymu IleRS-R2. Jak dotąd brak jednoznacznych dowodów na pochodzenie genu *mupA*. Prawdopodobnie pochodzi on z organizmu eukariotycznego lub *Bacillus anthracis* [40].

Borelidyna, naturalny inhibitor aaRS, jest syntezowana przez dwa szczepy *Streptomyces albobovineus* (bakteria glebowa). Jej właściwości antybakteryjne po raz pierwszy zaobserwowano w stosunku do *Treponema hyodysenteriae*. Obecnie znane są również inne bakterie wrażliwe na ten związek. Analiza struktury kompleksu ThrRS *Escherichia coli* z borelidyną pokazała, że inhibitor ten wiąże się z enzymem w kieszeni hydrofobowej poza domeną katalityczną. Skutkiem tego jest zmiana konformacji enzymu, która prowadzi do utraty jego aktywności. Zatem związek ten niekompetycyjnie hamuje zdolności wiązania ATP i Thr przez enzym [38,41].

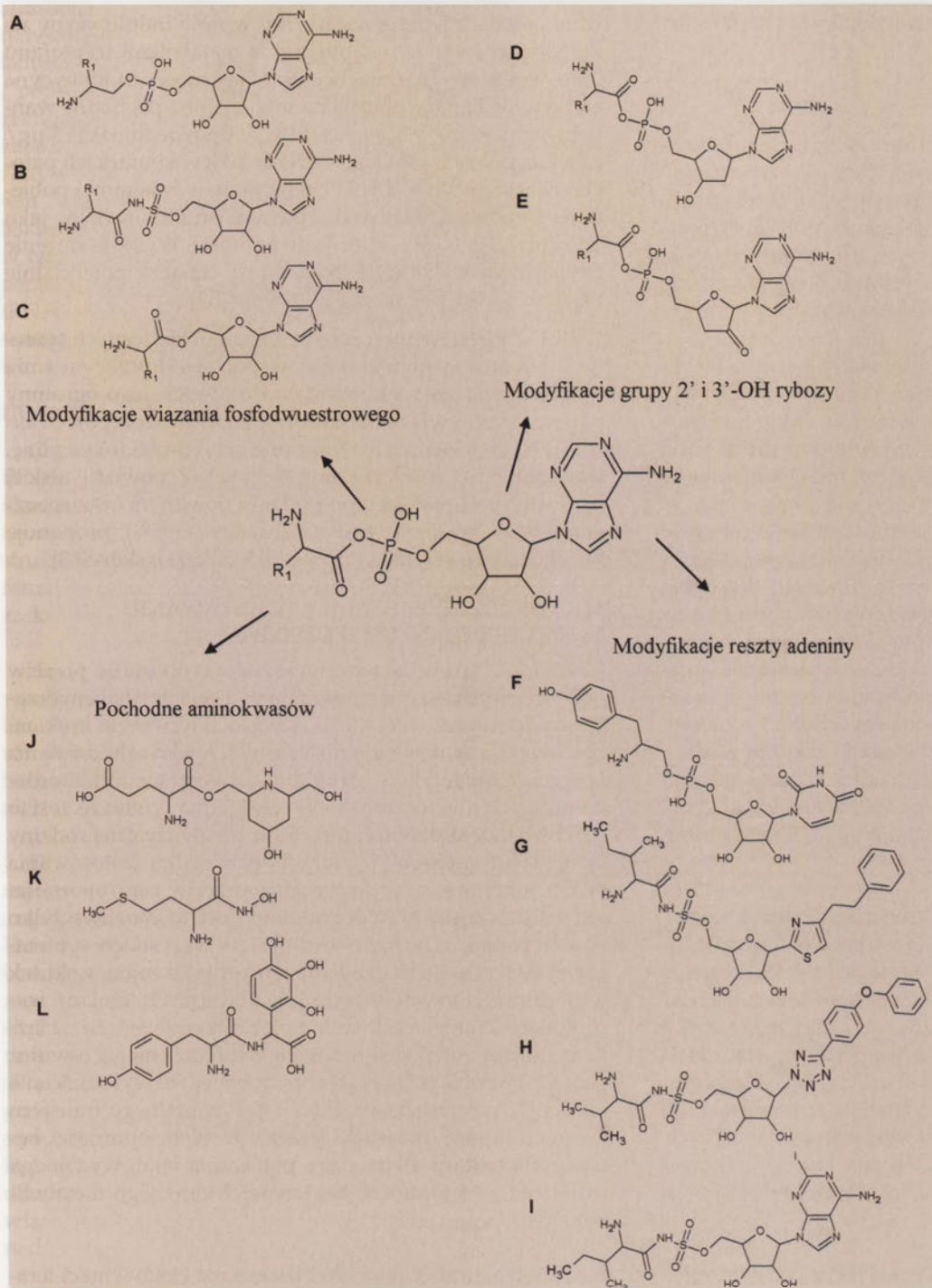
Chuangksinmycyna syntezowana przez *A. tsinanensis* swoją budową przypomina tryptofan, z którym konkuruje o wiązanie do enzymu. Wykazuje specyficzność w stosunku do TrpRS bakterii Gramm (+) i Gramm (-) (IC<sub>50</sub> dla TrpRS *E. coli* = 30 nM). Potwierdzono jej skuteczność w zwalczaniu zakażeń wywoływanych przez *E. coli* i *Shigella dysenteriae* [42].

Agrocyna wytwarzana jest przez *Agrobacterium radiobacter* przeciw *Agrobacterium tumefaciens*, odpowiedzialnym za wywoływanie zakażeń roślin prowadzących do powstawania nowotworowych narośli na szyjce korzeniowej. Związek ten w znacznym stopniu przypomina adenylan leucyny, co czyni go potencjalnym inhibitorem IleRS (IC<sub>50</sub> < 10 nM). Szczepy produkujące ten związek posiadają system obronny przed własną toksyną w postaci genu kodującego białko niewrażliwe na agrocynę [43].

Wszystkie opisane wyżej substancje cechuje wysoki potencjał hamowania aktywności syntetaz aminoacylo-tRNA. Za sprawą zbyt niskiej wybiórczości względem bakterii chorobotwórczych, wysokiej toksyczności w stosunku do komórek gospodarza oraz niestabilności żadna z nich, z wyjątkiem mupirocyny, nie została dopuszczona do użytku. Mupirocyna wykazuje 8000 razy wyższą wybiórczość w stosunku do IleRS mikroorganizmów niż enzymów ssaków. Przyjęto, że potencjalny terapeutyk powinien wykazywać co najmniej 100-krotną wybiórczość względem wybranego celu. Teoretycznie zatem, mupirocyna powinna być doskonałym lekiem. Jednak z powodu nietrwałości jej użycie jest ograniczone. W związku z tym podjęto próby zwiększenia jej stabilności i specyficzności w stosunku do poszczególnych grup mikroorganizmów. Na podstawie budowy Ile-AMP i mupirocyny stworzono farmakofor stanowiący punkt wyjścia do dalszych poszukiwań. W ten sposób udało się otrzymać kilka znaczących inhibitorów aaRS. Niektóre z nich, np. Icofungipen, zostały dopuszczone do badań klinicznych [46].

### INHIBITORY SYNTETYCZNE

Poznanie mechanizmu aminoacylacji oraz struktur syntetaz aminoacylo-tRNA daje możliwość projektowania specyficznych inhibitorów aaRS. W pierwszym etapie aminoacylacji powstaje aminoacyloadenylan – produkt pośredni, który tworzy z enzymem kompleks o stałej dysocjacji rzędu od kilku do kilkudziesięciu nmoli. Dla IleAMP-IleRS (*S. aureus*) K<sub>d</sub> wynosi 30 nM. Wartość stałej dysocjacji dla aminokwasu i ATP jest kilka rzędów wielkości wyższa [47]. Można więc oczekiwać, że analogi aminoacyloadenyliku, podobnie jak sam aa-AMP, będą silniej wiązane przez enzym. Stanowi to punkt wyjścia w pracach zmierzających do stworzenia nowych inhibitorów aaRS [48]. W projektowaniu inhibitorów na bazie cząsteczki aminoacyloadenyliku bierze się pod uwagę modyfikację czterech regionów cząsteczki: nietrwałego wiązania fosfodiesterowego, rybozy, adeniny i reszty aminokwasowej (Ryc. 6). Klasyfikacją w syntezie inhibitorów syntetaz w oparciu o modyfikacje aa-AMP jest użycie aminoalkoholi zamiast aminokwasów. Związki te posiadają w cząsteczce równocześnie grupy hydroksylowe i aminowe. Powstający produkt – ester aminoalkilo-AMP (Ryc. 6A) – wykazuje znacznie



Rycina 6. Strategie syntezy analogów aminoacyloadenylnu (szczegółowy opis w tekście).

większą stabilność niż acylofosforan i równie wysokie powinowactwo do aaRS [49]. Innym sposobem zwiększenia stabilności cząsteczki jest zastąpienie atomu fosforu w wiązaniu fosfodiestrowym siarką (Ryc. 6B). Główną wadą powstałych w ten sposób pochodnych jest ich niska specyficzność w stosunku do enzymów prokariotycznych. Dodatkowo, porównując działanie poszczególnych aminoalkilowych adenylanów i pochodnych aminoacylosulfaminowych na ArgRS, HisRS i ThrRS, zauważono związek między rodzajem pochodnych aa-AMP a klasą syntetaz. Hamowanie aktywności ArgRS (klasa I) obserwowano po zastosowaniu obu rodzajów pochodnych

Arg-AMP już w stężeniach nanomolowych. W przypadku HisRS i ThrRS (klasa II) skuteczne okazały się jedynie acylosulfaminy. Potwierdza to różny sposób wiązania produktu pośredniego reakcji przez syntetazy klasy I i II. Cztery z analogów metionyladenylanu hamują aktywność enzymu w następującej kolejności: ester > N-hydroksyamina > amid > O-hydroksyamina. Jednak ze względu na zbyt niską specyficzność i niewystarczające powinowactwo do aaRS nie znalazły one zastosowania w leczeniu [49]. Usunięcie grup hydroksylowych przy C2' i C3' (Ryc. 6D i 6E) aa-AMP, powoduje zmniejszenie powinowactwa pochodnych do aaRS. Wskazuje to na udział grup hydroksylowych rybozy w wiązaniu cząsteczki do enzymu. Podobną funkcję pełni adenina. Dowodem na to jest znikomy stopień wiązania analogów pozbawionych adeniny bądź z grupą hydrofobową w jej miejscu. Zastąpienie jej z kolei polarną cząsteczką uracylu (Ryc. 6F) nie wpływa negatywnie na powinowactwo analogu do aaRS [49]. Pochodne zmodyfikowane w obrębie reszty adeniny mogą być wiązane przez enzym znacznie silniej niż związek wyjściowy, co czyni je potencjalnymi inhibitorami aaRS. Tak jest w przypadku 2-jodo (Ryc. 6G) i 2-etynylo pochodnych adenylanu izoleucynowego z wiązaniem sulfonowym. Tiazole (Ryc. 6H), estry i karbaminiany aa-AMP hamują wybrane enzymy już w stężeniach nanomolarnych.

Przykładowo,  $IC_{50}$  dla sulfamidowej pochodnej izoleucynowej z grupą tiazolową połączoną z fenolem (Ryc. 6I), skierowanej przeciwko IleRS *E. coli* wynosi 1,3 nM [49]. Możliwe jest również wprowadzanie modyfikacji łańcucha bocznego aminokwasu aa-AMP lub użycie jako inhibitorów aaRS, pochodnych aminokwasów. aaRS wszystkich organizmów przyłączają te same aminokwasy, jednak różnice w mechanizmie ich rozpoznawania dają możliwość użycia tego typu analogów. Oto kilka przykładów o dość znaczącym potencjale: kwas glutaminowy połączony wiązaniem estrowym z pochodną piperydyny

(inhibitor GluRS *E. coli*) (Ryc. 6J), hydroksamina L-metioniny (MetRS *E. coli*) (Ryc. 6K) i tyrozyno-fenylglicyna (TyrRS *S. aureus*) (Ryc. 6L) [49].

#### POTENCJALNE LEKI

Jedynym obecnie dostępnym lekiem, który hamuje biosyntezę białka bakterii na etapie aminoacylacji jest wspomniany wcześniej kwas pseudomonowy (mupirocyna). Dzięki intensywnym badaniom pojawiają się kolejne związki. Niektóre z nich, np. AN-2690 (1,3-dihydro-5-fluoro-1-hydroksy-benzooksaborol), przeszły II fazę badań klinicznych. Część zaś odrzucono, mimo doskonałych wyników w testach *in vitro* (Tab. 4).

Icofungipen jest pochodną występującego naturalnie  $\beta$ -aminokwasu – cis-pentacyny, która oprócz zdolności wybiórczego hamowania IleRS, jest również wydajnie transportowana do komórek patogenów przez permeazy drożdżowe. Transport terapeutyku do komórek może być ograniczony w przypadku podwyższonego stężenia Ile współzawodniczącej z inhibitorem o miejsce wiązania z permeazą. Istotne jest, że do tej pory nie odnotowano szczepów z dodatkową kopią genu kodującego enzym niewrażliwy na Icofungipen. Wszystkie przypadki oporności są efektem zaburzenia transportu leku do komórki bądź nadprodukcji IleRS. Nie stanowi to poważnego problemu, gdyż substancja ta jest na tyle neutralna dla organizmu gospodarza, że nawet znaczne podwyższenie jej stężenia w organizmie nie pociąga za sobą negatywnych skutków [38]. Icofungipen jest testowany w leczeniu zakażeń gardła i górnych dróg oddechowych (wywoływanych przez bakterie odporne na flukonazol) oraz zakażeń centralnego układu nerwowego. Obecnie substancja ta znajduje się w II fazie testów klinicznych [50].

AN-2690 jest pochodną benzoksaborolu. Badania oparte na mutantach opornych na ten związek pozwoliły ustalić, że celem jego działania jest domena edytująca LeuRS szerokiej gamy patogenów (drożdży i grzybów) odpowiedzialnych za rozwój grzybic paznokci. Dzięki łatwej penetracji przez płytkę paznokcia, aż do jego łożyska, trafia w miejsce rozwoju zakażenia i skutecznie hamuje jego rozwój (MIC = 0,125–8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Za użytecznością tego związku przemawia również fakt, że nie stwierdzono jego obecności we krwi pacjentów na których testowano specyfik. Obecnie AN-2690 znajduje się w II fazie testów klinicznych i wszystko wskazuje na to, że przejdzie ją pozytywnie [51].

Indolmycynę wyizolowano po raz pierwszy z *Streptomyces griseus*. Przypomina ona L-tryptofan i wybiórczo hamuje aktywność bakteryjnych TrpRS (IC<sub>50</sub> dla *E. coli* – 9,25 nM). Nie hamuje natomiast enzymu eukariotycznego (IC<sub>50</sub> dla enzymu z wątroby wołowej – 4,04 mM). Ze względu na lipofilowy charakter cząsteczki oraz jej włączanie w błony bakteryjne nie znalazła ona zastosowania w leczeniu zakażeń wywoływanych przez streptokoki, enterokoki i bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*. Indolmycyna okazała się jednak skuteczna w zwalczaniu wszystkich 54 znanych szczepów *Helicobacter pylori* (MIC<sub>90</sub> – 0,03  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Swoją aktywność zachowuje nawet w silnie kwaśnym środowisku żołądka, będącego naturalnym rezerwuarem tej bakterii. Ta niezwykła skuteczność oraz rzadkość powstawania szczepów opornych nasuwa przypuszczenie, że wpływa ona

również na inne procesy komórkowe patogenów. Odnotowano jednak również negatywny wpływ indolmycyny na komórki gospodarza. Zaburza ona metabolizm tryptofanu oraz wykazuje znaczną hepatotoksyczność. Indolmycyna efektywnie hamuje odporne na metycylinę i pochodne wankomycyny szczepy *S. aureus* (MIC<sub>90</sub> odpowiednio 0,5 i 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Uzyskanie wysokiego stężenia leku w komórkach patogenów jest możliwe dzięki bakteryjnemu systemowi pobierania tryptofanu. Błędnie rozpoznaje on indolmycynę jako Trp i przez to transportuje ją do komórki. Wysokie stężenie terapeutyku w komórce bakteryjnej oznacza potencjalnie większe szanse pokonania zakażenia [52].

REP8839 jest dopuszczonym do badań klinicznych syntetycznym analogiem metioniny współzawodniczącym z nią o miejsce wiązania aminokwasu do MetRS. Jego ogromny potencjał przejawia w hamowaniu wzrostu szczepów *S. aureus* (K<sub>i</sub> ~ 10 pM) opornych na inne antybiotyki (oksacylinę, wankomycynę, linezolid, mupirocynę). Z powodu niskiej biodostępności związku po podaniu doustnym oraz znacznemu wiązaniu przez białka surowicy (> 95%), proponuje się jego użycie jedynie w przypadku zakażeń skóry [53].

#### STRATEGIE ZAPOBIEGAJĄCE POWSTAWANIU NOWYCH, OPORNÝCH SZCZEPÓW

Tempo z jakim bakterie wykształcają oporność przeciw nowym antybiotykom zmusza do podjęcia działań zmierzających do zahamowania tego zjawiska. Pierwszym krokiem była selekcja syntetaz aminoacylo-tRNA jako celu działania nowych terapeutyków, drugim – stworzenie inhibitorów hamujących równocześnie więcej niż jedną syntetazę. Jest to możliwe dzięki stałym fragmentom struktury całej rodziny syntetaz lub w obrębie ich klas. W przypadku zastosowania takich inhibitorów, wykształcenie przeciw nim oporności jest bardzo mało prawdopodobne. Jest to możliwe tylko w przypadku, gdy równocześnie we wszystkich syntetazach będących celem działania terapeutyku zajdą, wskutek mutacji punktowych w genach je kodujących, zmiany warunkujące ich niewrażliwość na lek. Okazało się, że związki hamujące równocześnie wiele syntetaz, mogą również skutecznie zmniejszać prawdopodobieństwo wykształcenia oporności powstającej na skutek horyzontalnego transferu genów. Niestety pozostaje jeszcze problem oporności będącej efektem upośledzonego pobierania leku, wydajnego usuwania go z komórek bakteryjnych oraz jego metabolizmu [54].

Inną strategią zmierzającą do zwiększenia efektywności terapii i zmniejszenia prawdopodobieństwa powstawania szczepów opornych jest jednoczesne użycie dwóch lub więcej inhibitorów aaRS. Zastosowano ją w przypadku mupirocyny i REP8839. Działają one synergistycznie i pomimo że znane są szczepy odporne zarówno na mupirocynę, jak i REP8839, nie odnotowano bakterii opornych równocześnie na oba terapeutyki. Pary inhibitorów można tworzyć analizując strukturę farmakoforu. Przykładem może być inhibitor ValRS, gdzie punktem wyjścia była ochratoksyna A (Tab. 4), czyli inhibitor PheRS, w którym grupę fenylową zastąpiono podstawnikiem charakterystycznym dla waliny. Niestety związki takie często hamują również syntetazy eukariotyczne. Istotnym problemem w opracowywaniu inhibitorów jest również oporność bakterii wynikająca z odstępstw od typowej budowy ich błony

komórkowej. Obecność na jej powierzchni aminoacylo-fosfatylogliceroli (aa-PG), np. Lys-PG i Arg-PG, znosi jej ładunek ładunek ujemny, czyniąc ją niedostępną dla wielu enzymów i peptydów odpowiedzialnych za lizę bakterii. Enzymami zaangażowanymi w syntezę aa-PG są np. MprF1 i MprF2, katalizujące powstawanie, odpowiednio, Ala-PG i Lys-PG. Aktywność ich warunkowana jest dostępnością aa-tRNA, zatem zależy również od prawidłowego funkcjonowania aaRS bakteryjnych. Podobnie aktywność enzymów uczestniczących w tworzeniu w ścianie komórkowej poprzecznych mostków peptydowych łączących łańcuchy wielocukrowe zależy od aa-tRNA. Wspomniane wyżej grupy enzymów mogą, obok aaRS, stanowić obiecujący obiekt badań mających na celu poszukiwanie nowych antybiotyków [55].

## UWAGI KOŃCOWE

Od momentu odkrycia pierwszych syntetaz aminoacylo-tRNA minęło ponad 50 lat. W tym czasie udało się je sklasyfikować, odtworzyć ich ewolucję, wyjaśnić mechanizm katalizowanej przez nie reakcji aminoacylacji. Rozwiązano także strukturę wielu aaRS. Mimo znacznego nagromadzenia informacji na ich temat wciąż pojawiają się nowe, coraz bardziej zaskakujące.

Zaangażowanie syntetaz w wiele procesów komórkowych stwarza ogromne możliwości ingerencji w metabolizm komórki. Odkrycie ich udziału w etiologii wielu chorób pozwala na zastosowanie ich w diagnostyce. Różnice w budowie między aaRS eukariontów i prokariotów czynią z nich dogodny cel dla leków przeciwbakteryjnych.

Dzięki technice mutagenety stworzono aaRS o zmienionej specyficzności do aminokwasów, co umożliwiło syntezę cząsteczek tRNA związanych z dowolnym aminokwasem. Dzięki temu, że rozpoznawanie cząsteczek aa-tRNA na rybosomach nie zależy od związanego z tRNA aminokwasu, możliwa jest synteza białek o praktycznie dowolnej sekwencji. Stwarza to możliwość produkowania peptydów o zaplanowanych z góry właściwościach. aaRS mogą być również składnikiem biosensorów używanych do szybkiego, łatwego i taniego określania stężenia poszczególnych aminokwasów, np. we krwi czy żywności. Czujniki tego typu mogą być stosowane m.in. w diagnostyce wielu chorób czy sprawdzaniu świeżości produktów spożywczych [57]. Omówione właściwości syntetaz aminoacylo-tRNA dowodzą, że są one nadal ciekawym i obiecującym obiektem badań.

## PIŚMIENNICTWO

1. Kamińska M, Zakrzewska A, Madajka M, Barciszewski J (2002) Udział syntetaz aminoacylo-tRNA w procesach komórkowych. *Postepy Biochem* 48: 189-199
2. Torchala M, Hoffmann M (2007) IA, database of known ligands of aminoacyl-tRNA synthetases. *J Comput Aided Mol Des* 21: 523-525
3. Hausamann CD, Ibba M, Giraldo (2008) Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiol Rev* 32: 705-721
4. Jura M, Rychlewski L, Barciszewski J (2007) Comprehensive insight into human aminoacyl-tRNA synthetases as autoantigens in idiopathic inflammatory myopathies. *Crit Rev Immunol* 27: 559-572
5. Szymański M, Deniziak M, Barciszewski J (2000) The new aspects of aminoacyl-tRNA synthetases. *Acta Biochim Polon* 47: 821-834

6. Cheng G, Zhang H, Yang X, Tzima E, Ewalt KL, Schimmel P, Faber JE (2008) Effect of mini-tyrosyl-tRNA synthetase on ischemic angiogenesis, leukocyte recruitment, and vascular permeability. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1138-1146
7. Antonellis A, Ellsworth RE, Sambuughin N, Puls I, Abel A (2003) Glycyl-tRNA synthetase mutations in Carcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am J Hum Genet* 72: 1293-1299
8. Antonellis A, Green ED (2008) The Role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9: 89-107
9. Chihara T, Luginbuhl D, Lou L (2007) Cytoplasmic and mitochondrial protein translation in axonal and dendritic terminal arborization. *Nat Neurosci* 10: 828-837
10. Levitan IB, Kaczmarek LK (2002) *The Neuron: Cell and Molecular Biology*. New York: Oxford Univ Press
11. Antonellis A, Lee-Lin SQ, Wasterlain A, Leo P, Quezado M (2006) Functional analyses of glycyl-tRNA synthetase mutation suggest a key role for tRNA-charging enzymes in peripheral axons. *J Neurosci* 26: 10397-10406
12. Park SG, Schimmel P, Kim S (2008) Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 11043-11049
13. Lee JB, Beebe K, Nangle LA, Jang J, Longo-Guess CM (2006) Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature* 443: 50-55
14. Paley EL, Denisova G, Sokolova O, Posternak N, Wang X, Brownell AL (2007) Tryptamine induces tryptophanyl-tRNA synthetase-mediated neurodegeneration with neurofibrillary tangles in human cell and mouse model. *Neuromol Med* 9: 55-81
15. Kisselev LL, Favorova OO, Kovaleva GK (1979) Tryptophanyl-tRNA synthetase from beef pancreas. *Methods Enzymol* 59: 234-257
16. Bremer HJ, Anninos A, Schultz B (1996) Amino acid composition of food products used in the treatment of patients with disorders of the amino acid and protein metabolism. *Eur J Pediatr* 155: S108-S114
17. O'Kane RL, Hawkins RA (2003) Na<sup>+</sup>-dependent transport of large neutral amino acids occurs at the abluminal membrane of the blood-brain barrier. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: 1167-1173
18. Lee YS (2006) Antitumor activity of the novel human cytokine AIMP1 in an *in vivo* tumor model. *Mol Cell* 21: 213-217
19. Kim KJ (2008) Determination of tree dimensional structure and residues of novel tumor suppressor, AIMP3/p18, required for the interaction with ATM. *J Biol Chem* 283: 14032-14040
20. Jakubowski H, Zhang L, Bardeguet A, Aviv A (2000) Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. *Circ Res* 87: 45-51
21. Szymański M, Deniziak MA, Barciszewski J (2001) Aminoacyl-tRNA synthetases database. *Nucleic Acids Res* 29: 288-290
22. Schimmel P, Giege R, Moras D, Yokoyama S (1993) An operational RNA code for amino acids and possible relationship to genetic code. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8763-8768
23. Bonnefond L, Giege R, Rudinger-Thirion J (2005) Evolution of the tRNA<sup>Tyr</sup>/TyrRS aminoacylation system. *Biochimie* 87: 873-883
24. Kisselev LL, Favorova OO, Kovaleva GK (1979) Tryptophanyl-tRNA synthetase from beef pancreas. *Methods Enzymol* 59: 234-257
25. Ibba M, Soll D (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem* 69: 617-650
26. Davie EW, Konigsberger VV, Lipmann F (1956) The isolation of a tryptophan-activating enzyme from pancreas. *Arch Biochem Biophys* 65: 21-36
27. Szymański M, Barciszewski J (2007) The genetic code — 40 years on. *Acta Biochim Polon* 54: 51-54
28. Sheppard K, Akochy PM, Salazar JC, Söll D (2007) The *Helicobacter pylori* amidotransferase GatCAB is equally efficient in glutamine-dependent transamidation of Asp-tRNA<sup>Asp</sup> and Glu-tRNA<sup>Gln</sup>. *J Biol Chem* 282: 11866-11873
29. Ambrogelly A, Palioura S, Söll D (2007) Natural expansion of the genetic code. *Nat Chem Biol* 3: 29-35

30. Sheppard K, Yuan J, Hohn MJ, Jester B, Devine KM, Söll D (2008) From one amino acid to another: tRNA-dependent amino acid biosynthesis. *Nucleic Acids Res* 36: 1813-1825
31. Nozawa K, O'Donoghue P, Gundllapalli S, Araiso Y, Ishitani R, Umehara T, Söll D, Nureki O (2009) Pyrrolysyl-tRNA synthetase-tRNA<sup>Pyl</sup> structure reveals the molecular basis of orthogonality. *Nature* 457: 1163-1167
32. Sauerwald A, Zhu W, Major TA, Roy H, Palioura S, Jahn D, Whitman WB, Yates JR, Ibba M, Söll D (2005) RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea. *Science* 307: 1969-1972
33. Fukunaga R, Yokoyama S (2007) Structural insights into the second step of RNA-dependent cysteine biosynthesis in *Archaea*: crystal structure of Sep-tRNA: Cys-tRNA synthase from *Archaeoglobus fulgidus*. *J Mol Biol* 370: 128-141
34. Johansson L, Gafvelin G, Arner ES (2005) Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. *Biochim Biophys Acta* 1726: 1-13
35. Yuan J, Palioura S, Salazar JC, Su D, O'Donoghue P, Hohn MJ, Cardoso AM, Whitman WB, Söll D (2006) RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 18923-18927
36. Longstaff DG, Larue RC, Faust JE, Mahapatra A, Zhang L, Green-Church KB, Krzycki JA (2007) A natural genetic code expansion cassette enables transmissible biosynthesis and genetic encoding of pyrrolysine. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1021-1026
37. Ochner UA, Sun X, Jarvis T, Critchley I, Janjic N (2007) Aminoacyl-tRNA synthetases: essential and still promising target for new anti-infective agent. *Expert Opin Investig Drugs* 16: 573-593
38. Su Z, Honek JF (2007) Emerging bacterial enzyme targets. *Curr Opin Investig Drugs* 8: 140-149
39. Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I (2005) Prospects for Aminoacyl-tRNA Synthetase Inhibitors as New Antimicrobial Agents. *Antimicrob. Agent Chemother* 49: 4821-4833
40. Brown JR, Gentry D, Becker JA, Ingraham K, Holmes DJ, Stanhope MJ (2003) Horizontal transfer of drug-resistant aminoacyl-transfer-RNA synthetases of anthrax and gram-positive pathogens. *EMBO Rep* 4: 692-698
41. Ruan B, Bovee ML, Sacher M, Stathopoulos C, Poralla K, Francklyn CS, Söll D (2005) A unique hydrophobic cluster near the active site contributes to differences in borrelidin inhibition among threonyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* 280: 571-577
42. Brown MJ, Carter PS, Fenwick AS, Fosberry AP, Hamprecht DW, Hibbs MJ, Jarvest RL, Mensah L, Milner PH, O'Hanlon PJ, Pope AJ, Richardson CM, West A, Witty DR (2002) The antimicrobial natural product chuangxinmycin and some synthetic analogues are potent and selective inhibitors of bacterial tryptophanyl tRNA synthetase. *Bioorg Med Chem Lett* 12: 3171-3174
43. Reader JS, Ordoukhanian PT, Kim JG (2005) Major biocontrol of plant tumors targets tRNA synthetases. *Science* 309: 1533
44. Kim S, Lee SW, Choi EC, Choi SY (2003) Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 278-288
45. Lee J, Kang SU, Kang MK, Chun MW, Jo YJ, Kwak JH, Kim S (1999) Methionyl adenylate analogues as inhibitors of methionyl-tRNA synthetase. *Bioorg Med Chem Lett* 9: 1365-1370
46. Brown MJ, Mensah LM, Doyle ML (2000) Rational design of fentomolar inhibitors of isoleucyl tRNA synthetase from a binding model for pseudomonic acid-A. *Biochemistry* 39: 6003-6011
47. Pope AJ, Lapointe J, Mensah L, Benson N, Brown MJB, Moore KJ (1998) Characterization of Isoleucyl-tRNA Synthetase from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 273: 31680-31690
48. Farhanullah, Kang T, Yoon E-J, Choi E-Ch, Kim S, Lee J (2009) 2-[2-Substituted-3-(3,4-dichlorobenzylamino)propylamino]-1H-quinolin-4-ones as *Staphylococcus aureus* methionyl-tRNA synthetase inhibitors. *Eur J Med Chem* 44: 239-250
49. Ferrer E (2006) Spotlight on targeting aminoacyl-tRNA synthetases for the treatment of fungal infections. *Drug News Perspect* 19: 347-348
50. Petraitis V, Petraitiene R, Kelaher AM (2004) Efficacy of PLD-118, a novel inhibitor of candida Isoleucyl-tRNA synthetase, against experimental oropharyngeal and esophageal candidiasis caused by fluconazole-resistant *C. albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother* 48: 3959-3967
51. Baker SJ, Zhang YK, Akama T (2006) Discovery of a new boron-containing antifungal agent, 5-fluoro-1,3-dihydro-1-hydroxy-2,1-benzoxaborole (AN2690) for the potential treatment of onychomycosis. *J Med Chem* 49: 4447-4450
52. Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I (2004) Anti-staphylococcal activity of indolmycin, a potential topical agent for control of staphylococcal infections. *J Antimicrob Chemother* 54: 549-552
53. Critchley IA, Ochsner UA (2008) Recent advances in the preclinical evaluation of the topical antibacterial agent REP8839. *Curr Opin Chem Biol* 12: 409-417
54. Summers AO (2006) Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem. *Anim Biotechnol* 17: 125-135
55. RajBhandary UL, Söll D (2008) Aminoacyl-tRNAs, bacterial cell envelope and antibiotics. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5285-5286
56. Kugimiya A, Morii M, Ohtsuki T (2008) Amino acid sensing using aminoacyl-tRNA synthetase. *Anal Biochem* 378: 90-92

## aaRS – the etiological factor and the attractive target of many disorders

Mirosława Skupińska<sup>1,2,3</sup>, Agnieszka Belter<sup>1,2,3</sup>, Małgorzata Giel-Pietraszuk<sup>1</sup>, Leszek Rychlewski<sup>2</sup>, Jan Barciszewski<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Science, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznan, Poland

<sup>2</sup>BioInfoBank Institute, Limanowskiego 24A/16, 60-744 Poznan, Poland

<sup>3</sup>equal authors

e-mail: jbarcisz@ibch.poznan.pl

**Key words:** aminoacyl-tRNA synthetases, tRNA aminoacylation

### ABSTRACT

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) are essential proteins of all living organisms. It is known that they ensure the fidelity of transfer of genetic information from the DNA into the protein. Not far away it occurred that their role is not confined to catalyze the attachment of amino acids to transfer RNAs and thereby establish the rules of genetic code by virtue of matching the nucleotide triplet of anticodon with cognate amino acid. aaRSs are also engaged in the other crucial cellular processes. So the disturbance of function of any of them often causes serious disorders. Therefore this proteins could be an attractive target of drugs, not only against the mentioned illnesses but also against bacterial, fungal and parasitic infections. Constant progress on this field makes aaRSs still an interesting object of researches.



# Kluczowe znaczenie nośnika GLUT 2 w transporcie glukozy w komórkach jelit

## STRESZCZENIE

W niniejszym artykule przedstawiono dane świadczące o tym, że w stanie resorpcyjnym, szczególnie po spożyciu posiłku bogatego w cukry, około 75% glukozy ulega wchłanianiu przy udziale białka transportującego GLUT 2 zlokalizowanego w błonie plazmatycznej strony szczytowej komórki. Wynika z tego fakt, że w stanie resorpcyjnym kluczową rolę we wchłanianiu glukozy do krwi poprzez komórkę enterocyta odgrywa dyfuzja ułatwiona przy udziale GLUT 2, a nie – jak wcześniej sądzono – dyfuzja bierna przez obwódkę desmosomalną.

## WPROWADZENIE

Według większości dostępnych podręczników biochemii i fizjologii, transport glukozy do komórek nabłonkowych jelita odbywa się przy udziale nośnika SGLT 1 (ang. *sodium glucose transporter 1*), nazywanego również symporterem Na<sup>+</sup>-glukoza (ang. *Na<sup>+</sup>-glucose symporter*). Z kolei transport glukozy z komórek nabłonkowych do naczyń włosowatych zachodzi przy udziale GLUT 2 (ang. *glucose transporter 2*), obecnego w błonie komórkowej części podstawno-bocznej enterocyta (ang. *basolateral membrane*) (Ryc. 1A) [1-3]. SGLT 1 transportuje glukozę do komórek nabłonkowych jelita wspólnie z jonami sodu. W przeciwieństwie do glukozy, Na<sup>+</sup> transportowane są zgodnie z gradientem stężeń. Wymaga to ciągłego usuwania Na<sup>+</sup> z komórki przy udziale Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> zależnej ATPazy. W ten sposób transport glukozy do komórek nabłonkowych jelita przy udziale SGLT 1 jest procesem pośrednio zależnym od hydrolizy ATP, określanym w podręcznikach jako transport wtórnie aktywny. Galaktoza (produkt rozkładu laktozy zawartej w pokarmach), podobnie jak glukoza, jest transportowana do enterocytów przy udziale tego samego nośnika. Natomiast fruktoza (produkt rozkładu sacharozy zawartej w pożywieniu) jest transportowana ze światła jelita do enterocytów na drodze dyfuzji ułatwionej przy udziale GLUT 5. W niektórych podręcznikach biochemii można znaleźć informacje sugerujące, że GLUT 5 jest również głównym transporterem glukozy i galaktozy [1]. Zgromadzone w komórce cukru proste opuszczają enterocyty przy udziale GLUT 2 obecnego w rejonie błony strony podstawno-bocznej komórki (Ryc. 1A). Ten typ transportu związany z wejściem glukozy (lub innych metabolitów, np. aminokwasów) do komórki i jej wyjściem z komórki nazywany jest transportem poprzez komórkę (ang. *transcellular pathway*).

Wchłanianie glukozy w przewodzie pokarmowym może odbywać się również zgodnie z gradientem stężeń na drodze dyfuzji biernej (bez udziału SGLT 1). Fizjologiczne znaczenie tej drogi transportu jest w podręcznikach biochemii pomijane lub traktowane marginalnie. Wydaje się jednak, że jest to główna droga wchłaniania glukozy w jelicie po spożyciu pokarmu bogatego w węglowodany, kiedy lokalne stężenie tego cukru na powierzchni rąbka prążkowanego jest wysokie (działanie izomaltazy i maltazy) [4]. Do niedawna kontrowersje budził mechanizm tej dyfuzji. Początkowo sądzono, że jest to transport międzykomórkowy (ang. *paracellular pathway*), polegający na przenikaniu glukozy ze światła jelita do naczyń włosowatych pomiędzy enterocytami zgodnie z gradientem stężeń poprzez obwódkę zamykającą, zwaną również obwódką desmosomalną (łac. *zonula occludens*, ang. *tight junction*) (Ryc. 1A). Sugerowano, że jest to możliwe dzięki rozluźnieniu zwartej struktury obwódki zamykającej, spowodowanej przebudową cytoszkieletu enterocyta pod wpływem transportu glukozy przy udziale SGLT 1 [5]. Jednak badania *in vitro* nie potwierdziły tego typu transportu glukozy ze światła przewodu pokarmowego do naczyń włosowatych.

## GLUT2 W TRANSPORCIE GLUKOZY

Wyniki ostatnio prowadzonych badań wskazują, że transport glukozy w stanie resorpcyjnym zachodzi poprzez komórkę enterocyta przy udziale GLUT 2 obecnego w błonie komórkowej powierzchni szczytowej (transport do komórki) oraz

Ewa Stelmańska<sup>✉</sup>

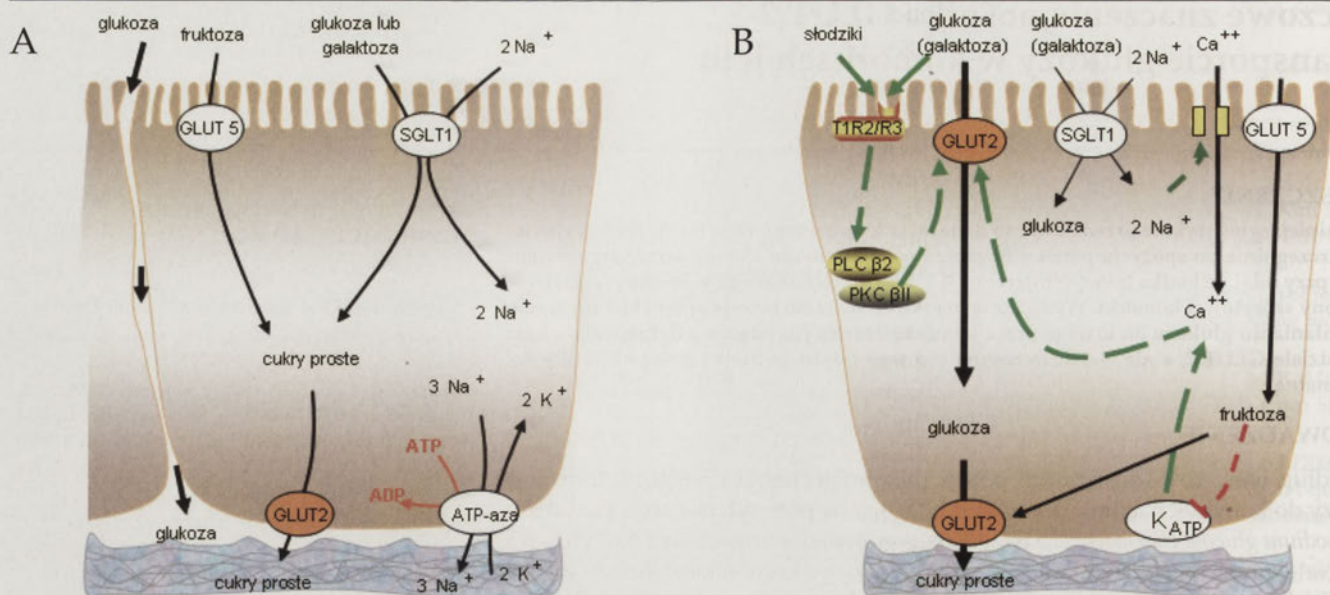
Katedra i Zakład Biochemii, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

<sup>✉</sup>Katedra i Zakład Biochemii GUMed, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk; tel.: (58) 349 14 78, e-mail: bori@amg.gda.pl

Artykuł otrzymano 6 kwietnia 2009 r.  
Artykuł zaakceptowano 27 czerwca 2009 r.

Słowa kluczowe: glukoza, GLUT 2, SGLT 1

**Podziękowania:** Autorka pracy dziękuje Panu prof. dr hab. n. med. Julianowi Świerczyńskiemu za cenne wskazówki i uwagi dotyczące niniejszej pracy. Praca powstała w ramach realizacji projektu statutowego ST-41 Katedry i Zakładu Biochemii GUMed.



**Rycina 1.** Wchłanianie monosacharydów w jelicie. A. Klasyczny mechanizm transportu cukrów prostych ze światła jelita do naczyń włosowatych. B. Regulacja zawartości GLUT 2 w błonach komórkowych jelit (według [4] zmienione). Przerywana strzałka wskazuje na aktywację (zielona) lub hamowanie (czerwona) poszczególnych procesów. Szczegółowy opis zamieszczono w tekście.

GLUT 2 obecnego w błonie plazmatycznej części podstawno-bocznej komórki (transport z komórki do naczyń włosowatych) [6]. Do tej pory uważano, że GLUT 2 obecny jest tylko w części podstawno-bocznej błony komórkowej enterocytów. Dowodem na to, że wchłanianie glukozy zgodnie z gradientem stężeń zachodzi poprzez komórkę, a nie poprzez obwódkę desmosomalną, są wyniki badań, w których zastosowano florydzynę (inhibitor SGLT 1) oraz cytochalazynę B (inhibitor GLUT 2). Wykazano, że jednoczesne zastosowanie florydzyiny i cytochalazyny B całkowicie hamuje wchłanianie glukozy ze światła jelita do krwi. Gdyby glukoza była transportowana przez obwódkę desmosomalną, całkowite zahamowanie wchłaniania glukozy w jelicie przy użyciu obu inhibitorów byłoby niemożliwe. Z powyższych danych wynika, że absorpcja glukozy w jelicie odbywa się głównie poprzez komórkę przy udziale zarówno SGLT 1, jak i GLUT 2 zlokalizowanych w domenie szczytowej błony komórkowej enterocyty. Po posiłku, gdy stężenie glukozy na powierzchni rąbka prążkowanego jest wysokie, główną rolę we wchłanianiu glukozy odgrywa dyfuzja ułatwiona przy udziale GLUT 2 zlokalizowanego w szczytowej części komórki [4,6].

Poziom SGLT 1 w błonie plazmatycznej komórek nabłonkowych jelita nie zmienia się pod wpływem zmian stężenia glukozy w jelicie. Maksymalne wysycenie SGLT 1 obserwuje się przy około 30 mM stężeniu tego cukru. Poziom GLUT 2 w błonie komórkowej powierzchni wolnej również nie zmienia się w zakresie 0–30 mM stężenia glukozy (niskie stężenia glukozy w jelicie). Sugeruje to, że kiedy stężenie glukozy w jelicie jest niskie (do około 30 mM) oba nośniki mogą odgrywać podobną rolę w transporcie tego cukru do enterocytów. Natomiast gdy stężenie glukozy w jelicie jest wysokie (od 30 mM do 100 mM) poziom GLUT 2 w domenie szczytowej błony komórkowej znacznie wzrasta [7]. Sugeruje to, że kiedy w świetle przewodu pokarmowego stężenie glukozy jest wysokie decydującą rolę w transporcie glukozy do enterocytów odgrywa GLUT 2. Ponadto wykazano, że w warunkach niskiej perfuzji florydzyina hamuje zarówno transport glukozy, jak i zmniejsza poziom GLUT 2 w domenie błony komórkowej części szczy-

towej enterocyty (mierzone techniką western blot) [8]. Sugeruje to, że poziom GLUT 2 w tym rejonie błony komórkowej jest przynajmniej częściowo zależny od transportu glukozy przy udziale SGLT 1. Wykazano również, że rolę w tym procesie odgrywa wchłanianie wapnia przy udziale kanałów wapniowych typu  $Ca_v1.3$  [9]. Proponowany udział prawidłowo działającego SGLT 1 i kanałów  $Ca_v1.3$  w regulacji poziomu GLUT 2 w domenie błony komórkowej części szczytowej enterocyty został przedstawiony na rycinie 1B. Kotransport glukozy i  $Na^+$  przy udziale SGLT 1 prowadzi do lokalnego wzrostu stężenia  $Na^+$ , a w konsekwencji do depolaryzacji błony komórkowej. Skutkuje to otwarciem kanałów wapniowych typu  $Ca_v1.3$  regulowanych napięciem, a w konsekwencji powoduje wzrost stężenia  $Ca^{2+}$  w cytosolu enterocytów. Jony wapniowe uruchamiają sygnały prowadzące do przebudowy cytoszkieletu komórkowego, powodując szybkie (trwające kilka minut) przemieszczenie magazynowanego w cytoplazmie GLUT 2 do powierzchni szczytowej błony komórkowej enterocytów [4,9]. Precyzyjny mechanizm działania jonów wapniowych w tym procesie nie jest jeszcze znany. Wiadomo, że w procesie translokacji GLUT 2 do błony niezbędna jest aktywacja kinazy lekkiego łańcucha miozyny i PKC  $\beta II$  (izofорма  $\beta II$  kinazy białkowej C). Sugeruje się również, że fruktoza, prowadząc do depolaryzacji błony komórkowej poprzez zamknięcie kanałów potasowych, może stymulować transport GLUT 2 do błony komórkowej części szczytowej komórki na drodze zależnej od jonów wapniowych.

Transport glukozy do enterocytów przy udziale GLUT 2 może być regulowany za pośrednictwem współpracujących z białkami G receptorów smaku słodkiego (heterodimer T1R2/T1R3), obecnych w rejonie szczytowym błon komórkowych jelit (Ryc. 1B) [10]. Pobudzenie tych receptorów powoduje przemieszczenie (a tym samym aktywację) PLC  $\beta 2$  (izofорма  $\beta 2$  fosfolipazy C) i PKC  $\beta II$  (izofорма  $\beta II$  kinazy białkowej C) do błony plazmatycznej komórki. Następnym etapem tych procesów jest szybkie wbudowanie GLUT 2 do domeny błony komórkowej części szczytowej enterocyty. Wzrost poziomu GLUT 2 w tym rejonie błony mogą też

powodować sztuczne słodziki, które pobudzają receptory smaku słodkiego T1R2/T1R3, podobnie jak glukoza, ale przy znacznie niższych stężeniach [10].

Intensywność wchłaniania cukrów prostych na drodze dyfuzji ułatwionej może być również regulowana przez hormony. Powszechnie panuje pogląd, że insulina ma niewielki wpływ na wchłanianie cukrów w jelicie [3]. Tymczasem w badaniach na myszach wykazano, że insulina, oddziałując z receptorami insulinowymi obecnymi w błonie komórkowej enterocytów, powoduje obniżenie poziomu GLUT 2 zarówno w domenie błony plazmatycznej części szczytowej, jak i podstawno-bocznej komórki [11]. Wynika z tego, że hipoglikemiczne działanie insuliny może być związane nie tylko ze zwiększeniem pobierania glukozy przez adipocyty i miocyty (w których insulina zwiększa poziom GLUT 4 w błonie plazmatycznej) oraz wzrostem katabolizmu glukozy w tkankach obwodowych, ale również z obniżeniem wchłaniania tego cukru z jelita do krwi. Wydzielanie insuliny zwiększają GIP (polipeptyd insulinotropowy zależny od glukozy; ang. *glucose-dependent insulinotropic polypeptide*) i GLP-1 (peptyd glukagonopodobny 1; ang. *glucagon-like peptide-1*), których uwalnianie z komórek enteroendokrynych typu K lub L jelita cienkiego stymulowane jest przez receptory smaku słodkiego. Hormony te pośrednio wpływają więc na obniżenie poziomu GLUT2 w błonie komórkowej enterocyty. Ważne znaczenie w procesie regulacji wchłaniania glukozy w przewodzie pokarmowym przypisuje się, działającemu parakrynnie, GLP2 (glukagonopodobny peptyd 2, ang. *glucagon-like peptide 2*). Hormon ten, produkowany przez komórki L jelita krętego, oddziałując z receptorami obecnymi w przedniej części jelita cienkiego, uruchamia sygnały prowadzące do szybkiej translokacji GLUT2 zarówno do domeny błony komórkowej powierzchni szczytowej, jak i podstawno-bocznej enterocyty [12].

W rąbku prążkowanym enterocytów znajduje się wiele nośników transportujących cukry proste. Większość z nich, z wyjątkiem SGLT 1 i GLUT 2, wykazuje niskie powinowactwo do glukozy (np.: GLUT 5), co sugeruje, że *in vivo* nie mają one większego znaczenia w wchłanianiu tego cukru [13].

## PODSUMOWANIE

Podsumowując, wydaje się że są podstawy, aby stwierdzić, że udział GLUT 2 w procesie wchłaniania glukozy ze światła jelita do enterocyty jest niesłusznie pomijany w

wielu podręcznikach biochemii i fizjologii. Najnowsze badania wskazują, że w stanie resorpcyjnym, szczególnie po spożyciu posiłku bogatego w cukry, około 75% glukozy ulega wchłanianiu przy udziale GLUT 2 zlokalizowanego w rejonie błony plazmatycznej strony szczytowej komórki. Wynika z tego, że w stanie resorpcyjnym kluczową rolę w wchłanianiu glukozy do krwi poprzez komórkę enterocyty odgrywa dyfuzja ułatwiona przy udziale GLUT 2, a nie, jak wcześniej sądzono, dyfuzja bierna poprzez obwódkę demosomalną.

## PIŚMIENNICTWO

1. Murray RK, Granner DK, Rodwell VW (2008) Biochemia Harpera, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa
2. Baynes JW, Dominiczak M (2005) Medical biochemistry 2<sup>nd</sup> edition. Mosby elsevier
3. Ganong WF (2007) Fizjologia: podstawy fizjologii lekarskiej, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa
4. Kellett GL, Brot-Laroche E, Mace OJ, Leturque A (2008) Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu Rev Nutr* 28: 35-54
5. Pappenheimer JR, Reiss KZ (1987) Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. *J Membr Biol* 100: 123-136
6. Kellett GL (2001) The facilitated component of intestinal glucose absorption. *J Physiol* 531: 585-595
7. Kellett GL, Helliwell PA (2000) The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem J* 350: 155-162
8. Helliwell PA, Kellett GL (2002) The active and passive components of glucose absorption in jejunum under low and high perfusion stress. *J Physiol* 544: 579-589
9. Morgan EL, Mace OJ, Affleck J, Kellett GL (2007) Apical GLUT2 and Ca<sub>v</sub>1.3: regulation of rat intestinal glucose and calcium absorption. *J Physiol* 580: 593-604
10. Mace OJ, Affleck J, Patel N, Kellett GL (2007) Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J Physiol* 582.1: 379-392
11. Tobin V, Le Gall M, Fioramonti X, Stolarczyk E, Blazquez AG, Klein C, Prigent M, Serradas P, Cuif MH, Magnan C, Leturque A, Brot-Laroche E (2008) Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes* 57: 555-562
12. Au A, Gupta A, Schembri P, Cheeseman CI (2002) Rapid insertion of GLUT2 into the rat jejunal brush-border membrane promoted by glucagon-like peptide 2. *Biochem J* 367: 247-254
13. Barone S, Fussell SL, Singh AK, Lucas F, Xu J, Kim Ch, Wu X, Yu Y, Amlal H, Seidler U, Zuo J, Soleimani M (2009) Slc2a5 (Glut5) Is essential for the absorption of fructose in the intestine and generation of fructose-induced hypertension. *J Biol Chem* 284: 5056-5066

## The important role of GLUT2 in intestinal sugar absorption

Ewa Stelmanska

Department of Biochemistry Medical University of Gdansk, Debinki 1, 80-211 Gdansk, Poland

e-mail: bori@amg.gda.pl

Key words: glucose, GLUT2, SGLT1


### ABSTRACT

The classical model of sugar absorption indicates that Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter, SGLT1 transports glucose from intestinal lumen to cytosol and GLUT2 transports glucose from cytosol to the blood. Recent evidence indicates that GLUT 2 is rapidly inserted into the apical membrane after a meal. Intestinal glucose absorption by the apical GLUT2 pathway can be 3 to 5-times greater than by SGLT1 at the high concentration of sugar. Apical GLUT2 insertion is regulated by pathway of calcium absorption through L-type channel Ca<sub>v</sub>1.3, activation of sweet taste receptors (T1R2/T1R3) and endocrine and paracrine hormones (especially insulin and GLP-2).


# Endomorfiny – endogenne ligandy receptora opioidowego $\mu$

Renata Perlikowska

Jakub Fichna

Anna Janecka 

Zakład Chemii Biomolekularnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

 Zakład Chemii Biomolekularnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; tel.: (42) 678 42 77, e-mail: anna.janecka@umed.lodz.pl

Artykuł otrzymano 4 marca 2009 r.  
Artykuł zaakceptowano 22 czerwca 2009 r.

**Słowa kluczowe:** receptory opioidowe, peptydy opioidowe, endomorfina-1, endomorfina-2

**Wykaz skrótów:** APM – aminopeptydaza M; APP – aminopeptydaza P; cAMP – cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan; CBY – karboksypeptydaza Y; Dmt – 2',6'-dimetylotyrozyna; DPP IV – dipeptydylo peptydaza IV; EM-1 – endomorfina-1; EM-2 – endomorfina-2; GPCR (ang. *G-protein coupled receptors*) – receptory sprzężone z białkiem G; GTPaza – fosfohydrolaza guanozynotrifosforanu; LC (ang. *locus coeruleus*) – miejsce sinawe; NMR (ang. *nuclear magnetic resonance*) – magnetyczny rezonans jądrowy; NTS (ang. *nucleus of the solitary tract*) – jądro pasma samotnego; OUN – ośrodkowy układ nerwowy; PA – proteina A; PAG (ang. *periaqueductal gray*) – substancja szara okolowodociągowa

## STRESZCZENIE

Dwa endogenne peptydy opioidowe, które wykazują wyjątkowe powinowactwo i wybiórczość w stosunku do receptora opioidowego typu  $\mu$ , endomorfina-1 i endomorfina-2, zostały odkryte i wyizolowane z mózgu ssaków w 1997 roku. Endomorfiny są amidowanymi tetrapeptydami, odmiennymi strukturalnie od tzw. „typowych” peptydów opioidowych, enkefalin, dynorfin i endorfin. Do tej pory nie udało się zidentyfikować białka będącego ich prekursorem, ani genu kodującego ich sekwencję. Z powodu zbyt małej lipofilowości, endomorfiny nie są zdolne do przekraczania bariery krew-mózg. W modelach zwierzęcych peptydy te okazały się bardzo skuteczne w zwalczaniu bólu neuropatycznego i bólu związanego ze stanami zapalnymi. W porównaniu z morfiną, prototypowym ligandem receptora opioidowego  $\mu$ , egzogennie podawane endomorfiny powodują mniej efektów ubocznych. W niniejszym artykule opisano historię odkrycia endomorfina, ich komórkową lokalizację, rolę w organizmie, a także zależności pomiędzy ich strukturą a aktywnością biologiczną oraz podatnością na biodegradację.

## WPROWADZENIE

Problematyką bólu i metodami jego łagodzenia ludzkość zajmuje się od zarania dziejów. Pierwsze doniesienia o kuracjach przeciwbólowych pochodzą z XIV-XV wieku p.n.e. Już wówczas opium, czyli wysuszony sok z niedojrzałych makówek maku lekarskiego (*Papaver somniferum*), było środkiem stosowanym do uśmierzania silnego bólu i wywoływania stanów euforii. W roku 1803 Serturner wyizolował z opium jego główny składnik – morfinę, a 120 lat później ustalono strukturę tego alkaloidu, którego nazwa pochodzi od imienia greckiego boga marzeń sennych, Morfeusza.

W 1972 r. Collier postawił hipotezę o istnieniu w mózgu ssaków „endogennej morfiny” oraz specyficznych dla niej receptorów, poprzez które może ona działać. Zaledwie rok później, trzy niezależne grupy, Snydera, Simona i Tereniusa, potwierdziły istnienie w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) ssaków trzech typów receptorów opioidowych ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ), które zostały zaliczone do grupy receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR, ang. *G-protein coupled receptors*). Pobudzenie receptorów opioidowych zwiększa aktywność GTPazy, aktywuje lub blokuje układy efektorowe, w tym aktywność cykazy adenylanowej, fosfolipazy C i kanałów jonowych. Stymulacja receptorów opioidowych wywołuje efekt przeciwbólowy. Morfina wiąże się ze wszystkimi trzema typami receptorów opioidowych, ale jej powinowactwo do receptora  $\mu$  jest stukrotnie większe niż do pozostałych dwóch typów [1].

Odkrycie receptorów opioidowych, na początku w OUN, a później także w obwodowych neuronach czuciowych, w komórkach zwojowych korzeni grzbietowych oraz na ośrodkowych i obwodowych zakończeniach neuronów aferentnych ssaków, zapoczątkowało poszukiwania ich endogennych ligandów. W krótkim czasie udało się odkryć i wyizolować z mózgu ssaków trzy anatomicznie i funkcjonalnie różne rodziny tzw. „typowych” peptydów opioidowych,  $\delta$ -selektywne enkefaliny,  $\kappa$ -selektywne dynorfiny i niewybiórcze endorfiny, z których każda wywodzi się ze specyficznego dla siebie prekursora, odpowiednio pro-enkefaliny, pro-dynorfiny i pro-opiomelanokortyny [2-4]. Natomiast znalezienie endogennego ligandu receptora opioidowego  $\mu$  okazało się niezwykle trudne i zostało uwieńczone sukcesem dopiero w 1997 r.

## ODKRYCIE ENDOMORFIN

Znaczący wkład w poszukiwania endogennych ligandów receptora opioidowego  $\mu$  miały badania nad „nietypowymi” peptydami opioidowymi, o różnorodnej sekwencji i pochodzeniu. Jako pierwsze odkryto  $\mu$ -selektywne  $\beta$ -kazomorfiny, powstałe wskutek proteolizy białka mleka,  $\beta$ -kazeiny oraz ich krótszą pochodną morficeptynę (Tyr-Pro-Phe-Pro-NH<sub>2</sub>). Inny peptyd opioidowy, hemorfina (Tyr-Pro-Trp-

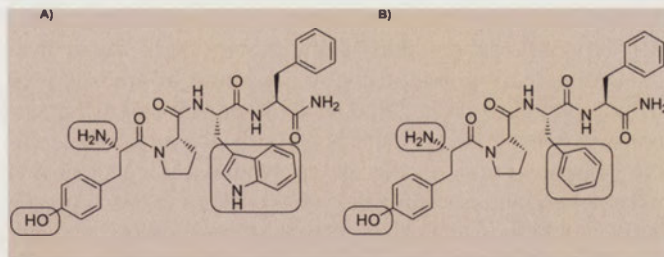
Thr) powstaje w wyniku enzymatycznej hydrolizy hemoglobiny, natomiast ze skóry płazów wyodrębniono szereg peptydów o dużym powinowactwie do receptorów opioidowych, z których najbardziej znane to  $\mu$ -selektywna dermorfina oraz  $\delta$ -selektywne dermenkefalina i deltorfina I i II [3]. Na początku lat 90-tych udało się wyizolować z mózgu dwa peptydy, Tyr-MIF-1 (Tyr-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>) i Tyr-W-MIF-1 (Tyr-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>), które charakteryzowały się dużą wybiórczością, ale małym powinowactwem do receptora opioidowego  $\mu$  [5]. Używając Tyr-W-MIF-1 jako związku wyjściowego, grupa Zydiny zsyntetyzowała serię analogów tego peptydu, zastępując resztę Gly w pozycji 4 kolejno wszystkimi dwudziestoma naturalnymi aminokwasami. Jeden z otrzymanych analogów o sekwencji Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub> okazał się mieć niezwykle wysokie powinowactwo (0,36 nM) i dużą wybiórczość (stosunek  $\delta/\mu$  i  $\kappa/\mu$  odpowiednio >4000 i >15000) do receptora opioidowego  $\mu$ . Peptyd o takiej sekwencji został następnie wyizolowany z mózgu wołu [6] i człowieka [7] wraz z drugim związkiem, różniącym się tylko jednym aminokwasem (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>), o powinowactwie (0,69 nM), i wybiórczości (stosunek  $\delta/\mu$  i  $\kappa/\mu$  odpowiednio >13000 i >7500) do receptora opioidowego  $\mu$ . Te dwa nowe peptydy posiadały podobne, silne właściwości przeciwbólowe w testach *in vivo* [6,8,9]. Ponieważ działały przez ten sam receptor co morfina, zostały nazwane odpowiednio endomorfina-1 (EM-1) i endomorfina-2 (EM-2) i uznane za endogenne ligandy receptora opioidowego  $\mu$  [5]. Bezpośrednim efektem ich oddziaływania z receptorem opioidowym jest hamowanie aktywności cyklicznej adenylanowej, co powoduje obniżenie poziomu cyklicznego 3',5'-adenozynomonofosforanu (cAMP) w komórce, aktywację kanałów potasowych oraz hamowanie aktywności kanałów wapniowych.

Do chwili obecnej, pomimo zastosowania najnowszych technik biologii molekularnej z wykorzystaniem metod bioinformatycznych, nie udało się zidentyfikować fragmentu DNA w genomie człowieka kodującego białko, które w wyniku posttranslacyjnej proteolizy dałoby sekwencję złożoną z czterech aminokwasów charakterystyczną dla endomorfina [6,10]. Biosynteza endomorfina pozostaje wciąż w sferze badań, a testy z wykorzystaniem znakowanych trytem sekwencji aminokwasowych, dają tylko hipotetyczny obraz syntezy, w którym dipeptyd Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> jest jednym z możliwych substratów [11].

## STRUKTURA ENDOMORFIN

Struktura endomorfina jest całkiem odmienna od struktur poznanych wcześniej „typowych” peptydów opioidowych, enkefalin, dynorfina i endorfina, które charakteryzują się N-końcową sekwencją Tyr-Gly-Gly-Phe i wolną grupą karboksylową na C-końcu [3,12]. Endomorfiny, będące tetrapeptydowymi amidami, posiadają Pro w pozycji 2 i strukturalnie są podobne do morfeptyny [13].

Sekwencję peptydów opioidowych umownie podzieliło na dwa fragmenty: N-końcową sekwencję informacyjną (ang. *message sequence*), odpowiedzialną za właściwości biologiczne, i C-końcową sekwencję adresową (ang. *address sequence*), odpowiedzialną za powinowactwo i wybiórczość [3,12,14]. W przypadku endomorfina sekwencja informacyjna składa się z dwóch aromatycznych aminokwasów, Tyr<sup>1</sup> i Trp/Phe<sup>3</sup> połączonych resztą Pro, pełniącą funkcję łącznika.



Rycina 1. Struktura endomorfina-1 (A) i endomorfina-2 (B) z zaznaczonymi grupami farmakoforowymi.

Grupa aminowa i fenolowa Tyr<sup>1</sup> oraz pierścień aromatyczny Trp/Phe<sup>3</sup> są tzw. grupami farmakoforowymi, odpowiedzialnymi za wiązanie się peptydu z receptorem (Ryc. 1).

## WYSTĘPOWANIE ENDOMORFIN

Analiza radioimmunologiczna i immunocytochemiczna wykazała obecność endomorfina w wielu miejscach OUN człowieka, wołu i gryzoni [2,15,16]. Znaczne ilości obu endomorfina występują w prążku kraniowym kresomózgowia, substancji szarej okołowodociągowej śródmózgowia (PAG, ang. *periaqueductal gray*), miejscu sinawym (LC, ang. *locus coeruleus*) i jądrze pasma samotnego tyłomózgowia wtórnego (NTS, ang. *nucleus of the solitary tract*). Szczegółowe badania wykazały jednak znaczne różnice w neuroanatomicznej lokalizacji tych peptydów. Endomorfina-1 występuje głównie w mózgu i górnej części pnia mózgu, a endomorfina-2 w rdzeniu kręgowym i dolnej części pnia mózgu [17,18]. Ogólnie endomorfiny są zlokalizowane najczęściej w pobliżu receptorów  $\mu$  w tych regionach OUN, które są zaangażowane w odczuwanie bólu. Różnice w lokalizacji endomorfina mogą wskazywać na istnienie dwóch różnych prekursorów tych peptydów. Jak dotąd niewiele wiadomo na temat występowania endomorfina poza OUN. Przypuszcza się, że, endomorfiny wytwarzane są w komórkach zwojowych korzeni grzbietowych, a następnie migrują wzdłuż włókien nerwowych do powierzchniowej warstwy rogów tylnych rdzenia kręgowego, w kierunku zarówno struktur OUN, jak również w kierunku obwodowym [2,15]. Wykazano obecność endomorfina w takich tkankach obwodowych ludzi i szczurów, jak śledziona, grasica i krew [19], a także w komórkach układu odpornościowego [20-22].

## ROLA ENDOMORFIN W ORGANIZMIE

Obecność endomorfina zarówno w ośrodkowym, jak i obwodowym układzie nerwowym, a także w strukturach układu hormonalnego, pokarmowego i odpornościowego świadczy o ich różnorodnych funkcjach biologicznych. Endomorfiny mają przede wszystkim działanie przeciwbólowe, ale wykazano, że odgrywają także rolę w sterowaniu procesami oddechowymi oraz wpływają na układ krążenia, pokarmowy i odpornościowy [5,18,23]. Te dodatkowe funkcje endomorfina w organizmie związane są z ich lokalizacją w obszarze pasma samotnego, którego zadaniem jest dośrodkowe przenoszenie informacji ze ścian narządów wewnętrznych.

Podstawową rolą endomorfina w organizmie jest sterowanie układem antynocyceptywnym, czyli udział w wygaszaniu transmisji bólu poprzez hamowanie wydzielania neuro-

transmiterów na poziomie rdzenia kręgowego (substancji P, glutaminianu, peptydów związanych z genem kalcytoniny) [24], hiperpolaryzację błony komórkowej bądź aktywowanie hamującej drogi zstępującej na poziomie śródmózgowia i rdzenia przedłużonego [18]. Działanie przeciwbólne endomorfina wynika z ich specyficznego oddziaływania z receptorem opioidowym  $\mu$ . Analgezja spowodowana egzogennym podaniem endomorfina zależy od dawki oraz czasu po podaniu i jest hamowana przez antagonistów receptora  $\mu$ , takich jak nalokson lub  $\beta$ -funaltreksamina [2,23]. Przypuszcza się, że endomorfina-2, ze względu na swą lokalizację, może być zaangażowana we wczesne stadium przewodzenia bólu, a endomorfina-1 w stadium późniejsze [18,23,24].

Właściwości przeciwbólne endomorfina testowano po podaniu centralnym lub obwodowym, w rozmaitych testach behawioralnych, pozwalających badać reakcje na bodźce mechaniczne, termiczne lub chemiczne [18,23]. Podawanie dooponowe endomorfina-1 dawało lepszy efekt w teście rzucania ogona u myszy niż podawanie do komór mózgowych [2,6,9]. Endomorfina-2 wykazywała słabsze właściwości przeciwbólne w teście gorącej płytki [25] i cofania łapy [26] niż endomorfina-1. Endomorfiny były mniej aktywne i działały znacznie krócej w modelu zapalenia zwierzęcego (test formalinowy) [2,23,27]. Natomiast w przypadku bólu neuropatycznego u szczurów, wynikającego z uszkodzenia nerwów, endomorfiny, w przeciwieństwie do morfiny, wykazywały aktywność przeciwbólową, a alłodynię hamowały bardziej efektywnie niż morfina [2,8,26,27]. Ogólnie jednak czas trwania efektu przeciwbólowego po egzogennym podaniu endomorfina jest krótki, co świadczy o ich szybkiej biodegradacji w płynach fizjologicznych [8,28,29].

Endomorfiny wykazują również obwodowe działanie przeciwzapalne i przeciwbólne [30]. Ich występowanie stwierdzono w homogenatach śledziony i grasicy szczurów oraz w homogenacie śledziony ludzi [19], jak również w leukocytach [21,22]. Obwodowe działanie opioidów wynika ze współdziałania układu nerwowego z układem odpornościowym. Powstanie w organizmie stanu zapalnego powoduje, że komórki układu odpornościowego wytwarzają endomorfiny, a te, pobudzając receptory opioidowe w nerwowych włóknach aferentnych, hamują bodźce bólowe, indukowane przez mediatory stanu zapalnego. Ostatnie badania przeprowadzone na osobach z artretyzmem, reumatoidalnym zapaleniem stawów i zapaleniem wielostawowym wykazały podwyższony poziom endomorfina w ogniskach zapalenia, co stanowi kolejny dowód na przeciwzapalne działanie tych endogennych peptydów opioidowych [31].

Oprócz odpowiedzi na stres i ból, endomorfiny podawane egzogennie, tak jak i inne opioidy, wywołują szereg niepożądanych efektów ubocznych. Następstwem długotrwałego ich stosowania jest rozwój tolerancji i uzależnienia [26]. U gryzoni wykazano, że jednorazowe podanie domózgowe lub dordzeniowe dużej dawki endomorfina powoduje tolerancję i osłabia działanie przeciwbólne [8]. Krzyżowy charakter tolerancji stwierdzono w przypadku jednoczesnego podawania morfina i endomorfina-1, a zależności takiej nie obserwowano w przypadku endomorfina-2. Może to być kolejnym dowodem na istnienie podtypów receptorów opioidowych [18].

Z kolei stymulacja receptorów opioidowych w obrębie układu oddechowego prowadzi do depresji oddechowej, wywołanej wytłumieniem czynności ośrodków oddechowych pnia mózgu. Pod wpływem endomorfina podwyższa się próg pobudliwości ośrodków w stosunku do dwutlenku węgla, w konsekwencji czego oddech ulega spłyceniu, a częstość oddechów maleje. Wykazano jednak, że depresja oddechowa wywołana podaniem endomorfina pojawia się przy użyciu dawki większej niż ta, która wywołuje efekt analgetyczny [5,24,32].

Tak jak większość analgetyków opioidowych, endomorfiny hamują też funkcje układu pokarmowego, co objawia się zaburzeniami gastrycznymi, wynikającymi ze zwiększenia napięcia odzwiernikowej części żołądka, zmniejszenia perystaltyki jelita cienkiego i kurczenia mięśni zwieraczy [33].

Układ sercowo-naczyniowy również podlega modulacji pod wpływem peptydów opioidowych. Badania radioimmunologiczne potwierdziły obecność endomorfina w obrębie jądra pasma samotnego, pola bocznego podwzgórza, jądra przykomorowego grzbietowej części hipokampa, czyli w regionach biorących udział w stymulacji układu krwionosnego [17]. Przypuszcza się, że endomorfiny powodują spadek częstości akcji serca oraz obniżenie ciśnienia tętniczego krwi, chociaż mechanizm działania endomorfina w układzie sercowo-naczyniowym nie jest wyjaśniony.

## BIOAKTYWNA KONFORMACJA ENDOMORFIN

Łańcuchy peptydowe endomorfina charakteryzują się dużą giętkością i dlatego do tej pory nie udało się ustalić budowy przestrzennej, jaką mają w momencie wiązania się z receptorem, czyli tak zwanej konformacji bioaktywnej. Reszta proliny w pozycji 2 endomorfina jest uważana za łącznik, oddzielający dwie aromatyczne grupy farmakoforowe, Tyr<sup>1</sup> i Trp/Phe<sup>3</sup> [14]. Zastąpienie w sekwencji endomorfina-1 Pro<sup>2</sup> jej enancjomerem (D-Pro) dało całkowicie nieaktywny analog [34], co wskazuje na ważną rolę tej reszty aminokwasowej w utrzymywaniu właściwej przestrzennej orientacji grup farmakoforowych względem siebie.

Cykliczna struktura Pro<sup>2</sup> jest odpowiedzialna za fakt, że wiązanie peptydowe pomiędzy Pro<sup>2</sup> a poprzedzającą ją w łańcuchu resztą aminokwasową ulega izomeryzacji. Badania z użyciem magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*) wykazały, że obie endomorfiny występują w roztworze wodnym jako mieszanina izomerów, posiadających wiązanie peptydowe pomiędzy Tyr<sup>1</sup> i Pro<sup>2</sup> w formie *cis* lub *trans*. Stosunek pomiędzy izomerem *cis* i *trans* dla endomorfina-1 wynosi 25%/75% [35,36], a dla endomorfina-2 33%/66% [37]. Powstaje pytanie czy w momencie wiązania się z receptorem wiązanie peptydowe Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> przyjmuje konfigurację *cis* czy *trans* i jaka jest wtedy bioaktywna konformacja całego łańcucha. Badania strukturalne z użyciem 1D- i 2D-NMR, dichroizmu kołowego, spektroskopii fluorescencyjnej i fourierowskiej w połączeniu z modelowaniem komputerowym, nie dały jak dotąd odpowiedzi na to pytanie. Niektóre dane wskazują, że bioaktywna konformacja endomorfina to rozciągnięty łańcuch, w którym wiązanie Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> ma konfigurację *trans* [35,37], podczas gdy inne sugerują istnienie  $\gamma$ -zgięcia [38,39]. Według innych autorów

konformacja bioaktywna musi zawierać wiązanie Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> o konfiguracji *cis* [13].

## DEGRADACJA ENZYMATYCZNA ENDOMORFIN

Odkrycie endomorfina dało nadzieję na wykorzystanie tych związków lub analogów o budowie opartej na ich strukturze jako środków przeciwbólowych, pozbawionych efektów ubocznych morfiny. Jednakże egzogenne stosowanie endomorfina, tak jak większości peptydów, wiąże się z poważnymi ograniczeniami, z których najważniejsze to brak aktywności po podaniu doustnym lub dożylnym. Aby tak podane związki dotarły do receptorów opioidowych zlokalizowanych w mózgu, muszą charakteryzować się stabilnością metaboliczną i zdolnością do przekroczenia bariery krew-mózg [28,40]. Degradacja endomorfina przez enzymy proteolityczne jest powodem ich krótkotrwałego działania przeciwbólowego [41]. W celu scharakteryzowania procesów metabolicznych prowadzących do degradacji endomorfina, peptydy te były poddawane *in vitro* działaniu wybranych enzymów proteolitycznych, dla których wydawały się być dobrymi substratami. Endomorfiny, ze względu na obecność w ich sekwencji Pro, są stosunkowo bardziej odporne na działanie enzymów proteolitycznych niż inne peptydy opioidowe. Obecność Pro w łańcuchu peptydowym powoduje zmianę jego kierunku oraz izomeryzację wiązania peptydowego z poprzedzającym aminokwasem. Te cechy strukturalne ograniczają podatność peptydów zawierających ten aminokwas na trawienie przez większość proteaz [42]. Uważa się więc, że podstawową fizjologiczną rolą Pro jest ochrona biologicznie ważnych peptydów przed degradacją enzymatyczną. Obecność Pro w pozycji 2 endomorfina zabezpiecza je przed działaniem większości aminopeptydaz. Jednakże natura stworzyła grupę enzymów, które mogą specyficznie hydrolizować wiązania peptydowe utworzone z udziałem tego aminokwasu.

Dipeptydylopeptydaza IV (DPP IV, EC.3.4.14.5) jest serynową proteinazą związaną z błoną komórkową. Enzym ten odcina dipeptydowe fragmenty od N-końca peptydów zawierających Pro w pozycji 2 [43]. W przypadku endomorfina DPP IV powoduje hydrolizę wiązania peptydowego pomiędzy 2 a 3 aminokwasem, uwalniając dipeptyd Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> [44].

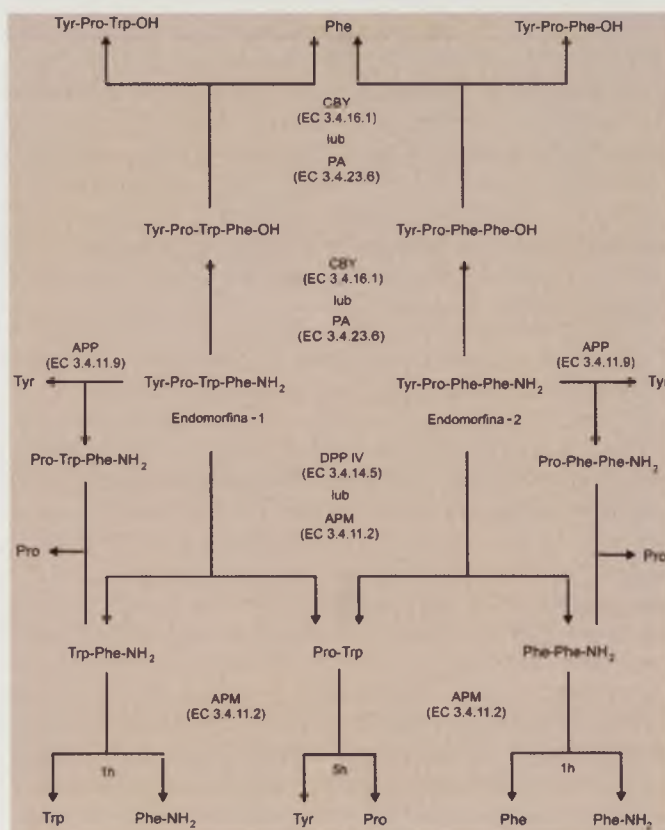
Endomorfiny są również odpowiednimi substratami dla prolino-specyficznych aminopeptydaz, takich jak obecne w mózgu i tkankach obwodowych aminopeptydaza P (APP, EC 3.4.11.9) i aminopeptydaza M (APM, EC 3.4.11.2). APP hydrolizuje wiązanie peptydowe pomiędzy N-końcową resztą aminokwasową a resztą Pro w pozycji 2. W przypadku endomorfina APP odcina resztę Tyr<sup>1</sup>, pozostawiając nieznaruszony tripeptyd [45]. APM również uwalnia z łańcucha peptydowego N-końcową resztę aminokwasową, ale jeśli po nim występuje reszta Pro, oba aminokwasy są odcinane razem jako dipeptyd [46]. Badania wykazały, że właśnie w taki sposób odbywa się degradacja endomorfina przez APM. W pierwszej kolejności powstają fragmenty Tyr<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> i Trp/Phe<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>, które po pewnym czasie są dalej hydrolizowane do poszczególnych aminokwasów [29,47].

Amidowany C-końiec endomorfina stanowi zabezpieczenie przed działaniem karboksypeptydaz, ponieważ większość z nich jest w stanie trawić tylko peptydy z wolną grupą kar-

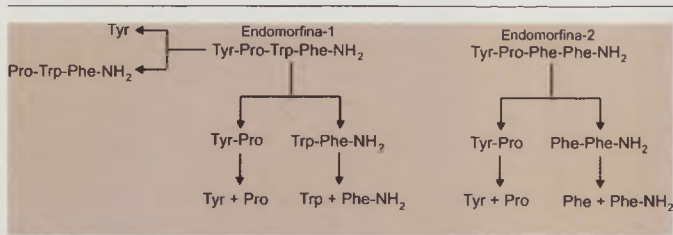
boksylową na C-końcu [48]. Karboksypeptydaza Y (CPY, EC 3.4.16.1) jest w tej grupie wyjątkiem, ponieważ charakteryzuje się małą specyficznością działania i może odcinać C-końcowy aminokwas zarówno od wolnych kwasów, jak i amidów [49, 50]. Trawienie endomorfina z udziałem CPY obejmuje dwa etapy. W pierwszym, w wyniku hydrolizy grupy amidowej, powstaje wolny kwas i wydziela się amoniak, a w drugim C-końcowy aminokwas ulega odszczepieniu. Powstały tripeptyd nie ulega dalszej degradacji pod wpływem CPY [51].

Rycina 2 przedstawia schemat degradacji endomorfina przez enzymy, dla których te peptydy mogą być substratami. Szatmari i współ. [41] wykazali, że żaden z produktów enzymatycznej hydrolizy endomorfina nie posiada właściwości przeciwbólowych, co oznacza, że degradacja całkowicie znosi aktywność biologiczną tych związków.

Dalsze badania poszły w kierunku ustalenia, jakie enzymy są odpowiedzialne za degradację endomorfina w organizmie. Shane i współ. [44] wykazali w testach *in vivo*, że DPP IV jest enzymem zapoczątkowującym proces hydrolizy, który jest dalej katalizowany przez aminopeptydazy. Tak więc pierwszym etapem w procesie katabolizmu endomorfina jest rozerwanie wiązania Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup> lub Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>, a powstałe dipeptydowe fragmenty są dalej hydrolizowane do aminokwasów (Ryc. 3). Niektórzy autorzy twierdzą, że endomorfin-1 jest bardziej odporna na degradację enzymatyczną *in vivo* niż endomorfin-2 [29,52]. Tezę tę potwierdzają wyniki testów przeciwbólowych na myszach, wykazujących, że endomorfin-1 ma silniejsze i dłużej utrzymujące się działanie niż endomorfin-2 [8,53].



Rycina 2. Schemat degradacji endomorfina z udziałem wybranych enzymów proteolitycznych, wg. Janecka i współ. [28], zmodyfikowano. Szczegóły opisano w tekście.



Rycina 3. Schemat degradacji endomorfina z udziałem homogenatu mózgu szczura.

## ANALOGI ENDOMORFIN

Odkrycie endomorfina dało początek intensywnym badaniom, mającym na celu ustalenie zależności pomiędzy ich strukturą a aktywnością biologiczną. Strukturę endomorfina modyfikowano przez wprowadzanie aminokwasów z szeregu D, aminokwasów nienaturalnych, a także przez modyfikację wiązań peptydowych oraz cyklizację. Szczegółowe omówienie różnorodnych modyfikacji chemicznych endomorfina oraz innych peptydów opioidowych zostało opisane w kilku pracach przeglądowych [3,4,12,54,55]. Tutaj autorzy skoncentrowali się tylko na omówieniu najbardziej istotnych modyfikacji.

Wprowadzenie do sekwencji peptydu D-aminokwasu zwiększa jego stabilność, ponieważ większość enzymów proteolitycznych nie hydrolizuje wiązań peptydowych powstałych z udziałem aminokwasów o konfiguracji D [56]. Z drugiej jednak strony D-aminokwas może wymuszać inną konformację łańcucha peptydowego, powodując utratę powinowactwa peptydu do receptora. W przypadku endomorfina kolejne zastępowanie wszystkich reszt aminokwasowych ich D-izomerami nie dało aktywnych analogów [57]. Najbardziej drastyczny spadek aktywności spowodowało zastąpienie Pro przez D-Pro. Stosując modelowanie komputerowe, wykazano że endomorfina-1 i jej analog, [D-Pro<sup>2</sup>]EM-1 różnią się sposobem ułożenia względem siebie pierścieni aromatycznych Tyr<sup>1</sup> i Trp<sup>3</sup>, sugerując że Pro<sup>2</sup> spełnia w cząsteczkach endomorfina funkcję łącznika, odpowiedzialnego za takie ustawienie grup farmakoforowych, które pozwala na ich oddziaływanie z miejscem wiążącym receptora opioidowego  $\mu$  [34].

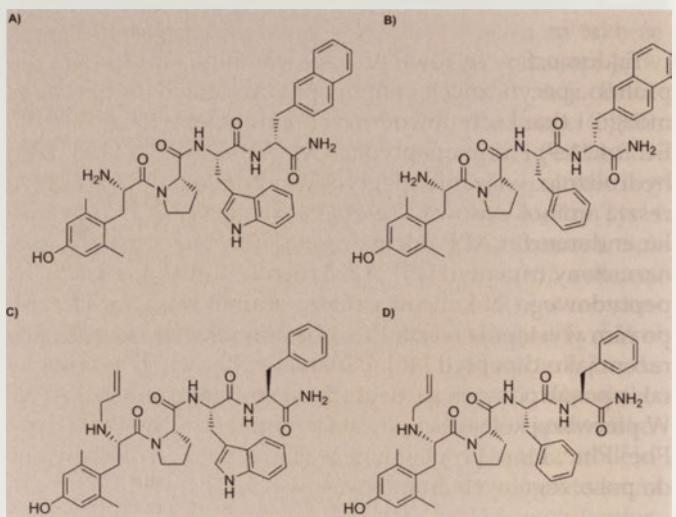
Ogromna większość peptydów opioidowych, w tym endomorfina, zawiera resztę Tyr<sup>1</sup> na N-końcu. Grupa OH w pierścieniu Tyr<sup>1</sup> jest uważana za ważny element strukturalny, pozwalający na zakotwiczenie ligandu w miejscu wiążącym receptora. Próby zastąpienia tej reszty aminokwasowej innymi naturalnymi bądź nienaturalnymi aminokwasami kończyły się zazwyczaj utratą aktywności [58]. Wyjątkiem okazała się 2',6'-dimetylotyrozyna (Dmt), analog Tyr, otrzymany poprzez metylację pierścienia fenolowego [59]. Wprowadzenie Dmt do sekwencji dowolnego peptydu opioidowego powoduje wzrost jego powinowactwa do receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\delta$  nawet o 2-3 rzędy wielkości [60-64]. Wprowadzenie grup metylowych do pierścienia aromatycznego Tyr zwiększa zawadę przestrzenną, a tym samym wpływa na konformację peptydu. Przypuszcza się, że grupy metylowe odgrywają ważną rolę w oddziaływaniu peptydu z receptorem, prawdopodobnie przez odpowiednie zorientowanie niezbędnej dla aktywności grupy OH. Analogi endomorfina zawierające Dmt<sup>1</sup> charakteryzują się wyjątkowym

powinowactwem do receptora  $\mu$ , ale mniejszą niż macierzyste związku wybiórczością [58].

Modyfikacje struktury endomorfina doprowadziły też do otrzymania analogów, będących antagonistami receptora opioidowego  $\mu$ . Analogi antagonistyczne są ważnym narzędziem w badaniach nad rolą i sposobem działania opioidów [65], a także mogą znaleźć zastosowanie jako środki terapeutyczne do zwalczania uzależnienia od morfiny [66]. Analogi antagonistyczne o budowie alkaloidowej są od dawna znane i stosowane w badaniach farmakologicznych. Ponieważ endomorfina charakteryzują się wysoką wybiórczością w stosunku do receptora opioidowego  $\mu$ , podejmowane były liczne próby otrzymania analogu o właściwościach antagonistycznych, opartego na ich strukturze. Zastąpienie C-końcowej Phe<sup>4</sup> przez nienaturalny aminokwas, 3-(2-naftylo)-D-alaninę (D-2-Nal) oraz Tyr<sup>1</sup> przez Dmt<sup>1</sup>, doprowadziło do otrzymania dwóch niezwykle wybiórczych antagonistycznych analogów receptora opioidowego  $\mu$ , antalanu-1 ([Dmt<sup>1</sup>, D-2-Nal<sup>4</sup>]EM-1) i antalanu-2 ([Dmt<sup>1</sup>, D-2-Nal<sup>4</sup>]EM-2) [67] (Ryc. 4). Niewielka różnica strukturalna pomiędzy endomorfina i antalanami wskazuje na ważną rolę, jaką C-końcowa reszta aminokwasowa wywiera na aktywność peptydu. Warto jednak zauważyć, że również modyfikacja N-końcowego fragmentu endomorfina, polegająca na wprowadzeniu grupy allilowej na grupę aminową Dmt<sup>1</sup> doprowadziła do otrzymania analogów antagonistycznych: [N-allil-Dmt<sup>1</sup>]EM-1 oraz [N-allil-Dmt<sup>1</sup>]EM-2 [68] (Ryc. 4).

## PODSUMOWANIE

Intensywne poszukiwania odpowiednika morfiny w organizmach zwierzęcych doprowadziły do identyfikacji wybiórczych, endogennych ligandów receptora  $\mu$ -opioidowego, endomorfina. Ich najważniejszą funkcją jest hamowanie odczuwania bólu. Odkrycie endomorfina dało nadzieję na znalezienie nowych środków farmakologicznych, opartych na ich strukturze, które mogłyby zastąpić morfinę z jej licznymi działaniami ubocznymi, takimi jak powodowanie tolerancji i uzależnienia oraz depresyjne działanie na OUN, objawiające się niewydolnością oddechową, zahamowaniem perystaltyki



Rycina 4. Struktura antagonistycznych analogów receptora  $\mu$ -opioidowego o budowie opartej na sekwencji endomorfina: antalan-1, [Dmt<sup>1</sup>, D-2-Nal<sup>4</sup>]EM-1 (A), antalan-2, [Dmt<sup>1</sup>, D-2-Nal<sup>4</sup>]EM-2 (B), [N-allil-Dmt<sup>1</sup>]EM-1 (C) oraz [N-allil-Dmt<sup>1</sup>]EM-2 (D).



jelit i obniżeniem ciśnienia krwi. W ciągu ostatnich dziesięciu lat opublikowano niezliczoną ilość prac na temat lokalizacji i roli endomorfina w organizmie, ich bioaktywnej struktury w momencie łączenia się z receptorem, degradacji przez enzymy proteolityczne oraz zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną. Ponieważ peptydy jako takie nie są dobrymi kandydatami na leki ze względu na ich krótki czas działania w płynach fizjologicznych i niezdolność do przechodzenia przez barierę krew-mózg, zsyntetyzowano dziesiątki analogów endomorfina w celu polepszenia ich profilu farmakologicznego. Mimo że otrzymano wiele aktywnych związków, żaden z nowych analogów nie wszedł jeszcze do leczenia, ale badania nadal trwają i można przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości doprowadzą do otrzymania środka/środków farmakologicznych, które będą miały równie silne jak morfina działanie, ale będą pozbawione jej niekorzystnych efektów ubocznych.

## PIŚMIENNICTWO


- Zadina JE, Kastin AJ, Ge L-J, Hackler L (1994) Mu, delta, and kappa opiate receptor binding of Tyr-MIF-1 and of Tyr-W-MIF-1, its active fragments, and two potent analogs. *Life Sci* 58: 461-466
- Przewlocki R, Przewlocka B (2001) Opioids in chronic pain. *Eur J Pharmacol* 429: 79-91
- Janecka A, Fichna J, Janecki T (2004) Opioid receptors and their ligands. *Curr Top Med Chem* 4: 1-17
- Janecka A, Staniszevska R, Fichna J (2007) Endomorphin analogs. *Curr Med Chem* 14: 3201-3208
- Pan W, Kastin AJ (2007) From MIF-1 to endomorphin: The Tyr-MIF-1 family of peptides. *Peptides* 28: 2411-2434
- Zadina JE, Hackler L, Ge L-J, Kastin AJ (1997) A potent and selective endogenous agonist for the  $\mu$ -opiate receptor. *Nature* 386: 499-502
- Hackler L, Zadina JE, Ge L-J, Kastin AJ (1997) Isolation of relatively large amounts of endomorphin-1 and endomorphin-2 from human brain cortex. *Peptides* 18: 1635-1639
- Stone LS, Fairbanks CA, Laughlin TM, Nguyen HO, Bushy TM, Wessendorf MW, Wilcox GL (1997) Spinal analgesic actions of the new endogenous opioid peptides endomorphin-1 and -2. *Neuroreport* 8: 3131-3135
- Goldberg IE, Rossi GC, Letchworth SR, Mathis JP, Ryan-Moro J, Leventhal L, Su W, Emmel D (1998) Pharmacological characterization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mouse brain. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 1007-1013
- Terskiy A, Wannemacher KM, Yadav PN, Tsai M, Tian B, Howells RD (2007) Search of the human proteome for endomorphin-1 and endomorphin-2 precursor proteins. *Life Sci* 81: 1593-1601
- Ronai AZ, Szemenyei E, Kato E, Kocsis L, Orosz G, Al-Khrasani M, Toth G (2006) Endomorphin synthesis in rat brain from intracerebroventricularly injected [ $^3$ H]-Tyr-Pro: A possible biosynthetic route for endomorphins. *Reg Peptides* 134: 54-60
- Gentilucci L (2004) New trends in the development of opioid peptide analogues as advanced remedies for pain relief. *Curr Top Med Chem* 4: 19-38
- Keller M, Boissard C, Patiny L, Chung NN, Lemieux C, Mutter M, Schiller PW (2001) Pseudoproline-containing analogues of morphiceptin and endomorphin-2: evidence for a cis Tyr-Pro amide bond in the bioactive conformation. *J Med Chem* 44: 3896-3903
- Yamazaki T, Ro S, Goodman M, Chung NN, Schiller PW (1993) A topochemical approach to explain morphiceptin bioactivity. *J Med Chem* 36: 708-719
- Martin-Schild S, Zadina JE, Gerall AA, Vigh S, Kastin AJ (1997) Localization of endomorphin-2-like immunoreactivity in the rat medulla and spinal cord. *Peptides* 18: 1641-1649
- Pierce TL, Wessendorf MW (2000) Immunocytochemical mapping of endomorphin-2-immunoreactivity in rat brain. *J Chem Neuroanat* 18: 181-207
- Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Zadina JE (1999) Differential distribution of endomorphin 1- and endomorphin 2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *J Comp Neurol* 405: 450-471
- Fichna J, Janecka A, Costentin J, do Rego JC (2007) The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol Rev* 59: 88-123
- Jessop DS, Major GN, Coventry TL, Kaye SJ, Fulford AJ, Harbuz MS, De Bree FM (2000) Novel opioid peptides endomorphin-1 and endomorphin-2 are present in mammalian immune tissues. *J Neuroimmunol* 106: 53-59
- Mousa SA, Machelska H, Schafer M, Stein C (2002) Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain. *J Neuroimmunol* 126: 5-15
- Łabuz D, Berger S, Mousa SA, Zolner C, Rittner HL, Shaqura MA, Segovia-Silvestre T, Przewlocka B, Stein C, Machelska H (2006) Peripheral antinociceptive effects of exogenous and immune cell-derived endomorphins in prolonged inflammatory pain. *J Neurosci* 19: 4350-4358
- Rittner HL, Brack A, Stein C (2008) Pain and immune system. *Br J Anaesthesia* 101: 40-44
- Horvath, G (2000) Endomorphin-1 and endomorphin-2: pharmacology of the selective endogenous  $\mu$ -opioid receptor agonist. *Pharmacol Therap* 88: 437-463
- Zadina JE (2002) Isolation and distribution of endomorphins in the central nervous system. *Jpn J Pharmacol* 89: 203-208
- Tseng LF (2002) The antinociceptive properties of endomorphin-1 and endomorphin-2 in the mouse. *Jpn J Pharmacol* 89: 216-220
- Przewlocki R, Łabuz D, Mika B, Przewlocka B, Tomboly C, Toth G (1999) Pain inhibition by endomorphins. *Ann N Y Acad Sci* 897: 154-164
- Przewlocka B, Mika J, Łabuz D, Toth G, Przewlocki R (1999) Spinal analgesic action of endomorphins in acute, inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol* 367: 189-196
- Janecka A, Staniszevska R, Gach K, Fichna J (2008) Enzymatic degradation of endomorphins. *Peptides* 29: 2066-2073
- Tomboly C, Peter A, Toth G (2002) In vitro quantitative study of the degradation of endomorphins. *Peptides* 23: 1573-1580
- Stein C, Cabot PJ, Schafer M (1999) Peripheral opioid analgesia: mechanism and clinical implications. W: Stein C (red) *Opioids in pain control: basic and clinical aspects*. Cambridge University Press, USA, str. 96-107
- Straub RH, Wolff Ch, Fassold A, Hofbauer R, Chover-Gonzalez A, Richards LJ, Jessop DS (2008) Antiinflammatory role of endomorphins in osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and adjuvant-induced polyarthritis. *Arthritis Rheum* 58: 456-466
- Czapla MA, Zadina JE (2005) Reduced suppression of CO<sub>2</sub>-induced ventilatory stimulation by endomorphins relative to morphine. *Brain Res* 1059: 159-166
- Glatzer NR, Derbenev AV, Banfield BW, Smith BN (2007) Endomorphin-1 modulates intrinsic inhibition in the dorsal vagal complex. *J Neurophysiol* 98: 1591-1599
- Paterlini MG, Avitabile F, Ostrowski BG, Ferguson DM, Portoghese PS (2000) Stereochemical requirements for receptor recognition of the  $\mu$ -opioid peptide endomorphin-1. *Biophys J* 78: 590-599
- Podlogar BL, Paterlini MG, Ferguson DM, Leo GC, Demeter DA, Brown FK, Reitz AB (1998) Conformational analysis of the endogenous  $\mu$ -opioid agonist endomorphin-1 using NMR spectroscopy and molecular modeling. *FEBS Lett* 439: 13-20
- Fiori S, Renner C, Cramer J, Pegoraro S, Moroder L (1999) Preferred conformation of endomorphin-1 in aqueous and membrane-mimetic environments. *J Mol Biol* 291: 163-175
- In Y, Minoura K, Ohishi H, Minakata H, Kamigauchi M, Sugiura M, Ishida T (2001) Conformational comparison of  $\mu$ -selective endomorphin-2 with its C-terminal free acid in DMSO solution, by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and molecular modeling calculation. *J Pept Res* 58: 399-412
- Leitgeb B, Szekeres A, Toth G (2003) Conformational analysis of endomorphin-1 by molecular dynamics methods. *J Pept Res* 62: 145-157

39. Leitgeb B, Otvos F, Toth G (2003) Conformational analysis of endomorphin-2 by molecular dynamics methods. *Biopolymers* 68: 497-511
40. Egleton RD, Davis TP (1997) Bioavailability and transport of peptides and peptide drugs into the brain. *Peptides* 18: 1431-1439
41. Szatmari I, Biyashev D, Tomboly C, Toth G, Macsai M, Szabo G, Borso di A, Lengyel I (2001) Influence of degradation on binding properties and biological activity of endomorphin 1. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 771-776
42. Vanhoof G, Goossens F, De Meester I, Hendriks D, Scharpe S (1995) Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J* 9: 736-744
43. Cunningham DF, O'Connor B (1997) Proline specific peptidases. *Biochim Biophys Acta* 1343: 160-186
44. Shane R, Wilk S, Bodnar RJ (1999) Modulation of endomorphin-2-induced analgesia by dipeptidyl peptidase IV. *Brain Res* 815: 278-286
45. Harbeck HT, Mentlein R (1991) Aminopeptidase P from rat brain, purification and action on bioactive peptides. *Eur J Biochem* 198: 451-458
46. Bairoch A (1996) The Enzyme Data Bank in 1995. *Nucleic Acids Res* 24: 221-222
47. Peter A, Toth G, Tomboly C, Laus G, Tourwe D (1999) Liquid chromatographic study of the enzymatic degradation of endomorphins, with identification by electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 846: 39-48
48. Ambler RP (1972) Carboxypeptidases A and B. *Methods Enzymol* 25: 262-272
49. Berne PF, Schmitter JM, Blanquet S (1990) Peptide and protein carboxyl-terminal labeling through carboxypeptidase Y-catalyzed transpeptidation. *J Biol Chem* 265: 19551-19559
50. Berne PF, Blanquet S, Schmitter JM (1992) Carboxypeptidase Y-catalyzed transpeptidation of esterified oligo- and polypeptides and its use for the specific carboxyl-terminal labeling of proteins. *J Am Chem Soc* 114: 2603-2610
51. Cardillo G, Gentilucci L, Qasem AR, Sgarzi F, Spampinato S (2002) Endomorphin-1 analogues containing beta-proline are mu-opioid receptor agonists and display enhanced enzymatic hydrolysis resistance. *J Med Chem* 45: 2571-2578
52. Fujita T, Kumamoto E (2006) Inhibition by endomorphin-1 and endomorphin-2 of excitatory transmission in adult rat substantia gelatinosa neurons. *Neuroscience* 139: 1095-1105
53. Grass S, Xu IS, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu X-J (2002) Comparison of the effect of intrathecal endomorphin-1 and endomorphin-2 on spinal cord excitability in rats. *Neurosci Lett* 324: 197-200
54. Bryant SD, Jinsmaa Y, Salvadori S, Okada Y, Lazarus L (2003) Dmt and opioid peptides: A potent alliance. *Biopolymers* 71: 86-102
55. Janecka A, Kruszyński R (2005) Conformationally restricted peptides as tools in opioid receptor studies. *Curr Med Chem* 12: 471-481
56. Yamada R, Kera Y (1998) D-amino acid hydrolysing enzymes. *EXS* 85: 145-155
57. Okada Y, Fukumizu A, Takahashi M, Shimizu Y, Tsuda Y, Yokoi T, Bryant SD, Lazarus LH (2000) Synthesis of stereoisomeric analogues of endomorphin-2, H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH(2), and examination of their opioid receptor binding activities and solution conformation. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 7-11
58. Okada Y, Fujita Y, Motoyama T, Tsuda Y, Yokoi T, Li T, Sasaki Y, Ambo A, Jinsmaa Y, Bryant SD, Lazarus LH (2003) Structural studies of [2',6'-dimethyl-L-tyrosine]endomorphin-2 analogues: enhanced activity and cis orientation of the Dmt-Pro amide bond. *Bioorg Med Chem* 11: 1983-1994
59. Dygos JH, Yonan EE, Scaros MG, Goodmanson OJ, Getman DP, Periana RA, Beck GR (1992) A convenient asymmetric synthesis of the unnatural amino acid 2,6-dimethyl-L-tyrosine. *Synthesis* 8: 741-743
60. Bryant SD, Salvadori S, Cooper PS, Lazarus LH (1998) New delta-opioid antagonists as pharmacological probes. *Trends Pharmacol Sci* 19: 42-46
61. Lazarus LH, Bryant SD, Cooper PS, Guerrini R, Balboni G, Salvadori S (1998) Design of delta-opioid peptide antagonists for emerging drug applications. *Drug Discov Today* 3: 284-294
62. Schiller PW, Fundytus ME, Merovitz L, Weltrowska G, Nguyen TM, Lemieux C, Chung NN, Coderre TJ (1999) The opioid mu agonist/delta antagonist DIPP-NH<sub>2</sub>[psi] produces a potent analgesic effect, no physical dependence, and less tolerance than morphine in rats. *J Med Chem* 42: 3520-3526
63. Sasaki Y, Soto T, Ambo A, Ouchi H, Yamamoto Y (1999) Biological properties of opioid peptides replacing Tyr at position 1 by 2,6-dimethyl-Tyr<sup>1</sup>. *Chem Pharm Bull* 47: 1506-1509
64. Narita M, Funada M, Suzuki T (2001) Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacol Ther* 89: 1-15
65. Zimmerman DM, Leander JD (1990) Selective opioid receptor agonists and antagonist: research tools and potential therapeutic agents. *J Med Chem* 33: 895-902
66. Gianoulakis C (2004) Endogenous opioids and addiction to alcohol and other drugs of abuse. *Curr Top Med Chem* 4: 39-50
67. Fichna J, do-Rego JC, Chung NN, Lemieux C, Schiller PW, Poels J, Broeck JV, Costentin J, Janecka A (2007) Synthesis and characterization of potent and selective mu-opioid receptor antagonists, [Dmt<sup>1</sup>, D-2-Nal<sup>2</sup>]endomorphin-1 (Antanal-1) and [Dmt<sup>1</sup>, D-2-Nal<sup>2</sup>]endomorphin-2 (Antanal-2). *J Med Chem* 50: 512-520
68. Li T, Jinsmaa Y, Nedachi M, Miyazaki A, Tsuda Y, Ambo A, Sasaki Y, Bryant SD, Marczak E, Li Q, Swartzwelder HS, Lazarus LH, Okada Y (2007) Transformation of mu-opioid receptor agonists into biologically potent mu-opioid receptor antagonists. *Bioorg Med Chem* 15: 1237-1251

## Endomorphins – endogenous ligands of the $\mu$ -opioid receptor

Renata Perlikowska, Jakub Fichna, Anna Janecka 

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

 e-mail: anna.janecka@umed.lodz.pl

**Key words:** opioid receptors, opioid peptides, endomorphin-1, endomorphin-2

### ABSTRACT

Two endogenous opioid peptides with extremely high  $\mu$ -opioid receptor affinity and selectivity, endomorphin-1 and endomorphin-2, were discovered and isolated from the mammalian brain in 1997. Endomorphins are amidated tetrapeptides, structurally different from so called typical opioids: enkephalins, dynorphins and endorphins. A protein precursor of endomorphins and a gene encoding their sequence remain unknown. Endomorphins are unable to cross the blood-brain barrier because of their low hydrophobicity. In animal models, these peptides turned out to be very potent in relieving neuropathic and inflammatory pain. In comparison with morphine, a prototype opioid receptor ligand, endomorphins produces less undesired side effects. In this article we describe the discovery of endomorphins, their cellular localization and functions in the organism, as well as their structure-activity relationships and biodegradation pathways.

# Leukotrieny cysteinyłowe i ich receptory

## STRESZCZENIE

Leukotrieny cysteinyłowe ( $LTC_4$ ,  $LTD_4$ ,  $LTE_4$ ) wywierają efekt prozapalny, taki jak skurcz mięśni gładkich naczyń wieńcowych i dróg oddechowych, chemotaksję komórek prozapalnych, zwiększenie przepuszczalności komórek śródbłonna oraz wydzielania śluzu. Są lipidowymi mediatorami odgrywającymi istotną rolę w patofizjologii astmy oskrzelowej, alergicznego nieżytu nosa, atopowego zapalenia skóry, pokrzywki, chorób układu krwionośnego i nowotworach. Swoje działanie wywierają poprzez przynajmniej cztery receptory z rodziny genów rodopsyny, leżącej w obrębie nadrodziny genów kodujących GPCR (ang. *G protein coupled receptor*) –  $CYSLTR1$ ,  $CYSLTR2$  i  $GPR17$  oraz receptor dla  $LTE_4$  ( $CYSLTR_E$ ). Ich lokalizacja, poza drobnymi wyjątkami, jest zróżnicowana i charakterystyczna dla tkanek. Najwyższy poziom syntezy  $CYSLTR1$  stwierdzono w śledzionie, leukocytach krwi obwodowej, śródmiąższowych makrofagach płuc oraz komórkach mięśni gładkich. Najwyższa produkcja  $CYSLTR2$  występuje w sercu, nadnerczach, łożysku, śledzionie i leukocytach krwi obwodowej, a nieco niższa w mózgu. Badania biochemiczne i farmakologiczne oraz analiza sekwencji wykazały, że wszystkie należą do grupy 7-krotnie przechodzących przez błonę receptorów GPCR. Siła pobudzenia  $CYSLTR1$  rozkłada się:  $LTD_4 > LTC_4 > LTE_4 >> LTF_4$ , a  $CYSLTR2$   $LTC_4 = LTD_4 > LTE_4$ . Receptory leukotrienów cysteinyłowych są związane z białkiem  $G_{\alpha 11}$  i ścieżką sygnałową prowadzącą do hydrolizy fosfatydyloinozytolu (PI) oraz mobilizacji wewnątrzkomórkowego wapnia. *In vivo* receptory te są związane również z wrażliwym na działanie  $PTX$  białkiem  $G_{\alpha 10}$  lub oboma białkami  $G$ .  $CYSLTR1$  zwiększa metabolizm PI i wewnątrzkomórkowego wapnia, aktywuje kinazy MAPK, indukuje różnicowanie i proliferację komórek, chemotaksję, reorganizację aktyny, uwalnianie mediatorów zapalnych i regulację hematopoetycznych komórek pnia.  $CYSLTR2$  również zwiększa stężenie wewnątrzkomórkowego wapnia, stymuluje wydzielanie IL-8 (interleukina 8) oraz zwiększa ekspresję wczesnych genów. Ma związek z zakrzepicą, uszkodzeniem naczyń, procesem zapalnym i śmiercią komórek. Postuluje się również istnienie nowej, jądrowej lokalizacji  $CYSLTR$  oraz współdziałanie z innymi receptorami błonowymi. Prawdopodobnie mogą tworzyć homo- lub heterodimery. Wskazuje to na istnienie nowych, dotychczas niepoznanych działań leukotrienów cysteinyłowych i ich receptorów.

## WPROWADZENIE

Leukotrieny cysteinyłowe,  $LTC_4$ ,  $LTD_4$ ,  $LTE_4$ , są lipidowymi mediatorami zapalenia, powstającymi na drodze przemian kwasu arachidonowego fosfolipidów błonowych, pod wpływem różnych bodźców, w tym cytokin, kompleksów immunologicznych i czynników środowiskowych, takich jak antygeny i mikroorganizmy. Najważniejsze pochodne kwasu arachidonowego, eikozanoidy, zawierają w cząsteczce 20 atomów węgla i zaliczamy do nich zarówno leukotrieny cysteinyłowe (cysLTs) i  $LTB_4$ , jak i prostaglandyny (PGE), prostacyklinę oraz tromboksan  $A_2$ . Leukotrieny cysteinyłowe to główne produkty aktywowanych mastocytów, bazofilów, eozynofilów, komórek dendrytycznych oraz makrofagów. Powodują skurcz mięśni gładkich naczyń wieńcowych oraz dróg oddechowych, zwiększają przepuszczalność komórek śródbłonna, co prowadzi do wysięku i powstania obrzęków, nasilają także wydzielanie śluzu i odgrywają ważną rolę w chorobach układu oddechowego, takich jak astma oskrzelowa i alergiczny nieżyt nosa. Są również zaangażowane w przewlekłe procesy zapalne w obrębie skóry (wyprysk atopowy, pokrzywka), powstawanie zależnego od hiperlipidemii tętniaka aorty [1], zaburzenia w układzie krążenia, od choroby niedokrwiennej serca do miażdżycy [2] i udaru [3,4].

Początkowo, leukotrieny cysteinyłowe w 1930 r. zostały opisane jako wolno reagująca substancja anafilaksji, SRS-A (ang. *slow reacting substance of anaphylaxis*), wywołująca skurcz mięśni gładkich w płucach świnek morskich po ekspozycji na jad kobry. Nazwa powstała w oparciu o fakt, że początek skurczu wywołany przez SRS-A, a także skurcz maksymalny, są opóźnione w stosunku do skurczu wywołanego histaminą. Późniejsze prace wykazały, że SRS-A to polarny lipid pochłaniający UV, zawierający siarkę. Znaczenie tej substancji w astmie oskrzelowej podkreślił jako pierwszy w latach 60-tych XX w. Blocklehurst [5] oraz Drazen [6] i Nicosia [7]. W 1977 r. Parker i wsp., stosując znakowany kwas

Karolina Wódz-Naskiewicz<sup>✉</sup>

Rafał Pawliczak

Zakład Immunopatologii, Katedra Alergologii, Immunologii i Dermatologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

<sup>✉</sup>Zakład Immunopatologii, Katedra Alergologii, Immunologii i Dermatologii, Uniwersytet Medyczny, w Łodzi, budynek C5, ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź; e-mail: kwodz@csk.umed.lodz.pl, tel.: (42) 675 73 09

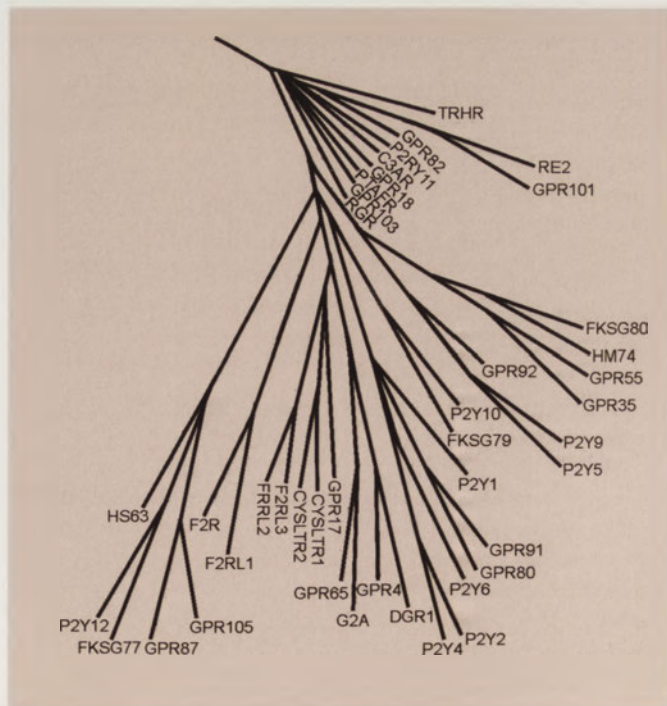
Artykuł otrzymano 8 marca 2009 r.  
Artykuł zaakceptowano 26 lipca 2009 r.

**Słowa kluczowe:** leukotrieny cysteinyłowe,  $CYSLTR1$ ,  $CYSLTR2$ ,  $CYSLTR_E$ ,  $GPR17$ , astma oskrzelowa

**Wykaz skrótów:**  $CYSLTR1$ ,  $CYSLTR2$ ,  $CYSLTR_E$ ,  $GPR17$  – receptor leukotrienów cysteinyłowych człowieka;  $Cysltr1$ ,  $Cysltr2$ ,  $CYSLTR_E$ ,  $Gpr17$  – receptor leukotrienów cysteinyłowych myszy/szczura; cysLTs – leukotrieny cysteinyłowe;  $LTA_4$ ,  $LTC_4$ ,  $LTD_4$ ,  $LTE_4$ ,  $LTF_4$  – leukotrien cysteinyłowy  $A_4$ ,  $C_4$ ,  $D_4$ ,  $E_4$ ,  $F_4$ ; GPCR (ang. *G protein coupled receptor*) – receptor związany z białkami  $G$

arachidonowy, odkryli że wchodzi on w skład SRS-A, a w 1980 r. Samuelsson i jego zespół ustalili, że SRS-A to w rzeczywistości mieszanina leukotrienów cysteinylowych, za co w 1982 r. otrzymał on Nagrodę Nobla z medycyny [8]. Oczyszczenia SRS-A dokonali Orango i wsp. [9].

Lekutreiny cysteinyłowe produkowane przez makrofagi mogą uczestniczyć w rekrutacji komórek prozapalnych – monocytów, limfocytów T, eozynofilów, komórek dendrytycznych w tkankach objętych zapaleniem. Badania farmakologiczne i zastosowanie wybiórczych antagonistów dla CYSLTR pozwoliło na wyróżnienie receptorów blokowanych przez antagonistów (CYSLTR1) oraz opornych na takie blokowanie (CYSLTR2). Obecnie wiadomo, że leukotrieny cysteinyłowe wywierają swój wpływ za pośrednictwem przynajmniej czterech różnych, ale spokrewnionych receptorów, połączonych z białkiem G – CYSLTR1, CYSLTR2 [1,10], GPR17 [11] CYSLTR<sub>R</sub> [28]. CYSLTR1 [12] oraz CYSLTR2 [13,14] człowieka zostały sklonowane i scharakteryzowane. Obecność trzeciego receptora potwierdzono w oparciu o profil farmakologiczny w badaniach na naczyniach płucnych [15] oraz tchawicach świnek morskich [16] i ustalono, że oddziałuje on zarówno z leukotrienami cysteinyłowymi, jaki z nukleotydami uracyłowymi i pełni istotną funkcję w uszkodzeniu mózgu [11]. Badania biochemiczne i farmakologiczne, a ostatecznie analiza sekwencji, wykazały, że wszystkie to receptory 7-krotnie przechodzące przez błonę, należące do rodziny genów rodopsyny, leżące w obrębie nadrodziny genów GPCR i częściowo w obrębie grupy receptorów purynowych, wewnątrz grupy δ. Grupa δ obejmuje filogenetycznie powiązane receptory nukleotydów pirymidynowych i purynowych (P2Y), proteaz (F2Rs) i chemoatraktantów (FPRs) oraz liczne receptory sieroce o nieznannej funkcji [17]. Filogenetyczne powiązanie receptorów purynowych obrazuje rycina 1.



Rycina 1. Filogenetyczne powiązanie receptorów purynowych rodziny genów rodopsyny, leżące w obrębie nadrodziny GPCR.

CYSLTR1 oraz CYSLTR2 to glikozyłowane białka o 37% homologii w sekwencji aminokwasów, z najniższym stopniem identyczności na końcu karboksylowym, nie wykazują homologii z bezkręgowcami, co wskazuje na stosunkowo niedawne powstanie w procesie ewolucji.

Za pośrednictwem CYSLTR1 oraz CYSLTR2 leukotrieny cysteinyłowe wywierają wpływ na zarówno wrodzoną, jak i nabytą odpowiedź immunologiczną oraz biorą udział w fazie efektorowej zapalenia, naprawie tkanek i procesie zwłóknienia [18]. Aktywacja przekazywania sygnału zachodzi w odpowiedzi na ich endogenne ligandy – LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> i LTE<sub>4</sub>, a zróżnicowane rozmieszczenie i odmienny profil wiązania ligandu wskazuje na pełnienie *in vivo* odmiennych funkcji. Postuluje się również obecność CYSLTR w jądrze, formowanie przez nie hetero- lub homodimerów oraz współdziałanie z innymi receptorami błonowymi. Lokalizacja jądrowa możliwa jest dzięki specyficznej sekwencji na C-końcu CYSLTR1 i może mieć związek z modulacją ekspresji genów prozapalnych [19]. Rozmieszczenie receptorów leukotrienów cysteinyłowych oraz poziom ich ekspresji obrazuje Tabela 1. Klasyfikacja i nomenklatura receptorów leukotrienów cysteinyłowych oparta jest o wytyczne International Union of Pharmacology (IUPHAR). Obecnie dla receptorów ludzi stosuje się nazewnictwo CYSLTR1 i CYSLTR2, dla mysich i szczurzych – Cysltr1 i Cysltr2.

## BIOSYNTeza LEUKOTRIENÓW CYSTEINYLOWYCH

Wszystkie leukotrieny cysteinyłowe są wytwarzane *de novo* z kwasu arachidonowego uwalnianego z fosfolipidów błon komórkowych przez cytosolową fosfolipazę A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) na drodze wielu przemian enzymatycznych, zachodzących w aktywowanych neutrofilach, eozynofilach, mastocytach i monocytach. Uwolniony kwas arachidonowy jest przekształcany do 5-HPETE (kwas 5S-hydroperoxy-6-*trans*-8,11,14-*cis*-eikozatetraenolowy), a następnie do niestabilnego, przejściowego produktu, jakim jest LTA<sub>4</sub> (kwas 5,6-*trans*-oksydo-7,9-*trans*-11,14-*cis*-eikozatetraenolowy). Przemiany te są możliwe dzięki działaniu enzymu 5-lipoksygenazy (5-LOX) [20], który zmienia swoją lokalizację z jądrowej (w makrofagach) lub cytoplazmatycznej (w neutrofilach) na otoczkę jądrową w odpowiedzi na aktywację komórki. Tam łączy się z FLAP (5-LOX-activating protein), białkiem umożliwiającym przyłączenie kwasu arachidonowego do 5-LOX oraz uprzywilejowane przekształcenie 5-HPETE do LTA<sub>4</sub> zamiast do 5-HETE (kwas 5-hydroksyeikozatetraenolowy), powstający na drodze częściowo nieenzymatycznej degradacji 5-HPETE [21].

W neutrofilach LTA<sub>4</sub> jest przekształcany na drodze hydrolizy do dihydroksyleukotrienu LTB<sub>4</sub> (kwas 5S,12R-dihydroksy-6,14-*cis*-8,10-*trans*-eikozatetraenolowy) poprzez hydrolazę LTA<sub>4</sub> [22]. W mastocytach, eozynofilach, bazofilach i makrofagach preferencyjnie wytwarzany jest leukotrien LTC<sub>4</sub> (kwas 5S-hydroksy-6R-S-glutatio-*n*-eikozatetraenolowy), który powstaje poprzez połączenie LTA<sub>4</sub> ze zredukowanym glutationem, przy udziale enzymu syntazy LTC<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>S) [23]. LTC<sub>4</sub> ulega przemianie do LTD<sub>4</sub> (kwas 5S-hydroksy-6R-S-cysteinyloglutatio-*n*-eikozatetraenolowy) przez  $\gamma$ -glutamylotranspeptydazę ( $\gamma$ -GT) lub bardziej swoisty enzym  $\gamma$ -

Tabela 1. Rozmieszczenie i zawartość receptorów cysteinylowych.

CYSLTR1	Cysltr1
leukocyty krwi obwodowej +++ mięśnie gładkie drzewa oskrzelowego +++ makrofagi śródmiąższowe płuc +++ neutrofile, eozynofile, bazofile, mastocyty [10,85] +++ komórki naciekające/strukturalne błony śluzowej u zdrowych [86], chorych na alergiczny nieżyt nosa, astmę oskrzelową [92], przewlekłe zapalenie zatok przy nadwrażliwości na aspirynę [93] +++ śledziona +++ łożysko, płuca, jelito cienkie ++ komórki CD34 <sup>+</sup> , limfocyty B ++ komórki nabłonka [12] ++ komórki raka jelita grubego i okrężnicy [19,94] ++ komórki linii Cos-7, HEK293, CHO, THP-1, U937, Int 407, CaCo-2 ++ okrężnica, nerka, wątroba + grasica, mięśnie szkieletowe + jajnik, jądro, mózg, serce [29] + mózg, komórki z guzów mózgu [12,29,95] + limfocyty T [37] -	skóra, płuca, jelito cienkie [30,31] +++
CYSLTR2	Cysltr2
leukocyty krwi obwodowej, serce, OUN, łożysko [10,13] +++ rdzeń nadnerczy, włókna Purkiniego [10] +++ serce [14,41] +++ komórki linii HL-60, U937, A549, HEK293T, HUVEC [10,13,14,53] +++ przysadka, wzgórze wzrokowe, podwzgórze [10] +++ bazofile i komórki tuczne ludzi [38] +++ granulocytach parenchymy mózgu, komórki gęstki, neurony, komórki śródbłonka mikronaczyń regenerujących się po uszkodzeniu mózgu [48,96] +++ monocytach i fibroblastach wywodzące się z przedsionka i komory serca ++ mięśnie gładkie tętnic wieńcowych ++ śledziona, węzłów chłonnych ++ komórki śródbłonka [97] -	serce ++ jelito cienkie [32,64] +++
GPR17	Gpr17
płuca, wątroba, tętnice wieńcowe [11] ++ mózg, serce, nerka [98] +++ komórki linii ADF, 1321N1, COS-7, HEK-293, 1321N1 [11] +++	Mózg [99] +++

+++ bardzo wysoki poziom, ++ wysoki poziom, + niski poziom, - brak

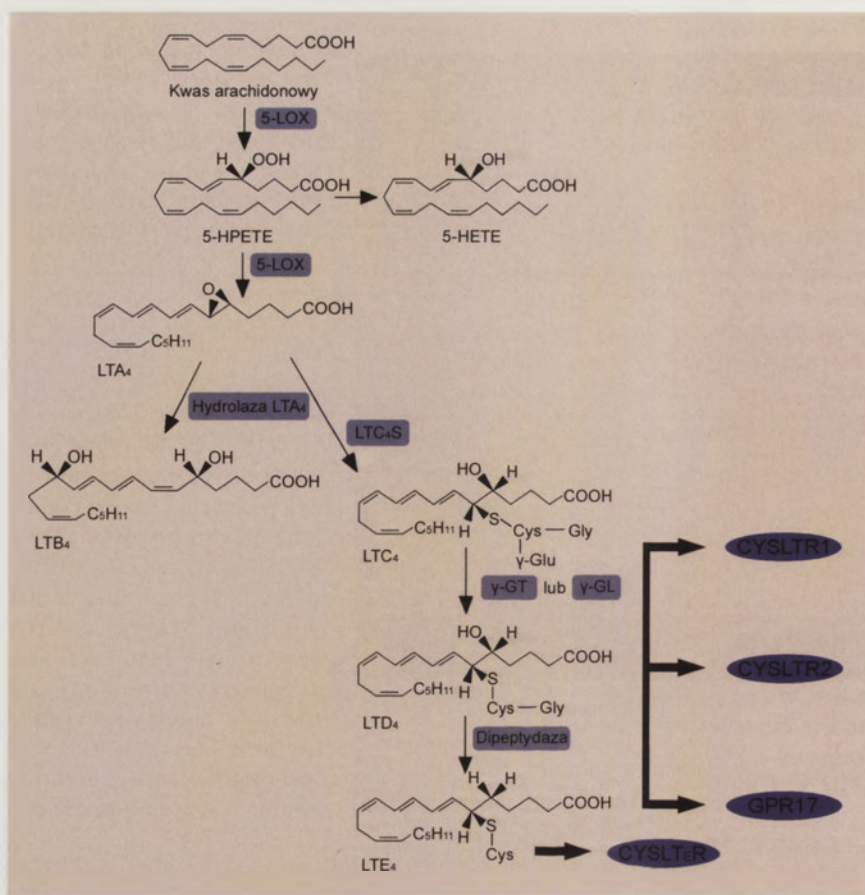
glutamylleukotrienazę [24,25]. LTD<sub>4</sub> ulega dalej przekształceniu przez dipeptydazę do LTE<sub>4</sub> (kwas 5S-hydroksy-6R-S-cysteinyl-7,9-trans-11,14-cis-eikozatetraenolowy), który jest usuwany z organizmu wraz z moczem, bez dalszych biochemicznych modyfikacji [26] (Ryc. 2). Przy udziale trzustkowej karboksypeptydazy A (CPA), obecnej w ziarnach cytoplazmatycznych mastocytów, *in vitro* LTC<sub>4</sub> można przekształcić w LTF<sub>4</sub>; podobny efekt uzyskano przez inkubację LTE<sub>4</sub> z  $\gamma$ -glutamylotranspeptydazą i glutationem. LTF<sub>4</sub> ma niewielkie działanie kurczące mięśnie gładkie i naczynia [27].

### CYSLTR1

Badania nad profilem farmakologicznym prowadzone na tkankach ssaków dostarczyły wiedzy na temat istnienia przynajmniej czterech typów receptorów dla leukotrienów cysteinylowych [11,15,28]. Sklonowanie genów dla receptorów pozwoliło na wyodrębnienie dwóch klas u człowieka - CYSLTR1 [12,29] i CYSLTR2 [10,13,14] oraz u myszy [30-32].

Gen *CYSLTR1* jest zlokalizowany na ramieniu długim chromosomu X (Xq13-Xq21) [12], składa się z pięciu eksonów, które podlegają alternatywnemu ciciu i składaniu, dając docelowo białko o jednokowej strukturze. Obecnie znane są cztery warianty splicingowe tego genu, których ekspresja jest zróżnicowana, zależna od typu komórek i tkanek [1,33]. Promotor *CYSLTR1* zawiera wiele miejsc startu transkrypcji, jednak jego dokładna lokalizacja pozostaje wciąż niejasna [33-35]. Badania z wykorzystaniem linii komórkowych THP-1 (ang. *human acute monocytic leukemia cell line*) oraz U937 (ang. *human leukemic monocyte lymphoma cell line*), wykazały istnienie dwóch nowych eksonów, w miejscu opisywanym wcześniej jako ekson 1, a promotor został zidentyfikowany w regionie pomiędzy -125 bp a -786 bp powyżej nowo opisanego eksonu. Tym samym możliwe jest, że gen ten posiada dwa alternatywne promotory, dające odrębne transkrypty. W obrębie genu, w części kodującej, zlokalizowanej w całości w eksonie 5 [1], zidentyfikowano cztery polimorfizmy pojedynczego nukleotydu: 617T/G (I206S), 815G/C (R272T), 927C/T (P309P) oraz 899G/A (G300S) [36].

CYSLTR1 to białko złożone z 337 aminokwasów, o masie cząsteczkowej wahającej się od 30 do 42 kDa dla form monomerycznych [12,29,37]. Obserwuje się również dimery i oligomery oraz homo- i/lub heterodimery we frakcji leukocytów krwi obwodowej oraz komórkach linii U937 [37, 38]. Tworzenie tego typu form jest interesujące ze względu na stosowanie leków, które są ligandami dla monomerów GPCR, a nie dla form homo- lub heteromerycznych, posiadających odmienny profil farmakologiczny. Mastocyty ludzi, wykazujące ekspresję obu typów receptorów, po zablokowaniu CYSLTR1 przez MK571 i stymulacji BAYu9773 nadal produkują IL-5 (interleukina 5), co może wynikać z aktywacji heterodimeru CYSLTR1/CYSLTR2, pozostającego niedostępnym dla interferencji z MK571 [39]. CYSLTR1 wykazuje 32% identyczność aminokwasów z receptorem purynowym P2Y<sub>1</sub> i 28% identyczność aminokwasów z receptorem dla LTB<sub>4</sub>R1. Posiada cztery potencjalne miejsca N-glikozylacji - jedno w zewnątrzkomórkowym N-końcu, dwa kolejne w drugiej pętli zewnątrzkomórkowej i ostatnie w trzeciej pętli zewnątrzkomórko-



Rycina 2. Biosynteza leukotrienów cysteinytowych.

wej, dodatkowo wiele potencjalnych miejsc fosforylacji kinaz białkowych A i C, większość w trzeciej wewnątrzkomórkowej pętli i końcu karboksylowym [12].

Leukotrieny cysteinyłowe wywierają swoje działanie poprzez receptory błonowe, postuluje się jednak ich lokalizację na terenie jądra komórkowego. Wykazano istnienie CYSLTR1 w zewnętrznej błonie jądrowej w komórkach nowotworowych jelita grubego, nietransformowanych komórkach nabłonkowych linii Int 407 (*human embryonic intestinal cells*) i komórkach linii CaCo-2 (*human colon carcinoma cell*). Komórki nowotworowe wykazują wysoką ekspresję jądrowego CYSLTR1, a przedłużona ekspozycja na LTD<sub>4</sub> powoduje przemieszczanie się receptora do jądra w nietransformowanych komórek nabłonka jelita [19]. Lokalizacja jądrowa jest możliwa dzięki istnieniu specyficznej sekwencji na C-końcu CYSLTR1, w pozycji 310-324 aminokwasów. Sekwencji takiej nie zlokalizowano w CYSLTR2. Sekwencja ta jest niezbędna do wywołanej przez LTD<sub>4</sub> translokacji receptora do jądra oraz przekazania sygnału do proliferacji komórek Int 407. CYSLTR1 zlokalizowany w jądrze może być aktywowany na zasadzie wewnątrzkomórkowej intrakrynnej pętli sprzężeń, inicjowanej przez lokalnie produkowane leukotrieny cysteinyłowe.

CYSLTR1 z najwyższym powinowactwem wiąże LTD<sub>4</sub> i z około 350-razy mniejszym - LTC<sub>4</sub> [12]. Pobudzenie CYSLTR1 w komórkach mięśni gładkich oskrzeli zapoczątkowuje przepływ wapnia oraz przemieszczenie zależnej od wapnia białkowej kinazy Ca i niezależnej od wapnia biał-

kowej kinazy C $\gamma$ . Wiązanie LTD<sub>4</sub> jest całkowicie hamowane przez antagonistów CYSLTR1 - MK571, zafirlukast, pobilukast, montelukast, pranlukast [29], podobnie jak chemotaksja eozynofików, co wykazano w modelu astmy oskrzelowej u szczurów oraz u ludzi chorych na astmę. Rola cysLTs patofizjologii astmy jest dobrze udokumentowana [7,40,41], a stosowane w przebiegu astmy leki, będące antagonistami CYSLTR1, przeciwdziałają skurczowi oskrzeli i mają działanie przeciwzapalne [12,37].

## AKTYWNOŚĆ CYSLTR1 I PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU

Lynch i wsp. [12] scharakteryzowali aktywność CYSLTR1, wykorzystując model *Xenopus laevis* i wykazali, że LTD<sub>4</sub> jest najsilniejszym agonistą (EC<sub>50</sub> 0,4nM), podczas gdy EC<sub>50</sub> dla LTC<sub>4</sub> to 21nM. Siła pobudzenia receptora rozkłada się: LTD<sub>4</sub> > LTC<sub>4</sub> > LTE<sub>4</sub>. Sarau i wsp. [29] uzyskali podobne wyniki w oparciu o analizę mobilizacji wapnia w komórkach wykazujących ekspresję CYSLTR1 - Cos-7 (*African Green Monkey SV40 transf d kidney fibroblast cell line*), HEK293 (*human embryonic kidney cell line*) i CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*). Udział leukotrienów cysteinyłowych w skurczu mięśniówki gładkiej oskrzeli w świetle wyników wielu wcześniejszych badań jest dobrze potwierdzony, jednak mało wiadomo o przekazywaniu sygnału

po połączeniu się ich z docelowym receptorem. Dobrym modelem do badań przekazywania sygnału jest linia komórkowa U937, która pod wpływem DMSO różnicuje się (dU937) i wykazuje wysoki poziom ekspresji CYSLTR1 a połączenie LTD<sub>4</sub> z receptorem indukuje wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia i nasila metabolizm fosfatydyloinozytolu (PI). Inkubacja komórek dU937 ze staurosporyną (inhibitor białkowej kinazy C) nasila wpływ LTD<sub>4</sub>, co wskazuje na udział kinazy C w przekazywaniu sygnału [42]. W komórkach mięśni gładkich świeżo izolowanych z oskrzelików, LTD<sub>4</sub> wywołuje powolny wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia, a następnie zwiększenie aktywności kanałów wapniowych zależnych od K<sup>+</sup>, przy udziale ścieżki PC-PLC (fosfatydylocholina-fosfolipaza C). W komórkach U937 wykazano, że CYSLTR1 moduluje stężenie Ca<sup>2+</sup> przez przynajmniej dwa białka G - wrażliwe na PTX (G<sub>v/o</sub>) oraz niewrażliwe na PTX (G<sub>q/11</sub>). W komórkach linii THP-1 LTD<sub>4</sub> aktywuje odrębną ścieżkę przekazywania sygnału, w zależności od białka G - aktywację PTX niewrażliwej MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*) oraz wrażliwej na PTX odpowiedzi chemotaktycznej. Aktywacja CYSLTR1 indukuje fosforylację MAPK poprzez białko G<sub>v/o</sub> w komórkach dU937 [43], komórkach mięśni gładkich dróg oddechowych [44] oraz mastocytach [45]. Z kolei zależna od aktywacji CYSLTR1 reorganizacja aktyny w komórkach mięśni gładkich oskrzeli jest związana z białkiem G wrażliwym na PTX i ścieżką GTPazy Rho oraz fosforylacji tyrozyny.

Aktywacja CYSLTR1 powoduje skurcz mięśni gładkich w drogach oddechowych oraz proliferację komórek nabłonka, mięśni gładkich dróg oddechowych [44,46], hamatopetycznych komórek progenitorowych eozynofiliów [47] oraz fibroblastów płuc [48]. Proliferacja komórek wymaga fosforylacji kinazy ERK1/2 (ang. *extracellular-signal regulated kinase 1/2*) lub transaktywacji receptorów dla czynników wzrostu, co sugerowały badania nad synergistycznym działaniem LTD<sub>4</sub> z IGF (ang. *insulin growth factor*) w indukcji proliferacji komórek mięśni gładkich. LTD<sub>4</sub> indukuje również proliferację komórek mięśni gładkich, transaktywując receptor EGF (ang. *epidermal growth factor*) poprzez wytwarzanie reaktywnych form tlenu i fosforylację ERK1/2 [44]. W komórkach tego typu LTD<sub>4</sub> indukuje fosforylację kinazy ASK1 (ang. *apoptosis signal-regulating kinase 1*), ta następnie – kinazy JNK (ang. *c-Jun-NH(2)-terminal kinase*) i p38 MAPK, która z kolei działa na czynnik transkrypcyjny AP-1 (ang. *activator protein-1*) regulujący różnicowanie i proliferację komórek [49].

W komórkach THP-1 LTD<sub>4</sub> aktywuje MAPK poprzez ścieżkę PKC-Raf1, podczas gdy w komórkach dU937 aktywacja ERK1/2 angażuje ścieżkę zależną od RasGTP, PLC oraz zależnych od Ca<sup>2+</sup> kinaz tyrozynowych [43]. W mastocytach człowieka nasilenie proliferacji przez LTD<sub>4</sub> jest zależne od ERK oraz transaktywacji c-kit [45]. Aktywacja CYSLTR1 przyczynia się również do propagacji procesu zapalnego poprzez uwalnianie mediatorów zapalnych. W komórkach U937 LTD<sub>4</sub> powoduje uwalnianie metabolitów kwasu arachidonowego, hamowane przez SK&F 104353, inhibitor topoizomery I (kamptotecyna) oraz przez staurosporynę. W mastocytach człowieka inkubowanych z IL-4 MK 571 blokuje działanie CYSLTR1, przepływ Ca<sup>2+</sup>, produkcję IL-5, TNF (ang. *tumor necrosis factor*) oraz MIP-1β (ang. *macrophage inflammatory protein β*) [50]. LTD<sub>4</sub> zwiększa ekspresję IL-8 w monocytarnej linii komórkowej oraz komórkach HEK293 poprzez ścieżkę NF-κB (ang. *nuclear factor κB*) i AP-1 [51]. W komórkach Int 407, wykazujących syntezę CYSLTR1 na otoczce jądrowej LTD<sub>4</sub>, powoduje proliferację i przeżywanie komórek poprzez aktywację dwóch równoległych ścieżek sygnałowych. Pierwsza z nich pobudza przeżycie komórek poprzez PKCα i CREB (ang. *cyclic AMP response element-binding protein*), druga – proliferację poprzez PKCε, ERK1/2 (ang. *extracellular signal-regulated kinases*) i p90<sup>RSK</sup> [52]. Sugeruje to, że CYSLTR1 może odgrywać rolę w procesie kancerogenezy i wskazuje na konieczność stosowania zarówno zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowych antagonistów w celu efektywnego zablokowania proliferacji i przeżycia komórek nowotworowych. Aktywacja licznych receptorów nie zawsze prowadzi do bezpośredniego wpływu na ścieżki przekazywania sygnału. Obecnie wiadomo, że pobudzenie GPCR prowadzi do aktywacji ścieżek sygnałowych, które mogą później oddziaływać z tymi aktywowanymi przez inne receptory. Tak złożony system przekazywania sygnału wydaje się oczywisty, biorąc pod uwagę różnorodność komórek oraz konieczność adaptacji do zmieniających się podczas procesów patologicznych warunków.

## CYSLTR2

CYSLTR2 pozostaje nadal słabiej scharakteryzowany farmakologicznie niż CYSLTR1, głównie z powodu braku wybiórczego antagonisty. Sklonowanie i charakterystyka

CYSLTR2 nastąpiły w niedługim czasie po CYSLTR1 [10] z wykorzystaniem szczurzego klonu EST o 40% homologii z CYSLTR2, w celu poszukiwania ludzkiego odpowiednika w bazie danych cDNA. Gen *CYSLTR2* zlokalizowany jest u ludzi na chromosomie 13 (13q14.12-q21.1). Otwarta ramka odczytu *CYSLTR2* koduje białko złożone z 346 aminokwasów o masie 58kDa. CYSLTR2 posiada cztery potencjalne miejsca glikozylacji, z czego trzy znajdują się w zewnątrzkomórkowym N-końcu i jedno w drugiej pętli zewnątrzkomórkowej. Ponadto w trzeciej wewnątrzkomórkowej pętli i na C-końcu znajduje się wiele potencjalnych miejsc fosforylacji białkowych kinaz A i C. Wykorzystując komórki HEK293T (ang. *human embryonic kidney 293T*) oraz oocyty *Xenopus laevis* [10,13], wykazano że LTC<sub>4</sub> i LTD<sub>4</sub> są równorzędnymi agonistami CYSLTR2, a LTE<sub>4</sub> jest częściowym agonistą. Rozmieszczenie CYSLTR2 w tkankach pokrywa się częściowo z CYSLTR1, jednak istnieją miejsca, w który występuje jedynie receptor typu 2 (serce, mózg, nadnercza). Wysoki poziom syntezy CYSLTR2 w nadnerczach wskazuje na nową funkcję leukotrienów cysteinylowych w modulacji układu hormonalnego [12]. Komórki HUVEC wykazują syntezę obu typów receptorów, ale to CYSLTR2 jest receptorem dominującym i odpowiedzialnym za mediowany przez LTC<sub>4</sub> przepływ wapnia w tych komórkach [53], a według wielu autorów komórki te wykazują prawie wyłącznie syntezę CYSLTR2 [2,53,54]. Komórki HL-60 w środowisku hodowlanym z dodatkiem maślanu sodu ulegają różnicowaniu do linii HL-60/eos, wykazującej syntezę CYSLTR2 [55].

CYSLTR2 nie jest blokowany przez klasycznych antagonistów CYSLTR1; jedyny znany częściowy agonista BAYu9773 działa na LTC<sub>4</sub> w sposób niekompetycyjny [10], mimo iż współzawodniczy z LTD<sub>4</sub>, co wykazano w komórkach HEK293T, oocytach *Xenopus laevis*, komórkach żył płucnych człowieka [10,13,14]. W obrębie genu *CYSLTR2* zidentyfikowano polimorfizm pojedynczego nukleotydu prowadzący do zamiany reszt metioniny na resztę waliny w pozycji 202 aminokwasu. Powstający z polimorficznego genu receptor wiąże LTD<sub>4</sub> oraz BAYu9773 z 4-krotnie niższym powinowactwem niż receptor powstający z genu niepolimorficznego [56]. Obecność takiego wariantu receptora wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia atopii w populacji Tristan da Cunha, charakteryzującej się zarówno efektem założyciela, jak i częstym występowaniem atopii. Badania prowadzone na komórkach śródbłonna wykazały, że CYSLTR2 może mieć związek z zakrzepicą, zapaleniem oraz uszkodzeniem naczyń (miażdżycy tętnic), jednak obserwacje dotyczące chorób układu krążenia, w tym miażdżycy, są wciąż weryfikowane i w trakcie badań. Szczególnie wysoki poziom syntezy receptora wykazano w sercu i naczyniach obwodowych, co sugeruje działanie leukotrienów cysteinylowych w układzie krążenia.

## AKTYWNOŚĆ CYSLTR2 I PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU

LTC<sub>4</sub> i LTD<sub>4</sub> wywołują w komórkach HUVEC gwałtowny wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia i skurcz [2,53] hamowany przez antagonistę SKF104,353. Początkowo sądzono, że efekt ten jest wywołany przez CYSLTR1, jednak komórki te wykazują prawie wyłącznie ekspresję CYSLTR2. Podobne wyniki uzyskał Heise i wsp. w badaniach z wyko-

rzystaniem [<sup>3</sup>H]LTD<sub>4</sub> i komórek Cos-7. CYSLTR2, podobnie jak CYSLTR1 w komórkach HUVEC i oocytach *X. laevis* jest związany z niewrażliwym na PTX białkiem G [10]. Jednak przekazywanie sygnału przez CYSLTR2 w mastocytach człowieka jest całkowicie hamowana przez PTX, co sugeruje, że jest on również związany z białkiem G wrażliwym na PTX (G<sub>i/o</sub>) [38]. Aktywacja CYSLTR2 przez LTD<sub>4</sub> zwiększa ekspresję 37 wczesnych genów, spośród których większość silnie indukuje EGR, jądrowy receptor podrodziny 4 grupy A czynników transkrypcyjnych, IL-8, TF (*tissue factor*), ADAMTS1 (*a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif*), E-selektynę, CXC ligand 2, COX-2 (cyklooksygenaza 2) [3]. LTC<sub>4</sub> w komórkach HEK293 indukuje produkcję IL-8 i MCP-1, silnych mediatorów zapalnych, które odgrywają rolę w rekrutacji i aktywacji komórek prozapalnych. Związanie LTC<sub>4</sub> z CYSLTR2 prowadzi do aktywacji ścieżki AP-1 i NF-κB oraz rodziny kinaz PKC. LTC<sub>4</sub> powoduje, przy udziale PKCδ, powstanie kompleksu c-Jun i c-Fos, które wiążą się do miejsc TRE (AP-1), co indukuje transkrypcję chemokin. Ścieżka przekazywania sygnału związana z AP-1 jest całkowicie blokowana przez rotlerynę, inhibitor PKCδ. Ponadto, LTC<sub>4</sub> indukuje fosforylację IκBα i p65 i aktywację NF-κB przez kompleks p50/p65, co prowadzi również do transkrypcji genów dla chemokin [57].

#### GPR17

Obecność dodatkowego podtypu receptora leukotrienów cysteinyłowych w tkankach człowieka sugerowało wielu autorów [58,59] w oparciu o obserwację, że jeden ligand – LTC<sub>4</sub> lub LTE<sub>4</sub> nie aktywuje CYSLTR1 i CYSLTR2, a wspólny antagonistą BAYu9773 nie wpływa na funkcjonalną odpowiedź po pobudzeniu komórek [60], co w oparciu o farmakologię obu sklonowanych receptorów nie wskazywało ani na profil CYSLTR1, ani na CYSLTR2. Wyniki uzyskane w badaniach nad wiązaniem ligandu wykazały obecność swoistych miejsc wiązania LTC<sub>4</sub> w mięszu płuc człowieka oraz w miażdżycowych tętnicach wieńcowych, odrębnych od miejsc wiązania LTD<sub>4</sub> [61], a nie związanych ze skurczem. W 2001 roku wykazano, że odkryty wcześniej, ulegający zwiększonej syntezie po stymulacji komórek IL-4, receptor reaguje zarówno na cysLT, jak i na UDP. Badania farmakologiczne, przeprowadzone z zastosowaniem antagonistów CYSLTR1 lub CYSLTR1/CYSLTR2, wykluczyły założenie, że dodatkowy receptor jest podtypem receptora typu 2 lub heterodimerem CYSLTR. Analiza sierocych receptorów GPCR znajdujących się w pośredniej filogenetycznej pozycji pomiędzy CYSLTR a P2Y wskazał istnienie heterologicznego GPR17, filogenetycznie odległego tak samo od CYSLTR1 i CYSLTR2 oraz od podgrupy receptora P2Y<sub>12,13,14</sub> [17]. Stwierdzono, że ekspresja tego receptora w różnych liniach komórkowych prowadzi do wystąpienia wysoce specyficznej, zależnej od stężenia, reakcji na zewnątrzkomórkowe nukleotydy i leukotrieny cysteinyłowe.

Gen *GPR17* zlokalizowany jest na chromosomie 2 (2q21), otwarta ramka odczytu koduje białko złożone z 339 reszt aminokwasowych. Zablokowanie GPR17 poprzez antagonistów CYSLTR1 i P2Y lub obniżenie *in vivo* (w modelu zwierzęcym) jego syntezy chroni przed uszkodzeniem mózgu po niedokrwieniu [11]. W doświadczeniu z komórkami 1321N1 (ang. *human astrocytoma cells*) transfekowanymi

GPR17 wykazano, że LTC<sub>4</sub> działa na receptor silniej niż LTD<sub>4</sub>. Odpowiedź na nukleotydy purynowe jest zbliżona do receptorów P2Y<sub>6</sub> i P2Y<sub>14</sub>, w szeregu UDP-galaktoza=UDP>UDP-glukoza. Wiązanie leukotrienów cysteinyłowych i nukleotydy jest wrażliwe na PTX i powoduje zwiększenie poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia, co sugeruje związek z białkiem G<sub>i/o</sub>. Wiązanie LTD<sub>4</sub> jest silnie hamowane przez montelukast i pranlukast, a wiązanie nukleotydy – przez antagonistę P2Y<sub>12</sub>/P2Y<sub>13</sub>, AR-C69931MX oraz antagonistę P2Y<sub>1</sub>, MRS2179. GPR17 łączy w sobie system receptorów dla leukotrienów cysteinyłowych i receptorów purinergicznymi i wskazuje, że oba systemy współdziałają ze sobą.

#### CYSLTR

LTE<sub>4</sub> jest najstabilniejszy spośród wszystkich leukotrienów cysteinyłowych, ale jest słabym agonistą zarówno CYSLTR1, CYSLTR2, jak i GPR17. Wykazano jednak, że *in vitro* wywołuje skurcz tchawicy u świnek morskich znacznie silniej niż LTD<sub>4</sub> i LTC<sub>4</sub> [16]. Wziewne podanie chorym na astmę oskrzelową LTE<sub>4</sub> powoduje masywny napływ eozynofili i bazofilów do błony śluzowej oskrzeli [62]. Z kolei u pacjentów z nadwrażliwością na aspirynę, charakteryzującą się astmą oskrzelową, polipami nosa i nadprodukcją leukotrienów cysteinyłowych, po podaniu LTE<sub>4</sub> w inhalacji zaobserwowano skurcz oskrzeli, znacznie silniejszy niż wywołany LTC<sub>4</sub> i histaminą [28], efektu takiego nie zaobserwowano u astmatyków bez nadwrażliwości na aspirynę. Geny kodujące CYSLTR1 i CYSLTR2 posiadają kilka alternatywnych transkryptów w komórkach człowieka, jednak wszystkie kodują to samo białko. Dlatego też zjawisko alternatywnego składania genów nie tłumaczy zwiększonego powinowactwa do LTE<sub>4</sub> [63]. Wydaje się, że to preferencyjne działanie LTE<sub>4</sub> nie jest związane z żadnym ze znanych receptorów leukotrienów cysteinyłowych, a nadreaktywność i skurcz oskrzeli mogą być mediowane przez nieznaną dotychczas receptor, specyficzny dla LTE<sub>4</sub>.

U myszy pozbawionych zarówno *Cysltr1*, jak i *Cysltr2* (*Cysltr1/Cysltr2* / -) po podaniu śródskórnym cysLT wykazano obecność nowego typu receptora (*CysLT<sub>F</sub>R*), mediującego zwiększoną przepuszczalność naczyń w odpowiedzi na LTE<sub>4</sub>. Dodatkowo, podanie myszom antagonisty *Cysltr1* MK-571 nasila ten proces w odpowiedzi na każdy z leukotrienów cysteinyłowych.

#### PORÓWNANIE RECEPTORÓW LEUKOTRIENÓW CYSTEINYŁOWYCH MYSZY I CZŁOWIEKA

Mysie *Cysltr* (*Cysltr1* i *Cysltr2*) zostały sklonowane jednocześnie przez trzy niezależne zespoły [30-32,64]. Gen kodujący *Cysltr1* jest zlokalizowany na ramieniu długim chromosomu X (XD), składa się z czterech eksonów i trzech intronów, z których powstają dwa alternatywne transkrypty – długa i krótka izoforma receptora. Eksony I i IV koduje formę krótką (339 aminokwasów), podczas gdy forma długa powstaje z eksonów I, II, III i IV. Ekson III zawiera dodatkową otwartą ramkę odczytu z kodonem start (ATG), co daje 13 dodatkowych aminokwasów na N-końcu łańcucha polipeptydowego i prowadzi do powstania długiej izoformy receptora, zbudowanej 352 reszt aminokwasowych o masie



cząsteczkowej 40 kDa. W porównaniu do CYSLTR1, mRNA mysiego odpowiednika jest zlokalizowane znacznie szerzej i ulega wysokiej ekspresji w skórze, płucach i jelicie cienkim (dominuje izoforma długa) [30,31]. Cysltr1 wykazuje 87% homologii z CYSLTR1, Cysltr2 składa się z 309 reszt aminokwasów i wykazuje 74% homologii z CYSLTR2 [30-32,64]. Podobnie jak u człowieka, Cysltr1 wiąże z najwyższym powinowactwem LTD<sub>4</sub>, a LTC<sub>4</sub> i LTE<sub>4</sub> z dużo mniejszym, a połączenie to powoduje mobilizację wewnątrzkomórkowego wapnia [30,31,64]. Cysltr2 jest kodowany przez gen zlokalizowany na chromosomie 14 (14 D3), złożony z 6 eks-onów, z sekwencją kodującą znajdującą się w ostatnim eks-onie. Zidentyfikowano dwa warianty splicingowe Cysltr2, długą i dominującą krótką formę receptora pozbawioną eksonu 3 [32]. Cysltr2 jest krótszy na obu końcach w porównaniu z CYSLTR2, ale z podobnym powinowactwem wiąże LTC<sub>4</sub> i LTD<sub>4</sub>. Charakterystyka funkcjonalna oraz wiązanie agonistów/antagonistów z Cysltr1 i Cysltr2 są podobne do receptorów u ludzi, wyjątek stanowi pranlukast, swoisty antagonist CYSLTR1, który hamuje aktywność Cysltr2, ale nie CYSLTR2 u ludzi. U myszy zidentyfikowano również receptor Gpr17, zlokalizowany na chromosomie 18. Dodatkowo, wykorzystując myszy, stwierdzono obecność nowego, odrębnego receptora odpowiadającego o wiele silniej na LTE<sub>4</sub> niż na LTD<sub>4</sub> i LTC<sub>4</sub>, CysLT<sub>E</sub>R [28]. Zaobserwowano, że istnieją wyraźne różnice w rozmieszczeniu i ekspresji genu kodującego Cysltr pomiędzy poszczególnymi szczepami wsobnymi myszy. Najwyższy poziom syntezy mRNA wykazano u myszy szczepu C57/BL6, a znacznie niższą u myszy szczepu Balb/c i 129 [64].

## ROLA LEUKOTRIENÓW CYSTEINYLOWYCH I ICH RECEPTORÓW W STANACH ZAPALNYCH

LTC<sub>4</sub> i LTD<sub>4</sub> *in vitro* w izolowanych oskrzelach wywołują 500–1000 krotnie silniejszy skurcz mięśni gładkich niż histamina. Podawany w inhalacji ludziom zdrowym LTE<sub>4</sub> znacznie silniej niż histamina wywołuje spadek przepływu powietrza w drogach oddechowych, mimo iż działa 30-krotnie słabiej niż LTD<sub>4</sub> i LTC<sub>4</sub>, które powodują przynajmniej 1000 krotnie silniejszy skurcz niż histamina [65]. Skurcz wywołany przez leukotrieny cysteinyłowe jest hamowany przez swoistych antagonistów CYSLTR1, co wskazuje na jego zaangażowanie w skurcz oskrzeli, a produkcja leukotrienów cysteinyłowych jest bezpośrednio związana ze skurczem po prowokacji alergenem. Zwiększone stężenie leukotrienów cysteinyłowych obserwowano w BAL (ang. *bronchoalveolar lavage*) pobranym od pacjentów z astmą oskrzelową lub atopią po dooskrzelowej prowokacji alergenem oraz u pacjentów z nadwrażliwością na aspirynę po prowokacji dooskrzelowej. Stężenie leukotrienów jest podwyższone w popłuczynach nosowych pacjentów z alergicznym niezżytym nosa oraz po doustnej prowokacji aspiryną u pacjentów z alergicznym niezżytym nosa lub astmą z nadwrażliwością na aspirynę. Stężenie LTE<sub>4</sub> w moczu jest znacznie zwiększone u osób chorych na astmę oskrzelową z nadwrażliwością na aspirynę, u hospitalizowanych z powodu zaostrzenia astmy, po epizodach nocnego zaostrzenia astmy oraz osób ze świstami indukowanymi przez zakażenia wirusowe. Zwiększonego stężenia LTE<sub>4</sub> nie obserwuje się w przebiegu astmy wywołanej przez wysiłek u osób dorosłych [66], podczas gdy u dzieci stężenie LTE<sub>4</sub> wzrasta [67]. Podwyż-

szony poziom LTE<sub>4</sub> w moczu występuje po zawale serca, w ostrych epizodach wieńcowych oraz po operacji wstawienia „by-passów”, u pacjentów z wypryskiem atopowym [68], reumatoidalnym zapaleniem skóry [69] i chorobą Crohna. Leukocyty uzyskane od pacjentów z astmą alergiczną oraz osób z atopią wytwarzają około pięciokrotnie więcej leukotrienów cysteinyłowych niż komórki pobrane od osób zdrowych, co sugeruje ich silny związek z atopią.

Doustne podawanie wybiórczych antagonistów CYSLTR1 zmniejsza skurcz oskrzeli u osób z astmą indukowaną wysiłkiem (EIA) [70], po prowokacji zimnym powietrzem [71] i inhalacji adenozyną [72]. Dożylnie podawanie montelukastu znacząco zwiększa przepływ powietrza w porównaniu do placebo, u osób hospitalizowanych z powodu zaostrzenia astmy, otrzymujących również leczenie bronchodilatatorami i glikokortykosteroidami [85], co potwierdza rolę leukotrienów cysteinyłowych w eksperymentalnie wywołanej, jak i naturalnie występującej astmie oraz udział CYSLTR1 w zaostrzeniach astmy. Badania nad polimorfizmami w obrębie CYSLTR1 dowiodły, że istnieje związek pomiędzy ich występowaniem a alergią. Kim i Park wykazali, że warianty genetyczne CYSLTR1 oraz CYSLTR2 mogą odgrywać rolę w występowaniu nadwrażliwości na aspirynę u astmatyków. Trzy polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w obrębie promotora CYSLTR1 (w pozycji -634C/T, -475A/C, -336A/G) wydają się być związane z fenotypem astmy z nadwrażliwością na aspirynę oraz wysokim poziomem całkowitego IgE u mężczyzn [34,74,75], zależności takiej nie wykazano u kobiet. Badania z użyciem trzech linii komórkowych – A549, U937 oraz limfocytów T człowieka (Jurkat) dowiodły, że genotyp [T-C-G], w przeciwieństwie do [C-A-A], zwiększa aktywność promotora, co wskazuje na możliwość modulacji ekspresji CYSLTR1 i prowadzi do zwiększenia podatności na nadwrażliwość na aspirynę [33,34,75]. W badaniach przeprowadzonych w populacji kaukaskiej wykazano związek polimorfizmu w obrębie części kodującej genu CYSLTR1 w pozycji 927 C/T (P309P) z występowaniem atopii, astmy i wyprysku kontaktowego. Wykazano w nich, że allel 927C predysponuje do występowania astmy i wyprysku kontaktowego u mężczyzn, a allel 927T do atopii – u kobiet [76,77]. Badania przeprowadzone w populacji Hiszpanii wykazały, że kombinacja allelu 927T w obrębie CYSLTR1 z -444A LTC4S (syntaza leukotrienu C4) występuje rzadziej u mężczyzn z astmą w porównaniu do grupy kontrolnej [78]. Thompson i wsp. [36] wykazali, że występowanie rzadkiego allelu 899A (G300S) jest związane z astmą i atopią u kobiet. Tym samym, pomimo drobnych rozbieżności, większość badań wskazuje, że zmienności genetyczna CYSLTR1 jest związana z alergią i specyficzna dla płci.

W obrębie genu CYSLTR2 opisano 4 polimorfizmy mogące mieć związek z występowaniem astmy i nietolerancją na aspirynę w obrębie populacji koreańskiej i japońskiej (-1220A/C, -819T/G, 2078C/T, 2534A/G, 2545+297A/G) [74], gdzie w przypadku trzech pierwszych polimorfizmów częstość występowania rzadkich alleli była wyższa u pacjentów z nietolerancją aspiryny i allelem -444A LTC4S. Związek CYSLTR2 z astmą atopową został potwierdzony przez Pillai i wsp. oraz Fukai i wsp. [79,80], a badania funkcjonalne wykazały, że LTD<sub>4</sub> działa słabiej na wariant M202V niż na niezmienny receptor [56,79].

W przypadku pokrzywki i obrzęku naczynioruchowego indukowanych przez aspirynę wykazano związek polimorfizmu -634C/T w obrębie promotora *CYSLTR1* z występowaniem tego zjawiska w populacji koreańskiej [81].

Analizy immunohistochemiczne wykazały obecność *CYSLTR1* na komórkach odgrywających rolę w atopii i astmie – monocytach, eozynofilach oraz komórkach CD34+ i limfocytach B [37]. Leukotrieny cysteinylowe wpływają na rekrutację eozynofilów w drogach oddechowych astmatyków, ich aktywację poprzez pobudzenie degranulacji oraz nasilają adhezję do nabłonka dróg oddechowych [82,83]. Ekspresja *CYSLTR1* może być zwiększona w wyniku nasilonej aktywności transkrypcyjnej w komórkach pobudzonych cytokinami profilu Th2 – IL-5 (HL-60 różnicowane do eozynofilów) [55] oraz IL-4 i IL-13 (interleukina 13) (monocyty, makrofagi) [84]. Inaczej jest w przypadku pobudzanych IL-4 mastocytów, które nie wykazują zwiększonej ekspresji *CYSLTR1* po inkubacji z tą cytokiną [85]. W błonie śluzowej nosa *CYSLTR1* ulega ekspresji w naczyniach krwionośnych, komórkach śródmiąższowych, eozynofilach, mastocytach, neutrofilach i makrofagach [86], dlatego też leki antyleukotrienne są skuteczne w leczeniu objawów sezonowego alergicznego nieżyty nosa. Poziom leukotrienów cysteinylowych wzrasta w przebiegu przewlekłego rozrostowego eozynofilowego zapalenia zatok, współistniejącego często z astmą oraz u pacjentów z astmą z nadwrażliwością na aspirynę [87]. Leukotrieny cysteinylowe są również czynnikami wywołującymi skurcz naczyń w obrębie płuc, powodowany oddziaływaniami z *CYSLTR2* umiejscowionym w warstwie mięśni gładkich oraz *CYSLTR1* w śródbłonku. CysLTs zwiększają przepuszczalność drobnych naczyń w drogach oddechowych poprzez kurczenie komórek śródbłonka naczyń włosowatych i zwiększanie hydrostatycznego ciśnienia w ich obrębie, co prowadzi do powstania obrzęku ścian oskrzeli, ich pogrubienia, odwarstwienia nabłonka, zmianę transportu śluzu przez ciała rzęskowe i zmianę orientacji rzęsek [88]. U ludzi zaobserwowano ochronny wpływ antagonistów *CYSLTR1*, które zmniejszają szybkość przemieszczania się śluzu w obrębie śródbłonka tchawicy i oskrzeli po prowokacji alergenem.

Leukotrieny cysteinylowe są silnymi chemoatraktantami dla eozynofilów. Podanie wziewnie świnkom morskim leukotrienów wywołuje, trwający do 4 tygodni, napływ do płuc wielojądrzastych eozynofilów, a lokalna rekrutacja eozynofilów jest hamowana po podaniu antagonistów *CYSLTR1* [89]. U ludzi po inhalacji  $LTE_4$  obserwuje się napływ eozynofilów i wielojądrzastych komórek do błony śluzowej dróg oddechowych, podobny efekt wywołuje  $LTD_4$ , który *in vitro* jest bardzo silnym i swoistym chemoatraktantem dla eozynofilów człowieka.  $LTC_4$  i  $LTD_4$  zwiększają również ekspresję P-selektyny w śródbłonku małych naczyń krwionośnych, do których początkowo migrują leukocyty podczas reakcji zapalnej [90]. W przebiegu ciężkiej astmy w obrębie dróg oddechowych obserwuje się hiperplazję komórek mięśni gładkich, co razem z niedokrwieniem i obrzękiem śluzówki wpływa na wystąpienie niedrożności w przebiegu astmy. *In vitro* wpływ na proliferację ludzkich komórek mięśni gładkich dróg oddechowych ma głównie  $LTD_4$ , a efekt ten jest hamowany przez antagonistów *CYSLTR1*. Obserwowaną w astmie hipertrofię mięśni

gładkich oskrzeli można wywołać eksperymentalnie u szczurów, poprzez powtarzalną ekspozycję na aerozol alergenów, którym zwierzę było wcześniej uczulane, a podanie zwierzętom wraz antygenem antagonistów *CYSLTR1* zapobiega hipertrofii mięśni gładkich w drogach oddechowych [91]. O roli GPR17 wiadomo jak dotąd stosunkowo mało. Wydaje się, że może być zaangażowany w procesy patologiczne w obrębie mózgu i rdzenia kręgowego [99]. Rola opisanego ostatnio *CYSLTR* pozostaje nadal niewyjaśniona, ale wydaje się on mieć związek z nadreaktywnością i skurczem oskrzeli.

## PODSUMOWANIE

Wyniki uzyskane na podstawie badań z rekombinowanymi *CYSLTR1* i *CYSLTR2* potwierdziły wcześniejsze obserwacje oparte na klasycznych badaniach farmakologicznych w różnych typach tkanek i komórek. Sklonowanie obu receptorów dostarczyło bardziej szczegółowych danych o ich systemach przekazywania sygnału oraz regulacji ich ekspresji zarówno u zdrowych, jak i chorych. Stwarza to możliwość opracowania silnych i wybiórczych antagonistów *CYSLTR2* i *CYSLTR1/CYSLTR2*, które mogą być użyte jako potencjalne leki w chorobach, w które zaangażowane są leukotrieny cysteinylowe. Możliwe jednak, że w pewnych chorobach mamy do czynienia z koekspresją obu typów receptorów, co obniża efektywność działania swoistych antagonistów *CYSLTR1* z powodu ich niezdolności do interferowania z wszystkimi działaniami cysLT. W ocenie roli poszczególnych leukotrienów cysteinylowych byłyby pomocne stabilne analogi tych związków oraz antagonisty *CYSLTR2*. Ponadto, prowadzone badania pozwoliły na jednoznaczne określenie różnic w profilach farmakologicznych pomiędzy *CYSLTR* człowieka i myszy, gdzie pranlukast hamuje funkcjonalną aktywność *Cysltr2*, w przeciwieństwie do *CYSLTR2*. Występują również znaczne różnice pomiędzy rozmieszczeniem *Cysltr* w różnych szczepów myszy, prawdopodobnie z powodu polimorfizmów pełniących funkcje regulatorowe. Sugeruje to ostrożną interpretację i ekstrapolację wyników uzyskanych z modeli zwierzęcych na człowieka. Ponadto potrzeba jeszcze szeregu badań nad rolą dwóch nowych receptorów dla leukotrienów cysteinylowych – GPR17 i *CYSLTR*.

## PIŚMIENNICTWO

1. Woszczek G, Pawliczak R, Qi H-Y, Nagineni S, Alsaaty S, Logun C, Shelhamer JH (2005) Functional characterization of human cysteinyl leukotriene 1 receptor gene structure. *J Immunol* 175: 5152-5159
2. Lotzer K, Spanbroek R, Hildner M, Urbach A, Bretschneider E, Galczenki H, Evans JF, Habenicht AJ (2003) Differential leukotriene receptor expression and calcium responses in endothelial cells and macrophage indicate 5-lipoxygenase-dependent circuitry of inflammation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: e32-e36
3. Uzonyi B, Lötzer K, Jahn S, Kramer C, Hildner M, Bretschneider E, Radke D, Beer M, Vollandt R, Evans JF, Funk CD, Habenicht AJ (2006) Cysteinyl leukotriene 2 receptor and protease-activated receptor 1 activate strongly correlated early genes in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6326-6331
4. Folko G, Ressori G, Buccellati C, Berti F, Maclouf J, Sala A (2000) Leukotrienes in cardiovascular disease. *Am J Respir Crit Care Med* 161: S112-S116
5. Brocklehurst WE (1962) Slow reacting substance and related compounds. *Prog Allergy* 6: 539-558
6. Drazen JM (2003) Leukotrienes in asthma. *Adv Exp Med Biol* 525: 1-5
7. Nicosia S, Capra V, Rovati GE (2001) Leukotrienes as mediators of asthma. *Pull Pharmacol Ther* 14: 3-19

8. Samuelsson B (1983) Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220: 568-575
9. Orango R, Murphy RC, Karnovsky ML, Austen KF (1973) The physicochemical characteristics and purification of slow reacting substance of anaphylaxis. *J Immunol* 110: 760-770
10. Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS, Stocco R, Bellefeuille JN, Abramovitz M, Cheng R, Williams DL Jr, Zeng Z, Liu Q, Ma L, Clements MK, Coulombe N, Liu Y, Austin CP, George S, O'Neil GP, Metters KM, Lynch KR, Evans JF (2000) Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem* 275: 30531-30536
11. Ciana P, Fumagalli M, Trincavelli ML, Verderio C, Rosa P, Lecca D, Ferrario S, Parravicini C, Capra V, Gelosa P, Guerrini U, Belcredito S, Cimino M, Sironi L, Tremoli E, Rovati GE, Martini C, Abbracchio MP (2006) The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor. *EMBO J* 25: 4615-4627
12. Lynch KR, O'Neil G.P, Liu Q, Im D-S, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z (1999) Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 399: 789-793
13. Takasaki J, Kamohara M, Matsumoto T, Saito T, Sugimoto T, Ohishi T, Ishii H, Ota T, Nishikawa T, Kawai Y (2000) The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT (2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 316-322
14. Nothacker H-P, Wang Z, Zhu Y, Reinscheid S, Lin SH, Civelli O (2000) Molecular cloning and characterization of second human cysteinyl leukotriene receptor: discovery of a subtype selective agonist. *Mol Pharmacol* 58: 1601-1608
15. Walch L, Norel X, Bäck M, Gascard JP, Dahlén SE, Brink C (2002) Pharmacological evidence for a novel cysteinyl-leukotriene receptor subtype in human pulmonary artery smooth muscle. *Br J Pharmacol* 137: 1339-1345
16. Lee TH, Austen KF, Corey EJ, Drazen JM (1984) Leukotriene E4-induced airway hyperresponsiveness of guinea pig tracheal smooth muscle to histamine and evidence for three separate sulfidopeptide leukotriene receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4922-4925
17. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63: 1256-1272
18. Beller TC, Friend DS, Maekawa A, Lam BK, Austen KF, Kanaoka Y (2004) Cysteinyl leukotriene 1 receptor controls the severity of chronic pulmonary inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3047-3052
19. Nielsen CK, Campbell JI, Ohd JF, Mörgelin M, Riesbeck K, Landberg G, Sjölander A (2005) A novel localization of the G-protein-coupled CysLT1 receptor in the nucleus of colorectal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 65: 732-742
20. Rouzer CA, Matsumoto T, Samuelsson B (1986) Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 857-861
21. Dixon RA, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF, Gillard JW, Miller DK (1990) Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* 343: 282-284
22. Evans JF, Dupuis P, Ford-Hutchinson AW (1985) Purification and characterisation of leukotriene A4 hydrolase from rat neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 840: 43-50
23. Welsch DJ, Creely DP, Hauser SD, Mathis KJ, Krivi GG, Isakson P (1994) Molecular cloning and expression of human leukotriene-C4 synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9745-9749
24. Anderson ME, Allison RD, Meister A (1982) Interconversion of leukotrienes catalyzed by purified gamma-glutamyl transpeptidase: concomitant formation of leukotriene D4 and gamma-glutamyl amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 1088-1091
25. Carter BZ, Shi ZZ, Barrios R, Lieberman MW (1998) Gamma-glutamyl leukotrienase, a gamma-glutamyl transpeptidase gene family member, is expressed primarily in spleen. *J Biol Chem* 273: 28277-28285
26. Lee CW, Lewis RA, Corey EJ, Austen KF (1983) Conversion of leukotriene D4 to leukotriene E4 by a dipeptidase released from the specific granule of human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 48: 27-35
27. Reddanna P, Prabhu KS, Whelan J, Reddy CC (2003) Carboxypeptidase A-catalyzed direct conversion of leukotriene C4 to leukotriene F4. *Arch Biochem Biophys* 413: 158-163
28. Maekawa A, Kanaoka Y, Xing W, Austen KF (2008) Functional recognition of a distinct receptor preferential for leukotriene E4 in mice lacking the cysteinyl leukotriene 1 and 2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16695-16700
29. Sarau HM, Ames RS, Chambers J, Ellis C, Elshourbagy N, Foley JJ, Schmidt DB, Muccitelli RM, Jenkins O, Murdock PR, Herrity NC, Halsety W, Sathe G, Muir AI, Nuthulaganti P, Dytko GM, Buckley PT, Wilson S, Bergsma DJ, Hay DW (1999) Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol* 56: 657-663
30. Martin V, Sawyer N, Stocco R, Unett D, Lerner MR, Abramovitz M, Funk CD (2001) Molecular cloning and functional characterization of murine cysteinyl-leukotriene 1 (CysLT(1)) receptors. *Biochem Pharmacol* 62: 1193-1200
31. Maekawa A, Kanaoka Y, Lam BK, Austen KF (2001) Identification in mice of two isoforms of the cysteinyl leukotriene 1 receptor that result from alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2256-2261
32. Hui Y, Yang G, Galczenski H, Figueroa DJ, Austin CP, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Funk CD (2001) The murine cysteinyl leukotriene 2 (CysLT2) receptor. cDNA and genomic cloning, alternative splicing, and in vitro characterization. *J Biol Chem* 276: 47489-47495
33. Zhang J, Migita O, Koga M, Shibasaki M, Arinami T, Noguchi E (2006) Determination of structure and transcriptional regulation of CYSLTR1 and an association study with asthma and rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol* 17: 242-249
34. Kim SH, Oh JM, Kim YS, Palmer LJ, Suh CH, Nahm DH, Park HS (2006) Cysteinyl leukotriene receptor 1 promoter polymorphism is associated with aspirin-intolerant asthma in males. *Clin Exp Allergy* 36: 433-439
35. Duroudier NP, Sayers I, Castagna CC, Fenech AG, Halapi E, Swan C, Hall IP (2007) Functional polymorphism and differential regulation of CYSLTR1 transcription in human airway smooth muscle and monocytes. *Cell Biochem Biophys* 47: 119-130
36. Thompson MD, Capra V, Takasaki J, Maresca G, Rovati GE, Slutsky AS, Lilly C, Zamel N, McIntyre Burnham W, Cole DE, Siminovich KA (2007) A functional G300S variant of the cysteinyl leukotriene 1 receptor is associated with atopy in a Tristan da Cunha isolate. *Pharmacogenet Genomics* 17: 539-549
37. Figueroa DJ, Breyer RM, Defoe SK, Kargman S, Daugherty BL, Waldburger K, Liu Q, Clements M, Zeng Z, O'Neill GP, Jones TR, Lynch KR, Austin CP, Evans JF (2001) Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 226-233
38. Rovati GE, Capra V (2007) Cysteinyl-leukotriene receptors and cellular signals. *Scientific World Journal* 7: 1375-1392
39. Mellor EA, Frank N, Soler D, Hodge MR, Lora JM, Austen KF, Boyce JA (2003) Expression of the type 2 receptor for cysteinyl leukotrienes (CysLT2R) by human mast cells: Functional distinction from CysLT1R. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11589-11593
40. Holgate ST, Peters-Golden M, Panettieri RA, Henderson WR Jr (2003) Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 111: S18-S36
41. Sampson AP, Pizzichini E, Bisgaard H (2003) Effects of cysteinyl leukotrienes and leukotriene receptor antagonists on markers of inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 111: S59-S61
42. Winkler JD, Sarau HM, Foley JJ, Crooke ST (1990) Inhibitors of protein kinase C selectively enhanced leukotriene D4-induced calcium mobilization in differentiated U-937 cells. *Cell Signal* 2: 427-437
43. Capra V, Ravasi S, Accomazzo MR, Parenti M, Rovati GE (2004) CysLT1 signal transduction in differentiated U937 cells involves the acti-

- vation of the small GTP-binding protein Ras. *Biochem Pharmacol* 67: 1569-1577
44. Ravasi S, Citro S, Viviani B, Capra V, Rovati GE (2006) CysLT1 receptor-induced human airway smooth muscle cells proliferation requires ROS generation, EGF receptor transactivation and ERK1/2 phosphorylation. *Respir Res* 7: 42
  45. Jiang Y, Kanaoka Y, Feng C, Nocka K, Rao S, Boyce JA (2006) Cutting edge: Interleukin 4-dependent mast cell proliferation requires autocrine/intracrine cysteinyl leukotriene-induced signaling. *J Immunol* 177: 2755-2759
  46. Espinosa K, Bossé Y, Stankova J, Rola-Pleszczynski M (2003) CysLT1 receptor upregulation by TGF-beta and IL-13 is associated with bronchial smooth muscle cell proliferation in response to LTD4. *J Allergy Clin Immunol* 111: 1032-1040
  47. Braccioni F, Dorman SC, O'byrne PM, Inman MD, Denburg JA, Parameswaran K, Baatjes AJ, Foley R, Gauvreau GM (2002) The effect of cysteinyl leukotrienes on growth of eosinophil progenitors from peripheral blood and bone marrow of atopic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 110: 96-101
  48. Perng DW, Wu YC, Chang KT, Wu MT, Chiou YC, Su KC, Perng RP, Lee YC (2006) Leukotriene C4 induces TGF-beta1 production in airway epithelium via p38 kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 101-107
  49. Kumasawa F, Hashimoto S, Onose A, Jibiki I, Mizumura K, Matsumoto K, Maruoka S, Gon Y, Kobayashi T, Takahashi N, Ichijo H, Horie T (2005) Apoptosis signal-regulating kinase 1 in leukotriene D(4)-induced activator protein-1 activation in airway smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 517: 11-16
  50. Mellor EA, Austen KF, Boyce JA (2002) Cysteinyl leukotrienes and uridine diphosphate induce cytokine generation by human mast cells through an interleukin 4-regulated pathway that is inhibited by leukotriene receptor antagonists. *J Exp Med* 195: 583-592
  51. Thompson C, Cloutier A, Bossé Y, Thivierge M, Gouill CL, Larivée P, McDonald PP, Stankova J, Rola-Pleszczynski M (2006) CysLT1 receptor engagement induces activator protein-1- and NF-kappaB-dependent IL-8 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35: 697-704
  52. Paruchuri S, Sjölander A (2003) Leukotriene D4 mediates survival and proliferation via separate but parallel pathways in the human intestinal epithelial cell line Int 407. *J Biol Chem* 278: 45577-45585
  53. Sjöström M, Johansson AS, Schröder O, Qiu H, Palmblad J, Haeggström JZ (2003) Dominant expression of the CysLT2 receptor accounts for calcium signaling by cysteinyl leukotrienes in human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: e37-e41
  54. Mita H, Hasegawa M, Saito H, Akiyama K (2001) Levels of cysteinyl leukotriene receptor mRNA in human peripheral leucocytes: significantly higher expression of cysteinyl leukotriene receptor 2 mRNA in eosinophils. *Clin Exp Allergy* 31: 1714-1723
  55. Thivierge M, Doty M, Johnson J, Stanková J, Rola-Pleszczynski M (2000) IL-5 up-regulates cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in HL-60 cells differentiated into eosinophils. *J Immunol* 165: 5221-5226
  56. Thompson MD, Storm van's Gravesande K, Galczenski H, Burnham WM, Siminovich KA, Zamel N, Slutsky A, Drazen JM, George SR, Evans JF, O'Dowd BF (2003) A cysteinyl leukotriene 2 receptor variant is associated with atopy in the population of Tristan da Cunha. *Pharmacogenetics* 13: 641-649
  57. Thompson C, Cloutier A, Bossé Y, Poisson C, Larivée P, McDonald PP, Stankova J, Rola-Pleszczynski M (2008). Signaling by the cysteinyl-leukotriene receptor 2. Involvement in chemokine gene transcription. *J Biol Chem* 283: 1974-1984
  58. Bäck M (2002) Functional characteristics of cysteinyl-leukotriene receptor subtypes. *Life Sci* 71: 611-622
  59. Norel X, Brink C (2004) The quest for new cysteinyl-leukotriene and lipoxin receptors: recent clues. *Pharmacol Ther* 103: 81-94
  60. Walch L, Norel X, Bäck M, Gascard JP, Dahlén SE, Brink C (2002) Pharmacological evidence for a novel cysteinyl-leukotriene receptor subtype in human pulmonary artery smooth muscle. *Br J Pharmacol* 137: 1339-1345
  61. Capra V, Nicosia S, Ragnini D, Mezzetti M, Keppler D, Rovati GE (1998) Identification and characterization of two cysteinyl-leukotriene high affinity binding sites with receptor characteristics in human lung parenchyma. *Mol Pharmacol* 53: 750-758
  62. Gauvreau GM, Parameswaran KN, Watson RM, O'Byrne PM (2001) Inhaled leukotriene E(4), but not leukotriene D(4), increased airway inflammatory cells in subjects with atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1495-1500
  63. Lee TH, Woszczek G, Farooque SP (2009) Leukotriene E(4): Perspective on the forgotten mediator. *J Allergy Clin Immunol* 124: 417-421
  64. Ogasawara H, Ishii S, Yokomizo T, Kakinuma T, Komine M, Tamaki K (2002) Characterization of mouse cysteinyl leukotriene receptors mCysLT1 and mCysLT2: differential pharmacological properties and tissue distribution. *J Biol Chem* 277: 18763-18768
  65. Davidson AB, Lee TH, Scanlon PD, Solway J, McFadden ER Jr, Ingram RH Jr, Corey EJ, Austen KF, Drazen JM (1987) Bronchoconstrictor effects of leukotriene E4 in normal and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 135: 333-337
  66. Taylor IK, Wellings R, Taylor GW, Fuller RW (1992) Urinary leukotriene E4 excretion in exercise-induced asthma. *J Appl Physiol* 73: 743-748
  67. Kikawa Y, Miyanomae T, Inoue Y, Saito M, Nakai A, Shigematsu Y, Hosoi S, Sudo M (1992) Urinary leukotriene E4 after exercise challenge in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 89: 1111-1119
  68. Hishinuma T, Suzuki N, Aiba S, Tagami H, Mizugaki M (2001) Increased urinary leukotriene E4 excretion in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 144: 19-23
  69. Nakamura H, Hishinuma T, Suzuki N, Chiba S, Tsukamoto H, Takabatake M, Sawai T, Mitomo T, Inoue H, Matsumoto F, Mizugaki M (2001) Difference in urinary 11-dehydro TXB2 and LTE4 excretion in patients with rheumatoid arthritis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65: 301-306
  70. Melo RE, Solé D, Naspitz CK (2003) Exercise-induced bronchoconstriction in children: montelukast attenuates the immediate-phase and late-phase responses. *J Allergy Clin Immunol* 111: 301-307
  71. Richter K, Jörres RA, Magnussen H (2000) Efficacy and duration of action of the antileukotriene zafirlukast on cold air-induced bronchoconstriction. *Eur Respir J* 15: 693-699
  72. Rorke S, Jennison S, Jeffs JA, Sampson AP, Arshad H, Holgate ST (2002) Role of cysteinyl leukotrienes in adenosine 5'-monophosphate induced bronchoconstriction in asthma. *Thorax* 57: 323-327
  73. Camargo CA Jr, Smithline HA, Malice MP, Green SA, Reiss TF (2003) A randomized controlled trial of intravenous montelukast in acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 528-533
  74. Park JS, Chang HS, Park CS, Lee JH, Lee YM, Choi JH, Park HS, Kim LH, Park BL, Choi YH, Shin HD (2005) Association analysis of cysteinyl-leukotriene receptor 2 (CYSLTR2) polymorphisms with aspirin intolerance in asthmatics. *Pharmacogenet Genomics* 15: 483-492
  75. Kim SH, Yang EM, Park HJ, Ye YM, Lee HY, Park HS (2007) Differential Contribution of the CYSLTR1 Gene in Patients with Aspirin Hypersensitivity. *J Clin Immunol* 27: 613-619
  76. Arriba-Mendez S, Sanz C, Isidoro-García M, Davild I, Laffond E, Horeno E, Avila C, Lorente F (2006) 927T>C polymorphism of the cysteinyl-leukotriene type-1 receptor (CYSLTR1) gene in children with asthma and atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 17: 323-328
  77. Hao L, Sayers I, Cakebread JA, Barton SJ, Beghe B, Holgate ST, Sampson AP, Holloway JW (2006) The cysteinyl-leukotriene type 1 receptor polymorphism 927T/C is associated with atopy severity but not with asthma. *Clin Exp Allergy* 36: 735-741
  78. Sanz C, Isidro-García M, Davila I, Moreno E, Laffond E, Lorente F (2006) Analysis of 927T> C CYSLTR1 and -444A > C LTC4S polymorphisms in patients with asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 16: 331-337
  79. Pillai SG, Cousens DJ, Barnes AA, Buckley PT, Chiano MN, Hosking LK, Cameron LA, Fling ME, Foley JJ, Green A, Sarau HM, Schmidt DB, Sprinkle CS, Blumenthal MN, Vestbo J, Kennedy-Wilson K, Wixted WE, Wagner MJ, Anderson WH, Ignar DM (2004) A coding polymor-

- phism in the CYSLT2 receptor with reduced affinity to LTD4 is associated with asthma. *Pharmacogenetics* 14: 627-633
80. Fukai H, Ogasawara Y, Migita O, Koga M, Ichikawa K, Shibasaki M (2004) Association between a polymorphism in cysteinyl leukotriene receptor 2 on chromosome 13q14 and atopic asthma. *Pharmacogenetics* 14: 683-690
  81. Kim SH, Choi JH, Holloway JW, Suh CH, Nahm DH, Ha EH, Park CS, Park HS (2005) Leukotriene-related gene polymorphisms in patients with aspirin-intolerant urticaria and aspirin-intolerant asthma: differing contributions of ALOX5 polymorphism in Korean population. *J Korean Med Sci* 20: 926-931
  82. Nagata M, Saito K (2003) The roles of cysteinyl leukotrienes in eosinophilic inflammation of asthmatic airways. *Int Arch Allergy Immunol* 131: 7-10
  83. Ohshima N, Nagase H, Koshino T, Miyamasu M, Yamaguchi M, Hirai K (2002) A functional study on CysLT(1) receptors in human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 129: 67-75
  84. Thivierge M, Stankova J, Rola-Pleszczynski M (2001) IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. *J Immunol* 167: 2855-2860
  85. Mellor EA, Maekawa A, Austen KF, Boyce JA (2001) Cysteinyl leukotriene receptor 1 is also a pyrimidnergic receptor and is expressed by human mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7964-7969
  86. Shirasaki H, Kanaizumi E, Watanabe K, Matsui T, Sato J, Narita S, Rautiainen M, Himi T (2002) Expression and localization of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in human nasal mucosa. *Clin Exp Allergy* 32: 1007-1012
  87. Sousa AR, Parikh A, Scadding G, Corrigan CJ, Lee TH (2002) Leukotriene-receptor expression on nasal mucosal inflammatory cells in aspirin-sensitive rhinosinusitis. *N Engl J Med* 347: 1493-1499
  88. Cyrus CB, Yang B, McCaffrey TV (1998) Leukotrienes C4 and D4 increase the ciliary beat frequency in human upper airway mucosa *in vitro*. *Otolaryngol Head Neck Surg* 118: 472-477
  89. Underwood DC, Osborn RR, Newsholme SJ, Torphy TJ, Hay DW (1996) Persistent airway eosinophilia after leukotriene (LT) D4 administration in the guinea pig: modulation by the LTD4 receptor antagonist, pranlukast, or an interleukin-5 monoclonal antibody. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 850-857
  90. Pedersen KE, Bochner BS, Udem BJ (1997) Cysteinyl leukotrienes induce P-selectin expression in human endothelial cells via a non-CysLT1 receptor-mediated mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 281: 655-662
  91. Hay DWP (1997) Pharmacology of leukotriene receptor antagonists. *Chest* 111: 35S-45S
  92. Figueroa DJ, Borish L, Baramki D, Philip G, Austin CP, Evans JF (2003) Expression of cysteinyl leukotriene synthetic and signalling proteins in inflammatory cells in active seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 33: 1380-1388
  93. Corrigan C, Mallett K, Ying S, Roberts D, Parikh A, Scadding G, Lee T (2005) Expression of the cysteinyl leukotriene receptors cysLT(1) and cysLT(2) in aspirin-sensitive and aspirin-tolerant chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 115: 316-322
  94. Massoumi R, Sjölander A (2007) The role of leukotriene receptor signalling in inflammation and cancer. *Scientific World Journal* 7: 1413
  95. Zhang WP, Hu H, Zhang L, Ding W, Yao HT, Chen KD, Sheng WW, Chen Z, Wei EQ (2004) Expression of cysteinyl leukotriene receptor 1 in human traumatic brain injury and brain tumors. *Neurosci Lett* 363: 247-251
  96. Hu H, Chen G, Zhang JM, Zhang WP, Zhang L, Ge QF, Yao HT, Ding W, Chen Z, Wei EQ (2005) Distribution of cysteinyl leukotriene receptor 2 in human traumatic brain injury and brain tumors. *Acta Pharmacol Sin* 26: 685-690
  97. Kamohara M, Takasaki J, Matsumoto M, Matsumoto Si, Saito T, Soga T, Matsushime H, Furuichi K (2001) Functional characterization of cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor on human coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 1088-1092
  98. Bläsius R, Weber RG, Lichter P, Ogilvie A (1998) A novel orphan G protein-coupled receptor primarily expressed in the brain is localized on human chromosomal band 2q21. *J Neurochem* 70: 1357-1365
  99. Lecca D, Trincavelli ML, Gelosa P, Sironi L, Ciana P, Fumagalli M, Villa G, Verderio C, Grumelli C, Guerrini U, Tremoli E, Rosa P, Cuboni S, Martini C, Buffo A, Cimino M, Abbraccio MP (2008) The recently identified P2Y-like receptor GPR17 is a sensor of brain damage and a new target for brain repair. *PLoS One* 3:e3579

## Cysteinyl leukotrienes and their receptors

Karolina Wódz-Naskiewicz<sup>✉</sup>, Rafał Pawliczak

Department of Immunopathology, Chair of Allergology, Immunology and Dermatology, Medical University of Lodz, Pomorska 251, 92-213 Łódź, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: kwodz@csk.umed.lodz.pl

**Key words:** cysteinyl leukotriene, CYSLTR1, CYSLTR2, GPR17, bronchial asthma

### ABSTRACT

Cysteinyl leukotrienes (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) have a proinflammation effect, such as contraction of blood vessels smooth muscle and the respiratory tract, chemotaxis of proinflammatory cells increased endothelium cells permeability and mucus secretion. They are lipid mediators playing an important part in the pathophysiology of bronchial asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, urticaria, cardiovascular system disorders and tumors. They act through at least four receptors from the rhodopsin gene family, lying in the area of GPCR genes superfamily – CYSLTR1, CYSLTR2, GPR17 and receptor for LTE<sub>4</sub> (CYSLT<sub>E</sub>R). Their location, apart from small exceptions, is differentiated and typical for tissues. The highest CYSLTR1 expression was stated in the spleen, peripheral blood leucocytes, interstitial lung macrophage and smooth muscle cells. CYSLTR2 shows highest expression in the hearth, adrenal glands, placenta, spleen and peripheral blood leucocytes, and somewhat smaller in the brain. Biochemical and pharmacological study and the analysis of sequences have shown that all three types of receptors belong to the group of 7-transmembrane receptors – GPCR. The CYSLTR1 excitation power is distributed: LTD<sub>4</sub> > LTC<sub>4</sub> > LTF<sub>4</sub>, and CYSLTR2 LTC<sub>4</sub> = LTD<sub>4</sub> > LTE<sub>4</sub>. Cysteinyl leukotrienes receptors are coupled with the G<sub>q/11</sub> proteins and signal path leading to phosphatidylinositol hydrolysis (PI) and mobilization of intracellular calcium. These receptors are *in vivo* coupled with the PTX-sensitive G<sub>γo</sub> protein or both G proteins. CYSLTR1 increases the metabolism of PI and intracellular calcium, activates MAPK kinases, induces differentiation and proliferation of cells, chemotaxis, actin reorganization, release of inflammation mediators and regulation of hematopoietic stem cells. CYSLTR2 also increases the concentration of intracellular calcium, stimulates the release of IL-8 and increases expression of early genes. It is connected to thrombosis, vessel damage, inflammation process and cell death. The existence of new, nuclear, localization of CYSLTR and coexistence with other membrane receptors is postulated. It is probable that they can crate homo- or heterodimers. This indicates the existence of new, previously not known actions of, cysteinyl leukotrienes and their receptors.

# Kalretikulina – budowa, lokalizacja komórkowa oraz proponowane funkcje u zwierząt i roślin

Marta Lenartowska<sup>1,✉</sup>

Jakub Walczewski<sup>1,§</sup>

Robert Lenartowski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Biologii Rozwoju, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń  
<sup>2</sup>Zakład Genetyki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

<sup>✉</sup>Pracownia Biologii Rozwoju, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; tel.: (56) 611 49 97, e-mail: mlenart@umk.pl

<sup>§</sup>autor był studentem II roku studiów II stopnia na kierunku biotechnologia Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMK

Artykuł otrzymano 6 maja 2009 r.  
Artykuł zaakceptowano 28 lipca 2009 r.

**Słowa kluczowe:** kalretikulina, komórka zwierzęca, komórka roślinna, białko opiekuńcze, homeostaza Ca<sup>2+</sup>

**Wykaz skrótów:** BiP – białko opiekuńcze siateczki śródplazmatycznej; CNX – kalneksyna; CRT – gen kalretikuliny; CRT – białko kalretikulina; ER – siateczka śródplazmatyczna; ERp57 – białko opiekuńcze ER; NLS – sygnał lokalizacji jądrowej; PB – ciało białkowe; PDI – izomeraza dwusiarczków białkowych; SR – siateczka sarkoplazmatyczna

**Podziękowanie:** Artykuł powstał w trakcie realizacji projektu badawczego Nr N303 023 32/1034 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

## STRESZCZENIE

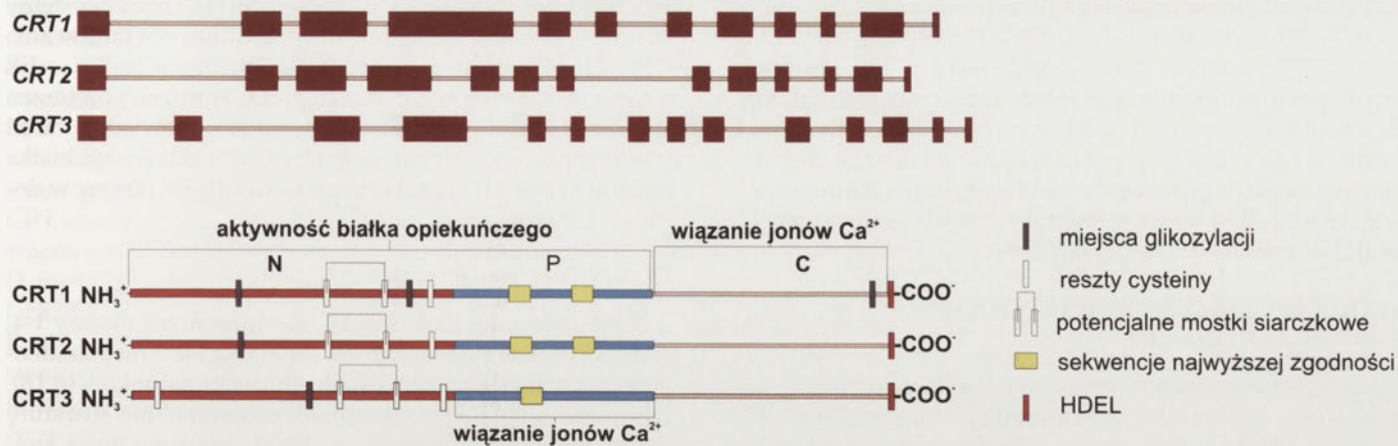
Kalretikulina (CRT) jest powszechnie występującym białkiem wiążącym jony Ca<sup>2+</sup> w siateczce śródplazmatycznej (ER) komórek eukariotycznych. Zachowana w toku ewolucji struktura homologów CRT występujących u różnych gatunków zwierząt i roślin dowodzi istotnej roli tego białka w funkcjonowaniu żywych komórek. Lokalizacja CRT została potwierdzona w różnych przedziałach komórki, co sugeruje jej udział w wielu procesach zachodzących zarówno w ER, jak i poza tym organellum. Jednak podstawowe funkcje przypisane CRT – regulacja homeostazy Ca<sup>2+</sup> i właściwości białka opiekuńczego w świetle ER – wydają się być kluczowe dla wyjaśnienia mnogości funkcji proponowanych dla CRT. Pomimo iż roślinna CRT ma podobną budowę i właściwości w porównaniu do homologu zwierzęcego, wiedza na temat poziomu syntezy i fizjologicznej roli tego białka u roślin jest wciąż fragmentaryczna. Dlatego w tej pracy koncentrujemy się głównie na omówieniu właściwości biochemicznych i proponowanych funkcji dla roślinnej CRT.

## WPROWADZENIE

CRT jest białkiem o sekwencji zachowanej w ewolucji występującym powszechnie w komórkach eukariotycznych, z wyjątkiem erytrocytów ssaków. Obecności CRT nie stwierdzono dotąd w komórkach drożdży i u *Prokaryota*. W 1974 roku Ostwald i MacLennan wyizolowali z mięśni szkieletowych królika białko charakteryzujące się wysokim powinowactwem do jonów Ca<sup>2+</sup>, sugerując że może być ono wewnątrzplazmatycznym białkiem siateczki sarkoplazmatycznej (SR) [1]. Dalsze badania ujawniły, że CRT jest głównym białkiem wiążącym jony Ca<sup>2+</sup> w SR mięśni gładkich i ER tkanki niemięśniowej [2]. Nazwa „kalretikulina” została zaproponowana w 1989 roku przez Smitha i Kocha jako najtrafniej charakteryzująca białko o aktywności wiązania jonów Ca<sup>2+</sup> i lokalizacji w ER/SR [3]. CRT została zidentyfikowana także u roślin. W 1991 roku Allen i Tiwari odkryli białko wiążące przeciwciała anti-CRT w ziarnach pyłkowych gruszy [4]. Następnie oczyszczono białko podobne do CRT z liści szpinaku [5] i określono sekwencję cDNA dla CRT u *Arabidopsis* [6]. Szybko przekonano się, że CRT występuje powszechnie u *Eucaryota*. Sekwencje cDNA CRT scharakteryzowano dla wielu organizmów (pierwotniaków, owadów, nicieni oraz roślin wyższych i kręgowców), a białko CRT zlokalizowano w różnych przedziałach komórki. Zachowana w toku ewolucji budowa CRT oraz wysoka międzygatunkowa homologia sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej świadczy o istotnym znaczeniu tego białka w funkcjonowaniu żywych komórek. Obecnie uważa się, że CRT jest białkiem wielofunkcyjnym ze względu na domenową strukturę, zmiany w poziomie syntezy w odpowiedzi na bodźce wewnątrzkomórkowe i zewnętrzne oraz bezpośrednie oddziaływania z innymi białkami [7]. Jednak dwie główne i zarazem niekwestionowane funkcje CRT, to regulacja wewnątrzkomórkowej homeostazy Ca<sup>2+</sup> i rola białka opiekuńczego na szlaku kontroli jakości nowo syntetyzowanych peptydów w ER.

## GENY CRT U ZWIERZĄT I ROŚLIN

Powszechnie uważano, że CRT jest genem obecnym w pojedynczej kopii, zbudowanym z 9 eksonów i odpowiadającej im liczbie intronów, na matrycy którego powstaje mRNA, nie podlegający alternatywnemu składaniu. U człowieka i myszy gen CRT odnaleziono odpowiednio na 19 i 8 chromosomie, a długość zmapowanych sekwencji określono na 3,6 i 4,6 kbp [8]. Porównanie genów CRT występujących u obu gatunków wykazało ponad 70% zgodność sekwencji nukleotydowej, z wyjątkiem intronów 3 i 6. Dogmat, że CRT kodowana jest przez pojedynczy gen nie jest już aktualny, gdyż ujawniono obecność nie jednego, lecz dwóch genów CRT w genomach człowieka i myszy (*CRT1* i *CRT2*), a na podstawie analizy sekwencji EST (ang. *Expressed Sequence Tag*) potwierdzono obecność obu homologów CRT także u szczura i świni [9]. Pomimo niewielkich różnic między *CRT1* i *CRT2*, oba geny przed-

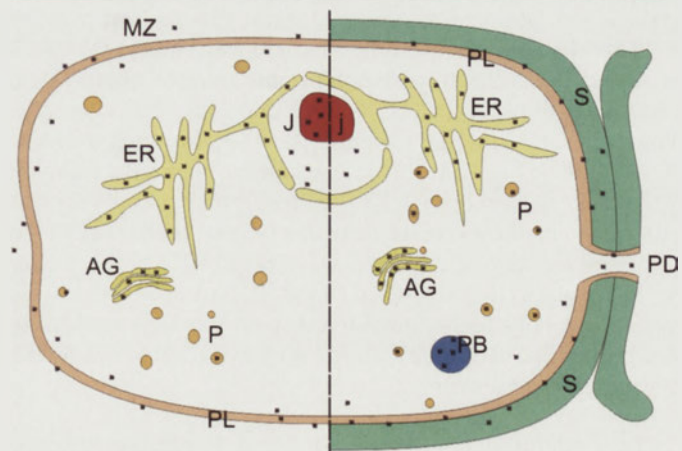


Rycina 1. Schemat budowy genów CRT i białek CRT zidentyfikowanych w *Arabidopsis thaliana*. Opracowano na podstawie danych literaturowych cytowanych w tekście.

stawiają odmienne tkankowo wzory ekspresji i kodują białka o nieco innych właściwościach. Gen *CRT1* podlega konstytutywnej ekspresji we wszystkich badanych tkankach, podczas gdy *CRT2* swoistej ekspresji w jądrach samców, co może świadczyć o funkcjonalnej specyfice obu homologów. Gen *CRT2* u człowieka położony jest na tym samym chromosomie co *CRT1*, zawiera również 9 eksonów, lecz jest znacznie dłuższy (17 kpz). Wysoki stopień zgodności sekwencji nukleotydowej *CRT1* i *CRT2* sugeruje wspólne pochodzenie obu genów i możliwość zajścia wczesnej duplikacji genu *CRT* u ssaków. Autorzy dowiedli także istnienia dwóch różnych form mRNA genów *CRT* u człowieka (1,95 kpz dla *CRT1* i 1,3 kpz dla *CRT2*), których obecność może być wynikiem alternatywnego składania pierwotnego transkryptu lub niezależnej transkrypcji obu genów podlegających tkankowo-specyficznej ekspresji [9].

W odróżnieniu od CRT występującej u zwierząt, białko roślinne jest kodowane przez rodzinę genów o małej liczbie kopii, którym odpowiada kilka izoform białka wykrytych u różnych gatunków roślin [10-17]. U kukurydzy i jęczmienia zidentyfikowano 2 homologu genu *CRT*, natomiast u ryżu i *Arabidopsis* aż 3 i dodatkowo jeden przypuszczalny pseudogen [16]. Na podstawie badań filogenetycznych zaproponowano podział roślinnych *CRT/CRT* na dwie grupy homologów genu/izoforn białka [16]. Do pierwszej zalicza się podobne do siebie *CRT1/CRT1* i *CRT2/CRT2*, powstałe prawdopodobnie przez wczesną duplikację genu ancestralnego jeszcze przed rozdzieleniem się linii roślin jedno- i dwuliściennych. Drugą grupę reprezentuje *CRT3/CRT3*, charakteryzujący się najwyższym stopniem międzygatunkowej homologii. U *Arabidopsis* geny *CRT2* i *CRT3* leżą na chromosomie 1 blisko siebie w loci Atlg09210 i Atlg08450, natomiast *CRT1* znajduje się w pewnym oddaleniu od nich (locus Altg156340), na tym samym chromosomie. Badania sekwencji nukleotydowej genów *CRT Arabidopsis*, kukurydzy i ryżu wykazały, że ich struktura jest podobna. Geny *CRT1* i *CRT2* kukurydzy i ryżu zawierają 14 eksonów, podobnie jak *CRT3* u wszystkich trzech gatunków, natomiast homologu *CRT1* i *CRT2 Arabidopsis* składają się odpowiednio z 12 i 13 eksonów. Mniejsza liczba eksonów w genach *CRT1* i *CRT2* u *Arabidopsis* sugeruje ich możliwe fuzje w obrębie

eksonów 4-6, których prawdopodobnym wynikiem było wydłużenie eksonu 4 w *CRT1* oraz 5 w *CRT2*. Z tego powodu stopień homologii wśród genów *CRT* jest wyższy dla *CRT3* u różnych gatunków roślin, przy czym eksony 2-10 i 14 są silniej zachowane w ewolucji niż eksony 1 i 11-13, które wykazują większe różnice w sekwencji nukleotydowej. Podobnie jak u zwierząt, roślinne homologu *CRT* przedstawiają odmienne tkankowo wzory ekspresji i kodują nieco inne izoformy białka CRT [16]. Ostatni ekson genów *CRT* odpowiada retencyjnej sekwencji sygnałnej dla ER (zwykle KDEL u zwierząt i HDEL u roślin, *D. melanogaster* i *C. elegans*), która może być wycinana w wyniku alternatywnego składania pierwotnego transkryptu [8,16]. Istnienie alternatywnych form mRNA genów *CRT* może wyjaśniać udział CRT w procesach odbywających się w ER i poza tym organellum. Promotory genów *CRT* zawierają szereg potencjalnych miejsc regulatorowych typowych dla genów transkrybowanych z udziałem polimerazy II (kasety TATA i sekwencje CCAAT), obszarów bogatych w pary GC, miejsc wiązania białek AP-1 i Sp1, sekwencji G-box oraz kaset dla AP-2 i H4TF-1 [8,13]. Doświadczalnie potwierdzono wiązanie tylko nielicznych



Rycina 2. Schemat ilustrujący porównanie lokalizacji CRT w komórkach zwierzęcych (lewa strona) i roślinnych (prawa strona). Objaśnienia symboli: AG – aparat Golgiego, ER – siateczka śródplazmatyczna, J – jądro komórkowe, j – jąderko, MZ – macierz zewnątrzkomórkowa, P – pęcherzyki, PD – plazmodesma, PB – ciało białkowe, PL – błona komórkowa, S – ściana komórkowa. Opracowano na podstawie danych literaturowych cytowanych w tekście.

czynników transkrypcyjnych do promotora CRT: Nkx2.5, COUP-TF1, GATA6, Evi-1, MEF2C i PPAR $\gamma$  (regulacja ekspresji CRT podczas rozwoju serca w okresie embrionalnym i postnatalnym oraz podczas różnicowania komórek tkanki tłuszczowej) [7]. Ekspresja genów CRT może być regulowana przez różne czynniki, takie jak szok cieplny, metale ciężkie, zaburzenia N-glikozylacji i homeostazy Ca $^{2+}$  oraz indukowana w stymulowanych limfocytach T i podczas zakażeń wirusowych [7,8].

#### WARIANTY BIAŁKA CRT WYSTĘPUJĄCE U ZWIERZĄT I ROŚLIN

CRT jest niewielkim, kwaśnym białkiem o masie cząsteczkowej 46 kDa u kręgowców, zbudowanym z około 400 (wariant CRT1) [7,8,18,19] lub 380-384 reszt aminokwasowych (wariant CRT2, odpowiednio u myszy i człowieka) [9]. U roślin masa cząsteczkowa CRT waha się od 50 kDa u *Ginkgo biloba* do 60 kDa u *Nicotiana* [20,21]. Typową cechą białka jest strefowa budowa przejawiająca się obecnością trzech zróżnicowanych pod względem struktury i funkcji domen (N, P, C) oraz obecność N-końcowej sekwencji sygnałowej dla ER i C-końcowego sygnału retencji w świetle ER [7,8]. CRT u roślin ma podobną budowę i właściwości biochemiczne w porównaniu do homologu zwierzęcego [16,22]. Wariant CRT2 u ssaków posiada odmienny sygnał retencyjny w domenie C u człowieka i myszy, odpowiednio RNEL lub QGEL [9], natomiast u roślin stwierdzono różnice w budowie sekwencji sygnałowej zlokalizowanej w domenie N dla wariantu CRT3 [16].

CRT zawiera jedno lub więcej potencjalnych miejsc N-glikozylacji [8]. W przeciwieństwie do CRT występującej u zwierząt, białko odnalezione u roślin jest powszechnie glikozylowane, a proces ten wydaje się być gatunkowo i tkankowo swoisty. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej CRT wykazała obecność zachowanego w ewolucji miejsca glikozylacji występującego w pozycji 32 domeny N-końcowej białka u większości gatunków roślin [23]. Dodatkowe miejsca glikozylacji w tym samym regionie występują u *Arabidopsis*, *Ricinus* i *Nicotiana* [13,16,23,24]. Dowiedziano też istnienia różnic w stopniu glikozylacji między CRT1 i dwoma pozostałymi wariantami białka. W CRT1 u *Arabidopsis* odkryto trzy potencjalne miejsca glikozylacji, natomiast w CRT2 i CRT3 tylko jedno [16]. Znaczenie glikozylacji CRT nie jest zupełnie jasne, aczkolwiek jej efektem może być redystrybucja wariantów białka do różnych przedziałów komórki. CRT stanowi potencjalny substrat dla kinaz białkowych, w tym dla kinazy białkowej C, co sugeruje możliwość regulacji aktywności CRT przez procesy fosforylacji/defosforylacji [8,19]. Wyjątkową cechą CRT wyizolowanej z liści szpinaku jest fosforylacja przez kinazę białkową CK2 *in vitro* [25], czego nie stwierdzono dla białka występującego u zwierząt.

Trzy zdefiniowane domeny CRT są w różnym stopniu zachowywane w toku ewolucji. Najwyższa zgodność sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej występuje w domenie N, natomiast najniższa homologia obserwowana jest w domenie C dojrzałego polipeptydu [8,26]. Warianty CRT odnalezione u zwierząt i roślin zachowują wysoką zgodność tzw. typowych sekwencji, decydujących o właściwościach

biochemicznych białka. Należą do nich: (1) 3 reszty cysteiny obecne w domenie N, istotne dla prawidłowego fałdowania CRT, (2) sekwencja sygnałowa dla lokalizacji białka w ER obecna w domenie N, (3) dwa ciągi trzykrotnych powtórzeń sekwencji zlokalizowane w domenie P, odpowiedzialne za wysokie powinowactwo do jonów Ca $^{2+}$  i aktywność białka opiekuńczego, (4) sygnał retencji w świetle ER obecny w domenie C [9,16].

#### DOMENA N

Globularna domena N jest kodowana przez eksony 1-4, stanowi prawie połowę cząsteczki białka i jest niemal identyczna u wszystkich przebadanych dotąd gatunków [8,18]. Obejmuje około 180 reszt aminokwasowych, ma strukturę antyrównoległej harmonijki i zawiera zbliżone ilości aminokwasów zasadowych i kwaśnych [18]. Pierwotny transkrypt CRT zawiera na N-końcu hydrofobową sekwencję decydującą o kotranslacyjnym transporcie białka do ER [8,26]. W białku człowieka odcinek ten liczy 17 reszt aminokwasowych [27]. Domena N zawiera miejsca wiązania dla polipeptydów i oligosacharydów, które wraz z podobnymi regionami zlokalizowanymi w domenie P decydują o właściwościach białka opiekuńczego [7]. Jednak molekularna charakterystyka tych miejsc i wiązanych przez nie substratów jest wciąż mało poznana. W domenie N dojrzałej cząsteczki CRT zlokalizowane są 3 reszty cysteiny, których położenie jest zachowane w ewolucji u zwierząt i roślin [16]. Dwie z nich tworzą wiązanie dwusiarczkowe istotne dla właściwego fałdowania tego regionu białka. W regionie N-końcowym zlokalizowane są także potencjalne miejsca glikozylacji i fosforylacji oraz cztery reszty histydynowe umożliwiające białku wiązanie jonów Zn $^{2+}$  [8,26]. Ponadto, domena N posiada zdolność oddziaływania z domeną wiążącą DNA receptora glukokortykoidowego *in vitro*, RNA wirusa różyczki i białkami ER: ERp57 i izomerazą dwusiarczków białkowych (PDI) [7,8] oraz zdolność wiązania podjednostki  $\alpha$ -integrzyn, rodziny białek błonowych pośredniczących w adhezji komórkowej oraz transdukcji sygnałów w poprzek błony cytoplazmatycznej [26,27]. Sugeruje się, że specyficzne oddziaływania N-końcowego regionu CRT z innymi białkami są regulowane przez wiązanie jonów Ca $^{2+}$  w C-końcowej domenie CRT [8].

#### DOMENA P

Bogata głównie w reszty proliny, seryny i treoniny domena centralna jest kodowana przez eksony 5-7 i obejmuje region od około 181 do 290 reszty aminokwasowej w cząsteczce CRT [8,18]. Zawiera dwa ciągi trzykrotnych powtórzeń sekwencji, które są zachowane w ewolucji, ale nie identyczne u zwierząt i roślin. Przypuszcza się, że powtórzenia tych sekwencji są odpowiedzialne za wysokie powinowactwo domeny P do jonów Ca $^{2+}$  oraz warunkują aktywność białka opiekuńczego. W zwierzęcych homologach CRT sekwencje najwyższej zgodności dla tych powtórzeń są bardzo podobne: „PXXIXDPDAXKPEDWD” dla ciągu I oraz „GXWXP-PXIXNPXYX” dla ciągu II w CRT1 [8]. Nie wiadomo czy nieznaczące różnice występujące w obrębie tych sekwencji w izoformie CRT2 mają wpływ na oddziaływania CRT z fałdowanym peptydem. Porównanie zestawień 18 sekwencji roślinnych CRT wykazało, że sekwencje najwyższej zgodności



ciągów I i II są następujące: „PXXIXDPXXKKPEXWDD” i „GXWXAXXIXNPXY” [16]. Ich obecność decyduje prawdopodobnie o unikalnych właściwościach domeny P pod względem aktywności podobnej do lektyn i podobieństwa CRT do innych białek opiekuńczych wiążących jony  $\text{Ca}^{2+}$ , włączając kalneksynę, kalmeginę i calnuc – białko wiążące jony  $\text{Ca}^{2+}$  w cysternach Golgiego [8,18,26]. Region centralny CRT zawiera miejsce wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z dużym powinowactwem (stała dysocjacji około 10  $\mu\text{M}$ ) i małą pojemnością (1 mol  $\text{Ca}^{2+}$ /mol białka) oraz potencjalne miejsce glikozylacji [8]. Ponadto, wykazano silne oddziaływania domeny P z PDI, perforyną i ERp57 [7,8,18]. W domenie P CRT występującej u zwierząt odnaleziono prawdopodobny sygnał lokalizacji jądrowej NLS (ang. *Nuclear Localization Signal*), co sugeruje możliwy eksport białka do jądra komórkowego [19]. Sekwencji NLS nie odnaleziono dotąd w homologach roślinnych CRT [16].

#### DOMENA C

Jest najbardziej zmiennym regionem CRT (od około 291 do 400 reszty aminokwasowej), kodowanym przez 2 ostatnie eksony i obfitującym w ujemnie naładowane aminokwasy, co nadaje domenie C silnie kwaśny charakter [18]. Domena C zawiera specyficzną sekwencję sygnałową HDEL/KDEL, odpowiedzialną za ukierunkowany transport i retencję CRT w świetle ER oraz miejsce wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z dużą pojemnością (ponad 25 moli  $\text{Ca}^{2+}$ /mol białka), lecz niskim powinowactwem (stała dysocjacji około 2 mM), [8,18,26]. Wiązanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w domenie C reguluje aktywność oddziaływać pozostałych domen CRT z białkami, takimi jak PDI i ERp57 oraz z innymi białkami opiekuńczymi i stabilizuje czwartorzędową strukturę CRT [26]. W regionie C-końcowym zawarte są potencjalne miejsca glikozylacji i fosforylacji dla kinazy kazeinowej typu 2 oraz miejsca wiązania czynników IX i X [8,15,26].

#### LOKALIZACJA KOMÓRKOWA I FUNKCJE CRT U ZWIERZĄT

CRT odnaleziono we wszystkich typach komórek zwierzęcych poza erytrocytami ssaków i zasadniczo we wszystkich, metabolicznie aktywnych organellach komórkowych. Głównym miejscem lokalizacji białka jest wnętrze ER, gdzie CRT pełni funkcję białka opiekuńczego oraz regulatora homeostazy  $\text{Ca}^{2+}$  [7,8,18,19,28-30]. CRT odnaleziono też na powierzchni komórki i w macierzy zewnątrzkomórkowej, gdzie może brać udział w adhezji mineralizacji [7]. Białko to jest wydzielane do krwiobiegu, wiązane w granulach cytotoksycznych limfocytów T i odnajdywane w ślinie kleszczy [8]. Pomimo licznych doniesień dokumentujących zróżnicowaną lokalizację CRT, występowanie białka poza przedziałami komórki uznany za typowe (cysterny ER i struktury Golgiego) wciąż budzi kontrowersje. Jest to zapewne spowodowane koniecznością wyjaśnienia potencjalnej roli CRT w tych nietypowych miejscach lokalizacji. Najbardziej dyskusyjna jest obecność tego białka w jądrze komórkowym i cytoplazmie. CRT odnaleziono na terenie jądra komórkowego ssaków, w tym w otocze jądrowej i jąderku szczura, a także związaną z macierzą jądrową i na powierzch-

ni chromosomów metafazowych [7,8,19,31], co sugeruje zaangażowanie białka w dynamikę chromatyny. Cytoplazmatyczną pulę CRT odnaleziono w liniach komórkowych ssaków [32], natomiast u *Trypanosoma cruzi* białko zlokalizowano zarówno w skondensowanej chromatynie, jak i w cytoplazmie (bez powiązań z jakąkolwiek strukturą komórkową) oraz na powierzchni komórki [33]. Postulowaną obecność CRT w cytoplazmie potwierdza fakt, iż białko posiada zdolność oddziaływania z domeną wiążącą DNA receptora glukokortykoidowego oraz z cytoplazmatycznym ogonem  $\alpha$ -integryny [7,8].

Pierwszą zdefiniowaną cechą CRT była zdolność sekwestracji jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , a przez to aktywny udział w regulacji wewnątrzkomórkowej homeostazy  $\text{Ca}^{2+}$ . Ta unikalna właściwość polipeptydu umożliwia szybką i odwracalną mobilizację jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w odpowiedzi na sygnał. Obecnie uważa się, że CRT spełnia dwie główne funkcje: białka opiekuńczego o aktywności lektyn w stosunku do podlegających fałdowaniu peptydów w ER oraz regulacyjną w kontroli wewnątrzkomórkowej homeostazy  $\text{Ca}^{2+}$  [7,18]. Oprócz tego postuluje się, że CRT moduluje wiele procesów odbywających się poza ER, w tym adhezję komórkową, zależną od integryn sygnalizację z udziałem jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , apoptozę, ekspresję genów wrażliwą na steroidy oraz destabilizację mRNA w warunkach *in vitro* i *in vivo* [7,27,30,34-37]. Sugeruje się także zaangażowanie CRT w odpowiedź immunologiczną i proces nowotworzenia oraz udział w wielu procesach warunkujących wzrost i rozwój organizmu [7].

#### CRT JAKO BIAŁKO OPIEKUŃCZE REZYDUJĄCE W ŚWIETLE ER

ER jest miejscem syntezy (około 30% wszystkich białek komórkowych) i ko- lub po-translacyjnego dojrzewania nowo powstałych peptydów, które oddziałując z obecnymi w ER białkami opiekuńczymi, uzyskują strukturę właściwą dla funkcjonalnych białek [7]. Wyjątkowemu nagromadzeniu pierwotnych peptydów w ER towarzyszy relatywnie wysoki poziom jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , który nie sprzyja procesowi poprawnego ich fałdowania. Pozorny problem niweluje prawdopodobnie stała obecność w ER białek opiekuńczych o wyjątkowej zdolności buforowania środowiska wapniowego. Jednym z nich jest CRT, która w swym działaniu jest podobna do kalneksyny (CNX) – transbłonowego białka ER. Oba białka opiekuńcze wiążą jony  $\text{Ca}^{2+}$  i wykazują zdolność rozpoznawania niesfałdowanych glikoprotein, co decyduje o ich roli w procesie kontroli jakości i wydzielania białek dojrzewających w ER [7,8,18,28,29]. Wiadomo, że oba białka opiekuńcze w swoistym „cyklu kontroli jakości” biorą udział w procesie fałdowania elementów szlaku fosfoinozytowego (z receptorem  $\text{IP}_3$  w błonie ER włącznie) oraz białek SERCA (błonowych pomp transportujących jony  $\text{Ca}^{2+}$  do światła ER), a także wielu innych białek, takich jak: kanały jonowe, receptory błonowe, integryny i liczne białka transportujące [8]. Udowodniono, że w przypadku braku aktywnej CRT i CNX wzmożony jest eksport nieprawidłowo sfaldowanych białek poza ER [38]. CRT może wiązać i następnie uwalniać nowo syntetyzowany peptyd poprzez grupę węglowodanową (aktywność lektyny) lub dzięki bezpośredniemu oddziaływaniu z fałdowanym

białkiem [7,8,18,28]. Badania kinetyczne wykazały, że CRT wykazuje tendencję do wiązania glikoprotein zawierających jedną cząsteczkę glukozy ( $\text{Glc}_1\text{Man}_0\text{GlcNAc}_2$ ), która jest dla niej ligandem. Białka kierowane tuż po syntezie do wnętrza ER zawierają trzy cząsteczki glukozy ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ), z których pierwsza (zewnątrzna) usuwana jest przez glikozydazę I, a dwie kolejne przez glikozydazę II. Zanim glikozydaza II usunie trzecią (ostatnią) cząsteczkę glukozy, fałdowana glikoproteina jest rozpoznawana i wiązana przez „cykl kontroli jakości CRT/CNX” [39]. Jeśli białko jest poprawnie sfałdowane, następuje usunięcie ostatniej cząsteczki glukozy i zwolnienie oddziaływania białka opiekuńczego z fałdowanym peptydem, które może opuścić ER. Jeśli jednak fałdowane białko nie osiągnęło natywnej struktury, staje się substratem dla UDP-glikozylotransferazy, która ponownie odtwarza ligand dla CRT. Jeśli mimo pewnej ilości cykli wiązania do CRT/CNX glikoproteina nie uzyska prawidłowej konformacji, aktywność specyficznej mannozydazy determinuje skierowanie jej do degradacji. Nie potwierdzono, że opisany cykl modyfikacji sprzyja procesowi fałdowania białek w ER. Sugeruje się, że CRT i CNX zaangażowane są raczej w zatrzymywanie w świetle ER peptydów niedojrzałych lub błędnie sfałdowanych [40]. Możliwe jest także bezpośrednie oddziaływanie CRT z białkami, które nie są glikoproteinami. Potwierdzono, że CRT wiąże bezpośrednio PDI, ERp57, perforynę, syntetyczny peptyd KLGFFKR oraz domenę wiążącą DNA receptora steroidowego, co kwalifikuje CRT do roli białka opiekuńczego zarówno w relacjach białko-glikoproteina, jak i białko-białko [8]. Pomimo że aktywność białka opiekuńczego w przypadku CRT wydaje się być regulowana stężeniem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  [7,26], jest ona prawdopodobnie niezależna od właściwości buforujących CRT względem tych jonów [41].

#### UDZIAŁ CRT W REGULACJI WEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ HOMEOSTAZY WAPNIOWEJ

Jony  $\text{Ca}^{2+}$  są uniwersalnym czynnikiem regulującym funkcje życiowe komórki, którego stężenie w cytoplazmie ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) jest ściśle kontrolowane. Ponadtoptymalne  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  zaburza przebieg procesów metabolicznych, a wytrącanie wapnia w postaci krystalicznej stanowi zagrożenie dla metabolizmu komórki. Dlatego komórki pozbywają się nadmiaru jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z cytoplazmy poprzez ich magazynowanie w wewnątrzkomórkowych organellach lub wypompowanie poza komórkę drogą aktywnego transportu z udziałem ATP. System błon ER, w świetle których występuje CRT, jest jednym z głównych magazynów wapnia w komórce. Białko to posiada odwracalną zdolność wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i pełni funkcję buforującą w utrzymywaniu ich optymalnego stężenia w świetle ER ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ ) z udziałem pompy wapniowej (ATPazy SERCA) oraz obecnych w błonach ER kanałów wapniowych (receptor inozytolotrifosforanu  $\text{IP}_3\text{R}$  i receptor rianodiny RyR) [8,42]. Dzięki dużej pojemności domeny C względem jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , CRT zapobiega nadmiernemu ich uwalnianiu poza ER i jednocześnie umożliwia ich aktywację, gdy są pożądane w wyższym stężeniu w cytoplazmie.

Całkowite  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  waha się w granicach od 1 do 3 mM lecz większość tej puli wapnia jest cyklicznie wiązana/

uwalniania przez obecne w ER białka opiekuńcze, takie jak: Grp94, BiP, PDI, ERp72 i CRT, pełniące funkcję swoistych magazynów [7,8,28]. Zmiany w poziomie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  mają decydujący wpływ na prawidłowe funkcjonowanie ER, obejmujące syntezę, dojrzewanie i wydzielanie nowo syntetyzowanych peptydów, oddziaływania białek opiekuńczych i ich substratów w ER, aktywację napływu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do ER przez kanały błonowe i uwalnianie ich do cytoplazmy, apoptozę i odpowiedź na warunki stresowe, w tym transkrypcyjną aktywację bądź supresję genów związanych ze stresem metabolicznym [28].  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  w postaci jonowej (niezwiązanej) waha się w granicach 60–400  $\mu\text{M}$ , gdy magazyny są pełne (dwa do trzech rzędów wielkości wyższe w porównaniu z cytoplazmą) oraz 1–50  $\mu\text{M}$ , kiedy są puste. Podczas antagonistycznych stymulacji komórkowych, wydzielanie i gromadzenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez ER wywołuje stałe wahania w ich poziomie w granicach od 400 do 1  $\mu\text{M}$ . Uwalnianie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z ER do cytoplazmy przez  $\text{IP}_3$  obniża ich stężenie w ER do poziomu  $<50 \mu\text{M}$ , czego konsekwencją jest akumulacja niesfałdowanych białek w ER, aktywacja białek opiekuńczych i zahamowanie dróg transportu ER – cysterny Golgiego [8]. Obecne w ER białka opiekuńcze wiążące jony  $\text{Ca}^{2+}$  reagują na niekorzystne zmiany i w warunkach niskiego  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  aktywują napływ tych jonów do światła ER przez pompę wapniową, ATPazę SERCA [42]. Istnieją dowody na to, że CRT obecna w świetle ER oddziałuje z innymi białkami opiekuńczymi oraz niedojrzałymi peptydami w sposób zależny od wapnia [8, 26]. W relatywnie niskim  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  obserwowano wiązanie CRT z PDI w warunkach *in vitro*, czego efektem było obniżenie wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez CRT i spadek aktywności białka opiekuńczego PDI. Przeciwnie, wysokie  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  sprzyja wiązaniu węglowodanów do CRT i promuje dysocjację kompleksu CRT/PDI oraz wzrost aktywności białka opiekuńczego PDI. Oddziaływanie CRT z innym białkiem opiekuńczym ER należącym do rodziny białek PDI – ERp57, a także degradacja CRT i PDI dzięki aktywności proteolitycznej ERp72 przebiega również w sposób zależny od wapnia. W wysokim  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  podczas dysocjacji kompleksu CRT/PDI obserwowano proteolityczną degradację PDI przez ERp57 przy utrzymaniu stabilnej konformacji CRT. Dlatego uważa się, że powstawanie kompleksu CRT/CNX w niższym  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  chroni PDI przed degradacją, natomiast rozpad tego kompleksu w wyższym  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  umożliwia degradację PDI bez wpływu na CRT, która w tych warunkach nie jest wrażliwa na proteolityczną aktywność ERp57. Wzajemne wiązania i dysocjacje białek opiekuńczych rezydujących w ER wydają się być zależne od buforujących względem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  właściwości CRT, co decyduje o tym, że białko to jest uważane za cząsteczkę sygnałową regulującą homeostazę  $\text{Ca}^{2+}$  nie tylko w cytoplazmie, ale także w ER [8,26].

Udział CRT w regulacji funkcji ATPazy SERCA i receptora  $\text{IP}_3$  zdecydowanie potwierdza rolę tego białka w kontroli wewnątrzkomórkowej homeostazy  $\text{Ca}^{2+}$  [8,26,27,42]. Zmiany w poziomie ekspresji CRT obserwowane są podczas rozwoju embrionalnego myszy. U mutantów z delecją genu CRT stwierdzono zaburzenia w rozwoju serca, co w konsekwencji wywołuje letalność zarodków [42]. Brak CRT u transgenicznym myszy prowadzi prawdopodobnie do za-

chwiania homeostazy  $\text{Ca}^{2+}$ , gdyż wiadomo, że białko to moduluje aktywność  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazy2 (SERCA2) w błonie ER/SR i uwalnia jony  $\text{Ca}^{2+}$  z wnętrza organelli poprzez receptor inozytolo-1,4,5-trifosforanowy [27]. Inna hipoteza zakłada, że CRT jako białko opiekuńcze wpływa na proces fałdowania i wewnątrzkomórkowy transport innych białek modulujących homeostazę  $\text{Ca}^{2+}$  istotnych w rozwoju embrionalnym [28]. Jednak u transgenicznym myszy z wyłączonym genem CRT obserwowano jedynie komplikacje w rozwoju serca, które wydają się być wynikiem zaburzonej homeostazy  $\text{Ca}^{2+}$ , a nie dysfunkcji białek opiekuńczych [7]. Ponadto, u myszy z wyciszoną ekspresją CRT nie obserwowano kompensacji braku CRT przez CNX, co sugeruje, że oba białka opiekuńcze, choć współdziałają w cyklu kontroli jakości nowo syntetyzowanych peptydów, mogą przejawiać inne, odmienne właściwości istotne dla prawidłowego przebiegu embriogenezy. Najnowsza hipoteza zakłada, że unikalne właściwości buforujące CRT względem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i związana z tym rola białka w regulacji wewnątrzkomórkowej homeostazy  $\text{Ca}^{2+}$  wydają się być krytyczne dla określenia jego funkcji zarówno w świetle, jak i poza ER [7].

#### UDZIAŁ CRT W ADHEZJI KOMÓRKOWEJ I MODULACJI EKSPRESJI GENÓW

Wyniki badań prowadzonych w celu wyjaśnienia potencjalnej roli CRT poza ER wskazują, że białko to może regulować zależną od integrzyn adhezję komórkową bezpośrednio z cytoplazmy/powierzchni komórki albo w sposób pośredni z wnętrza ER, poprzez modulację ekspresji określonych genów i/lub zależną od integrzyn sygnalizację z udziałem wapnia [7,8,27]. Przy braku aktywności CRT, właściwości adhezyjne integrzyn są tracone i zanika zależny od integrzyn efekt przekazywania sygnałów do wnętrza komórki [27]. Badania *in vitro* wykazały, że CRT wiąże się do sekwencji  $\text{KXFF}^{(K/R)}\text{R}$  syntetycznego peptydu, która jest identyczna z sekwencją występującą w C-końcowej domenie  $\alpha$ -integrzyn. Pojawiły się także doniesienia o zależnym od wapnia oddziaływaniu CRT z cytoplazmatyczną domeną C  $\alpha$ -integrzyn i zależnej od CRT modulacji aktywności tych białek powierzchni komórki. Sugerowany udział CRT w adhezji komórkowej wymagałby obecności tego białka w cytoplazmie. Jakkolwiek niektóre badania potwierdzają cytoplazmatyczną lokalizację CRT [32,33], jest ona wciąż kontrowersyjna. Postuluje się też inną możliwość – regulację adhezji komórkowej przy udziale CRT zlokalizowanej na powierzchni komórki. Wykazano, że CRT może pośredniczyć w rozprzestrzenianiu się komórek na glikozylowanych lamininach, natomiast brak tego białka prowadzi do zaniku zdolności adhezyjnych komórek do fibronektyn i laminin macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez oddziaływania z integrzynami [7,27]. Hipotezę potwierdza fakt odnalezienia CRT na powierzchni plazmolemy [43]. Jednak nie wiadomo, w jaki sposób białko to mogłoby przechodzić z ER do cytoplazmy i na powierzchnię komórki. Przyjęto trzy możliwe scenariusze wyjaśniające potencjalną obecność CRT w cytoplazmie: (1) zakłócenia w ukierunkowanym transporcie białka do ER, których wynikiem może być akumulacja prekursorów CRT w cytoplazmie, (2) translokacja CRT z ER do cytoplazmy po uprzednim odcięciu sekwencji sygnałowej dla lokalizacji w ER, (3) swobodna dyfuzja CRT z ER do cytoplazmy [7]. Niejasny jest też mechanizm eksportu

CRT na powierzchnię komórki. Białko to znajduje się na powierzchni plazmolemy, pomimo iż nie zawiera domeny transbłonowej ani miejsca wiązania GPI (glikozylofosfodyloinozytoli). Niewykluczone, że CRT wykorzystuje w tym przypadku jakąś cząsteczkę adaptorową. Zakłada się też możliwość istnienia wariantów CRT pozbawionych sekwencji retencyjnej dla ER lub takich, w których sekwencja ta jest osłonięta. Jednak najbardziej prawdopodobnym wydaje się eksport CRT na powierzchnię komórki drogą transportu wydzielniczego po uprzedniej proteolitycznej modyfikacji białka w ER [7,27]. Regulacja adhezji komórkowej przez CRT jest też możliwa w sposób pośredni. Wykazano, że CRT może modulować ekspresję lub fosforylację/defosforylację białek zaangażowanych w proces adhezji komórkowej, takich jak winkulina, N-kadheryna,  $\beta$ -katenina i fibronektyna, zmieniając zdolności adhezyjne oraz migracyjne komórek [8,35,44].

Jedną z bardziej kontrowersyjnych funkcji CRT jest jej udział w regulacji ekspresji genów. Wykazano, że CRT może modulować biosyntezę licznych białek, w tym wspomnianych już wcześniej białek zaangażowanych w proces adhezji komórkowej. Ponadto, badania *in vitro* wykazały, że CRT posiada zdolność oddziaływania z domeną wiążącą DNA receptora glukokortykoidowego oraz wiązania czynników transkrypcyjnych zawierających sekwencję  $\text{KXFF}^{(K/R)}\text{R}$ , co blokuje możliwość wiązania ich do DNA [8]. Badania *in vivo* dowiodły, że nadekspresja CRT obniża poziom ekspresji genów aktywowanych poprzez receptory kwasu retinolowego, glukokortykoidów, androgenów oraz receptora witaminy D [7,8]. Zaproponowano, że CRT oddziałując z receptorami steroidowymi, blokuje miejsca ich wiązania do DNA i tym samym hamuje transkrypcję określonego genu. Zgodnie z tą koncepcją, CRT musiałaby opuszczać ER i wędrować do cytoplazmy i/lub jądra komórkowego. Jednak w badaniach, w których wymuszano nadekspresję CRT, nie wykryto obecności białka CRT w jądrze komórkowym i w cytoplazmie, lecz pomimo tego obserwowano zahamowanie ekspresji genu reporterowego [7]. Ponadto, wykazano brak wiązania CRT z receptorami steroidowymi *in vivo* i brak zmian w poziomie ekspresji genu reporterowego aktywowanej przez te receptory po mikroiniekcji CRT do cytoplazmy, tak jak miało to miejsce w przypadku podania białka bezpośrednio do ER. Dlatego przyjęto, że CRT reguluje ekspresję genów raczej ze światła ER. Wówczas białko to mogłoby w sposób pośredni modulować procesy jądrowe, takie jak ekspresja genów, naprawa DNA, eksport molekuł do cytoplazmy oraz fragmentacja DNA w procesie apoptozy [7]. Ponieważ mechanizm tej postulowanej regulacji pozostaje niewyjaśniony, również możliwa wydaje się hipoteza zakładająca obecność CRT w jądrze komórkowym, gdzie białko mogłoby regulować lokalne stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  optymalne dla zdefiniowanych faz cyklu komórkowego (interfaza i okres podziału komórki). Nieliczne, jak dotąd, badania potwierdzają obecność CRT na terenie jądra komórkowego u zwierząt [7,8,19,31].

#### EKSPRESJA CRT, LOKALIZACJA KOMÓRKOWA I PROPONOWANE FUNKCJE CRT U ROŚLIN

CRT powszechnie występuje u roślin wyższych i wykazuje duże podobieństwa w organizacji strukturalnej

i mechanizmie działania w porównaniu z homologiem zwierzęcym [22,45-47]. Znane są sekwencje cDNA dla CRT występującej u *Arabidopsis*, jęczmienia, gruszy, tytoniu, kukurydzy, *Brassica*, *Ricinus*, ryżu i pszenicy [6,10-13,15,17,48-51]. Wzorzec ekspresji genów CRT wydaje się być uniwersalny u przebadanych gatunków roślin. Wysoki poziom wszystkich wariantów białka CRT obserwowano głównie w tkankach liści, korzeni i kwiatów, natomiast zdecydowanie niższy w łodygach kwiatostanowych [14]. Jakkolwiek wielu badaczy obserwuje konstytutywną ekspresję CRT zarówno w tkankach merystematycznych, jak i dojrzałych, istnieją doniesienia o wzmożonej aktywności tego genu w pąkach kwiatowych, młodych liścieniach i liściach, włośnikach korzeniowych oraz w tkankach proliferujących i wydzielniczych [13,14,48]. Indukcja ekspresji genów CRT w tkankach merystematycznych sugeruje udział CRT w podziałach komórkowych, natomiast wysokie poziomy mRNA CRT obserwowane w komórkach aktywnych wydzielniczo wskazują na potencjalną rolę tego białka w syntezie i/lub dojrzewaniu nowo powstałych peptydów. U roślin wykryto obecność kompleksu CRT z innym białkiem opiekuńczym rezydującym w świetle ER – BiP [45,48,52]. Ujawniono, że podwyższona ekspresja CRT prowadzi do akumulacji wolnego BiP, natomiast nadekspresja BiP promuje tworzenie kompleksów BiP-CRT. Akumulacja niesfałdowanych białek w ER skutkuje oddysocjowaniem CRT od kompleksu CRT-BiP i wiązaniem uwolnionego BiP do fałdowanych peptydów, co zapewnia szybką odpowiedź komórki wyprzedzającą syntezę *de novo*. Niesfałdowane białka wiążą się do innego regionu BiP niż CRT, a kompleks BiP-modyfikowany peptyd dysocjuje wraz z hydrolizą ATP, dając wolny BiP i polipeptyd. Jeśli dojrzałe białko nie uzyskuje natywnej struktury, BiP wiąże się z nim ponownie, natomiast w przypadku poprawnie przeprowadzonego procesu fałdowania peptydu BiP wiąże się z CRT obecną w nadmiarze [45]. Koloalkalizację CRT i BiP potwierdzono m.in. w pęcherzykach tapetosomalnych u *Brassica* [53]. Ponieważ CRT występująca u roślin posiada właściwości białka opiekuńczego w świetle ER [12], zaangażowanie roślinnej CRT w procesy syntez i/lub dojrzewania nowo powstałych peptydów w ER jest sugerowane od dawna [12,15,21,48,54].

Poziom ekspresji genów roślinnej CRT jest regulowany przez różne czynniki, m. in. kwas abscysynowy, cytokininy i gibereliny [48,55,56]. Pewne dane wskazują także na udział CRT w odpowiedzi obronnej na atak patogenów [57,58] oraz w percepcji grawitacji [59]. Wiadomo, że w odpowiedziach obu typów pośredniczą jony  $Ca^{2+}$ , możliwe więc, że udział CRT w tych procesach polega na regulacji wewnątrzkomórkowej homeostazy  $Ca^{2+}$ . CRT bierze też udział w odpowiedzi na stres chłodu [60-62], który obniża istotnie poziom transkrypcji tego białka i w którym kluczową rolę odgrywiają kinazy białkowe zależne od wapnia [60]. Sugeruje się, że fosforylacja CRT może decydować o udziale tego białka w transdukcji sygnału stresowego u roślin [15,63]. Wzmocniona ekspresja CRT jest też obserwowana w odpowiedzi na stres osmotyczny [17].

Wszystkie roślinne warianty CRT poznane dotychczas zawierają sekwencję HDEL, która kieruje to białko do światła ER [16]. Jednak poza typową lokalizacją CRT w ER ko-

mórek roślinnych [5,12,21,23,48,54,64-67] obserwowano jej występowanie także poza ER, głównie w cysternach Golgiego i pęcherzykach wydzielniczych [21,23,54,66,67], ale także w cytoplazmie i jądrze komórkowym [12,17,66], wrzecionie podziałowym dzielących się komórek [48] oraz w błonie komórkowej i na powierzchni komórki [23,54]. Możliwość transportu CRT pomiędzy ER i strukturami Golgiego była już dawno sugerowana [23,24,27,68], a lokalizacja tego białka w diktiosomach komórek roślinnych uważana jest obecnie za typową [21,23,54]. Obecność CRT potwierdzono ponadto w tzw. ciałach białkowych PB (ang. *Protein Body*) komórek bielma oraz w pęcherzykach wydzielniczych mezofilu i tkanki kalusowej ryżu [65]. Ostatnie badania wykazały, że białko CRT oraz jego mRNA obecne są w PB występujących w kalusowych komórkach spichrzowych kukurydzy [69]. PB są jedną ze strukturalnych subdomen ER, często spotykanych w komórkach roślinnych. Autorzy sugerują, że mRNA CRT jest wybiórczo transportowany do PB, gdzie w wyniku lokalnej syntezy gromadzona jest CRT, która uczestniczy w kierunkowej sekwestracji białek w PB. Według nich hipoteza ta potwierdza, że CRT pełni funkcję białka opiekuńczego także u roślin.

Badania z użyciem transgenicznym roślin wykazały, że CRT może być zaangażowana w mechanizm regulacji homeostazy  $Ca^{2+}$ , gdyż rośliny z nadekspresją CRT żyją dłużej na pożywcze pozbawionej wapnia bez widocznych oznak chlorozy [70]. CRT roślinna, podobnie jak jej homolog zwierzęcy, posiada dwa miejsca wiążące jony  $Ca^{2+}$  [13], a rola tego białka jako czynnika regulującego poziom jonów  $Ca^{2+}$  oraz jego udział w zależnej od wapnia transdukcji sygnałów w procesach regeneracji u roślin są prawdopodobne [15,71]. Ponadto, wydaje się że u roślin to CRT, a nie kalsekwestryna sprawuje nadrzędną rolę w magazynowaniu mobilnej puli wapnia w ER [49,72]. Wyniki tych badań wskazują, że u roślin, podobnie jak u zwierząt, obecna w ER CRT odgrywa kluczową rolę w buforowaniu środowiska wapniowego [70]. Równie istotnym magazynem wapnia w komórkach roślinnych jest wakuola, w której nie odnaleziono, jak dotąd, CRT [64]. Dlatego uważa się, że w wakuoli funkcjonuje odmienny od zdefiniowanego w ER mechanizm sekwestracji jonów  $Ca^{2+}$ . Białko odnaleziono natomiast w plazmodesmach, gdzie prawdopodobnie uczestniczy w komunikacji międzykomórkowej i transporcie [73]. Ponadto, odnalezienie w aktywnych plazmodesmach CRT, aktywny oraz charakterystycznej dla roślin miozyny VIII stało się podstawą do wysunięcia hipotezy, zgodnie z którą buforujące właściwości CRT względem jonów  $Ca^{2+}$  mogą mieć kluczowe znaczenie dla regulacji architektury plazmodesm [74].

#### EKSPRESJA CRT PODCZAS PROCESÓW REPRODUKCYJNYCH U ROŚLIN

Ekspresję genów CRT obserwuje się w organach generatywnych różnych gatunków roślin wyższych, natomiast białko CRT obecne jest w pylnikach podczas mikrosporoogenezy, w rozwijającym się i dojrzałym ziarnie pyłkowym oraz w tkankach somatycznych pylnika, głównie w aktywnym tapetum [14,20,21,53,67,75]. Podwyższony poziom mRNA CRT oraz białka CRT występuje w regionach aperturowych kielkujących *in vitro* ziaren pyłkowych *Haemanthus* [67]. Natomiast badania prowadzone u *Nicotiana*, *Petunia* i *Haeman-*

thus potwierdziły ekspresję CRT w łagiewkach pyłkowych rosnących w warunkach *in vitro* [21,67] i *in vivo* [66,67] oraz w komórkach plemnikowych łagiewek kukurydzy [76]. W łagiewkach pyłkowych CRT odnaleziono zarówno w ER, jak i w diktiosomach, a także w pęcherzykach wydzielniczych, podbłonowej cytoplazmie i w pobliżu błony komórkowej [21,66,67]. Poza wewnątrzkomórkową lokalizacją CRT, miejscem występowania białka była ściana kalozowa w łagiewkach pyłkowych *Petunia* i *Haemanthus* [66,67]. Występowanie CRT w regionach zewnątrzkomórkowych u roślin jest prawdopodobne, gdyż wcześniej potwierdzono ten fakt u zwierząt [7]. Geny CRT podlegają ekspresji również w tkankach słupka roślin okrytonasiennych, zarówno w wyspecjalizowanych komórkach somatycznych szlaku transmisyjnego [66,67,77], jak i w zalążniach [10,14,23,54]. Podwyższony poziom mRNA CRT i obecność białka CRT obserwowano głównie w zalążniach zapylnych słupków, a następnie we wszystkich stadiach rozwojowych zalążka [10,23,54]. U *Arabidopsis* szczególnie wysoką ekspresję CRT wykazywały zalążki we wczesnym stadium embriogenezy [14]. Ponadto, istotny poziom ekspresji CRT potwierdzono w hodowanych *in vitro* zygotach kukurydzy [50], natomiast transkrypty CRT zlokalizowano w dojrzewających nasionach [13,20,23,48].

Nie wiadomo, w jaki sposób CRT uczestniczy w procesach reprodukcyjnych u roślin. Relatywnie wysoki poziom ekspresji CRT w pylniku podczas mikrosporogenezy oraz w kiełkujących ziarnach pyłkowych i rosnących łagiewkach tłumaczy się wzmoczoną aktywnością wydzielniczą mikrospor i tapetum oraz szybkim tempem wzrostu łagiewki pyłkowej. Procesy te wymagają zaangażowania białek opiekuńczych [21]. Obecność CRT w cytoplazmie gametofitu męskiego na granicy plazmolemszcziana komórkowa w kiełkujących ziarnach pyłkowych i rosnących łagiewkach może odzwierciedlać postulowany udział tego białka w kontroli adhezji komórkowej, która jest jednym z kluczowych zjawisk warunkujących wzrost łagiewki pyłkowej na drodze od znamienia do zalążni [21,66,67]. Obserwacje u zwierząt i roślin potwierdzają rolę CRT jako regulatora wewnątrzkomórkowej homeostazy Ca<sup>2+</sup>. Zgodnie z tym nie dziwi szybkie tempo sekwestracji wapnia w komórkach plemnikowych kukurydzy w warunkach podwyższonego stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> [76]. Badania dotyczące dystrybucji CRT w rosnących łagiewkach pyłkowych także sugerują jej udział w sekwestracji i uwalnianiu jonów Ca<sup>2+</sup> w tych komórkach [21,66,67]. Zaangażowanie CRT w regulację szczytowego wzrostu komórek roślinnych postulowano już wcześniej w oparciu o model wierzchołkowego wzrostu włóśników korzeniowych [78]. Biorąc pod uwagę fakty, że (1) w podwierzchołkowym regionie rosnącej łagiewki pyłkowej [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> jest niższe od obserwowanego na jej apikalnym wierzchołku i (2) relatywnie niskie [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> sprzyja polimeryzacji aktyny w regionie podwierzchołkowym umożliwiając transport cargo do rosnącego wierzchołka, należy wziąć pod uwagę możliwość udziału CRT w regulacji lokalnego środowiska wapniowego, optymalnego dla właściwej organizacji i dynamiki aktyny w rosnącej łagiewce pyłkowej [67]. Jak dotąd, nie badano ewentualnej roli CRT w procesie podwójnego zapłodnienia u roślin. Wiadomo, że CRT występuje na powierzchni oocy-

tów myszy, gdzie może być zaangażowana w transdukcję sygnałów podczas fuzji gamet [43], natomiast u roślin potwierdzono obecność tego białka w komórkach plemnikowych kukurydzy [76]. Podwyższony poziom CRT towarzyszący kolejnym stadiom rozwojowym zalążka i dojrzewaniu nasion potwierdza także rolę tego białka w kontroli przebiegu embriogenezy u roślin. Hipoteza zakładająca udział CRT w regulacji wewnątrzkomórkowej homeostazy Ca<sup>2+</sup> podczas oddziaływań komórkowych w procesach reprodukcyjnych u roślin wydaje się niezwykle atrakcyjna z uwagi na to, że wymagają one istnienia mechanizmów precyzyjnej kontroli poziomu jonów Ca<sup>2+</sup> na wszystkich etapach rozmnażania płciowego.

## PIŚMIENICTWO

- Ostwald TJ, MacLennan DH (1974) Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 249: 974-979
- Milner RE, Baksh S, Shemanko C, Carpenter MR, Smillie L, Vance JE, Opas M, Michalak M (1991) Calreticulin, and not calsequestrin, is the major calcium binding protein of smooth muscle sarcoplasmic reticulum and liver endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 266: 7155-7165
- Smith MJ, Koch GLE (1989) Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO J* 8: 3581-3586
- Allen NS, Tiwari SC (1991) Localization of calreticulin, a major calcium binding protein, in plant cells. *Plant Physiol* 96: 42
- Menegazzi P, Guzzo F, Baldan B, Mariani P, Treves S (1993) Purification of calreticulin-like protein(s) from spinach leaves. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 1130-1135
- Huang L, Franklin AE, Hoffman NE (1993) Primary structure and characterization of an *Arabidopsis thaliana* calnexin-like protein. *J Biol Chem* 268: 205-211
- Michalak M, Groenedyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M (2009) Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 417: 651-666
- Michalak M, Corbett EF, Mesaeri N, Nakamura K, Opas M (1999) Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* 344: 281-292
- Persson S, Rosenquist M, Sommarin M (2002) Identification of a novel calreticulin isoform (Crt2) in human and mouse. *Gene* 297: 151-158
- Chen F, Hayes PM, Mulrooney DM, Pan A (1994) Identification and characterization of cDNA clones encoding plant calreticulin in barley. *Plant Cell* 6: 835-843
- Kwiatkowski BA, Zielińska-Kwiatkowska AG, Migdalski A, Kleczkowski LA, Wasilewska LD (1995) Cloning of two cDNAs encoding calnexin-like and calreticulin-like proteins from maize (*Zea mays*) leaves: identification of potential calcium-binding domains. *Gene* 165: 219-222
- Napier RM, Trueman S, Henderson J, Boyce JM, Hawes C, Fricker MD, Venis MA (1995) Purification, sequencing and functions of calreticulin from maize. *J Exp Bot* 46: 1603-1613
- Coughlan SJ, Hastings C, Winfrey R (1997) Cloning and characterization of the calreticulin gene from *Ricinus communis* L. *Plant Mol Biol* 34: 897-911
- Nelson DE, Glaunsinger B, Bohnert HJ (1997) Abundant accumulation of the calcium-binding molecular chaperone calreticulin in specific floral tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 114: 29-37
- Li Z, Komatsu S (2000) Molecular cloning and characterization of calreticulin, a calcium-binding protein involved in the regeneration of rice cultured suspension cells. *Eur J Biochem* 267: 737-745
- Persson S, Rosenquist M, Svensson K, Galvão R, Boss WF, Sommarin M (2003) Phylogenetic analyses and expression studies reveal two distinct groups of calreticulin isoforms in higher plants. *Plant Physiol* 133: 1385-1396

17. Jia XY, Xu CY, Jing RL, Li RZ, Mao XG, Wang JP, Chang XP (2008) Molecular cloning and characterization of wheat calreticulin (CRT) gene involved in drought-stressed responses. *J Exp Bot* 59: 739-751
18. Gelebart P, Opas M, Michalak M (2005) Calreticulin, a Ca<sup>2+</sup>-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 260-266
19. Michalak M, Milner RE, Burns K, Opas M (1992) Calreticulin. *Biochem J* 285: 681-692
20. Nardi MC, Giacomelli E, Dainese P, Fitchette-Laine AC, Faye L, Baldan B, Navazio L, Mariani P (1998) *Ginkgo biloba* expresses calreticulin, the major calcium-binding reticuloplasm in eukaryotic cells. *Bot Acta* 111: 66-70
21. Nardi MC, Feron R, Navazio L, Mariani P, Pierson E, Wolters-Arts M, Knuiman B, Mariani C, Derksen J (2006) Expression and localization of calreticulin in tobacco anthers and pollen tubes. *Planta* 223: 1263-1271
22. Libik M (1998) Kalretikulina – charakterystyka biochemiczna i funkcje w komórkach roślinnych. *Post Biol Kom* 25: 501-509
23. Navazio L, Miuzzo M, Royle L, Baldan B, Varotto S, Merry AH, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM, Mariani P (2002) Monitoring endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic of a plant calreticulin by protein glycosylation analysis. *Biochemistry* 41: 14141-14149
24. Crofts AJ, Leborgne-Castel N, Hillmer S, Robinson DG, Phillipson B, Carlsson LE, Ashford DE, Denecke J (1999) Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde bulk flow. *Plant cell* 11: 2233-2247
25. Baldan B, Navazio L, Friso A, Mariani P, Meggio F (1996) Plant calreticulin is specifically and efficiently phosphorylated by protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 498-502
26. Corbett E, Michalak M (2000) Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem Sci* 25: 307-310
27. Johnson S, Michalak M, Opas M, Eggleton P (2001) The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol* 11: 122-129
28. Michalak M, Parker JMP, Opas M (2002) Ca<sup>2+</sup> signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 32: 269-278
29. Ellgaard L, Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:181-191
30. Groenendyk J, Lynch J, Michalak M (2004) Calreticulin, Ca<sup>2+</sup>, and calcineurin – signaling from the endoplasmic reticulum. *Mol Cells* 17: 383-389
31. Kobayashi S, Uchiyama S, Sone T, Noda M, Lin L, Mizuno H, Matsunaga S, Fukui H (2006) Calreticulin as a new histone binding protein in mitotic chromosomes. *Genome Res* 115: 10-15
32. Afshar N, Black BE, Paschal MB (2005) Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol. *Mol Cell Biol* 25: 8844-8853
33. Souto-Pradrón T, Labriola CA, de Souza W (2004) Immunocytochemical localisation of calreticulin in *Trypanosoma cruzi*. *Histochem Cell Biol* 122: 563-569
34. Groenendyk J, Michalak M (2005) Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochim Polon* 52: 381-395
35. Papp S, Szabo E, Kim H, McCulloch CA, Opas M (2008) Kinase-dependent adhesion to fibronectin: regulation by calreticulin. *Exp Cell Res* 314: 1313-1326
36. Waterhouse N, Pinkoski MJ (2007) Calreticulin: raising awareness of apoptosis. *Apoptosis* 12: 631-634
37. Yokoyama M, Hirata KI (2008) New function of calreticulin: calreticulin-dependent mRNA destabilization. *Circ Res* 97: 961-963
38. Molinari M, Eriksson KK, Calanca V, Galli C, Cresswell P, Michalak M, Helenius A (2004) Contrasting functions of calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and ER quality control. *Mol Cell* 13: 125-135
39. Jørgensen MM, Bross P, Gregersen N (2003) Protein quality control in the endoplasmic reticulum. *APMIS* 111: 86-89
40. Williams CM (2005) Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 119: 615-623
41. Conte IL, Keith N, Gutierrez-Gonzalez C, Parodi AJ, Caramelo JJ (2007) The interplay between calcium and the in vitro lectin and chaperone activities of calreticulin. *Biochemistry* 46: 4671-4680
42. Szperl M, Opas M (2006) Kalretikulina, białko opiekuńcze regulujące stężenie Ca<sup>2+</sup> w siateczce śródplazmatycznej. *Postepy Biochem* 51: 382-386
43. Tutuncu L, Stein P, Ord TS, Jorgez CJ, Williams CJ (2004) Calreticulin on the mouse egg surface mediates transmembrane signaling linked to cell cycle resumption. *Dev Biol* 270: 246-260
44. Hayashida Y, Urata Y, Muroi E, Kono T, Miyata Y, Nomata K, Kanetake H, Kondo T, Ihara Y (2006) Calreticulin represses e-cadherin gene expression in madin-darby canine kidney cells via slug. *J Biol Chem* 281: 32469-32484
45. Crofts AJ, Denecke J (1998) Calreticulin and calnexin in plants. *Trends Plant Sci* 3: 396-399
46. Wyatt SE, Tsou PL, Robertson D (2002) Expression of the high capacity calcium-binding domain of calreticulin increases bioavailable calcium stores in plants. *Transgenic Res* 11: 1-10
47. Mariani P, Navazio L, Zuppini A (2003) Calreticulin and the endoplasmic reticulum in plant cell biology. W: Michalak M, Eggleton P (red) Calreticulin. Landes Bioscience, Georgetown, str. 94-101
48. Denecke J, Carlsson LE, Vidal S, Höglund AS, Ek B, van Zeijl MJ, Sinjorgo KM, Palva ET (1995) The tobacco homolog of mammalian calreticulin is present in protein complexes in vivo. *Plant Cell* 7: 391-406
49. Hassan AM, Wesson C, Trumble WR (1995) Calreticulin is the major Ca<sup>2+</sup> storage protein in the endoplasmic reticulum of the pea plant (*Pisum sativum*). *Biochem Biophys Res Commun* 211: 54-59
50. Dresselhaus T, Hagel C, Lorz H, Kranz E (1996) Isolation of a full length cDNA encoding calreticulin from a PCR library of in vitro zygotes of maize. *Plant Mol Biol* 31: 23-34
51. Lim CO, Kim HY, Kim MG, Lee SI, Chung WS, Park SH, Hwang J, Cho MJ (1996) Expressed sequence tags of Chinese cabbage flower bud cDNA. *Plant Physiol* 111: 577-588
52. Crofts AJ, Leborgne-Castel N, Pesca M, Vitale A, Denecke J (1998) BiP and calreticulin from an abundant complex that is independent of endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell* 10: 813-823
53. Hsieh K, Huang AH (2005) Lipid-rich tapetosomes in *Brassica* tapetum are composed of oleosin-coated oil droplets and vesicles, both assembled in and then detached from the endoplasmic reticulum. *Plant J* 43: 889-899
54. Borisjuk N, Sitailo L, Adler K, Malysheva L, Tewes A, Borisjuk L, Mantuffel R (1998) Calreticulin expression in plant cells: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution. *Planta* 206: 504-514
55. Komatsu S, Jan A, Koga Y (2009) Characterization of a histidine- and alanine-rich protein showing interaction with calreticulin in rice. *Amino Acids* 36: 137-146
56. Shen S, Sharma A, Komatsu S (2003) Characterization of proteins responsive to gibberellins in the leaf-sheath of rice (*Oryza sativa* L.) seedling using proteome analysis. *Biol Pharm Bull* 26: 129-136
57. Laporte C, Vetter G, Loudes AM, Robinson DG, Hillmer S, Stussi-Garaud C, Ritzenthaler C (2003) Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of Grapevine fanleaf virus movement protein in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* 15: 2058-2075
58. Chen MH, Tian GW, Gafni Y, Citovsky V (2005) Effects of calreticulin on viral cell-to-cell movement. *Plant Physiol* 138: 1866-1876
59. Heilmann I, Shin J, Huang J, Perera IY, Davies E (2001) Transient dissociation of polyribosomes and concurrent recruitment of calreticulin and calmodulin transcripts in gravistimulated maize pulvini. *Plant Physiol* 127: 1193-1203
60. Li Z, Onodera H, Ugaki M, Tanaka H, Komatsu S (2003) Characterization of calreticulin as a phosphoprotein interacting with cold-induced protein kinase in rice. *Biol Pharm Bull* 26: 256-261

61. Sharma A, Isogai M, Yamamoto T, Sakaguchi K, Hashimoto J, Komatsu S (2004) A novel interaction between calreticulin and ubiquitin-like nuclear protein in rice. *Plant Cell Physiol* 45: 684–692
62. Imin N, Kerim T, Weinman JJ, Rolfe BG (2006) Low temperature treatment at the young microspore stage induces protein changes in rice anthers. *Mol Cell Proteomics* 5: 274–292
63. Komatsu S, Masuda T, Abe K (1996) Phosphorylation of a protein (p56) is related to the regeneration of rice cultured suspension cells. *Plant Cell Physiol* 37: 748–753
64. Opas M, Tharin S, Milner RE, Michalak M (1996) Identification and localization of calreticulin in plant cells. *Protoplasma* 191: 164–171
65. Torres E, Gonzalez-Melendi P, Stöger E, Shaw P, Twyman RM, Nicholson L, Vaquero C, Fischer R, Christou P, Perrin Y (2001) Native and artificial reticuloplasmins co-accumulate in distinct domains of the endoplasmic reticulum and in post-endoplasmic reticulum compartments. *Plant Physiol* 127: 1212–1223
66. Lenartowska M, Karaś M, Marshall J, Napier R, Bednarska E (2002) Immunocytochemical evidence of calreticulin-like protein in pollen tubes and styles of *Petunia hybrida* Hort. *Protoplasma* 219: 23–30
67. Lenartowska M, Lenartowski R, Smoliński DJ, Wróbel B, Niedojadło J, Jaworski K, Bednarska E (2009) Calreticulin expression and localization in plant cells during pollen – pistil interactions. *Planta*, w druku
68. Pagny S, Cabanes-Macheteau M, Gillikin JW, Leborgne-Castel N, Le-rouge P, Boston RS, Faye L, Gomord V (2000) Protein recycling from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum in plants and its minor contribution to calreticulin retention. *Plant Cell* 12: 739–756
69. Šamaj J, Salaj J, Obert B, Baluška F, Menzel D, Volkmann D (2008) Calreticulin mRNA and protein are localized to protein bodies in storage maize callus cells. *Plant Cell Rep* 27: 231–239
70. Persson S, Wyatt SE, Love J, Thompson WF, Robertson D, Boss WF (2001) The Ca<sup>2+</sup> status of the endoplasmic reticulum is altered by induction of calreticulin expression in transgenic plants. *Plant Physiol* 126: 1092–1104
71. Jin ZL, Hong JK, Yang KA, Koo JC, Choi YJ, Chung WS, Yun DJ, Lee SY, Cho MJ, Lim CO (2005) Over-expression of Chinese cabbage calreticulin 1, BrCRT1, enhances shoot and root regeneration, but retards plant growth in transgenic tobacco. *Transgenic Res* 14: 619–626
72. Navazio L, Baldan B, Dainese P, James P, Damiani E, Margreth A, Mariani P (1995) Evidence that spinach leaves express calreticulin but not calsequestrin. *Plant Physiol* 109: 983–990
73. Baluška F, Šamaj J, Napier R, Volkmann D (1999) Maize calreticulin localizes to plasmodesmata in root apex. *Plant J* 19: 481–487
74. Baluška F, Cvrčková F, Kendrick-Jones J, Volkmann D (2003) Sink plasmodesmata as gateways for phloem unloading. Myosin VIII and calreticulin as molecular determinants of sink strength? *Plant Physiol* 126: 39–46
75. Navazio L, Sponga L, Dainese P, Fitchette-Laine AC, Faye L, Baldan B, Mariani P (1998) The calcium binding protein calreticulin in pollen of *Liriodendron tulipifera* L. *Plant Sci* 131: 35–42
76. Williams CM, Zhang G, Michalak M, Cass DJ (1997) Calcium induced protein phosphorylation and changes in levels of calmodulin and calreticulin in maize sperm cells. *Sex Plant Reprod* 10: 83–88
77. Lenartowska M, Lenartowski R, Bednarska E (2001) Localization of the calreticulin gene mRNA in unpollinated and pollinated styles of *Petunia hybrida* Hort. *J Appl Genet* 42: 15–20
78. Baluška F, Salaj J, Mathur J, Braun M, Jasper F, Šamaj J, Chua NH, Barlow PW, Volkmann D (2000) Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profiling-supported F-actin meshwork accumulated within expansion-enriched bulges. *Dev Biol* 227: 618–632

## Calreticulin – the structure, cell localizations and functions in animals and plants

Marta Lenartowska<sup>1,✉</sup>, Jakub Walczewski<sup>1</sup>, Robert Lenartowski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Developmental Biology, <sup>2</sup>Department of Genetics, Institute of General and Molecular Biology, Faculty of Biology and Earth Sciences, Nicolaus Copernicus University, Gagarina 9, 87-100 Toruń, Poland

✉e-mail: mlenart@umk.pl

**Key words:** calreticulin, animal cell, plant cell, molecular chaperon, Ca<sup>2+</sup> homeostasis

### ABSTRACT

Calreticulin (CRT) is an ubiquitously expressed Ca<sup>2+</sup> binding protein in endoplasmic reticulum (ER) of eukaryotic cells. A highly conserved structure between CRTs from different species of animals and plants confirms an important role of the protein in living cells. CRT has been found in different cellular compartments, suggesting to play a role in many cellular processes both inside and outside the ER. Although, the basic CRT functions like regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis and molecular chaperoning in ER might be the key to explain the multi-process property of the protein. The plant CRT sequence shares the same structural domain features identified for animal CRT and seems to have similar properties. However, the current knowledge about CRT expression and physiological role in plants is still very limited. Therefore in this work, we focus on these less-well-characterized functions of CRT in plants.

### Marzanna Cechowska-Pasko

Zakład Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2A, 15-089 Białystok; tel.: (85) 748 56 91, e-mail: mapasko@tlen.pl

Zakład Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2A, 15-089 Białystok; tel.: (85) 748 56 91, e-mail: mapasko@tlen.pl

Artykuł otrzymano 7 maja 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 13 sierpnia 2009 r.

**Słowa kluczowe:** białka opiekuńcze, GRP78, GRP94, ORP150, siateczka śródplazmatyczna

**Wykaz skrótów:** ER – siateczka śródplazmatyczna; ERSE (ang. *edoplasmic reticulum stress response element*) – element odpowiedzi na stres ER; GRP (ang. *glucose-regulated proteins*) – białka regulowane przez glukozę; HSE (ang. *heat shock element*) – element szoku cieplnego; HSP (ang. *heat shock proteins*) – białka szoku cieplnego; ORP (ang. *oxygen-regulated protein*) – białko regulowane przez tlen; UPR (ang. *unfolded protein response*) – odpowiedź na białko niesfałdowane; UPRE (ang. *unfolded protein response element*) – element odpowiedzi na białko niesfałdowane

### STRESZCZENIE

Indukcja białek opiekuńczych, należących do rodziny GRP (białka regulowane przez glukozę), jest mechanizmem obronnym komórek, adaptującym je do stresu siateczki śródplazmatycznej (ang. *ER stress*). Poznano geny kodujące te białka oraz niektóre czynniki i mechanizmy regulujące ich ekspresję. Wyjaśnienie funkcji GRP i regulacji ich syntezy otwiera nowe możliwości w leczeniu nowotworów oraz chorób związanych z zaburzeniami homeostazy siateczki śródplazmatycznej.

### WPROWADZENIE

Każde powstające białko wymaga odpowiedniego sfałdowania łańcucha polipeptydowego tak, by utworzyła się charakterystyczna drugo- czy trzeciorzędowa przestrzenna struktura umożliwiająca funkcjonowanie białka. Prawidłowe przestrzenne ułożenie łańcucha polipeptydowego jest zapewnione przez jego oddziaływanie z białkami opiekuńczymi (ang. *molecular chaperones*). Białka te wiążą się w sposób odwracalny z niepofałdowanym odcinkiem polipeptydu, który w innym przypadku mógłby służyć jako ośrodek agregacji lub błędnego fałdowania. Białka opiekuńcze wiążą się z częściowo zwiniętymi łańcuchami, umożliwiając im kontynuację zwijania się w sposób najbardziej korzystny energetycznie. Pomagają białkom w uporządkowanym tworzeniu ich struktury przestrzennej [1].

Jedną z rodzin białek opiekuńczych nazywana jest białkami szoku cieplnego HSP (ang. *heat shock proteins*). Białka szoku cieplnego dzieli się na rodziny: małe HSP, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 i HSP110, gdzie wartości liczbowe oznaczają przybliżoną masę cząsteczkową tych białek, wyrażoną w kDa [2]. HSP70 są najliczniejszą i ewolucyjnie najbardziej zachowaną rodziną HSP. Oprócz indukcyjnych HSP70i, do rodziny tej zalicza się również białka konstytutywne, obecne w cytoplazmie HSC70 (ang. *heat shock cognate protein 70*) czy GRP75, GRP78 w mitochondriach i siateczce śródplazmatycznej [3]. Poziom syntezy tych białek wzrasta, kiedy komórki są narażone na działanie czynników stresowych, m. in. podwyższonej temperatury, głodu, niedotlenienia, zakażeń, toksyn, promieniowania UV [3]. Wśród HSP wyróżnić można białka opiekuńcze (ang. *molecular chaperones*) i proteazy szoku termicznego. Pierwsze z nich w warunkach stresogennych zapobiegają przede wszystkim agregacji białek komórkowych, hamując agregację białek częściowo zdenaturowanych (ang. *holder chaperones*), a niektóre nawet przywracają im właściwą konformację oraz właściwości biologiczne (ang. *folder chaperones*). Z kolei główne zadanie proteaz szoku termicznego sprowadza się do wyeliminowania z komórki nieodwracalnie uszkodzonych białek, których obecność mogłaby niekorzystnie wpływać na funkcjonowanie innych białek komórkowych. Białka opiekuńcze wraz z proteazami tworzą tzw. system kontroli jakości białek, sprawujący opiekę nad stanem fałdowania białek komórkowych i ich prawidłowym funkcjonowaniem w komórce [4].

Białka, których prawidłowej konformacji przestrzennej nie da się przywrócić, mają tendencję do agregowania przez oddziaływanie eksponowanych odcinków hydrofobowych. Białka opiekuńcze charakteryzują się wysokim powinowactwem do hydrofobowych odcinków łańcuchów polipeptydowych (normalnie takie hydrofobowe odcinki są schowane wewnątrz prawidłowo sfałdowanego białka lub wiążą się z lipidami błonowymi). Obecne są one w cytosolu, w organellach cytoplazmatycznych, takich jak: mitochondria i siateczka śródplazmatyczna oraz w jądrze komórkowym [1,5,6,58]. Energia potrzebna do fałdowania bądź renaturacji białek jest dostarczana w postaci ATP. W jej uwalnianiu uczestniczy aktywność białek opiekuńczych jako ATPaz [1,5].

Odpowiedź na stres jest ewolucyjnie zachowywanym mechanizmem, który zapewnia komórkom przeżywalność pomimo działania niekorzystnych warunków.



ków metabolicznych i środowiskowych. Prowadzi ona do nasilenia syntezy specyficznych białek działających cytoprotekcyjnie. Na przykład podwyższona temperatura czy stan zapalny są sygnałem do wzmożonej produkcji białek szoku termicznego [7]. W warunkach niedoboru glukozy następuje nasilenie syntezy różnych białek opiekuńczych w siateczce śródplazmatycznej, tzw. GRP (ang. *glucose-regulated proteins*) [8,9]. Indukcja białek należących do rodziny GRP jest mechanizmem obronnym komórek, przystosowującym je do stresu siateczki śródplazmatycznej. Geny GRP mogą również ulegać aktywacji poprzez, zaburzające funkcje siateczki śródplazmatycznej, inne czynniki usuwające jony wapniowe z magazynów czy hamujące glikozylację białek. W warunkach stresu siateczki śródplazmatycznej dochodzi do akumulacji nieprawidłowo sfałdowanych białek w siateczce śródplazmatycznej, co pobudza ekspresję genów *grp*. Produkty tych genów są markerami odpowiedzi komórek na akumulację niesfałdowanych białek. Reakcja ta, określana jako proces UPR (ang. *unfolded protein response*), występuje bardzo powszechnie, od drożdży do człowieka, jako odpowiedź na zaburzenia homeostazy w siateczce śródplazmatycznej. Obejmuje ona także tymczasowe zmniejszenie syntezy nowych i degradację nieprawidłowo sfałdowanych białek oraz kierowanie komórek do apoptozy [10].

## EKSPRESJA GENÓW GRP U SSAKÓW

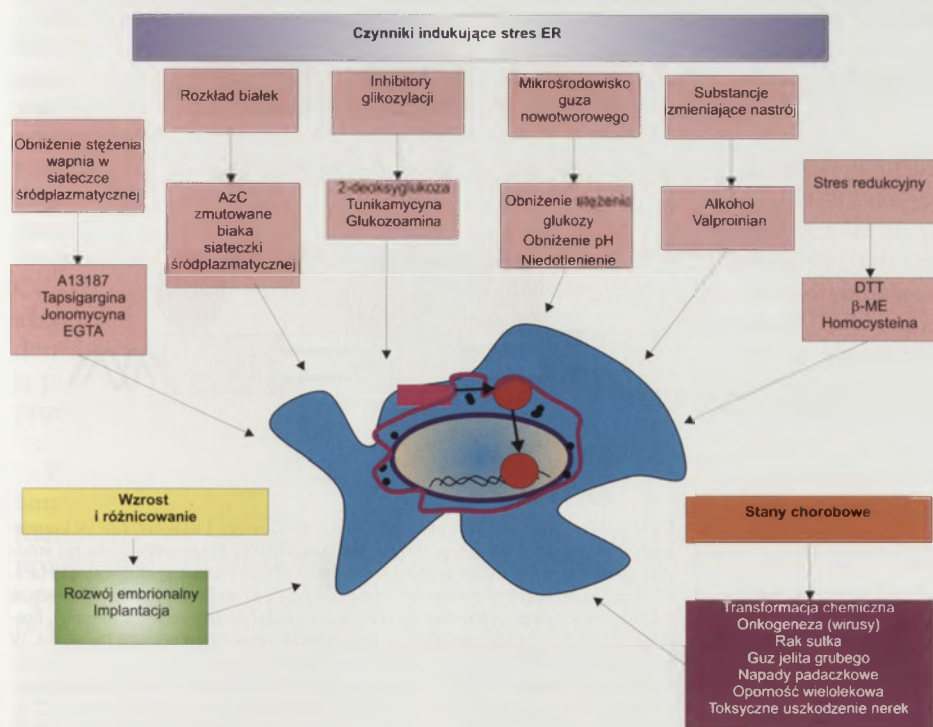
Pierwsze białka GRP, o masach cząsteczkowych 78 i 94 kDa zostały odkryte w roku 1977 w hodowlach komórek embrionalnych kury i fibroblastów nerki szczura, transformowanych RSV [11]. Indukcja syntezy obu białek nie była jednak związana, jak wcześniej sądzono, z transformacją nowotworową, lecz wynikała ze zubożenia pożywki w glu-

kozę wskutek szybkiego wzrostu komórek transformowanych. Aby podkreślić zależność ekspresji od stężenia glukozy, zaproponowano dla obu białek nazwy, odpowiednio do ich masy cząsteczkowej, jako: GRP78 i GRP94 [11]. Białko GRP78 kodowane jest przez gen należący do rodziny genów szoku termicznego *hsp70*. Białko GRP78 jest tożsame z białkiem BiP wiążącym się z ciężkim łańcuchem immunoglobulin (ang. *immunoglobulin heavy chain binding protein*). Z kolei białko GRP94 jest pokrewne z białkiem szoku termicznego z rodziny HSP90. Podczas gdy GRP78 jest zachowane w ewolucji od drożdży po człowieka, GRP94 zostało zidentyfikowane tylko u kręgowców, co sugeruje że może ono pełnić bliżej nieznanne funkcje, specyficzne dla wyższych eukariontów [12].

Wzrost stężenia nieprawidłowo sfałdowanych białek, zahamowanie ich glikozylacji oraz traktowanie komórek czynnikami redukującymi pobudza ekspresję genów *grp* zarówno u drożdży, jak i u ssaków, podczas gdy inne czynniki wywołujące stres działają tylko na geny wyższych eukariontów (Ryc. 1). Na przykład nieforbolowy ester, czynnik kancerogeny – tapsigargina, która specyficznie hamuje ATPazę zależną od wapnia, jest silnym induktorem stresu w siateczce śródplazmatycznej. Podobny efekt wywierają jonofory wapnia: A23187, jonomycyna i EGTA. Aktywują one transkrypcję GRP przez usunięcie zapasów  $Ca^{2+}$  z siateczki [13]. Tego rodzaju stresu, wywołanego przez niedobór wapnia, nie obserwuje się u drożdży. Zahamowanie poprzez działanie swoistych inhibitorów lub w wyniku mutacji tych etapów glikozylacji, które zachodzą w siateczce śródplazmatycznej powodowało *in vitro* zwiększoną syntezę białek GRP78 i GRP95. Na poziom ekspresji genów *grp* nie wpływa jednak zahamowanie końcowych etapów gli-

kozytacji, które zachodzą w aparacie Golgiego. W warunkach, w których następuje akumulacja GRP notowano także obniżenie stopnia glikozylacji białek [14]. Także inne czynniki indukują syntezę GRP. Są to (przynajmniej *in vitro*) 0,25%  $\beta$ -merkaptopoetanol, niskie pH (5,8–5,9) pożywki, niedotlenienie komórek, środowisko hipertoniczne oraz insulina [14]. Ponadto, przewlekła ekspozycja na etanol wzmacnia transkrypcję GRP [15]. Stabilizujący nastrój – walproinian sodu, nasycone kwasy tłuszczowe o rozgałęzionym łańcuchu stosowane w leczeniu zaburzeń biopola i epilepsji indukują ekspresję genów *grp78* w mózgu szczura [16].

Większość badań nad indukcją GRP jest prowadzona *in vitro*, jakkolwiek są nowe doniesienia na temat syntezy GRP *in vivo*. GRP są niezbędne w procesie rozwoju tkanek. Poziom syntezy GRP78 wzrasta w procesie rozwoju embrionalnego serca myszy i jest indukowany w następstwie stresu hipoglikemicznego w sercu [17] oraz w endome-



Rycina 1. Czynniki pobudzające ekspresję genów kodujących białka z rodziny GRP. Warunki stresowe zaburzają homeostazę siateczki śródplazmatycznej i aktywują szlaki sygnałowe z siateczki do jądra. Następuje aktywacja specyficznych czynników transkrypcyjnych, które indukują transkrypcję genów *grp* i syntezę białek opiekuńczych. Skróty: A23187 – jonofor wapnia, AzC – kwas azetyldyno-2-karboksylowy,  $\beta$ -ME –  $\beta$ -merkaptopoetanol, DDT – di-tiotreitol, EGTA – kwas etylenoglikolo-O-O'-bis(2-aminoetylo)-N,N,N',N'-tetraoctowy.

trium szczura w stanie przed implantacją [18]. Nasilenie syntezy GRP78 i GRP94 obserwowano w mózgu niedojrzałych szczurów w porównaniu do mózgu zwierząt dorosłych. Poziom syntezy tych białek był również wysoki w mózgu szczurów w przypadku niedokrwienia mózgu, urazu głowy czy napadów padaczkowych indukowanych przez kwas kainowy, agonistę glutamianu [19]. Również wzrost guzów nowotworowych jest związany ze wzmożoną syntezą GRP78 i GRP94 [9]. Jest to następstwem aktywacji ekspresji genów *grp* w warunkach głodu, kwasicy oraz hipoksji, które cechują mikrośrodowisko słabo unaczynionych guzów litych [20]. Indukcja GRP78 jest również związana z uszkodzeniem i dysfunkcją komórek endotelialnych naczyń człowieka w przypadku hiperhomocysteinemii lub innych chorób genetycznych [21]. Wiele czynników wywołujących zapalenie, apoptozę czy martwicę indukuje syntezę GRP *in vivo*.

## MECHANIZMY INDUKCJI GENÓW GRP U DROŹDZY I SSAKÓW

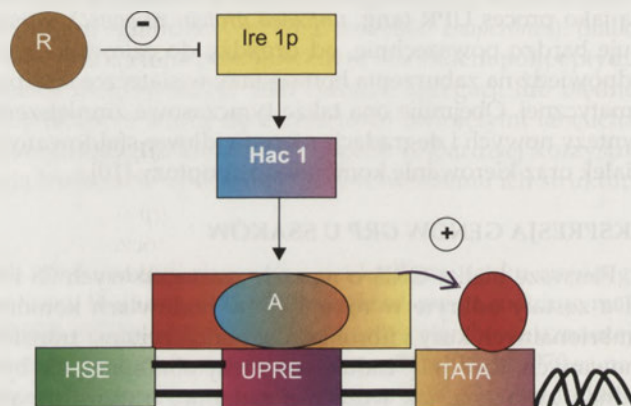
Zarówno u drożdży, jak i ssaków indukcja genów *grp* w warunkach stresu komórkowego jest regulowana na poziomie transkrypcji (Ryc. 2). W komórkach drożdży stres RE prowadzi do aktywacji białka błonowego siateczki śródplazmatycznej Ire1p, które indukuje składanie RNA i translację aktywatora Hac1 [10]. W skład kompleksu aktywującego transkrypcję wchodzi Hac1, który wiąże się bezpośrednio do sekwencji UPRE (ang. *unfolded protein response element*), podobnie jak białka Ada i Gcn5, które posiadają aktywność acetylotransferazy histonowej. U drożdży UPR jest regulowana negatywnie przez fosfatazę Ptc2p (R), która, defosforylując Ire1p, prowadzi do jego inaktywacji. Usunięcie genu kodującego Ire1p hamuje proces UPR, a tym samym indukcję genów *grp*. W rejonie promotora genu *kar2* (homolog *grp78* u drożdży) występuje także funkcjonalna sekwencja regulacyjna HSE (ang. *heat shock element*), charakterystyczna dla genów białek szoku cieplnego.

W komórkach ssaków promotory *grp* zawierają wiele kopii elementu odpowiedzi na stres ER, w skrócie ERSE (ang. *edoplasmic reticulum stress response element*), ale nie zawierają sekwencji HSE. Promotory *grp* u ssaków zawierają także sekwencje podobne do UPRE. Stres ER prowadzi do aktywacji Ire1p, którego mechanizm działania nie został jeszcze poznany. Białko transbłonowe ATF6, indukowane w siateczce śródplazmatycznej pod wpływem stresu, ulega proteolitycznemu rozpadowi i innym modyfikacjom. Jądrowa forma ATF6 jest silnym aktywatorem genów *grp*. Czynniki transkrypcyjne, tj. NF-Y, YY1 i TFII-I, mogą się także wiązać i aktywować ERSE. Wykazano, że zarówno NF-Y, jak i YY1 oddziałują z białkami, które modyfikują acetylację histonów i wraz z kofaktorami wiążą się z elementem TATA. Inny mechanizm aktywacji zachodzi przez kinazę tyrozynową i produkt protoonkogenu *c-fos*, jakkolwiek mechanizm ten nie jest poznany [22].

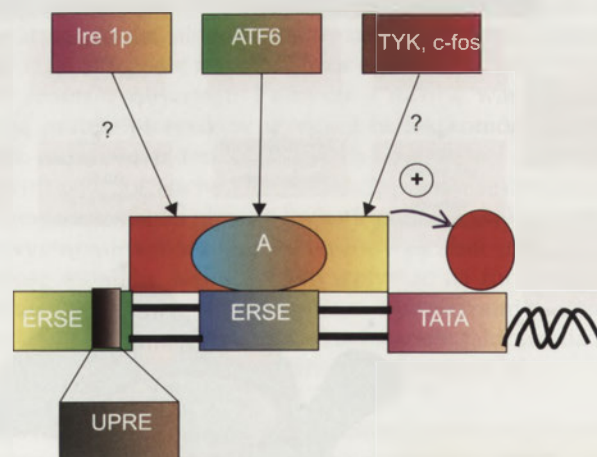
Niektóre elementy UPR u drożdży są zachowane w komórkach ssaków [22] (Ryc. 2). Na przykład, fragmenty promotorów *grp* u ssaków zawierają podobną do UPRE sekwencję [23], do której może się przyłączyć Hac1 drożdży i tym samym aktywować transkrypcję [22]. Mysz i człowiek

posiadają dwa allele *ire1*. Potwierdzenie mechanizmu UPR zależnego od Ire1p u ssaków opiera się na obserwacji, że wzrost stężenia białka błonowego Ire1p aktywuje promotor *grp* w sposób zależny od jego aktywności endorybonukleazowej [10,24,25]. To pokazuje, że indukcja syntezy GRP przez Ire1p zachodzi także za pośrednictwem aktywności endorybonukleazowej Ire1p, a nie jest jedynie konsekwencją stresu ER wywołanego nadprodukcją białek w siateczce śródplazmatycznej. W komórkach ssaków nie zostało zidentyfikowane białko docelowe dla endorybonukleazy Ire1p i nie wykryto homologu Hac1. Zdumiewającym jest fakt, że genetyczne uszkodzenie obydwu alleli *ire1* u myszy nie wpływa na UPR [25]. Dotychczas nie zbadano alleli *ire1* u

(a) drożdże



(b) ssaki



Rycina 2. Mechanizmy indukcji genów *grp* u drożdży i ssaków. (a) W komórkach drożdży stres ER prowadzi do aktywacji białka błonowego siateczki śródplazmatycznej Ire1p, które indukuje składanie RNA i translację aktywatora Hac1. W skład kompleksu aktywującego transkrypcję (A) wchodzi Hac1, który wiąże się bezpośrednio do sekwencji UPRE (ang. *unfolded protein response element*). Fosfataza Ptc2p działa jako negatywny regulator (R) przez inaktywację Ire1p. (b) W komórkach ssaków promotory *grp* zawierają wiele kopii elementu odpowiedzi na stres ERSE (ang. *edoplasmic reticulum stress response element*), ale nie zawierają sekwencji HSE. Promotory *grp* u ssaków także zawierają sekwencje podobne do UPRE. Stres ER prowadzi do aktywacji Ire1p, którego mechanizm działania nie został jeszcze poznany. ATF6, białko transbłonowe, indukowane w siateczce śródplazmatycznej pod wpływem stresu, ulega proteolitycznemu rozpadowi i innym modyfikacjom. Jądrowa forma ATF6 jest silnym aktywatorem genów *grp*. Inny mechanizm aktywacji zachodzi przez kinazę tyrozynową i produkt protoonkogenu *c-fos*, jakkolwiek mechanizm ten nie jest poznany.

ssaków. Wydaje się, że homolog Ire1p nie jest konieczny do wywołania UPR u ssaków.

Coraz częściej sugeruje się, że komórki ssaków wykorzystują szlaki sygnałowe niezależne od Ire1p w celu aktywacji genów *grp* w odpowiedzi na stres siateczki śródplazmatycznej. Czynniki stresogenne mogą aktywować różne albo zachodzące na siebie szlaki sygnalizacyjne. Komórki chłoniaka WEHI7.2 nasilają transkrypcję *grp* w odpowiedzi na blokowanie glikozylacji białek, ale nie odpowiadają na usunięcie wapnia z magazynów siateczki śródplazmatycznej. Ostatnie badania sugerują, że produkt protoonkogenu *c-fos* jest zaangażowany w indukcję *grp78* w następstwie uwolnienia zapasów wapnia z siateczki [26]. Synteza GRP78 i GRP94 jest hamowana przez genisteinę (inhibitor białkowej kinazy tyrozynowej), która działa blokując miejsca wiązania ATP w tym enzymie [27]. Stres ER pobudza również szlak sygnałowy z udziałem kinaz MAP aktywowanych przez stres (ang. *stress-activated protein kinases*–JNK) i kinazę MAP – p38 [25]. Bezpośredni związek pomiędzy innymi kinazami aktywowanymi przez stres a indukcją genów *grp* pozostaje niezbadany.

### KOMPLEKS REGULUJĄCY TRANSKRYPCJĘ GRP

Charakterystyczną cechą promotorów *grp* u ssaków jest obecność wielu kopii elementu CCAAT otoczonych przez sekwencje bogate w GC. Te sekwencje nukleotydowe są powtarzającymi się jednostkami składowymi elementu odpowiedzi na stres ERSE [28], który jest ewolucyjnie zachowywaną trzyczęściową strukturą CCAAT(N<sub>3</sub>)CCACG (N<sub>9</sub> – 9 par zasad) (Ryc. 2). Ta sekwencja jest znacznie bardziej złożona niż UPRE.

Ostatnio została zidentyfikowana nowa sekwencja AT-TGG(N)CCACG, określana jako ERSE-II, w promotorze genu *Herp* kodującego białko transbłonowe siateczki śródplazmatycznej. Ten motyw może także brać udział w odpowiedzi na stres ER [29]. Czynniki transkrypcyjne NF-Y, wiążąc się z motywem CCAAT, aktywuje ERSE. Jest on konieczny zarówno do podstawowej, jak i indukowanej przez stres transkrypcji promotora *grp* [27,28,30]. Zaś transkrypcyjny czynnik *Ying Yang1* (YY1) wiąże się z motywem CCACG [31]. W warunkach stresu ER czynnik YY1 wzmacnia aktywność promotora *grp78*, podczas gdy nasilona synteza domen białka szoku zimna dbpA i YB-1, które też wykazują powinowactwo do motywu CCACG, hamuje aktywność promotora *grp78* [32].

W komórkach traktowanych genisteiną zaobserwowano hamowanie syntezy GRP78, jak i oddziaływania czynników transkrypcyjnych NF-Y i YY1 z ERSE [27]. Sekwencja N<sub>3</sub> promotorów *grp* u kręgowców jest zachowana w ewolucji i posiada zastanawiająco wysoką zawartość par GC, które wiążą czynniki transkrypcyjne indukowane przez stres [23,28,33]. Ponadto, mutacje motywu bogatego w GC hamują indukcję odpowiedzi na stres. [28]. Białko, które wiąże się z motywem ERSE – bogatym w GC, zostało zidentyfikowane jako czynnik transkrypcyjny TFII-I, który ułatwia oddziaływania białko-białko [33]. Zastosowanie oligonukleotydów antysensownych hamujących syntezę TFII-I blokuje indukcję odpowiedzi na stres ER poprzez ERSE. Aktywność

TFII-I zależna od fosforylacji reszty tyrozyny może być potencjalnym ogniwem, łączącym szlak sygnałowy kinazy tyrozynowej i transkrypcję *grp*.

Białko transbłonowe ATF6, zlokalizowane w siateczce śródplazmatycznej i okołojądrowo, nie występujące w kompleksie wiążącym się z sekwencją ERSE, jest potencjalnym aktywatorem promotorów *grp*. Występują dwie formy ATF6. Pierwsza o masie cząsteczkowej 90 kDa, określana jako ATF6(α), i druga forma o masie cząsteczkowej 110 kDa, określana jako ATF6(β) albo CREB-RP. W warunkach stresu obie formy ATF6 ulegają translokacji do aparatu Golgiego, gdzie ulegają proteolizie za pośrednictwem dwóch proteaz Site-1(S1P) i Site-2 (S2P), tworząc fragmenty o masie cząsteczkowej od 50 do 60 kDa, które wchodzą do jądra i aktywują sekwencje ERSE przez tworzenie kompleksów z NF-Y w sposób zależny od sekwencji CCACG [30]. Obecność inhibitora proteasomu hamuje degradację ATF6, przez co hamuje wyżej opisane efekty [34]. Interesującym jest, że brefeldyna A, lek który powoduje redystrybucję składników aparatu Golgiego do siateczki śródplazmatycznej i blokuje transport białek poza system siateczka-aparat Golgiego [35], indukuje transkrypcję *grp78* w fibroblastach królika. W tej indukcji pośredniczy region promotora *grp78* zawierający sekwencję ERSE [36]. Dotychczas nie ustalono czy upośledzenie indukcji GRP w komórkach pozbawionych S2P jest wyłącznie skutkiem braku tego enzymu czy może istnieją jeszcze inne mechanizmy. W komórkach, w których usunięto jony wapniowe z magazynów siateczki śródplazmatycznej, poziom niestrawionego ATF6(α) wzrasta wraz z indukcją ekspresji *grp78*, a równocześnie pojawiają się inne jego zmodyfikowane formy, wykrywane w rozpuszczalnej frakcji jądrowej [37]. Przypuszcza się, że ATF6 jest zatrzymywany w siateczce podczas oddziaływań z białkami opiekuńczymi. W stanie stresu ER, ATF6 może oddysocjowywać z kompleksów z białkami opiekuńczymi i wskutek zmian płynności błony uzyskiwać nową lokalizację. Ponieważ ATF6 jest substratem MAP-kinazy p38 [38], jego aktywność może być również modulowana przez fosforylację.

### LICZNE FUNKCJE GRP

Tabela 1 przedstawia wykaz białek ssaków indukowanych przez stres ER. Większość GRPs: GRP78, GRP94, GRP170, Erp72, PDI, kalretikulina i GRP58 są to białka opiekuńcze, które uczestniczą w formowaniu struktury przestrzennej białek, a niektóre, jak: GRP78, GRP94, Erp72 i kalretikulina, wykazują również zdolność wiązania wapnia.

Ostatnio wykryte białka siateczki śródplazmatycznej: SERCA-2β, *Herp*, oksydoreduktyna1-Lβ i *Adapt78* są również indukowane w warunkach stresu ER i są odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy w siateczce śródplazmatycznej. SERCA-2β jest białkiem transbłonowym, które pompuje jony wapniowe z cytosolu do wnętrza siateczki [23]. Zablockowanie aktywności SERCA-2β przez tapsigarginę powoduje wyczerpanie zapasów jonów wapniowych w siateczce, a następnie indukcję *grp* [6]. *Herp* posiada na N-końcu domenę podobną do ubikwityny, a geny kodujące *grp78* i *herp* wykazują wzmożoną ekspresję w komórkach endotelialnych człowieka poddanych działaniu homocysteiny [21,29]. Oksydoreduktyna1-Lβ jest N-glikoproteiną

Tabela 1. Białka kodowane przez geny ssaków indukowane w warunkach stresu ER.

Białko	Lokalizacja	Funkcja
GRP78/BiP/HSPA5	światło ER	fałdowanie białek, wiązanie wapnia, działanie cytoprotekcyjne
GRP94/gp96/CaBP4/ERp99	światło ER, transbłonowa, na powierzchni komórki	fałdowanie białek i peptydów, wiązanie wapnia, działanie cytoprotekcyjne
GRP170/ORP150	światło ER	fałdowanie białek i peptydów
ERp72	światło ER	fałdowanie białek, wiązanie wapnia
PDI/ERp58	światło ER	tworzenie wiązań disiarczkowych
Kalretikulina	światło ER	fałdowanie białek i glikoprotein, wiązanie wapnia
GRP58/ERp57	światło ER	fałdowanie białek i glikoprotein
SERCA-2 $\beta$	transbłonowa w ER	pompa wapniowa zlokalizowana w ER
HERP	transbłonowa w ER	podobna do ubikwiny
Oksydoreduktaza 1-L $\beta$	światło ER	utrzymywanie równowagi redoks w ER
Adapt78	obszar okołojądrowy, światło ER, cytosol	działanie cytoprotekcyjne
CHOP	jądro	czynnik transkrypcyjny, hamowanie wzrostu, pobudzanie apoptozy
GLUT-1	błona komórkowa	transport glukozy
Syntetaza asparaginowa	cytosol	synteza aminokwasów

Pierwsza kolumna przedstawia alternatywne nazwy lub symbole białek opiekuńczych. Skrót: BiP – białko wiążące immunoglobuliny; CHOP – jądrowy aktywator transkrypcji związany z zahamowaniem wzrostu i indukcją apoptozy; GLUT – transporter glukozy; PDI – izomeraza wiązań disiarczkowych, SERCA – Ca<sup>2+</sup>-ATPaza wapniowa siateczki sarko/śródpłazmatycznej.

konieczną do utrzymania równowagi oksydoredukcyjnej w siateczce śródpłazmatycznej [39]. Adapt78 jest odpowiednikiem GRP78 i pełni funkcję cytoprotekcyjną [40].

W warunkach stresu ER są również indukowane geny kodujące białka niewystępujące w siateczce, tj. GLUT-1 (białko transportujące glukozę) [41], syntetazę asparaginy [42] i CHOP – jądrowy aktywator transkrypcji odpowiedzialny za hamowanie wzrostu i apoptozę [25]. Jakkolwiek CHOP nie reguluje ekspresji genów *grp*, poziom aktywatorów promotorów *grp*, ATF6( $\alpha$ ) i TFII-I wzrasta podczas uwalniania jonów wapniowych z siateczki śródpłazmatycznej w komórkach hodowanych *in vitro* [33,37]. Autoregulacja tych czynników transkrypcyjnych reprezentuje nowy mechanizm sprzężenia zwrotnego, występującego w odpowiedzi na stres ER.

Białko HSP47 – kolagenowo-specyficzne białko opiekuńcze (o masie cząsteczkowej 47kDa) – zlokalizowane na terenie siateczki śródpłazmatycznej, odpowiedzialne jest za proces syntezy i dojrzewania kolagenu. [43]. HSP47

uczestniczy w transporcie prokolagenu z siateczki do aparatu Golgiego [44]. Białko to chroni kolagen przed denaturacją i wewnątrzkomórkową degradacją [43,44].

Niedawno wykryte białko z rodziny GRP, określane jako GRP170/ORP150 (glucose/oxygen-regulated protein 150 kDa), występuje w siateczce śródpłazmatycznej i bierze udział w procesie fałdowania białek błonowych i wydzielniczych. Niedobór glukozy jest czynnikiem nasilającym syntezę tego białka opiekuńczego w kulturach fibroblastów *in vitro*. Zaobserwowano znaczne obniżenie zawartości kolagenu, któremu towarzyszy wzrost aktywności żelatynolitycznej i nieznaczne obniżenie ekspresji receptora insulinopodobnego czynnika wzrostowego-I (IGF-I). To sugeruje, że ORP150 jest białkiem opiekuńczym, które chroni białka wewnątrzkomórkowe przed proteolizą, nasilaną przez niedobór glukozy czy hipoksję [45]. Zbadano wpływ niedoboru glukozy na syntezę i degradację kolagenu w kulturach fibroblastów *in vitro* i związek tych procesów z poziomem syntezy ORP 150. Brak glukozy w medium powoduje znaczne obniżenie syntezy kolagenu. Proporcjonalnie mniej kolagenu ulega degradacji, czemu towarzyszy nasilenie syntezy ORP150 w hodowlach pozbawionych glukozy w porównaniu z tymi, które były inkubowane w medium o prawidłowym stężeniu glukozy. Sugeruje się, że ORP150 jest czynnikiem, który chroni kolagen przed

wewnątrzkomórkową degradacją, indukowaną przez niedobór glukozy [46].

#### ROLA GRP W PRZEŻYWALNOŚCI KOMÓREK W STANIE STRESU ER

Z badań wykonanych na kulturach komórkowych wynika, że GRP78, GRP94 i Adapt78 chronią komórki przed apoptozą [9,47-52] (Ryc. 3). Dwa niezależne zespoły badawcze wykazały, że GRP chronią komórkę bardziej przed stresem wywołanym przez usunięcie jonów wapnia z siateczki śródpłazmatycznej niż przez blokowanie glikozylacji białek [47,52]. Jakkolwiek mechanizm antyapoptotycznego działania GRP nie jest znany, to zmutowane białko GRP78, które utraciło aktywność ATPazową, traci swoje funkcje cytoprotekcyjne [50]. Białko HSC70 – odpowiednik GRP78, jest jednym z ważniejszych chaperonów w cytoplazmie. Chroni ono komórki przed apoptozą, działając przez pobudzenie licznych mechanizmów antyapoptotycznych [7]. Jednym z nich jest zapobieganie formowania nowych apoptosomów. Badania kilku zespołów zmierzają do wyjaśnienia czy GRP

oddziałują ze składnikami biorącymi udział w apoptozie indukowanej przez stres ER [10,25,53].

Szereg obserwacji wskazuje, iż GRP zapobiegają lub ograniczają zakres niektórych procesów patologicznych. Wysoki poziom GRP94 i GRP78 w mózgu młodych szczurów w porównaniu z osobnikami dorosłymi nadaje im większą odporność na występowanie napadów padaczkowych [19]. Specyficzna indukcja GRP w regionie zakrętu zębatego szczurów dorosłych w konsekwencji napadu padaczki zapewnia neuroochronę w tej szczególnej części mózgu. Białku GRP78 przypisuje się zdolność do przywracania odporności na stres ER we wczesnym stadium rodzinnego zespołu Alzheimera [54,55]. Ekspresja GRP zapobiega agregacji i ułatwia degradację w proteasomach zmutowanych białek prionowych w przebiegu chorób neurozwyrodnieniowych [56]. Uszkodzenie proteasomów

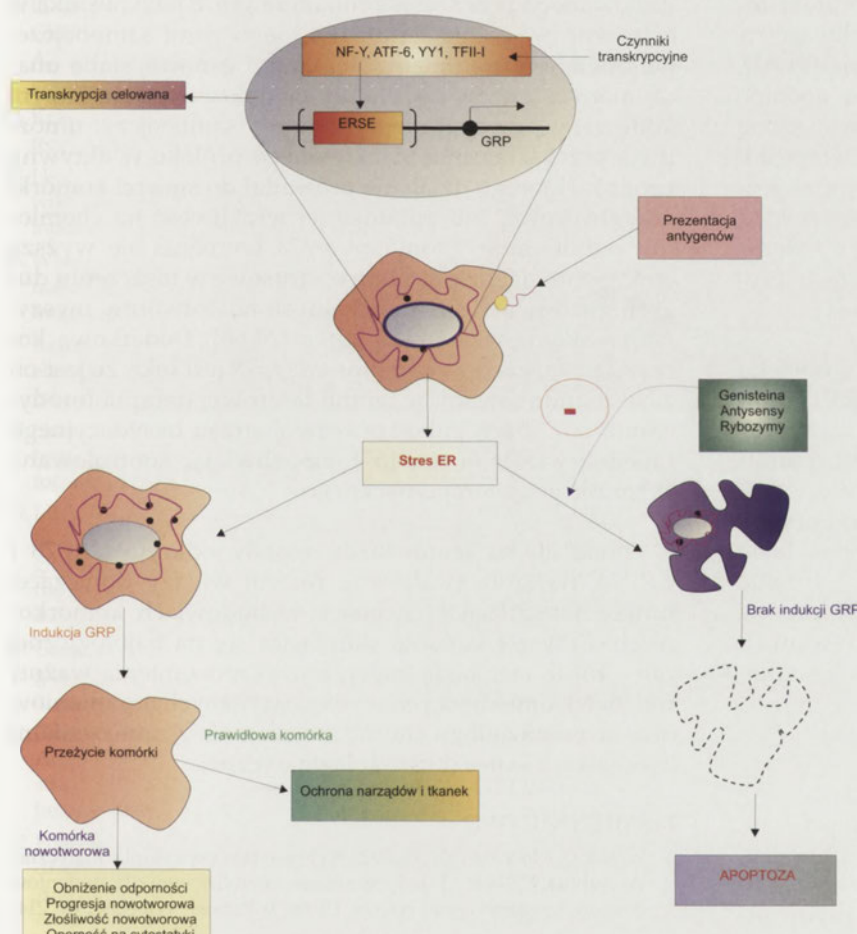
sprawia, że GRP78 może fałdować zmutowane białka prionowe, nadając im bardziej patogenny charakter.

Indukcję GRP78 obserwuje się w komórkach endotelialnych uszkodzonych przez stres redukcyjny spowodowany hiperhomocysteinemią, która jest powszechnie uznawana za czynnik ryzyka wczesnej miażdżycy i chorób zakrzepowych: udaru mózgu lub zawału mięśnia sercowego [21,38]. Dlatego indukcja GRP78 może być odpowiedzią adaptacyjną w celu ochrony komórek endotelialnych przed apoptozą indukowaną przez stres ER.

Brak glukozy upośledza proces fałdowania białek w siateczce śródplazmatycznej. Nagromadzenie niesfałdowanych białek powoduje aktywację procesu transkrypcji wielu genów, a szczególnie kodujących białka opiekuńcze, np.: GRP78, GRP94, ORP150, które porządkują strukturę przestrzenną wspomnianych białek, zwiększając przez to przeżywalność komórek. W warunkach niedoboru glukozy oraz niedoboru tlenu obserwuje się nasiloną syntezę ORP150 w komórkach nowotworowych: HeLa, HEK 293, A 2058, HCT 116, BT 474 [57]. Komórki HeLa rosnące w medium o niskiej zawartości glukozy są kierowane na drogę apoptozy znacznie częściej niż te rosnące w optymalnych warunkach. Komórki te, poddane transfekcji metodą siRNA (stosując siRNA specyficzny dla ORP150), zmniejszają syntezę ORP150, a w konsekwencji stają się bardziej podatne na proces apoptozy. Sugeruje to, że ORP150 minimalizuje proapoptotyczny efekt wywierany przez niedobór glukozy [57]. Również hipoksja wywołana w hodowlach komórek HeLa powoduje zwiększoną syntezę ORP150 oraz nasilenie procesu apoptozy. Zahamowanie syntezy ORP150 poprzez transfekcję specyficznym dla ORP150 siRNA powoduje dalszy wzrost liczby komórek ulegających apoptozie, nasilenie ekspresji białka Bim i trawienia białka związanego z poli-ADP-rybozą (PARP – *poly ADP-ribose protein*). Nasilenie syntezy ORP150 chroni komórki przed proapoptotycznym wpływem hipoksji [58].

### GRP JAKO CEL CHEMIOTERAPII NOWOTWOROWEJ

Podczas gdy wzmożona ekspresja GRP może zmniejszać uszkodzenie organów narażonych na stres ER, ich indukcja w komórkach nowotworowych i antyapoptotyczne działanie może pobudzać rozwój nowotworów i powodować ich oporność na leki (Ryc. 3). W różnych liniach komórek nowotworowych i w guzach człowieka, poziom GRP78 i GRP94 jest podwyższony i ma związek ze złośliwością guza [9,59]. Dodatkowo, wykazano że wzmożona indukcja GRP78 chroni komórki nowotwo-



**Rycina 3.** Indukcja GRP i ochrona komórki. Stres ER aktywuje transkrypcję genów *grp* za pośrednictwem sekwencji ERSE, czego skutkiem jest nasilenie syntezy białek opiekuńczych. Składnikami kompleksu aktywującego transkrypcję są: NF-Y, ATF6, YY1 i TFI-I. Indukowane przez stres właściwości promotora *grp78* mogą być wykorzystane do transkrypcji celowanej w terapii genowej. Ekspresja *grp* może być blokowana na poziomie transkrypcji przez leki hamujące syntezę GRP, np. genisteinę. Zastosowanie wektorów z rybozymami czy oligonukleotydów antysensownych hamuje translację GRP. Hamowanie syntezy GRP w warunkach stresu ER prowadzi do podwyższonej cytotoksyczności i apoptozy. Nasilenie syntezy GRP zwiększa przeżywalność komórek. Jest to bardzo korzystny mechanizm odgrywający znaczną rolę w ochronie narządów, np. zapobiega uszkodzeniu mózgu czy defektom komórce śródbłonna. W przeciwieństwie do tego, wzmożona synteza GRP w komórkach nowotworowych prowadzi do wymykania się tych komórek spod kontroli systemu immunologicznego, czego następstwem jest nasilenie proliferacji i złośliwości guza. Nasilenie syntezy GRP w komórkach nowotworowych może prowadzić do oporności na leki. GRP94, pochodzące z martwych komórek nowotworowych, biorą udział w prezentacji antygenów.

rowe, podczas gdy zahamowanie syntezy tego białka opiekuńczego nasila apoptozę, hamuje wzrost guza i zwiększa podatność na działanie czynników cytotoksycznych [9,48]. Dlatego celowane hamowanie syntezy i funkcji GRP w komórkach nowotworowych jest nowym kierunkiem w chemioterapii nowotworów.

Genisteina, która obniża syntezę GRP, hamuje wzrost guzów indukowanych karcynogenami u szczurów oraz komórek białaczki u człowieka, przeszczepianych do myszy [27]. Wykazano także, że GRP94 wiąże się i stabilizuje białko p185/erbB2 (także określane jako HER-2/neu), którego nasiloną syntezę w raku sutka jest związana ze złym rokowaniem [60]. Traktowanie komórek raka sutka geldanamycyną, która jest inhibitorem białek opiekuńczych HSP90, umożliwia rozpad kompleksów GRP94-p185 i degradację p185.

Indukcja GRP w wielu liniach komórek nowotworowych u człowieka nadaje im oporność na inhibitory topoisomery II (np. etoposid), ale nasila wrażliwość na czynniki wiążące się z DNA, takie jak cisplatyna [61,62]. Bezpośrednie hamowanie syntezy GRP94 przez podanie oligonukleotydów antysensownych skutkuje zwiększoną wrażliwością na indukowaną przez cytostatyki, etoposid, śmierć komórki [51]. Interesującym jest, że apoptoza wywołana przez etoposid powoduje proteolityczny rozpad GRP94 przez kalpainę, która także trawi Bcl-xL podczas apoptozy, przekształcając białko antyapoptotyczne w proapoptotyczne [51,53].

Specyficzne warunki stresowe w mikrośrodkowisku guzów litych mogą prowadzić do indukcji GRP. Funkcja opiekuńcza GRP jest konieczna do ich działania cytoochronnego. Prawdopodobnie wiąże się to z ich zdolnością do zatrzymywania receptorów czynników wzrostowych w kanalikach siateczki śródplazmatycznej, co prowadzi do zahamowania podziału komórek w fazie G1 i oporności na leki cytotoksyczne działające w fazie S cyklu komórkowego [61]. Inny mechanizm ochrony, w którym pośredniczą GRP, obejmuje ich oddziaływanie z efektorami apoptozy, zmniejszając skuteczność farmakoterapii nowotworów.

## ROLA GRP W IMMUNOTERAPII

Wykazano, że GRP94 towarzyszy wielu peptydom, które powstają przez degradację białek prawidłowych, nowotworowych, bakteryjnych, czy wirusowych [63]. GRP94 pochodzący z nowotworów przenosi peptydy antygenowe guza, a GRP94 pochodzący z komórek zakażonych wirusami przenosi antygeny wirusowe. GRP94 w warunkach prawidłowych jest zlokalizowany wewnątrzkomórkowo. W czasie rozpadu komórek nekrotycznych uwalniane są kompleksy GRP94-peptyd i przenoszone na komórki prezentujące antygen. Prezentacja peptydów na powierzchni tych komórek prowadzi do stymulacji limfocytów T i odpowiedzi prozapalnej. Kompleksy GRP94 z peptydami służyły jako czynniki immunogenne do wywołania odpowiedzi immunologicznej, specyficznej dla chronionych przez GRP94 peptydów antygenowych [64]. Nie obserwowano autoimmunizacji, co sugeruje że

odpowiedź immunologiczna jest skierowana przeciwko peptydom, a nie przeciwko GRP94.

Wykorzystując wnioski z badań na zwierzętach, immunizowano pacjentów onkologicznych preparatami GRP94 pochodzącymi z ich własnych nowotworów, jako test skuteczności specyficznej szczepionki w immunoterapii ludzkich nowotworów [64]. Ostatnio wykazano, że białko z rodziny GRP, określane jako GRP170/ORP150, jest skuteczne jako szczepionka przeciwnowotworowa [65]. Podejmowane są również próby zastosowania GRP170 w terapii chorób zakaźnych.

## PROMOTOR GENU *GRP78* W PRZECIWNOWOTWOROWEJ TERAPII GENOWEJ

W agresywnych nowotworach wskutek niedokrwienia i braku składników odżywczych miejscowo rozwija się hipoksja i kwasica. W tych warunkach dochodzi do specyficznej aktywacji promotora genu *grp78*. Użycie indukowanego przez stres promotora *grp78* jako nośnika w celu wprowadzenia terapeutycznego genu samobójczego, otwiera nowe możliwości terapii genowej słabo uznaczonych guzów czy chorób niedokrwienych. Enzym kodowany przez terapeutyczny gen samobójczy, umożliwia przekształcenie nieaktywnego proleku w aktywny produkt, którego działanie prowadzi do śmierci komórki nowotworowej lub pobudza jej wrażliwość na chemio- lub radioterapię. Promotor *grp78* wyróżnia się wyższą efektywnością niż promotory wirusowe w niszczeniu dużych guzów, np. doświadczalnych nowotworów myszy, włókniakomięsaka i raka sutka [20,66]. Dodatkową korzyścią związaną z promotorem *grp78* jest fakt, że jest on zawsze indukowany w terapii laserowej (terapia fotodynamiczna), która pobudza rozwój stresu oksydacyjnego i niedokrwienie *in vivo* [67], umożliwiając kontrolowaną ekspresję genu terapeutycznego.

Ponad 20 lat temu, kiedy zostały odkryte GRP78 i GRP94, nastąpił gwałtowny rozwój wiedzy dotyczącej funkcji i regulacji tych białek w hodowlach komórkowych. Przyszłe badania skupiające się na fizjologicznej roli GRP *in vivo* będą zmierzały do zrozumienia ważnej roli białek opiekuńczych w rozwoju różnych organizmów oraz w patofizjologii chorób związanych z zaburzeniami homeostazy siateczki śródplazmatycznej.

## PIŚMIENNICTWO

1. Wójcik C, Moskalewski S (2002) Wybrane procesy cytoplazmatyczne, W: Kawiak J, Zabel M (red) Seminaria z cytofizjologii dla studentów medycyny, weterynarii i biologii. Urban & Partner Wrocław, str. 214-215
2. Prinsloo E, Setati MM, Longshaw VM, Blatch GL (2009) Chaperoning stem cells: a role for heat shock proteins in the modulation of stem cell self-renewal and differentiation? *Bioessays* 31: 370-377
3. Widłak W (2006) Odpowiedź na stres komórkowy I ekspresja genów Hsp 70 w męskich komórkach rozrodczych. *Postepy Biochem* 52: 289-295
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. Marzec Ł, Zdrojewski Z, Bryl E, Rutkowski B (2007) Białka szoku termicznego 72 (Hsp72) w chorobach nerek. *Nefrol Dial Pol* 11: 78-82

6. Little E, Ramakrishnan M, Roy B, Gazit G, Lee AS (1994) The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 4: 1-18
7. Jolly C, Morimoto RI (2000) Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 92: 1564-1572
8. Lee AS (1992) Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. *Curr Opin Cell Biol* 4: 267-273
9. Little E, Ramakrishnan M, Roy B, Gazit G, Lee AS (1994) The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Crit Rev Eukaryotic Gene Expr* 4: 1-18
10. Kaufman RJ (1999) Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13: 1211-1233
11. Shiu RP, Pouyssegur J, Pastan I (1977) Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous Sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3840-3844
12. Lee AS (2001) The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 26: 504-510
13. Li WW, Alexandre S, Cao X, Lee AS (1993) Transactivation of the GRP78 promoter by  $Ca^{2+}$  depletion. A comparative analysis with A23187 and the endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase inhibitor thapsigargin. *J Biol Chem* 268: 12003-12009
14. Krawczyk Z (1991) Struktura, regulacja ekspresji i funkcja białek siateczki śródplazmatycznej GRP78 i GRP95. *Postepy Biochem* 37: 70-75
15. Hsieh KP, Wilke N, Harris A, Miles MF (1996) Interaction of ethanol with inducers of glucose-regulated stress proteins. Ethanol potentiates inducers of GRP78 transcription. *J Biol Chem* 271: 2709-2716
16. Wang JF, Bown C, Young LT (1999) Differential display PCR reveals novel targets for the mood-stabilizing drug valproate including the molecular chaperone GRP78. *Mol Pharmacol* 55: 521-527
17. Barnes JA, Smoak IW (2000) Glucose-regulated protein 78 (GRP78) is elevated in embryonic mouse heart and induced following hypoglycemic stress. *Anat Embryol (Berl)* 202: 67-74
18. Simmons DG, Kennedy TG (2000) Induction of glucose-regulated protein 78 in rat uterine glandular epithelium during uterine sensitization for the decidual cell reaction. *Biol Reprod* 62: 1168-1176
19. Little E, Tocco G, Baudry M, Lee AS, Schreiber SS (1996) Induction of glucose-regulated protein (glucose-regulated protein 78/BiP and glucose-regulated protein 94) and heat shock protein 70 transcripts in the immature rat brain following status epilepticus. *Neuroscience* 75: 209-219
20. Gazit G, Hung G, Chen X, Anderson WF, Lee AS (1999) Use of the glucose-starvation inducible GRP78 promoter in suicide gene therapy of murine fibrosarcoma. *Cancer Res* 59: 3100-3106
21. Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JL, Austin RC (1999) Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* 94: 959-967
22. Foti DM, Welihinda A, Kaufman RJ, Lee AS (1999) Conservation and divergence of the yeast and mammalian unfolded protein response. Activation of specific mammalian endoplasmic reticulum stress element of the GRP78/BiP promoter by yeast Hac1. *J Biol Chem* 274: 30402-30409
23. Caspersen C, Pedersen PS, Treiman M (2000) The sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 2 $\beta$  is an endoplasmic reticulum stress-inducible protein. *J Biol Chem* 275: 22363-22372
24. Tirasophon W, Lee K, Callaghan B, Welihinda A, Kaufman RJ (2000) The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes Dev* 14: 2725-2736
25. Urano F, Bertolotti A, Ron D (2000) IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 113: 3697-3702
26. He H, McColl K, Distelhorst CW (2000) Involvement of c-Fos in signaling GRP78 induction following ER calcium release. *Oncogene* 19: 5936-5943
27. Zhou Y, Lee AS (1998) Mechanism for the suppression of the mammalian stress response by genistein, an anticancer phytoestrogen from soy. *J Natl Cancer Inst* 90: 381-388
28. Roy B, Lee AS (1999) The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of an evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stress-inducible complex. *Nucleic Acids Res* 27: 1437-1443
29. Kokame K, Agarwala KL, Kato H, Miyata T (2000) Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 275: 32846-32853
30. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K (2001) Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6 $\alpha$  and 6 $\beta$  that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 21: 1239-1248
31. Li WW, Hsiung Y, Zhou Y, Roy B, Lee AS (1997) Induction of the mammalian GRP78/BiP gene by  $Ca^{2+}$  depletion and formation of aberrant proteins: activation of the conserved stress-inducible GRP core promoter element by the human nuclear factor YY1. *Mol Cell Biol* 17: 54-60
32. Li WW, Hsiung Y, Wong V, Galvin K, Zhou Y, Shi Y, Lee AS (1997) Suppression of GRP78 core promoter element-mediated stress induction by the dbpA and dbpB (YB-1) cold shock domain proteins. *Mol Cell Biol* 17: 61-68
33. Parker R, Phan T, Baumeister P, Roy B, Cheriya V, Roy AL, Lee AS (2001) Identification of TFII-I as the endoplasmic reticulum stress response element binding factor ERSF: its autoregulation by stress and interaction with ATF6. *Mol Cell Biol* 21: 3220-3233
34. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6: 1355-1364
35. Lippincott-Schwartz J, Yuan L, Tipper C, Amherdt M, Orci L, Klausner RD (1991) Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* 67: 601-616
36. Liu ES, Ou JH, Lee AS (1992) Brefeldin A as a regulator of GRP78 gene expression in mammalian cells. *J Biol Chem* 267: 7128-7133
37. Li M, Baumeister P, Roy B, Phan T, Foti D, Luo S, Lee AS (2000) ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1. *Mol Cell Biol* 20: 5096-5106
38. Thuerauf DJ, Arnold ND, Zechner D, Hanford DS, DeMartin KM, McDonough PM, Prywes R, Glembotski CC (1998) p38 mitogen-activated protein kinase mediates the transcriptional induction of the atrial natriuretic factor gene through a serum response element. A potential role for the transcription factor ATF6. *J Biol Chem* 273: 20636-20643
39. Pagani M, Fabbri M, Benedetti C, Fassio A, Pilati S, Bulleid NJ, Cabibbo A, Sitia R (2000) Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1- $\beta$  (ERO1- $\beta$ ), a human gene induced in the course of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 275: 23685-23692
40. Leahy KP, Crawford DR (2000) Adapt78 protects cells against stress damage and suppresses cell growth. *Arch Biochem Biophys* 379: 221-228
41. Wertheimer E, Sasson S, Cerasi E, Ben-Neriah Y (1991) The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose-regulated protein family of stress-inducible proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2525-2529
42. Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, Schuster SM, Nick HS, Kilberg MS (1999) Activation of the unfolded protein response pathway induces human asparagine synthetase gene expression. *J Biol Chem* 274: 31139-31144
43. Nagata K (2003) HSP47 as a collagen-specific molecular chaperone: function and expression in normal mouse development. *Semin Cell Dev Biol* 14: 275-282
44. Masuda H, Fukumoto M, Hirayoshi K, Nagata K (1994) Coexpression of the collagen-binding stress protein HSP47 gene and the alpha(I) and alpha. *J Clin Invest* 94: 2481-2488

45. Cechowska-Pasko M, Palka J, Bańkowski E (2007) Glucose-depleted medium reduces the collagen content of human skin fibroblast cultures. *Mol Cell Biochem* 305: 79-85
46. Cechowska-Pasko M, Surazyński A, Bańkowski E (2009) The effect of glucose deprivation on collagen synthesis in fibroblast cultures. *Mol Cell Biochem* 327: 211-218
47. Little E, Lee AS (1995) Generation of a mammalian cell line deficient in glucose-regulated protein stress induction through targeted ribozyme driven by a stress-inducible promoter. *J Biol Chem* 270: 9526-9534
48. Jamora C, Dennert G, Lee AS (1996) Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7690-7694
49. Liu H, Bowes RC 3rd, van de Water B, Sillence C, Nagelkerke JF, Stevens JL (1997) Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca<sup>2+</sup> disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *J Biol Chem* 272: 21751-21759
50. Morris JA, Dornier AJ, Edwards CA, Hendershot LM, Kaufman RJ (1997) Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. *J Biol Chem* 272: 4327-4334
51. Reddy RK, Lu J, Lee AS (1999) The endoplasmic reticulum chaperone glycoprotein GRP94 with Ca<sup>2+</sup>-binding and antiapoptotic properties is a novel proteolytic target of calpain during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274: 28476-28483
52. Miyake H, Hara I, Arakawa S, Kamidono S (2000) Stress protein GRP78 prevents apoptosis induced by calcium ionophore, ionomycin, but not by glycosylation inhibitor, tunicamycin, in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 77: 396-408
53. Nakagawa T, Yuan J (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150: 887-894
54. Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, Morihara T, Yoneda T, Gomi F, Mori Y, Nakano Y, Takeda J, Tsuda T, Itoyama Y, Murayama O, Takashima A, St George-Hyslop P, Takeda M, Tohyama M (1999) Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 1: 479-485
55. Sato N, Urano F, Yoon Leem J, Kim SH, Li M, Donoviel D, Bernstein A, Lee AS, Ron D, Veselits ML, Sisodia SS, Thinakaran G (2000) Upregulation of BiP and CHOP by the unfolded-protein response is independent of presenilin expression. *Nat Cell Biol* 2: 863-870
56. Jin T, Gu Y, Zanusso G, Sy M, Kumar A, Cohen M, Gambetti P, Singh N (2000) The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. *J Biol Chem* 275: 38699-38704
57. Cechowska-Pasko M, Bańkowski E, Chene P (2005) Glucose effect on the expression of 150 kDa oxygen-regulated protein in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 992-997
58. Cechowska-Pasko M, Bankowski E, Chene P (2006) The effect of hypoxia on the expression of 150 kDa oxygen-regulated protein (ORP 150) in HeLa cells. *Cell Physiol Biochem* 17: 89-96
59. Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, Manning FCR, Tsangaris TN, Schwartz AM, Kennedy KA, Patierno SR (2000) Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Res Treat* 59: 15-26
60. Chavany C, Mimnaugh E, Miller P, Bitton R, Nguyen P, Trepel J, Whitesell L, Schnur R, Moyer J, Neckers L (1996) p185erbB2 binds to GRP94 in vivo. Dissociation of the p185erbB2/GRP94 heterocomplex by benzoquinone ansamycins precedes depletion of p185erbB2. *J Biol Chem* 271: 4974-4977
61. Tomida A, Tsuruo T (1999) Drug resistance mediated by cellular stress response to the microenvironment of solid tumors. *Anticancer Drug Des* 14: 169-177
62. Belfi CA, Chatterjee S, Gosky DM, Berger SJ, Berger NA (1999) Increased sensitivity of human colon cancer cells to DNA cross-linking agents after GRP78 up-regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 361-368
63. Binder RJ, Han DK, Srivastava PK (2000) CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol* 1: 151-155
64. Janetzki S, Palla D, Rosenhauer V, Lochs H, Lewis JJ, Srivastava PK (2000) Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations: a pilot study. *Int J Cancer* 88: 232-238
65. Wang XY, Kazim L, Repasky EA, Subjeck JR (2001) Characterization of heat shock protein 110 and glucose regulated protein 170 as cancer vaccines and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity. *J Immunol* 166: 490-497
66. Chen X, Zhang D, Dennert G, Hung G, Lee AS (2000) Eradication of murine mammary adenocarcinoma through HSVtk expression directed by the glucose-starvation inducible GRP78 promoter. *Breast Cancer Res Treat* 59: 81-90
67. Gomer CJ, Ferrario A, Rucker N, Wong S, Lee AS (1991) Glucose regulated protein induction and cellular resistance to oxidative stress mediated by porphyrin photosensitization. *Cancer Res* 51: 6574-6579

## Endoplasmic reticulum chaperons

Marzanna Cechowska-Pasko<sup>✉</sup>

Department of Pharmaceutical Biochemistry, Medical University of Białystok, Mickiewiczza 2A, 15-089 Białystok, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: mapasko@tlen.pl

**Key words:** chaperons, GRP78, GRP94, ORP150, edoplasmic reticulum

### ABSTRACT

The induction of chaperon proteins, belonging to GRPs (glucose-regulated proteins) family, is a mechanism which protects the cells against the endoplasmic reticulum stress. The genes that code synthesis of these proteins as well as some factors and mechanisms which regulate their expression were described. The explanation of GRPs function and regulation of their synthesis create new therapeutic possibilities in neoplasm diseases and those induced by endoplasmic reticulum stress.



# Zmiany kształtu erytrocytów i czynniki je wywołujące

## STRESZCZENIE

Erytrocyty występują w wielu różnych kształtach, zależnych od czynników środowiskowych oraz stanu fizjologicznego. Większość z tych kształtów (np. knizocyty, leptocyty i keratocyty) jest charakterystyczna dla wielu chorób, w tym anemii o różnej etiologii. Trzy typy kształtów uważane są za formy fizjologiczne: dyskocyty, echinocyty i stomatocyty. Możliwość transformacji echinocyt – dyskocyt – stomatocyt chroni erytrocyty przed zniszczeniem przez czynniki echinocytogenne (np. wysoka siła jonowa, zasadowe pH, anionowe związki amfifilowe i spadek poziomu ATP) lub stomatocytogenne (roztwór hipotoniczny, kwaśne pH i kationowe związki amfifilowe). Czynniki powodujące zmiany kształtu erytrocytów mogą być podzielone na trzy główne grupy: działające za pośrednictwem redystrybucji fosfolipidów błonowych, modyfikujące równowagę Donnana oraz oddziałujące z białkiem pasma 3.

## WPROWADZENIE – PODSTAWOWE INFORMACJE O KRWI I ERYTROCYTACH

Z chemicznego punktu widzenia krew jest roztworem koloidalnym o gęstości zawierającej się w granicach 1040–1060 kg/m<sup>3</sup> i wartościach pH w zakresie 7,35–7,43; jej składnikami są osocze i elementy morfotyczne [1]. Osocze czyli nieupostaciowana część krwi składa się w 90–92% z wody; pozostałe składniki to albuminy (4,3%) i globuliny (2,4%) oraz niebiałkowe związki azotowe (takie jak kwas moczowy, alantoina, kreatynina, amoniak, bilirubina, nukleotydy), wolne aminokwasy i substancje nieposiadające w strukturze atomów azotu (głównie glukoza) [1]. Elementy morfotyczne to krwinki czerwone (erytrocyty, retikulocyty), krwinki białe (granulocyty, monocyty, limfocyty) oraz płytki krwi (trombocyty). Elementy morfotyczne stanowią 35–52% objętości krwi, natomiast pozostałe 48–65% to osocze [2]. Procentowa zawartość elementów morfotycznych określana jest jako wskaźnik hematokrytowy. W grupie elementów morfotycznych krwi wyróżniają się morfologicznie erytrocyty. Są to wysoce wyspecjalizowane komórki, służące do przenoszenia tlenu z płuc do tkanek oraz dwutlenku węgla z tkanek do płuc. Obie te funkcje są możliwe dzięki obecności hemoglobiny, która dzięki grupie hemowej umożliwia odwracalne wiązanie tlenu. Hemoglobina pełni również pierwszoplanową funkcję w buforze węglanowym, będącym najważniejszym układem buforowym utrzymującym pH krwi. Dla efektywnego wypełniania tych funkcji, czyli możliwości przenoszenia jak największej ilości hemoglobiny, erytrocyty posiadają bardzo uproszczoną budowę morfologiczną i nie posiadają żadnych organelli komórkowych (erytrocyty ssaków) [1]. Błona białkowo-lipidowa, oddzielająca wnętrze erytrocytów od otoczenia, jest jedyną barierą dla niekorzystnych czynników środowiskowych i ulega pod ich wpływem modyfikacjom, co wyrażane jest m.in. przez zmianę kształtu komórek. Kształty erytrocytów można podzielić według wielu kryteriów. Najbardziej ogólnym podziałem jest podział ze względu na stan fizjologiczny erytrocytów; wyróżnić można erytrocyty o kształtach fizjologicznych oraz patologicznych.

Erytrocyty czynne biologicznie mają najczęściej kształt dwuwklęsłego dysku czyli dyskocytu. Mechanizm odpowiedzialny za przyjmowanie przez erytrocyty charakterystycznego dyskocytarnego kształtu jest przedmiotem sporów. Kształt taki daje krwince czerwonej większą powierzchnię w stosunku do objętości niż kształt kulisty, co stwarza lepsze warunki wymiany gazowej oraz gwarantuje większą odkształcalność erytrocytu potrzebną przy przechodzeniu przez naczynia włosowate. Kształt dyskocytarny erytrocytów może ulegać zmianie zależnej od właściwości fizykochemicznych środowiska życia tych komórek. Kwasowe pH, wysokie ciśnienie hydrostatyczne, substancje amfipatyczne gromadzące się przede wszystkim w wewnętrznej monowarstwie dwuwarstwy lipidowej błony, itp. powodują, że erytrocyty przyjmują kształt stomatocytów, krwinek posiadających pojedyncze wklęsnięcie przypominające usta. Natomiast zasadowe pH, substancje amfipatyczne gromadzące się preferencyjnie w zewnętrznej mono-

Maria Stasiuk<sup>✉</sup>

Grzegorz Kijanka

Arkadiusz Kozubek

Zakład Lipidów i Liposomów, Wydział Biotechnologii Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

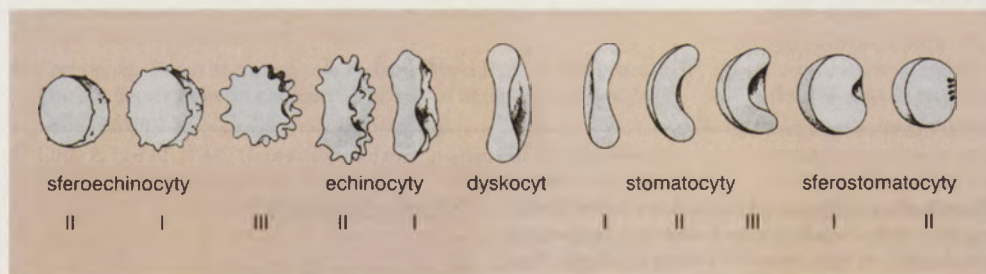
<sup>✉</sup>Zakład Lipidów i Liposomów, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; tel.: (71) 375 63 38, e-mail: stasiuk@ibmb.uni.wroc.pl

Artykuł otrzymano 8 lipca 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 23 czerwca 2009 r.

**Słowa kluczowe:** białko pasma 3, echinocytoza, erytrocyty, stomatocytoza

**Wykaz skrótów:** AFM – mikroskopia sił atomowych; CSC – krytyczne stężenie solubilizacji; CMC – krytyczne stężenie micelizacji; HLB – równowaga hydrofilowo-lipofilowa



Rycina 1. Zmiany kształtów erytrocytów w procesach echinocytozy i stomatocytozy [3].

warstwie dwuwarstwy lipidowej błony, obniżony poziom ATP, nadmiar cholesterolu itp., powodują transformację dyskocyty w echinocyt, czyli krwinkę o kulistym kształcie, posiadającą liczne wypustki o regularnym układzie. Obie te transformacje zachodzą w zdrowych erytrocytach i są odwracalne (Ryc. 1) [3].

W przebiegu wielu chorób występują erythrocyty o rozmaitych kształtach patologicznych. Transformacje patologiczne są nieodwracalne i powodują zaburzenia funkcjonowania krwinek. Istnieje cały szereg kształtów patologicznych erythrocytów i spotkać można różne klasyfikacje bazujące na ich morfologii. Do krwinek o kształcie patologicznym zaliczamy między innymi: akantocyty (występujące m.in. przy wrodzonym braku beta-lipoprotein, ciężkiej marskości wątroby i mocznicy), poikilocyty (występujące m.in. w pierwotnej mielofibrylozie i przy niedoborze witaminy B<sub>12</sub>), drepantocyty (niedokrwistość sierpowatokrwinkowa), daktrioocyty, kodocyty, leptocyty, schizocyty (niedokrwistości hemolityczne), knizocyty (hemoglobinopatie, talasemie), eliptyocyty (eliptycytoza wrodzona), mikrocyty (m. in. niedokrwistość z niedoboru żelaza), makrocyty (niedokrwistości megaloblastyczne), ekscentrocyty, sferocyty (sferocytoza wrodzona) i inne [3] (formy erythrocytów czynnych biologicznie, jak i przykłady form patologicznych zostały przedstawione na Ryc. 2).

Transformacja echinocyt ↔ dyskocyt ↔ stomatocyt zachodzi, w odróżnieniu od transformacji patologicznych, naturalnie w naczyniach krwionośnych. Jest to zmiana odwracalna, wywoływana przez szereg czynników zarówno chemicznych, jak i fizycznych. Najprostszym podziałem czynników wywołujących transformację erythrocytów jest podział na czynniki echinocytogenne i stomatocytogenne, bez względu na mechanizm, według którego poszczególne czynniki działają. Dużo bardziej interesujący byłby podział według proponowanych mechanizmów działania. Niestety, przeważająca większość z czynników działa w oparciu o więcej niż jeden mechanizm i niemożliwe staje się określenie mechanizmu działania konkretnego czynnika. Dlatego w tej pracy podzielono je arbitralnie na trzy grupy, klasyfikując według najważniejszego, jak się wydaje, mechanizmu ich działania. W każdej klasie znajdują się zarówno czynniki stomatocytogenne, jak i echinocytogenne. Klasy te to: 1) amfifile egzogenne oraz czynniki wpływające na rozmieszczenie cząsteczek amfifili błonowych; 2) modyfikatory równowagi wynikającej z równania Donnana; 3) czynniki działające poprzez oddziaływanie z białkiem pasma 3.

Mechanizm działania większości tych czynników, będący bezpośrednią przyczyną zmian kształtów erythrocytów, jest zgodny z przedstawioną przez Sheeza i Singera w 1974 roku teorią sprzężonych monowarstw [4]. Hipoteza ta mówi, że bezpośrednią przyczyną zachodzenia transformacji dyskocyty w echinocyt lub stomatocyt jest różnica w powierzchniach monowarstw

zewnątrznej i wewnętrznej błony –  $\Delta A$ . Jeżeli  $\Delta A$  maleje (powierzchnia monowarstwy wewnętrznej staje się większa niż monowarstwy zewnętrznej) w stosunku do występującej w dyskocyty, krwinka przechodzi w formę stomatocyty. Jeżeli natomiast  $\Delta A$  rośnie (powierzchnia monowarstwy zewnętrznej staje się większa niż wewnętrznej), krwinka przyjmuje kształt echinocyty [5]. Kształt krwinki określany jest parametrem  $I_s$ , czyli tzw. indeksem kształtu erythrocyty. Krwinka o kształcie dyskocyty ma wartość indeksu równą 0. Stomatocytom przypisuje się ujemne wartości tego parametru, aż do wartości -4, która to wartość jest charakterystyczna dla stomatosferocyty. Echinocyty mają wartość  $I_s$  dodatnią, aż do +4, jest to wartość charakterystyczna dla echinosferocyty [6]. Istnieją także hipotezy mówiące np., że kształt jest odpowiedzią na stan energetyczny krwinki oraz że kształt jest uwarunkowany zmianami równowagi pomiędzy energią zagięcia błony (ang. *bilayer bending energy*) a energią szkieletu (ang. *membrane skeleton shear energy*) [7]. Zazwyczaj jednak czynniki zmieniające te parametry zmieniają także  $\Delta A$ . Poniżej opisano najważniejsze czynniki wywołujące transformację kształtu erythrocytów wraz z mechanizmami ich działania.

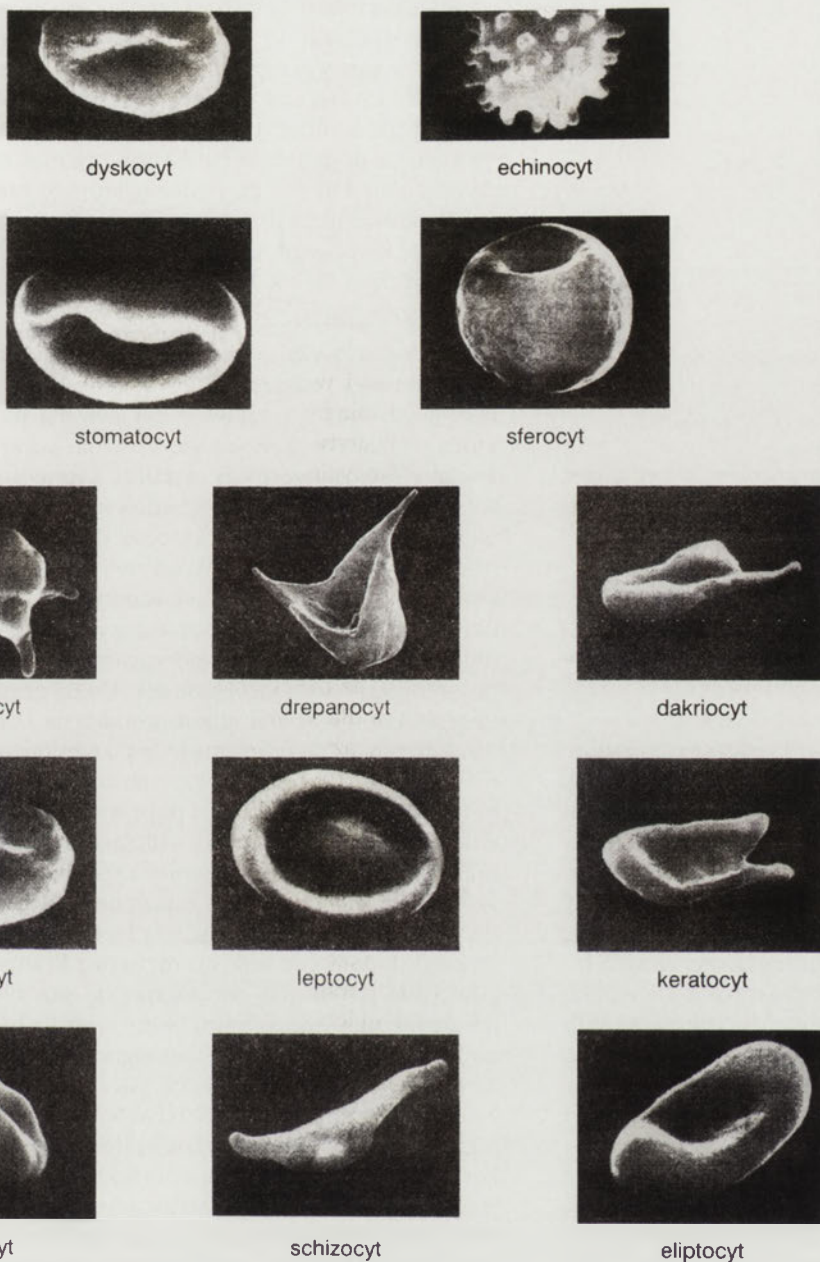
#### AMFIFILE EGZOGENNE ORAZ CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA ROZMIESZCZENIE CZĄSTECZEK AMFIFILI BŁONOWYCH

Związki amfifilowe charakteryzują się obecnością w swojej strukturze części hydrofilowej i hydrofobowej. Jednym z głównych kryteriów podziału cząsteczek amfifilowych jest ich polarność. Amfifile niepolarne nie rozpuszczają się w wodzie, natomiast polarne mogą być w niej zarówno nierozpuszczalne, jak i rozpuszczalne. Matematycznym wyrażeniem amfifilowości jest współczynnik podziału olej/woda ( $\log P_{o/w}$ ) oraz wartość HLB, wyliczana ze wzoru:

$$HLB = 0,36 \ln \left( \frac{C_o}{C_w} \right) + 7$$

gdzie  $C_o$  to stężenie molowe amfifilu w oleju, a  $C_w$  to stężenie molowe amfifilu w wodzie. Wartość tego współczynnika zawiera się w przedziale 1–40, przy czym im większa wartość, tym większa rozpuszczalność związku w fazie wodnej. Związki amfifilowe rozpuszczalne w wodzie przy odpowiednio dużym stężeniu organizują się w struktury agregacyjne. Kształt tych struktur zależy od kształtu cząsteczki amfifilu. Kształt ten określany jest wzorem:

$$S = \frac{V}{a \cdot l}$$



Rycina 2. Mikrografie skaningowe fizjologicznych oraz patologicznych form erytrocytów [2].

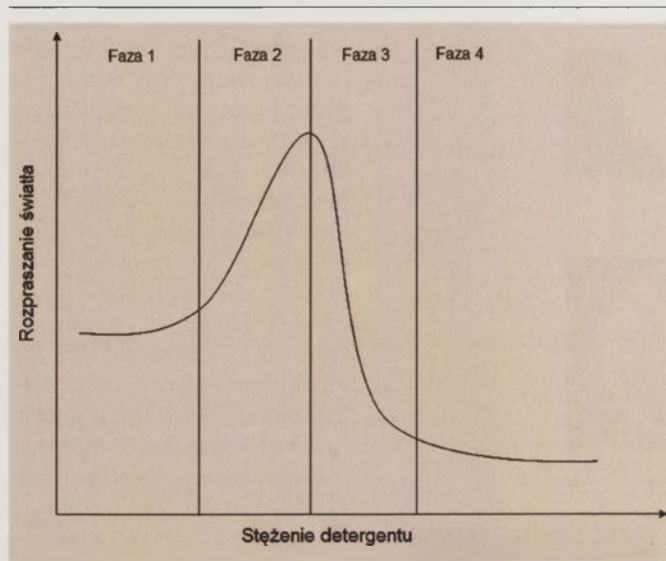
gdzie  $V$  jest to objętość cząsteczki,  $a$  to powierzchnia części hydrofilowej, a  $l$  to długość łańcucha węglowodorowego [8]. Maksymalne stężenie, przy którym amfifil jest w stanie występować w roztworze jako monomer, nazywane jest krytycznym stężeniem micelizacji (CMC).

Oddziaływanie amfifili z błoną biologiczną jest warunkowane ich kształtem. Cząsteczki o kształcie cylindrycznym ( $1/2 < S < 1$ ), przy założeniu, że w równym stopniu będą wbudowywały się w monowarstwę wewnętrzną, jak i zewnętrzną, będą powodowały zwiększanie się powierzchni błony. Natomiast amfifile o kształcie klina ( $S < 1/3$ ) lub stożka ( $S > 1$ ) powodować będą zwiększanie się powierzchni błony tylko do określonego ich stężenia w dwuwarstwie. Przekroczenie tego stężenia będzie po-

wodowało lizę błony i powstawanie mieszanych miceli złożonych z cząsteczek amfifili błonowych i amfifila egzogenego. Stężenie związku amfifilowego powodujące zwiększanie powierzchni błony, ale niepowodujące jeszcze jej lizy, nazywamy stężeniem sublitycznym (prelitycznym), natomiast stężenie powodujące lizę komórki nazywamy stężeniem litycznym [9]. Typowy proces solubilizacji modelowej dwuwarstwy fosfolipidowej (liposomów) przez detergent składa się z czterech etapów: w początkowej części procesu (faza 1) cząsteczki detergentu wnikają w zewnętrzną monowarstwę dwuwarstwy fosfolipidowej, nie zmieniając wielkości jej powierzchni. W trakcie dalszego zwiększania stężenia detergentu może nastąpić transfer części jego cząsteczek do monowarstwy wewnętrznej, następuje zwiększenie powierzchni dwuwarstwy (faza 2). Przy odpowiednio dużym stężeniu detergentu następuje solubilizacja błony, w fazie 3 w roztworze pojawiają się zarówno micelle zbudowane z detergentu, jak i mieszane micelle detergentowo-lipidowe. Ostatecznie całe liposomy ulegają solubilizacji, a w roztworze znajdują się już tylko micelle mieszane [9] (faza 4). Zmiany zachodzące w roztworze podczas solubilizacji liposomów obserwować można przy wykorzystaniu metod spektrofotometrycz-

nych. Na Ryc. 3 przedstawiono schematycznie zmiany w rozpraszaniu światła zachodzące podczas tego procesu.

Oddziaływanie detergentu z błoną białkowo-lipidową różni się swoim przebiegiem od solubilizacji błony liposomowej. W pierwszej fazie procesu cząsteczki detergentu wiążą się niekooperatywnie z błoną. W fazie drugiej, po przekroczeniu błonowego stężenia wolnego detergentu ( $C_{crit}$ ), cząsteczki detergentu wiążą się z błoną kooperatywnie i dochodzi do stopniowego mieszania się ich z fosfolipidami błony. Powyżej krytycznego stężenia solubilizacji (CSC), w fazie trzeciej, lipidy i białka tworzące jednostki zaczynają być solubilizowane do roztworu, tworząc różnorodne, niesedymetujące obiekty, takie jak bardzo małe kawałki błony lub micelle mieszane. W fazie ostatniej w roz-



Rycina 3. Przebieg procesu solubilizacji struktur liposomowych przez detergent.

tworze występują już tylko mieszane micelle lipidowo-detergentowe oraz białka opłaszczane cząsteczkami lipidów błonowych i detergentu [10].

Wpływ amfifili egzogennych na kształt erytrocytów został zauważony i scharakteryzowany najwcześniej. Jak powszechnie wiadomo, fosfolipidy, będące główną, obok białek, grupą związków budującą błony, mają budowę amfipatyczną. Posiadają w swojej strukturze części hydrofobowe zbudowane z reszt kwasów tłuszczowych oraz części hydrofilowe z grupami polarnymi lub mogącymi ulegać jonizacji. Budowa błony biologicznej umożliwia bardzo łatwe wbudowywanie się cząsteczek egzogennych związków amfifilowych. Transformacja dyskocyty w echinocyt lub stomatocyt zależna jest od docelowego umiejscowienia się cząsteczek egzogennych amfifili wewnątrz dwuwarstwowej fosfolipidowej. Stwierdzono doświadczalnie, że amfifile kationowe łączą się preferencyjnie z wewnętrzną warstwą błony, natomiast amfifile anionowe z zewnętrzną warstwą [11]. Preferencyjne wiązanie amfifili kationowych, takich jak: chlorpromazyna, eter oktaetylenoglikododecyłowy, itp., związane jest z oddziaływaniami elektrostatycznymi między tymi związkami a ujemnie naładowaną wewnętrzną powierzchnią błony. Ładunek ten jest wynikiem asymetrycznego rozmieszczenia fosfolipidów błony, a w szczególności fosfatydyloseryny. Odpychające oddziaływania między cytoplazmatyczną powierzchnią błony a amfifilami anionowymi (np. dodecylomaltozydem) są natomiast przyczyną wbudowywania się tych związków w zewnętrzną monowarstwę. Zatem, wynikiem wbudowywania się amfipatów kationowych jest transformacja dyskocyty do stomatocyty, natomiast anionowych – transformacja do echinocyty. Amfifile niejonowe mogą być zarówno echinocytogenne (cholesterol, dodecyl-D-maltozyd, decylo- $\beta$ -D-glukopiranozyd), jak i stomatocytogenne (etry alkilooktaetylenoglikolowe, eter dodecylpentaetylenoglikolu) [5,12,13]. Mechanizm wywoływania transformacji przez amfifile niejonowe nie jest jak dotąd dobrze poznany. Isomaa i wsp. [14] zaproponowali mechanizm oparty na tworzeniu się faz niewarstwowych pomiędzy monowarstwami błony erytrocy-

tu. Wykazali oni, że cząsteczki amfifili echinocytogennych wywołują zmiany kształtu komórek gwałtownie, niemal od razu po dodaniu do medium, w którym znajdują się erytrocyty. Cząsteczki amfifili stomatocytogennych mogą natomiast zachowywać się w różny sposób. Mogą, podobnie jak amfifile echinocytogenne, wywoływać zmianę kształtu od razu po dodaniu do zawiesiny krwinek czerwonych lub działać z opóźnieniem, podczas którego nie obserwuje się zmian kształtu erytrocytów. Trzecią grupą są amfifile wywołujące na początku echinocytozę, a po upływie pewnego czasu, zazwyczaj nie krótszego niż 30 min, i/lub zwiększenia stężenia amfifilu, stomatocytozę.

Zmiany wywołane przez amfifile echinocytogenne, głównie anionowe, można łatwo wytłumaczyć bezpośrednim kontaktem tych związków z zewnętrzną monowarstwą, w którą wnikają, wykorzystując istnienie korzystnych oddziaływań elektrostatycznych. Amfifile kationowe, jak napisano wcześniej, preferencyjnie wbudowują się do monowarstwy wewnętrznej. Pierwszym etapem wnikania jest pokonanie bariery monowarstwy zewnętrznej. Cząsteczki amfifilowe, których ładunek w trakcie wbudowywania się i przechodzenia przez błonę może być zniesiony, łatwo i szybko dyfundują w poprzek błony do monowarstwy cytoplazmatycznej, po czym odzyskują swój ładunek. Do tej grupy należy m. in. trzeciorzędowa amina chlorpromazyna. Amfifile kationowe, których ładunek nie może być zniesiony wbudowują się w monowarstwę zewnętrzną, a następnie są przenoszone do monowarstwy wewnętrznej poprzez flipazę. Wnikając w zewnętrzną warstwę błony, wywołują echinocytozę, a następnie poprzez redystrybucję do monowarstwy cytoplazmatycznej, stomatocytozę [14]. Isomaa zaproponował jeszcze jeden możliwy mechanizm oddziaływania błony z amfifilami, w myśl którego dodanie amfifili do roztworu krwinek czerwonych powoduje gwałtowne tworzenie się faz niewarstwowych pomiędzy monowarstwami błony erytrocyty. Fazy te to odwrócone micelle oraz faza heksagonalna II. Zbudowane są zarówno z lipidów błonowych, jak i z amfifili egzogennych. Następnie amfifile budujące odwrócone micelle lub fazę heksagonalną II redystrybuowane są do monowarstw zgodnie z korzystnymi oddziaływaniami elektrostatycznymi. Powstawanie struktur międzywarstwowych chroni zatem błonę przed nagłymi zmianami składu i powierzchni, zabezpieczając erytrocyt przed uszkodzeniem. Fazy międzywarstwowe mogą brać udział także w fuzji błon, egzo- i endocytozie oraz w transporcie transbłonowym [14]. Niezależnie od faktu czy dany amfifil wywołuje transformację echinocytogenną, czy stomatocytogenną, w odpowiednio dużym jego stężeniu, erytrocyt przechodzi w sferocyt. Echinocyt transformuje w sferocyt poprzez uwalnianie na końcach wypustek egzopęcherzyków zbudowanych z lipidów monowarstwy zewnętrznej [11]. Jednak transformacja kształtu wywołana tylko i wyłącznie biernym wbudowywaniem się egzogennych fosfolipidów w błonę, przynajmniej w początkowych jej stadiach, jest mało prawdopodobna, gdyż szybkość zmian jest znacząco większa niż szybkość ich wbudowywania [15]. Możliwym rozwiązaniem tego problemu jest uwzględnienie oddziaływania amfifili z białkiem pasma 3 opisane w dalszej części tych rozważań.

Preferencyjne wbudowywanie się amfifili jonowych w błonę i indukowanie przez nie transformacji możliwe jest

jedynie przy zachowaniu asymetryczności błony erythrocytarnej. Zaburzenie działania transferazy aminofosfolipidów (flipazy) powoduje zniesienie asymetrii w wyniku biernej dyfuzji fosfatydyloseryny do zewnętrznej monowarstwy błony. Po zaniku asymetrii dwuwarstwy fosfolipidowej amfifile o właściwościach echinocytogenych i stomatocytogenych nie wykazują już zdolności do indukowania zmian kształtów erythrocytów [16]. Zjawisko takie zachodzi przy spadku stężenia wewnątrzkomórkowego ATP. ATP-zależna transferaza aminofosfolipidów (flipaza) przestaje transportować fosfatydyloserynę do wewnętrznej monowarstwy, w związku z czym spontaniczna dyfuzja tego fosfolipidu (PS) (wspomagana działaniem skramblazy, niewykazującej właściwości ATPazowych, przenoszącej cząsteczki fosfatydyloseryny z monowarstwy wewnętrznej do zewnętrznej), połączona ze zmianami zachodzącymi z szkieletie błonowym, wywołuje echinocytozę. Zmniejszenie stężenia ATP powoduje bowiem dysocjację kompleksu spektryna-aktyna. Defosforylowana spektryna skupia się przy wewnętrznym listku błony, powodując echinocytozę [17]. Mechanizm echinocytozy następującej wskutek agregacji defosforylowanej spektryny nie jest do końca wyjaśniony (istnieją doniesienia mówiące o tym, że zmiana kształtu z dyskocytarnego na echinocytarny zachodzi szybciej niż defosforylacja spektryny [18]). Proponowany jest jeszcze inny mechanizm echinocytozy, powiązany z amfifilami błonowymi. Zaobserwowano mianowicie, że przy jednoczesnym obniżeniu komórkowego poziomu ATP i wzroście stężenia jonów  $Ca^{2+}$  wzrasta stężenie diacyloglicerolu w błonie. Związane jest to z aktywacją znajdującej się w błonie fosfodiesterazy, która hydrolizuje polifosfoinozytole (fosfatydyloinozytolo-4-fosforan, fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan) do m. in. diacyloglicerolu. Brak dostępu ATP powoduje zablokowanie reakcji odwrotnej. Aktywność fosfodiesterazy prowadzi do utraty grup fosforanowych i redystrybucji produktu, wynikiem czego jest zmniejszenie się powierzchni wewnętrznej monowarstwy błony i echinocytoza [17]. Zaznaczyć trzeba, że aby zaszła zmiana kształtu, wystarczy aby  $1-2 \times 10^6$  cząsteczek fosfolipidów przeszło z wewnętrznej warstwy do zewnętrznej lub na odwrót. Stanowi to około 1-2% całkowitej puli fosfolipidów krwinki czerwonej i wystarcza do rozpoczęcia transformacji kształtu erythrocytu [16].

Echinocytozę powoduje także dodanie do roztworu zawierającego erythrocyty jonów wanadanowych. Wana-dany znane są jako inhibitory wielu enzymów, między innymi z grupy ATPaz, kinaz i fosfataz. W erythrocytach potraktowanych wana-danem zachowana zostaje aktywność fosfodiesterazy, natomiast blokowany jest enzym o działaniu antagonistycznym. Pomimo obecności w roztworze ATP nie mogą być odtwarzane fosfatydyloinozytole. Następują zmiany analogiczne jak przy braku ATP w roztworze [17].

#### CZYNNIKI MODYFIKUJĄCE RÓWNOWAGĘ JONOWĄ WYNIKAJĄCĄ Z RÓWNIANIA DONNANA

Równanie Donnana charakteryzuje matematycznie stan równowagi jonowej (w odniesieniu do jonów jednowartościowych) w poprzek błony:

$$\begin{aligned} (Cl^-)_i / (Cl^-)_o &= (HCO_3^-)_i / (HCO_3^-)_o = \\ (OH^-)_i / (OH^-)_o &= (H^+)_i / (H^+)_o = r \end{aligned}$$

gdzie: indeksy dolne „o” i „i” określają odpowiednio stężenia molowe jonów na zewnątrz i wewnątrz erythrocytu.

Stężenie jonów  $Cl^-$  i  $HCO_3^-$  równoważy się w poprzek błony za pośrednictwem białka pasma 3. Za zachowanie równowagi stężenia jonów  $H^+$  i  $OH^-$  odpowiedzialny jest cykl Jacoba-Stewart. Najważniejszym jonem, którego stężenia wpływają na kształt erythrocytu, jest jon chlorkowy. Stosunek stężenia jonów chlorkowych wewnątrz krwinki do stężenia zewnętrznego jest związany z potencjałem błonowym zależnością:

$$\psi = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{Cl^-}_i / (Cl^-)_o \right) = \frac{RT}{zF} \ln r$$

gdzie:  $R$  – stała gazowa równa  $8,315 \text{ [J/(mol}\cdot\text{K)]}$ ,  $T$  – temperatura,  $z$  – wartościowość jonu (dla jonów chlorkowych  $z=1$ ), a  $F$  – stała Faradaya równa  $9,649 \cdot 10^4 \text{ [C/mol]}$ .

Stosunek  $(Cl^-)_i / (Cl^-)_o$  za pośrednictwem potencjału błonowego połączony jest także zależnością z pH:  $\Delta\psi = -59(pH_i - pH_o)$  gdzie:  $(pH_i - pH_o)$  jest to różnica pH na zewnątrz ( $pH_o$ ) i wewnątrz ( $pH_i$ ) erythrocytu. Wpływ na stosunek  $(Cl^-)_i / (Cl^-)_o$  ma także siła jonowa roztworu, a także takie składniki cytosolu krwinki czerwonej, jak 2,3-difosfoglicerynian, hemoglobina oraz jony  $Na^+$  i  $K^+$ . Jonizacja 2,3-difosfoglicerynianu i/lub hemoglobiny, następująca po zmianie pH lub zmianie potencjału błonowego, wpływa na stosunek  $(Cl^-)_i / (Cl^-)_o$  [15]. Wykaz wybranych czynników wpływających na wartość wyrażenia  $(Cl^-)_i / (Cl^-)_o$  zamieszczono w Tabelach 1 i 2.

Kolejnym czynnikiem wpływającym na zmianę kształtu erythrocytów jest pH. Aczkolwiek nie budzi to już kontrowersji, to jednak wciąż nie jest jasny mechanizm transformacji zachodzącej pod wpływem wysokiego lub niskiego pH. Doświadczenia przeprowadzone na izolowanym szkieletie podbłonowym krwinki czerwonej wykazały, że jeśli głównym składnikiem odpowiedzialnym za indukowanie zmian byłby szkielet erythrocytu, to krwinka w niskim pH powinna przechodzić w postać echinocytu (uprotanowanie białek szkieletu prowadzi do ich agregacji), natomiast w wysokim pH – w postać stomatocytu (deprotonacja prowadzi do rozluźnienia oddziaływań białek szkieletowych). Badania na nienaruszonych erythrocytach jednoznacznie wykluczyły taki mechanizm. W pH 6,3-7,9 krwinka czerwona utrzymuje kształt dyskocyty. Poniżej pH 6,3 erythrocyt przechodzi w formę stomatocytu. Przy dalszym zmniejszaniu pH stomatocyt przechodzi w stomatosferocyt, a przy pH równym 5,4 stomatocyt przechodzi w sferocyt, od którego uwalniany jest jeden lub kilka dużych egzopęcherzyków pozbawionych szkieletu spektrynowego [19]. Powyżej pH 7,9 erythrocyt przyjmuje formę echinocytu. Podniesienie pH powyżej 9,2 powoduje uwolnienie egzopęcherzyków pozbawionych szkieletu. W pH = 11 wszystkie erythrocyty w roztworze przechodzą w sferocyty [20].

Według Wonga [15] mechanizmem odpowiedzialnym za pH-zależną zmianę kształtu jest zmiana stosunku  $(Cl^-)_i / (Cl^-)_o$ , która z kolei wymusza zmianę konformacji białka pasma 3. Aby zaszła transformacja wystarczająca jest zmiana konformacji 1% całkowitej liczby cząsteczek białek pasma 3. Zmiany stosunku  $(Cl^-)_i / (Cl^-)_o$  są wynikiem jonizacji 2,3 di-

**Tabela 1.** Wybrane czynniki echinocyto-genne (zmniejszające wartość stosunku  $(Cl^-)_i/(Cl^-)_o$  [15].

Czynnik	Mechanizm działania
hipertoniczne stężenie NaCl	wzrost stężenia $(Cl^-)_o$
zasadowe pH	deprotonacja 2,3-DPG i hemoglobiny
bliskość powierzchni szklanych	deprotonacja 2,3-DPG i hemoglobiny
pole elektryczne	deprotonacja 2,3-DPG i hemoglobiny
wzrost stężenia jonów $Ca^{2+}$	spadek stężenia jonów $K^+$
zahamowanie aktywności kinazy pirogronianowej	wzrost stężenia 2,3-DPG

**Tabela 2.** Wybrane czynniki stomatocyto-genne (zwiększające wartość stosunku  $(Cl^-)_i/(Cl^-)_o$  [15].

Czynnik	Mechanizm działania
hipotoniczne stężenie NaCl	spadek stężenia $(Cl^-)_o$
kwasowe pH	protonacja 2,3-DPG i hemoglobiny
izotoniczny roztwór cytrynianu	spadek stężenia $(Cl^-)_o$
izotoniczny roztwór sacharozy	spadek stężenia $(Cl^-)_o$
nadmiar deaminazy adenozykowej	wzrost stężenia $NH_3$
nadtlenek wodoru	wzrost stężenia $CO_2$

fosfoglicerynianu i hemoglobiny w alkalicznym pH lub protonacji tych białek w kwasowym pH. Zmiany te powodują odpowiednio spadek stosunku  $(Cl^-)_i/(Cl^-)_o$  i echinocytozę oraz wzrost tego stosunku i stomatocytozę.

Inny mechanizm wpływu pH na zmiany kształtu erytrocytów został zaproponowany przez Gedde i wsp. [21] i opiera się na zależnej od pH obecności w erytrocycie białek amfitropowych. Białka te, w zależności od pH komórki, mogą być związane z błoną komórkową lub rozpuszczone w cytosolu. W niskim pH wbudowują się one w wewnętrzną monowarstwę błony, działając stomatocyto-gennie, natomiast w wysokim pH przechodzą do cytoplazmy, działając echinocyto-gennie. Białka te działają również antagonistycznie w stosunku do napięcia echinocyto-gennego lub stomatocyto-gennego wywieranego przez wahania kształtu szkieletu błonowego. W pH 6,3–7,9, w którym krwinka ma kształt dyskocytu, napięcia te znoszą się wzajemnie. Jeżeli natomiast pH wzrośnie lub zmaleje, przeważają siły echino- lub stomatocyto-genne, istniejące dzięki białkom amfitropowym. Posiadanie właściwości amfitropowych wykazano dla białek, takich jak: spektryna, aktyna, hemoglobina, białko pasma 4.1. oraz dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Doświadczenia prowadzone przez Gedde i współpracowników wykazały [21], że najważniejszym białkiem amfitropowym odpowiedzialnym za transformację kształtu wydaje się być dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Jest to białko peryferyjne, powiązane z błoną poprzez oddziaływania elektrostatyczne z cytosolową częścią białka pasma 3. Nieznany jest natomiast mechanizm wbudowywania się tego białka w błonę i indukowania w niej zmian. Jedną z hipotez zakłada, że w miarę wbudowywania się rozpuszczonego w cytosolu białka w błonę, ładunki dodatnie na jego powierzchni stabilizowane są przez pierścienie aromatyczne znajdujące się po stronie hydrofobowej tego białka. Następna opiera się na oddziaływaniach dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego z białkiem pasma 3. Zmiany konformacyjne białka pasma 3 powstałe wskutek np.: zmiany siły jonowej lub działania inhibitorów jego aktywności, wpływają na orientację wiązania z dehydrogenazą aldehydu 3-fosfoglicery-

nowego i indukują w ten sposób zmiany kształtu erytrocytu [21].

Inna hipoteza próbująca wyjaśnić pH-zależną transformację erytrocytów została zaproponowana przez Rasia i Bollini [22]. Wiąże ona zmiany kształtu erytrocytów z glikokaliksem. Glikokaliks jest silnie ujemnie naładowaną strukturą na powierzchni błony biologicznej, zbudowaną głównie przez reszty cukrowe glikoforyn. Zaproponowany mechanizm opiera się na pH-zależnej zmianie relacji pomiędzy oddziaływaniami kohezijnymi reszt węglowodanowych i działającymi przeciwie siłami odpychania cząsteczek o takim samym ładunku. Małe jony, w tym  $H^+$ , mogą swobodnie penetrować glikokaliks i częściowo osłaniać ujemne ładunki reszt pochodnych cukrowych glikokaliksu. Dlatego wzrost siły jonowej i/lub spadek pH powodują kurczenie się warstwy glikokaliksu, co pociąga zmniejszenie się powierzchni zewnętrznej monowarstwy błony. Efektem jest obserwowana stomatocytoza.

Dodatkowo, spadek pH powoduje zmniejszenie ilości naładowanych grup w glikokaliksie, zwiększając efekt ekranowania ładunków. Zwiększenie pH i/lub spadek siły wywołuje reakcję odwrotną, efektem której jest transformacja dyskocytołów do formy echinocytołów.

Możliwe, że zmiana konformacji białka pasma 3 i amfitropowe zachowanie dehydrogenazy 3-fosfoglicerynowej kumulują się, wywołując w niskim pH stomatocytozę, a w wysokim – echinocytozę. Wszystkie powyższe przedstawione hipotezy pH-zależnej transformacji są zgodne z teorią sprzężonych monowarstw.

## POTENCJAŁ TRANSBŁONOWY

Stosunek stężeń  $(Cl^-)_i/(Cl^-)_o$  jest elementem, który pozwala na powiązanie potencjału transbłonowego  $\Delta\psi$  z matematycznym wyrażeniem równowagi Donnana:

$$\psi = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{(Cl^-)_i}{(Cl^-)_o} \right) = \frac{RT}{zF} \ln r$$

Potencjał transbłonowy uważany jest często za najważniejszy czynnik wpływający na kształt erytrocytów [6,23], ponieważ za jego pośrednictwem wpływają na błonę erytrocytarną czynniki takie jak pH, temperatura, siła jonowa oraz cząsteczki substancji amfifilowych. Indeks kształtu erytrocytu ( $I_{\psi}$ ) jest proporcjonalny zarówno do  $\Delta\psi$ , jak i do  $\Delta l$  (różnicy siły jonowej po obu stronach błony). W swoich doświadczeniach Glaser [23] udowadnia, że zachowanie  $\Delta\psi$  przy jednoczesnych zmianach pH i objętości krwinki nie wpływa na zmiany kształtu erytrocytów. Natomiast Tacker wykazał, że  $\Delta\psi$  zależy od siły jonowej wewnątrz i na zewnątrz erytrocytu, zmian pH, temperatury i dodatku cząsteczek amfifili egzogennych. Zmiana któregośkolwiek z tych parametrów zmienia  $\Delta\psi$  i może doprowadzić do transformacji kształtu. Przy sile jonowej równej 96 mM erytrocyty znajdują się w formie dyskocytu, zmniejszenie jej wartości do 45 mM indukuje transformację do stomatocytu, natomiast przy zwiększeniu do 300 mM obserwuje się przejście dyskocytołów w echinocyty. Tendencja ta jest najsilniej widoczna w

środoowisku izoosmotycznym (290 mOsm). Środoowisko hipotoniczne i hipertoniczne sprawiają, że przejście stomatocyt – echinocyt jest łagodniejsze, a zmiany kształtu słabiej zaznaczone [6]. Zależności te można podsumować w następujący sposób: jeżeli  $\Delta\psi = \psi_{in} - \psi_{out} \approx 0$ , to krwinka czerwona występuje w formie dyskocytu. Zwiększenie wartości  $\Delta\psi > 0$  wywołuje stomatocytozę, natomiast spadek  $\Delta\psi < 0$  – echinocytozę. Podobna zależność występuje między  $\Delta I$  a kształtem erythrocytu. Jeżeli  $\Delta I = I_{in} - I_{out} > 0$  zachodzi stomatocytoza, natomiast gdy  $\Delta I < 0$  echinocytoza.

### CZYNNIKI DZIAŁAJĄCE ZA POŚREDNICTWEM BIAŁKA PASMA 3

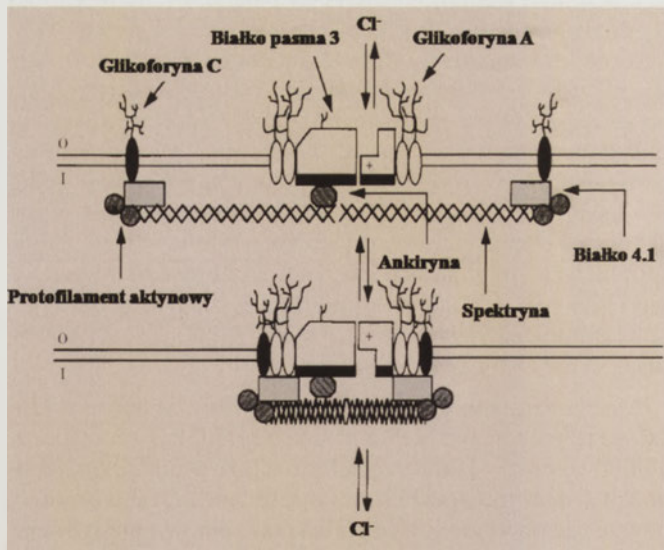
Białko pasma 3 jest, podobnie jak potencjał błonowy, uważane jest za główny i najważniejszy czynnik wpływający na transformację kształtów erythrocytów [13,15,24]. Wykazały to badania przeprowadzone na erythrocytach człowieka, pstrąga i minoga. Stwierdzono, że czynniki echinocyto-genne, takie jak amfifile anionowe i jony  $Ca^{2+}$  wywoływały transformacje kształtu jedynie w krwinkach ludzkiej i ryb (pstrąg), wiadomo natomiast, że erythrocyty minoga nie zawierają w błonie białka pasma 3. Dodatkowo, podniesienie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $Ca^{2+}$  powodowało sferocytozę jedynie w przypadku erythrocytów pstrąga, co spowodowane było brakiem oddziaływań pomiędzy białkiem pasma 3 a szkieletem podbłonowym, których mediatorem jest ankiryna, nieobecna w krwinkach pstrąga [25].

Białko pasma 3 jest najliczniejszym białkiem błony erythrocytarnej. W błonie znajduje się około  $1,2 \times 10^6$  kopii tego białka i stanowi to 25% wszystkich białek integralnych błony krwinki czerwonej [26]. Powierzchnia pojedynczej cząsteczki białka pasma 3 wynosi  $13,75 \text{ nm}^2$ , więc łączna powierzchnia przypadająca na to białko to ponad 10% powierzchni całego erythrocytu, wynoszącej  $137 \text{ }\mu\text{m}^2$ . Tworzony przez to białko kanał jonowy ma średnicę  $0,8\text{--}0,9 \text{ nm}$  [25]. Białko pasma 3 jest białkiem zbudowanym z około 930 reszt aminokwasowych, posiada budowę dwudomenową. Politopowa domena transbłonowa przebija błonę 14  $\alpha$ -helisami i ma masę cząsteczkową 55 kDa. Jest ona odpowiedzialna za wymianę anionów, przede wszystkim  $Cl^-$  i  $HCO_3^-$ . Transport anionów odbywa się zgodnie z mechanizmem typu „ping-pong”. Druga domena znajduje się po stronie cytoplazmatycznej i ma masę 43 kDa. Jest ona połączona z ankiryną, białkiem pasma 4.1, białkiem pasma 4.2, glikoforyną A oraz innymi. Ta N-końcowa domena posiada kwaśny charakter i jest wrażliwa na zmiany pH. Może ulegać fosforylacji przez kinazę i być defosforylowana przez fosfatazę związaną z białkiem pasma 3 [15]. Białko pasma 3 występuje w błonie w dwóch różnych konformacjach: pozwalającej na wypływ anionów z komórki („outward-facing”) i pozwalającej na napływ anionów z środowiska zewnętrznego („inward-facing”). Stosunek cząsteczek białka posiadających konformację pozwalającą na napływ anionów do konformacji przeciwnej wynosi około 15:1. Teoretycznie, transport anionów do wnętrza komórki może zachodzić 15 razy szybciej niż ich transport na zewnątrz, co oznacza, że występuje znacząca nierównowaga w ilości transportowanych poprzez błonę jonów na korzyść ich napływu do wnętrza komórki. Aby mógł wystąpić nagły wypływ anionów na zewnątrz komórki, muszą zostać zerwane oddziaływania pomię-

dzy białkiem pasma 3 a białkiem pasma 4.1 i glikoforyną A, gdyż stabilizują one konformację „inward-facing” [15]. Istnienie mechanizmu odpowiedzialnego za transformację erythrocytów powiązaną z białkiem pasma 3 potwierdzają obserwacje dwóch wrodzonych chorób, w których występują zmienione mutacyjnie białka pasma 3. W wyniku mutacyjnej zamiany proliny 868 na leucynę powstaje rzadko występujące białko pasma 3 HT. Wynikiem tej zamiany jest akancytoza krwinek czerwonych. Inna odmiana tego białka, spotykana w populacjach ludzkich z południowo-wschodniej Azji, różniąc się od prawidłowej dziewięcioma resztami aminokwasowymi w pozycjach 400 do 409, wywołuje owalocytozę [15].

Mechanizm zmian kształtu erythrocytów, w którym kluczową rolę odgrywa białko pasma 3 i inhibitory transportu anionów przez to białko, został zaproponowany przez Wonga. Inhibitory transportu indukują zmianę kształtu krwinki, zmieniając powinowactwo białka do anionów i modyfikując pośrednio stosunek stężeń jonów chlorkowych  $(Cl^-)_{in}/(Cl^-)_{out}$  wynoszący 0,67, i równowagę tych jonów wynikającą z równania Donnana. Istnieje kilka klas czynników wykazujących właściwości hamujące w stosunku do białka pasma 3. Pierwszym z nich jest pH. Zaobserwowano zmiany aktywności wymiany anionów przez białko pasma 3 związane z pH-zależnymi zmianami krzywizny erythrocytów. Jonizacja 2,3-difosfoglicerynianu oraz hemoglobiny, występująca przy wzroście pH, wymusza zmianę konformacji białka pasma 3 na „inward-facing”. Jest to spowodowane spadkiem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $Cl^-$ . Trzeba zauważyć, że wzrost pH nie hamuje transportu anionów przy udziale białka pasma 3, w przeciwieństwie do spadku pH. Wraz ze spadkiem pH rośnie stężenie jonów  $Cl^-$  w komórce, co wymaga przejścia białka pasma 3 w konformację „outward-facing”. Przy spadku pH następuje również protonacja białka po jego cytoplazmatycznej stronie [15].

Białko pasma 3, oprócz jonów  $Cl^-$  i  $HCO_3^-$ , może transportować wiele innych jonów, które jednak są najczęściej transportowane dużo wolniej i z mniejszą wydajnością niż jony  $Cl^-$  i  $HCO_3^-$ . Wykazują dlatego właściwości inhibitorów kompetycyjnych transportu tych jonów. Wiele eksperymentów potwierdza hipotezę, że zmniejszony transport jonów  $Cl^-$  i  $HCO_3^-$  może być odpowiedzialny za zmianę kształtu krwinek czerwonych. Jony chromiowe, azotanowe, szczawianowe, wanadanowe i aniony ponadtlenkowe należą do znanych czynników wywołujących echinocytozę. Ich transport przez białko pasma 3 jest znacznie wolniejszy niż jonów chlorkowych i węglanowych. Zjawisko zachodzenia echinocytozy w buforach octanowych również wydaje się potwierdzać powyższą hipotezę. Jony octanowe konkurują z jonami chlorkowymi o miejsce wiązania z białkiem pasma 3. Dochodzi do zablokowania tego miejsca, ponieważ octan nie jest transportowany przez błonę przy udziale białka pasma 3, lecz praktycznie tylko na zasadzie biernej dyfuzji. O podobną zasadę opiera się transformacja echinocyto-genna w buforze kakodylanowym o pH 7,4, kakodylan posiada prawdopodobnie zdolność do oddziaływania z miejscem w białku pasma 3 odpowiedzialnym za wiązanie transportowanych anionów [27].



Rycina 4. Proponowany mechanizm zmian kształtu erytrocytów za pośrednictwem zmian konformacji białka pasma 3 [15].

Wiele amfifilowych leków wykazuje właściwości stomatocytogenne lub echinocytogenne. Jak już wspomniano wcześniej, większość echinocytogennych leków to amfifile anionowe, a leki stomatocytogenne to amfifile kationowe. Proponowany przez Wonga mechanizm działania tych leków zakłada hamowanie wymiany anionów przez białko pasma 3 oraz zmianę stosunku konformacji „outward-facing” do „inward-facing” (Ryc. 4). Stwierdzono, że białko pasma 3 jest hamowane przez leki z obu powyższych grup oraz że hamowanie i transformacja kształtu zachodzą równolegle. Echinocytogeneza spowodowana anionowymi lekami amfifilowymi może być odwrócona dodaniem leków kationowych, natomiast ich hamujący wpływ na funkcje białka pasma 3 nie wykazuje takich właściwości. Wykazano, że wybiórcze trawienie ankiryny przez trypsynę w cieniach erytrocytów uniemożliwia transformację stomatocytogeną wywołaną przez chlorpromazynę. Można z tego wywnioskować, że amfifile nie są zdolne do indukcji transformacji wyłącznie poprzez wybiórcze wbudowywanie się w błonę erytrocytarną. Również na tych samych zasadach opiera się działanie detergentów, które związane jest z zaburzaniem transportu anionów przez białko pasma 3 [15]. Za hipotezą tą przemawiają także badania Betz'a i wsp. [28], którzy badali łączną objętość białek w zewnętrznej monowarstwie błony, używając AFM (ang. *Atomic Force Microscopy*, mikroskopia sił atomowych). Objętość białek w zewnętrznej monowarstwie zależy od ich konformacji. Wykazali oni, że w stomatocytach uzyskanych w warunkach niskiego pH, niskiej siły jonowej lub obecności kwasu niflumowego, który jest inhibitorem transportu anionów, łączna objętość tych białek jest znacząco niższa niż w formie dyskocyty. Natomiast w echinocytach uzyskanych w obecności np. furosemidu, objętość białek w zewnętrznej monowarstwie rośnie. Furosemid wpływa na zmianę konformacji białka pasma 3, natomiast kwas niflumowy, przy wykazywanych właściwościach hamujących, nie wpływa na zmianę konformacji. Z badań tych wynika, że zmiana kształtu erytrocytu wywołana czynnikami echinocytogennymi lub stomatocytogennymi wpływa na konformację białek w błonie

nie erytrocytu. Możliwe jest również działanie odwrotne – zmiana konformacji białek błonowych może wywołać zmianę kształtu erytrocytu.

## POTENCJALNE ZNACZENIE ZMIAN KSZTAŁTU ERYTROCYTÓW

W zdrowym organizmie dzięki, między innymi, buforowi węglanowemu i fosforanowemu utrzymywana jest homeostaza pH. W stanach chorobowych lub podczas uszkodzenia naczyń krwionośnych homeostaza może ulec zaburzeniu. Dzięki zdolnościom erytrocytów do zmiany kształtu są one w stanie przetrwać i wykonywać swoje podstawowe funkcje w zmienionym środowisku. Erytrocyt utrzymuje kształt dyskocyty w zakresie pH 6,3–7,9. Powyżej pH 7,9 krwinka przechodzi transformację echinocyt-echinocyt, by w pH 11 przybrać kształt sferocyty (przejście w postać sferocyty następuje także w pH 5,4 po uprzedniej zmianie kształtu na stomatocyt). Dopiero dalszy wzrost pH powoduje hemolizę erytrocytu [20]. Homeostaza może zostać zaburzona także podczas silnego odwodnienia organizmu. Zwiększeniu ulega wtedy wskaźnik hematokrytowy, zwiększa się gęstość krwi oraz zmieniają się jej warunki fizykochemiczne. Płynność krwi zostaje jednak utrzymana [15]. Erytrocyt, mimo iż nie posiada organelli, prowadzi własny intensywny metabolizm, a ATP niezbędne do działania wielu enzymów w czerwonych ciałkach krwi jest wytwarzane w procesie glikolizy. W organizmie człowieka w warunkach głodu zgromadzony zapas glikogenu pozwala na dostarczanie glukozy niezbędnej do zachodzenia procesu glikolizy przez około dobę. Dzięki możliwości transformacji dyskocyt – echinocyt krwinka jest w stanie przetrwać okres głodu.

## PIŚMIENNICTWO

1. Minakowski W, Weidner S (1998) *Biochemia kręgowców*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
2. Krzymowski T (1998) *Fizjologia zwierząt*, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa
3. Dąbrowski Z (red) (2000) *Fizjologia krwi. Wybrane zagadnienia cz. 2*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
4. Sheetz MP, Singer SJ (1974) *Biological Membranes as Bilayer Couples. A Molecular Mechanism of Drug - Erythrocyte Interactions*. *Proc Nat Acad Sci USA* 71: 4457-4461
5. Lim GHW, Wortis M, Mukhopadhyay R (2002) *Stomatocyte-discocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer-couple hypothesis from membrane mechanics*. *Proc Nat Acad Sci USA* 99: 16766-16769
6. Tachev KD, Danov KD, Kralchevsky PA (2004) *On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experimental and theoretical model*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 34: 123-140
7. Mukhopadhyay R, Lim GHW, Wortis M (2002) *Echinocyte shapes: bending, stretching, and shear determine spicule shape and spacing*. *Biophys J* 82: 1756-1772
8. Dołowy K, Szewczyk A, Pikula S (2003) *Błony biologiczne*, Wydawnictwo Naukowe Śląsk, Katowice, Warszawa
9. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ (2004) *Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera*. *Biochim Biophys Acta* 1666: 105-117
10. Maire M, Champeil P, Moller JV (2000) *Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents*. *Biochem Biophys Acta* 1508: 86-111



11. Iglic A, Kralj-Iglic V, Hagerstrand H (1998) Amphiphile induced echinocyte-spherocyte transformation of red blood cell shape. *Eur Biophys J* 27: 335-339
12. Iglic A, Veranic P, Jezernik K, Fosnaric M, Kamina B, Hagerstrand H, Kralj-Iglic V (2004) Spherocyte shape transformation and release of tubular membranes in human erythrocytes. *Bioelectrochemistry* 62: 159-161
13. Hagerstrand H, Danieluk M, Bobrowska-Hagerstrand M, Iglic A, Wrobel A, Isomaa B, Nikinmaa M (2000) Influence of band 3 protein absence and skeletal structures on amphiphile- and  $Ca^{2+}$ -induced shape alterations in erythrocytes: a study with lamprey (*Lampetra fluviatilis*), trout (*Onchorhynchus mykiss*) and human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1466: 125-138
14. Isomaa B, Hagenstrand H, Paatero G (1986) Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochem Biophys Acta* 899: 93-103
15. Wong P (1999) A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte. *J Theor Biol* 196: 343-361
16. Schwarz S, Haest CWM, Deuticke B (1999) Extensive electroporation abolishes experimentally induced shape transformations of erythrocytes: a consequence of phospholipids symmetrization? *Biochim Biophys Acta* 1421: 361-379
17. Backman L (1986) Shape control in the human red cell. *J Cell Sci* 80: 281-298
18. Patell VP, Fairbanks G (1986) Relationship of major phosphorylation reactions and MgATPase activities to ATP-dependent shape change of human erythrocyte membranes. *Biol Chem* 261: 3170-3177
19. Bobrowska-Hagerstrand M, Hagerstrand H, Iglic A (1998) Membrane skeleton and red blood cell vesiculation at low pH. *Biochim Biophys Acta* 1371: 123-128
20. Iglic A, Hagerstrand H, Kralj-Iglic V, Bobrowska-Hagerstrand M (1998) A possible physical mechanism of red blood cell vesiculation obtained by incubation at high pH. *Biomech* 31: 151-156
21. Gedde MM, Yang E, Huestis WH (1999) Resolution of the paradox of red cell shape changes in low and high pH. *Biochim Biophys Acta* 1417: 246-253
22. Rasia M, Bollini A (1998) Red blood cell shape as a function of medium's ionic strength and pH. *Biochim Biophys Acta* 1372: 198-204
23. Glaser R (1998) Does the transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ) or the intracellular pH (pH<sub>i</sub>) control the shape of human erythrocytes? *Biophys J* 75: 568-570
24. Gimsa J (1998) A possible molecular mechanism governing human erythrocyte shape. *Biophys J* 75: 568-570
25. Gimsa J (1995) Red cell echinocytogenesis is correlated to the recruitment of external band-3 conformations. *Bioelectrochem Bioenerg* 38: 99-103
26. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J (2000) *Molecular Cell Biology*, WH Freeman, New York
27. Jennings ML (1989) Structure and function of the red blood cell anion transport protein. *Annu Rev Biophys Chem* 18: 397-430
28. Betz T, Bakowsky U, Muller MR, Lehr C, Bernhardt I (2007) Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cell. *Bioelectrochemistry* 70: 122-126

## Transformations of erythrocytes shape and its regulation

Maria Stasiuk<sup>✉</sup>, Grzegorz Kijanka, Arkadiusz Kozubek

Department of Lipids and Liposomes, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: stasiuk@ibmb.uni.wroc.pl

**Key words:** band 3 protein, echinocytosis, erythrocytes, stomatocytosis

### ABSTRACT

Erythrocytes can occur in many different shapes. Most of them are pathological and can be involved in diseases such as hemolytic anemia and sickle cell anemia. Only three kinds of red blood cells are not pathological. Echinocytes, stomatocytes and discocytes can occur in the blood stream of a healthy organism. The echinocyte-dysocyte-stomatocyte transformation protects red blood cells from lysis caused by echinocytogenic agents (hypertonic saline, basic pH, vanadate, anionic amphiphiles, ATP depletion etc.) or stomatocytogenic agents (hypotonic saline, acidic pH, cationic amphiphiles etc.). Mechanisms of these transformations can be classified in three groups: redistribution of bilayer's lipid, modification of Donnan's equilibrium and interaction of band 3 protein with different types of external factors.

# Mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) w badaniach biologicznych i medycznych

Jarosław Korczyński<sup>1,✉</sup>

Jakub Włodarczyk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Mikroskopii Konfokalnej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa

<sup>2</sup>Pracownia Neurobiologii Molekularnej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa

<sup>✉</sup>Pracownia Mikroskopii Konfokalnej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (22) 589 23 06, e-mail: j.korczynski@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 18 maja 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 31 lipca 2009 r.

**Słowa kluczowe:** FLIM, mikroskopia fluorescencyjna, FRET

**Wykaz skrótów:** CaMKII (ang. *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II*) – zależna od Ca<sup>2+</sup>/kalmoduliny kinaza II; EGFR (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*) – receptor naskórkowego czynnika wzrostu; FLIE (ang. *Fluorescence Lifetime Imaging Endoscopy*) – endoskopia obrazowania czasów życia fluorescencji; FLIM (ang. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) – mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji; FLIP (ang. *Fluorescence Loss in Photobleaching*) – utrata fluorescencji w wyniku fotowygazania; FRAP (ang. *Fluorescence Recovery after Photobleaching*) – odtworzenie fluorescencji po fotowygazaniu; FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) – Försterowskie rezonansowe przeniesienie energii; GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*) – zielone białko fluoryzujące; TCSPC (ang. *Time Correlated Single Photon Counting*) – skorelowane w czasie zliczanie pojedynczych fotonów; YFP (ang. *Yellow Fluorescent Protein*) – żółte białko fluoryzujące

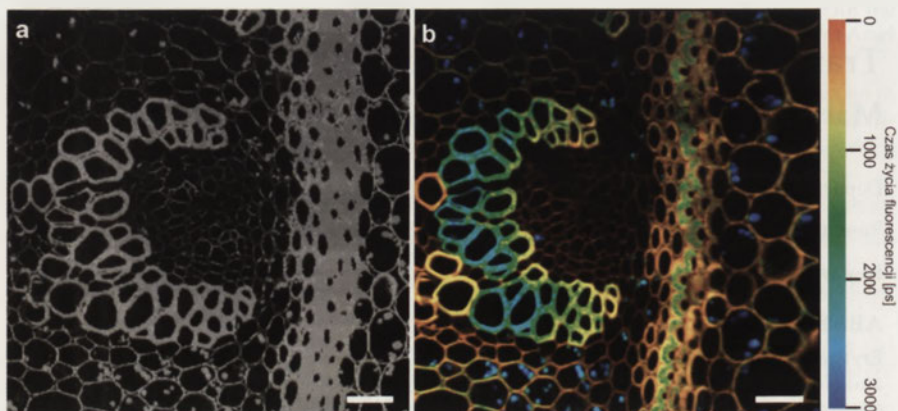
**Podziękowanie:** Autorzy pragną podziękować Pani dr hab. Wandzie Kłopockiej za cenne uwagi podczas pisania niniejszego pracy

## STRESZCZENIE

Zaawansowane techniki mikroskopii fluorescencyjnej znajdują ostatnio coraz szersze zastosowanie w badaniach podstaw molekularnych procesów zachodzących w komórkach. Jedną z takich metod badawczych jest technika FLIM. Technika ta, poprzez pomiar czasu życia fluorescencji w każdym obszarze badanego preparatu, pozwala badać m.in.: oddziaływanie cząsteczek w komórce, stężenie różnych jonów oraz tlenu w określonych obszarach komórki. W niniejszym artykule przedstawiono teoretyczne podstawy i mechanizmy pomiarów czasu życia fluorescencji oraz opisano praktyczne zastosowanie tej techniki w badaniach biologicznych i medycznych.

## WPROWADZENIE

W XXI wieku udział mikroskopii świetlnej w badaniach biologicznych stopniowo wzrasta. Odsunięte w cień w ostatniej dekadzie XX wieku bioobrazowanie staje się znowu jedną z najważniejszych metod badawczych. Dotyczy to szczególnie mikroskopii fluorescencyjnej, którą stosuje się dziś zarówno do precyzyjnego określenia lokalizacji wyznakowanych cząsteczek w komórkach, jak i do badania procesów zachodzących w żywych komórkach czy tkankach. Zainteresowanie tego rodzaju badaniami ma w znacznym stopniu związek z powstaniem nowych znaczników fluorescencyjnych, w tym białek fluorescencyjnych mających zastosowanie w barwieniach przyżyciowych [1]. Zaawansowane techniki mikroskopii fluorescencyjnej umożliwiają m.in.: pomiary oddziaływań cząsteczek w komórce (technika FRET, ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) [2], badanie migracji cząsteczek oraz określenie mobilnej frakcji cząsteczek w komórce (techniki fotoaktywacji i FRAP, ang. *Fluorescence Recovery after Photobleaching*) [3], czy też badanie ciągłości błon biologicznych tworzących wewnątrzkomórkowe przedziały (technika FLIP, ang. *Fluorescence Loss in Photobleaching*) [4]. Dodatkowo, przy zastosowaniu do znakowania próbek określonych sond fluorescencyjnych, możemy mierzyć stężenie jonów Ca<sup>2+</sup> w komórce (np. Fura-2; Calcium-green) [5], czy też pH badanego materiału (np. pyranina) [6]. Wszystkie wymienione wyżej metody opierają się na badaniu zmian intensywności świecenia barwników fluorescencyjnych w określonych obszarach preparatów. Fluorescencję cząsteczek fluorochromów, poza daną intensywnością oraz stałą długością fali, charakteryzuje jeszcze określony czas życia. Na rycinie 1 zestawiono obraz preparatu przedstawiającego intensywność fluorescencji z obrazem pokazującym czas życia fluorescencji w poszczególnych miejscach preparatu.

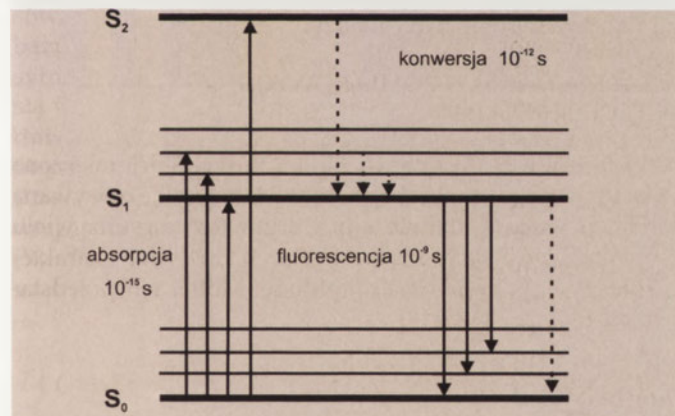


**Rycina 1.** Przekrój przez ogonek liściowy konwalii majowej. a) Obraz intensywności autofluorescencji, b) Obraz FLIM. Kolory wyznaczają długość czasu życia autofluorescencji w danym punkcie. Zdjęcie wykonane z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego Leica SP2 wyposażonego w moduł FLIM (Becker&Hickl, działający w domenie czasowej). Skala 30 µm.

Ostatnio w mikroskopii fluorescencyjnej popularna stała się właśnie technika obrazowania czasu życia fluorescencji użytych barwników (FLIM, ang. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*). Technika ta umożliwia przeprowadzenie całego spektrum badań mikroskopowych od badania oddziaływania cząsteczek w komórce i pomiaru stężenia jonów, po identyfikację w tkance komórek nowotworowych, stosowaną w diagnostyce medycznej.

## CZAS ŻYCIA FLUORESCENCJI

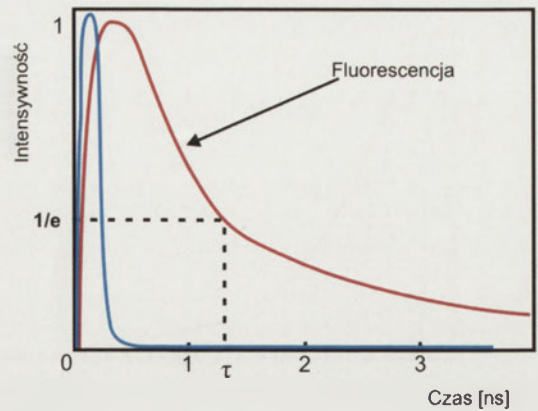
W wyniku absorpcji światła, cząsteczka barwnika fluorescencyjnego przechodzi do wyższych poziomów oscylacyjnych wzbudzonego stanu elektronowego. Wzbudzona cząsteczka uwalnia zaabsorbowaną energię na drodze kilku procesów (bezpromienistych lub promienistych). W procesach bezpromienistych (bez emisji fotonu) wzbudzona cząsteczka w wyniku oddziaływania z innymi cząsteczkami wydziela pochłoniętą energię do otoczenia w postaci ciepła. W ten sposób przechodzi stopniowo do najniższego poziomu oscylacyjnego wzbudzonego stanu elektronowego. Proces ten zachodzi szczególnie szybko ( $10^{-12}$  s) w fazie skondensowanej (w preparatach ciekłych i stałych). Cząsteczka przebywająca w stanie wzbudzonym wystarczająco długo (rzędu  $10^{-8}$  s), aby zaszedł proces emisji spontanicznej, pozbywa się nadmiaru energii, czemu towarzyszy emisja światła zwana fluorescencją (Ryc. 2).



Rycina 2. Schemat Jabłońskiego obrazujący zjawisko fluorescencji; diagram energetyczny cząsteczki pokazuje pozycje elektronów w stanie podstawowym ( $S_0$ ) i stanach wzbudzonych ( $S_1$ ,  $S_2$ ). Strzałkami ciągłymi zaznaczono najważniejsze procesy promieniste, strzałkami kropkowanymi – procesy bezpromieniste. Podano czasy charakterystyczne dla tych procesów.

Średni czas, jaki cząsteczka przebywa w stanie wzbudzonym jest charakterystyczny dla danego fluorochromu i określane jest mianem czasu życia fluorescencji. W praktyce wartość czasu życia fluorescencji wyznaczana jest jako czas, po którym początkowe natężenie fluorescencji wzbudzonej cząsteczki maleje  $e$  razy<sup>1</sup> (Ryc. 3). Wartość ta nie zależy od natężenia użytego światła wzbudzającego, ani od stężenia fluorochromów [7]. Zmienia się jednak z chwilą zmiany właściwości fizykochemicznych otoczenia cząsteczki fluorochromu, co powoduje, że metoda ta

<sup>1</sup> $e$  jest podstawą logarytmu naturalnego (liczbą Eulera) i wynosi w przybliżeniu  $e \approx 2,718$



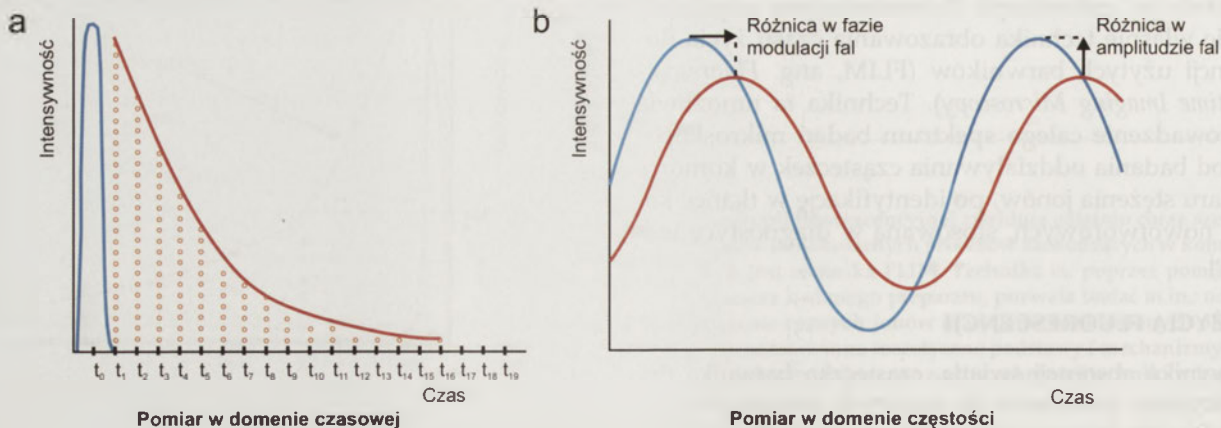
Rycina 3. Czas życia fluorescencji ( $\tau$ ) widoczny po wzbudzeniu fluorochromu krótkim impulsem światła (linia niebieska). Linia czerwona odpowiada zanikowi fluorescencji. Objasnienia w tekście.

jest idealnym narzędziem do badania procesów zachodzących w komórce.

Pomiar czasu życia fluorescencji może być przeprowadzany na wiele sposobów [8], z czego dwie najpopularniejsze metody to pomiary w domenie czasowej oraz w domenie częstości. Sama koncepcja pomiaru czasu życia fluorescencji w domenie czasowej jest stosunkowo prosta. Używany jest w tym przypadku relatywnie krótki (w porównaniu z czasem życia fluorescencji) puls lasera wzbudzającego, po którym można zebrać rozkład czasów zaniku emitowanej fluorescencji (Ryc. 4a). W praktyce pomiar ten jest dokonywany z użyciem licznika pojedynczych fotonów powiązanych czasowo (TCSPC, ang. *Time Correlated Single Photon Counting*), gdzie rejestrowany jest czas detekcji pierwszego emitowanego fotonu po impulsie wzbudzającym. Proces wzbudzania światłem pulsacyjnym obserwowanej próbki jest powtarzany, a pomiar kontynuowany do czasu zebrania powyżej  $10^3$  zliczeń w kanale piksu. Następnie tworzony jest histogram zliczeń fotonów względem krótkich przedziałów czasowych po wzbudzeniu fluorochromu. Obwiednia otrzymanego histogramu reprezentuje krzywą zaniku fluorescencji (Ryc. 4a). Jej analiza, często automatyczna (patrz rozdział Analiza pomiarów czasu życia fluorescencji), pozwala na wyznaczenie czasu życia fluorescencji.

Opisana powyżej technika umożliwia badanie preparatów słabo wybarwionych o niskim natężeniu emitowanej fluorescencji. Wiąże się jednak ze stosunkowo długim czasem pomiarów (potrzebnym do zebrania odpowiedniej liczby fotonów w maksimum krzywej zaniku) oraz wymaga zastosowania drogich i dopiero od niedawna dostępnych pulsacyjnych źródeł światła.

Kolejna technika pomiaru czasu życia fluorescencji działa w domenie częstości. W tej metodzie światło wzbudzające zazwyczaj jest emitowane w sposób ciągły, a jego intensywność jest sinusoidalnie modulowana. Opóźnienie pomiędzy absorpcją wzbudzających fotonów a emisją fluorescencji z próbki (związane z istnieniem czasu życia fluorescencji) powoduje przesunięcie w fazie modulacji fali i demodulację emisji w odniesieniu do światła wzbudzającego (Ryc. 4b). Czas życia fluorescencji badanej próbki określane jest przez



Rycina. 4. Zasada pomiaru czasu życia fluorescencji w domenie czasowej (a) i w domenie częstotliwości (b). Na schemacie a linią niebieską zaznaczono puls światła wzbudzającego. Czerwone kółka obrazują zliczenia pojedynczych fotonów w danych przedziałach czasowych ( $t_0$ – $t_{19}$ ). Obwiednia utworzonego histogramu zliczeń fotonów względem czasu reprezentuje krzywą zaniku fluorescencji (linia czerwona). Na schemacie b przedstawiono zmiany w intensywności światła wzbudzającego (linia niebieska) oraz światła emitowanego przez fluorochrom (linia czerwona). Zaznaczone różnice w fazie modulacji i w amplitudzie pomiędzy tymi dwiema falami są związane z istnieniem czasu życia fluorescencji. Dalsze objaśnienia w tekście.

pomiar i porównanie różnicy w fazie pomiędzy sygnałem wzbudzającym a fluorescencją z próbki. Czytelnika zainteresowanego aparatem matematycznym pozwalającym wyznaczyć czas życia fluorescencji z zastosowaniem tej metody odsyłamy do monografii Lakowicza [9]. Należy podkreślić, że technika ta jest znacznie szybsza od poprzedniej, jednak nie powoduje powstawania krzywej zaniku fluorescencji w danym punkcie i wymaga użycia do badań preparatów o mocniejszym sygnale fluorescencji (w porównaniu z metodą pomiaru w domenie czasowej).

Opisane sposoby pomiaru czasu życia fluorescencji cechuje duża dokładność i wyniki otrzymane z obu przedstawionych metod są porównywalne. W praktyce więc o wyborze odpowiedniego modułu FLIM decyduje zwykle rodzaj posiadanego już źródła światła wzbudzającego w mikroskopie fluorescencyjnym. Najczęściej spotykane układy FLIM to mikroskopy szerokiego pola działające w domenie częstotliwości oraz mikroskopy skaningowe operujące w domenie czasowej. Obecnie szereg firm oferuje gotowe moduły do mikroskopów fluorescencyjnych pozwalające na przeprowadzanie pomiarów czasów życia fluorescencji.

#### ANALIZA POMIARÓW CZASU ŻYCIA FLUORESCENCJI

Jako rezultat pomiarów w technice obrazowania czasów życia użytkownik otrzymuje mapę składającą się z krzywych zaniku fluorescencji. Krzywe te następnie opisywane mogą być różnymi modelami matematycznymi. W wyniku dopasowania modeli otrzymywany jest czas życia fluorescencji ( $\tau$ ). Wybór odpowiedniego modelu pozostaje w gestii badacza i w dużej mierze zależy od cech charakterystycznych danego fluorochromu (liczby charakterystycznych czasów życia), środowiska (bądź gamy środowisk), w którym ten fluorochrom się znajduje oraz jakości zebranego sygnału (ilości zliczeń fotonów w maksimum krzywej zaniku).

Interpretacja zaników fluorescencji otrzymanych z zastosowaniem FLIM, jeżeli jest wykonana z należytą starannością, może dostarczać wiedzy o strukturze i dynamice białek,

peptydów oraz ich kompleksów z ligandami, a przede wszystkim może być źródłem nowych danych o oddziaływaniu badanej biomolekuły z innymi białkowymi partnerami. Zrozumienie tych oddziaływań jest kluczowe dla opisu molekularnego mechanizmu działania białek i znalezienia relacji z ich biologiczną funkcją. Niemniej jednak złożone właściwości fotofizyczne fluorochromów sprawiają, że zanik fluorescencji jest często skomplikowany, a powiązanie parametrów FLIM z cechami badanych układów wymaga od badacza szczegółowej analizy.

#### ANALIZA DANYCH POMIAROWYCH W TECHNICIE FLIM

W technice FLIM krzywa zaniku fluorescencji mierzona w każdym pikselu zebranego obrazu jest zwykle opisywana modelem wielowykładniczym, tj. arytmetyczną sumą wielu wykładniczych<sup>2</sup> składników, z których każdy ma charakterystyczny czas życia oraz amplitudę. Model ten przedstawia następujący wzór [9]:

$$I(t) = \sum_{i=1}^M A_i e^{-t/\tau_i} \quad (1)$$

gdzie  $A_i$  i  $\tau_i$  są odpowiednio amplitudami i czasami zaniku a  $M$  jest liczbą wykładniczych składników zaniku fluorescencji. Średni czas zaniku jest wtedy dany równaniem [9]:

$$\langle t_e \rangle = \frac{\int_0^{\infty} t I(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} \quad (2)$$

Model ten preferowany jest w sytuacji, gdy użyty fluorochrom charakteryzowany jest kilkoma czasami życia bądź w sytuacji, gdy wiedza o liczbie czasów życia uży-

<sup>2</sup>Funkcja wykładnicza, funkcja postaci  $f(x) = a^x$  ( $a > 0$ ), której szczególną postacią jest funkcja eksponencjalna postaci  $f(x) = e^x$ , gdzie  $e$  jest podstawą logarytmu naturalnego.

tego barwnika nie jest dostępna, a zebrany sygnał jest wystarczająco silny, aby umożliwić dopasowanie takiej wieloparametrycznej funkcji (powyżej  $10^3$  zliczeń w maksimum krzywej zaniku). Model ten w swojej granicznej postaci, funkcji monowykładniczej, może być stosowany również w przypadku gdy mamy do czynienia ze słabym sygnałem i stosunkowo niewielką liczbą zliczeń fotonów, rzutując jednak często na jakość otrzymanych wyników (dokładność wyznaczenia mapy czasów życia). Powyższy model, choć ciągle najczęściej używany w literaturze, jest często stosowany arbitralnie, a znaczenie użytych parametrów ( $\tau_1$  i  $A_1$ ) zależy w dużej mierze od użytego fluorochromu i informacji jakie posiadamy na temat kinetyki zaników jego fluorescencji [9]. Alternatywą dla tego opisu są inne modele, nie wymagające od badacza dodatkowej wiedzy o badanym układzie. Przykładem jest tzw. funkcja rozciągniętej eksponenty (ang. *stretched exponent*), którą przedstawiamy w formie zaproponowanej ostatnio do analizy fluorescencyjnego obrazowania czasów życia [10]

$$I(t) = A e^{-\left(\frac{t}{\tau_0}\right)^b} \quad (3)$$

gdzie  $b$  jest bezwymiarowym parametrem heterogeniczności.

Jeszcze innym podejściem preferowanym w sytuacjach, w których nie można przewidzieć określonej liczby czasów życia fluorescencji danego fluorochromu są modele bazujące na rozkładach czasów życia. Przykładowo taka sytuacja spodziewana jest dla fluorochromu znajdującego się w mieszaninie roztworów, gdzie występuje on w środowisku niejednorodnym. Taki barwnik fluorescencyjny otoczony przez więcej niż jedną polarną cząsteczkę będzie wykazywał złożony zanik, będący rezultatem różnych czasów życia fluorescencji dla każdego z układów [9]. Przykładem takiego podejścia jest funkcja potęgowa używana do opisu złożonych zaników fluorescencji [11]

$$I(t) = I_0 \left[ 1 - (1-q) \frac{t}{\tau_0} \right]^{1-q} \quad (4)$$

charakteryzowana przez średnią wartość z rozkładu czasów życia ( $\tau_0$ ) oraz parametr heterogeniczności ( $q$ ) opisujący względną wariancję rozkładu czasów życia.

Warto podkreślić, że użycie dwóch ostatnich modeli (wzory 3,4) w dużej mierze wpływa na poprawę kontrastu obrazu otrzymanego w technice FLIM i ich stosowanie polecane jest w sytuacji gdy odzwierciedlenie szczegółów na mapie czasów życia nie jest zadawalające. Dopasowanie powyższych modeli do danych doświadczalnych znacząco wpływa na jakość końcowego wyniku. Ponadto, ze względu na mniejszą liczbę użytych parametrów niż w przypadku funkcji wielowykładniczej (wzór 1), dwa ostatnie modele stosowane mogą być w przypadku analizy słabego ale złożonego sygnału bądź w sytuacji, gdy dłuższe zliczanie fotonów nie jest możliwe (np. z powodu fotowygazania).

Jakość dopasowania modeli do mierzonych krzywych zaniku fluorescencji analizowana jest zwykle testem zredukowanego Chi kwadrat i/lub weryfikowana przez strukturę obserwowaną na wykresie odchyłeń resztkowych [9].

$$d_{res} = \frac{(G_{exp} - G_{teo.})}{\sqrt{G_{exp.} + G_{teo.}}} \quad (5)$$

## ZASTOSOWANIE TECHNIKI FLIM W BADANIACH BIOLOGICZNYCH I DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ

Najprostszą formą wykorzystania mikroskopii obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) jest określenie lokalizacji barwników fluorescencyjnych. Niekiedy jest to trudne przy analizie samego tylko natężenia fluorescencji, gdy widma emisji badanych barwników są położone blisko siebie lub wręcz pokrywają się. Z uwagi na fakt, że wartości czasów życia fluorescencji są wielkościami charakterystycznymi dla naturalnych barwników obecnych w tkankach możemy, używając techniki FLIM, zlokalizować i oddzielić fluorescencję barwników wprowadzonych do preparatu od jego autofluorescencji. Technika ta pozwala na badanie każdego zjawiska czy procesu, który wpływa na zmianę czasu życia fluorescencji poszczególnych barwników. Jej niewątpliwą zaletą jest fakt, iż czas życia fluorescencji jest niezależny od stężenia fluorochromów, natężenia światła wzbudzającego czy użytego obiektywu [7]. Pomiar FLIM są więc mniej podatne na zaburzenia spowodowane różnicami w lokalnym stężeniu fluorochromu w komórce czy nierównomiernym wzbudzeniu fluorescencji we wszystkich obszarach preparatu. Dodatkowo umożliwiają porównanie wyników uzyskanych z obrazów o różnym powiększeniu.

## BADANIE ODDZIAŁYWANIA POMIĘDZY CZĄSTECZKAMI

Mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji znajduje zastosowanie w pomiarach rezonansowego przeniesienia energii między blisko położonymi cząsteczkami (FRET, ang. *Förster Resonance Energy Transfer*). Ten bezpromienisty transfer energii między dwoma fluorochromami: donorem i akceptorem, ma miejsce jedynie, gdy: 1) widmo emisji fluorescencji donora pokrywa się z widmem absorpcji akceptora, 2) odległość między cząsteczką donora a akceptora jest mniejsza niż 10 nm oraz 3) gdy występuje odpowiednia, wzajemna orientacja między momentami dipolowymi przejścia dla emisji donora i absorpcji akceptora. Efektywność transferu ( $E$ ) maleje z szóstą potęgą odległości między molekułami ( $r$ ).

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (6)$$

W powyższym wzorze  $R_0$  jest odległością Förstera, dla której wydajność transferu wynosi 50%. W zależności od barwnika przyjmuje ona wartość od 3 do 6 nm [8]. Oznaczenie

cza to, że przy dystansie między donorem a akceptorem większym niż 10 nm, wydajność przeniesienia energii ( $E$ ) jest zanedbywalnie mała. Istnienie rezonansowego przeniesienia energii między cząsteczkami w komórce wskazuje na ich oddziaływanie. Takiego oddziaływania dwóch wybarwionych molekuł nie można być pewnym przy obserwacji samych tylko obrazów z mikroskopu fluorescencyjnego ze względu na jego ograniczoną rozdzielczość (dla mikroskopów konfokalnych rozdzielczość lateralna wynosi minimum 160 nm).

FRET można badać na kilka sposobów, mierząc: 1) spadek intensywności fluorescencji donora po związaniu się z akceptorem, 2) wzrost intensywności fluorescencji takiego akceptora lub 3) obserwując skrócenie czasu życia fluorescencji donora związanego z akceptorem (technika FRET-FLIM). Skrócony czas życia fluorescencji związanego donora ( $\tau_{DA}$ ) będzie wynosił

$$\tau_{DA} = \tau_D (1-E) \quad (7)$$

gdzie  $E$  to wydajność transferu energii, a  $\tau_D$  to czas życia fluorescencji niezwiązanego donora w preparacie kontrolnym [8].

Technika FRET-FLIM jest często wykorzystywana w mierzeniu oddziaływania pomiędzy cząsteczkami w komórce. Szczególnie intensywnie technika ta stosowana jest przy badaniu współwystępowania białek biorących udział w przekazywaniu sygnałów. Technika FRET-FLIM badano m.in. poziom fosforylacji receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*) w komórkach Cos-7. Receptor ten został wyznakowany białkiem GFP pełniącym funkcję donora. Akceptorem był zaś fluorochrom Cy3 związany z przeciwciałem przeciwko fosforylowanej kinazie tyrozynowej [12]. Podobnie, używając tej samej kombinacji barwników fluorescencyjnych (GFP-Cy3), obserwowano oddziaływanie pomiędzy białkową kinazą C (PKC) a integryną  $\beta 1$  w komórkach raka piersi MCF-7 [13].

Metoda FRET-FLIM była pomocna również w poszukiwaniu oddziaływania między kluczowymi białkami związanymi z powstawaniem wielu chorób u człowieka. Przykładem może być badanie współwystępowania białkowego prekursora amyloidu  $\beta$  (APP) i preseniliny 1 (PS-1) w komórkach CHO (ang. *Chinese Hamster Ovary*). Oba te białka u człowieka mogą brać udział w tworzeniu płytek starczych w chorobie Alzheimer'a. W doświadczeniu jako donora użyto barwnik FITC (znakujący presenilinę 1), akceptorem był zaś fluorochrom Cy3 (barwiący APP). Analiza zmian czasu życia fluorescencji donora wykazała istnienie ścisłego oddziaływania pomiędzy tymi dwoma białkami głównie w strefie podbłonowej komórki, mimo iż oba te białka współwystępują najliczniej w obrębie siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego [14]. Podobnie zbadano oddziaływanie dysferliny – białka błonowego odpowiedzialnego m.in. za procesy naprawcze włókien mięśni szkieletowych, z aneksyną A1 i A2. Mutacje w genie dysferliny mogą prowadzić do wystąpienia zanikowej dystrofii mięśni Leydena i Möbiusa. W doświadczeniu prowadzonym na mioblastach myszy, dysferlinę wyznakowano fluoresceiną (donor), natomiast aneksynę A1 i A2 odpowiednio fluorochromami Alexa fluor 594 i 568 (akceptor). Dzięki pomiarom FRET-FLIM za-

obserwowano współwystępowanie dysferliny z aneksynami podczas procesów naprawy błony komórkowej w prawidłowych komórkach mięśniowych oraz brak podobnego oddziaływania w komórkach ze zmutowaną dysferliną [15].

Technika FRET-FLIM umożliwiła także badanie oddziaływania pomiędzy białkami w komórkach roślinnych, czego przykładem jest praca dotycząca współdziałania białek MADS-box w jądrach przyżyciowo barwionych komórek z liścia petunii. Białka tego typu często tworzą dimery funkcjonujące jako czynniki transkrypcyjne zaangażowane w rozwój kwiatów. Do badania tych oddziaływań poszczególne grupy białek typu MADS-box sprzężono z barwnikami CFP (jako donor) oraz YFP (jako akceptor) [16].

Interesujące badania z użyciem techniki FRET-FLIM przeprowadzone zostały ostatnio przez Lee i wsp. [17]. Polegały one na mierzeniu aktywności kinazy CaMKII w pojedynczych kolcach dendrytycznych neuronów hipokampalnych szczura. W tym celu zmodyfikowano badaną kinazę, znakując jej N-koniec białkiem mEGFP, pełniącym funkcję donora. Jako akceptora użyto zaś białka YFP przekształconego do niefluorescencyjnej formy i przyłączonego do końca karboksylowego kinazy CaMKII. Podczas aktywacji kinazy, wskutek zmiany jej przestrzennej konformacji, dochodziło do zwiększenia czasu życia fluorescencji donora. Efekt ten był rezultatem zmniejszenia FRET, a więc zwiększaniem odległości pomiędzy parą donor-akceptor.

Technikę FRET-FLIM stosowano z powodzeniem również w badaniach dotyczących współwystępowania białek i lipidów [18,19]. Jako przykład można podać badanie oddziaływania fosfolipazy D z lipidami błonowymi. W doświadczeniu prowadzonym na żywych komórkach HeLa i HEK-293 (ang. *Human Embryonic Kidney*) fosfolipazę sprzężono z białkiem fluorescencyjnym GFP (donor), w błonie zaś wyznakowano za pomocą barwnika BODIPY fosfatydylocholinę (akceptor). Zwiększenie aktywności fosfolipazy D i współwystępowanie z lipidami błonowymi następowało po stymulacji komórek naskórkowym czynnikiem wzrostu (EGF) [19]. Podobnie, dzięki pomiarom FRET-FLIM udało się zidentyfikować miejsca oddziaływań pomiędzy białkami a łańcuchem DNA. W tym przypadku stwierdzono oddziaływanie między histonem 2B wyznakowanym białkiem GFP a cząstkami barwnika SYTOX-orange wiążącymi się z łańcuchem DNA w jądrach komórek HeLa [20].

Interesujące są również badania obrazujące współwystępowanie fragmentów DNA bogatych w pary zasad A:T z fragmentami G:C. W doświadczeniu z zastosowaniem techniki FRET-FLIM przeprowadzonym przez Muratę i wsp. [21] jako donora użyto barwnik Hoechst 33258, specyficznie wiążący regiony A:T w łańcuchu DNA, a jako akceptora – fluorochrom 7-aminoaktynomycynę D (7-AAD), przyłączający się do rejonów bogatych w pary zasad G:C. Dzięki tym badaniom zobrazowano miejsca kondensacji i separacji chromatyny podczas cyklu komórkowego fibroblastów u myszy.

W badaniach oddziaływania pomiędzy cząsteczkami częściej stosowano metodę pomiarów czasu życia fluorescencji w domenie częstości [12,13,16,18-21] niż w domenie czasowej [14,15,17].

## POMIARY STĘŻENIA JONÓW

W mikroskopii fluorescencyjnej stosuje się szereg barwników, których parametry emitowanego światła zależą od lokalnego stężenia poszczególnych jonów w komórce. Takim wskaźnikiem stężenia jonów mogą być: intensywność emisji, spektrum emisji oraz czas życia fluorescencji danych barwników. Ze względu na niewrażliwość techniki FLIM na zmiany w lokalnym stężeniu fluorochromów i lokalnym natężeniu światła wzbudzającego, pomiar stężenia jonów w komórce za pomocą obserwacji czasu życia fluorescencji jest dokładniejszy i mniej podatny na występowanie artefaktów.

Metodą FLIM przeprowadzono pomiary stężenia wielu rodzajów jonów mających kluczowe znaczenie w metabolizmie komórek. Szczególnie dużo prac poświęcono badaniom stężenia jonów wapnia, używając barwników: Calcium-green, Quin-2, Calcium-Crimson, Oregon Green Bapta [5,22]. Do tej pory tą techniką prowadzono również pomiary stężenia m.in. jonów  $Zn^{2+}$  (przy użyciu barwnika Newport Green DCF) [23],  $Na^+$  (barwnik Sodium Green) [24],  $Mg^{2+}$  (barwniki Magnesium-green oraz Mag-quin 1 i 2),  $K^+$  (barwniki PBFI) oraz  $Cl^-$  (barwniki SPQ i MQAE) [25]. Podobnie jest wiele prac, w których za pomocą techniki FLIM mierzono zmiany pH wewnątrz komórki (stężenie jonów  $H^+$ ) [26-28]. Czulość tej metody pozwala na detekcję zmian pH w komórce na poziomie 0,1 jednostki [26]. Do prowadzenia takich pomiarów stosuje się barwniki wykazujące zróżnicowany czas życia fluorescencji w zależności od odczynu środowiska, są to m.in.: karboksy-SNAFL-2 [26,27] czy karboksylfluoresceina [28]. Do pomiarów stężenia jonów w komórkach używano techniki FLIM zarówno w domenie częstości [23-26], jak i w domenie czasowej [22].

## BADANIE STĘŻENIA TLENU W KOMÓRCIE

Wzrost stężenia tlenu zawartego w komórce, z uwagi na jego zdolności do wygaszania fluorescencji, zmniejsza intensywność i czas życia fluorescencji barwników. Szczególnie wrażliwe na działanie tlenu są fluorochromy mające długi czas życia fluorescencji (np. barwniki rutenowe) [8]. Badając czas życia fluorescencji endogenicznej protoporfiryny IX (PpIX), udało się zmierzyć ciśnienie cząsteczkowe tlenu w mitochondriach komórek (mitoPO<sub>2</sub>) pochodzących z różnych linii hodowlanych (HeLa, fibroblastach V-79, neuroblastomie IMR 32-K1) [29]. Niedawno takie same pomiary przeprowadzono na mitochondriach komórek wątroby żyjącego szczura [30]. Warto zaznaczyć, że do tej pory nie istniała metoda pozwalająca mierzyć ciśnienie mitochondrialnego tlenu *in vivo*. W obu pomiarach użyto techniki FLIM w domenie częstości.

## DIAGNOSTYKA MEDYCZNA

Pomiary czasu życia fluorescencji okazały się być przydatne również w diagnostyce medycznej. Wykazano, że czas życia fluorescencji barwników w komórkach nowotworowych jest w porównaniu z komórkami prawidłowymi znacznie dłuższy. Dotyczy to zarówno naturalnej autofluorescencji komórek, jak i fluorescencji wprowadzonych do nich barwników i wynika z różnic w metabolizmie pomiędzy komórkami nowotworowymi a prawidłowymi [31]. Badania nad oznaczaniem komórek nowotworowych za pomocą techniki FLIM prowadzono m.in. obserwując czas życia autofluorescencji utrwalonych komórek

pobranych ze złośliwych nowotworów piersi u kobiet [32] lub też prowadząc obserwacje *in vivo* zmienionych nowotworowo komórek w skórze człowieka [33]. Obecnie w wykrywaniu komórek nowotworowych można również stosować endoskopy wyposażone w detektor mierzący czas życia fluorescencji barwników w poszczególnych komórkach tkanki (FLIE, ang. *Fluorescence Lifetime Imaging Endoscopy*). W tego typu urządzeniach ważne jest, aby pomiar czasu życia fluorescencji trwał krótko i by można było śledzić wyniki tych pomiarów podczas badania na bieżąco. Stąd też do niedawna endoskopy FLIE wykonywały pomiary jedynie w domenie częstości [34]. Dopiero w obecnej dekadzie, za sprawą miniaturyzacji laserów pulsacyjnych oraz zwiększenia wydajności detektorów zliczających fotony, stało się możliwe skonstruowanie endoskopu wykonującego pomiary czasu życia w domenie czasowej [35]. Wyposażenie takich urządzeń dodatkowo w wysokiej mocy laser podczerwony, może służyć do natychmiastowego i selektywnego niszczenia komórek nowotworowych zaraz po ich wykryciu.

## PODSUMOWANIE

Nie ma wątpliwości, że mikroskopia pomiaru czasu życia fluorescencji ma szansę stać się rutynowym narzędziem do badań podstaw molekularnych procesów zachodzących w komórkach. Dodatkowo, technika ta zdobywa również uznanie w farmakologii oraz przemyśle medycznym. Nieinwazyjna technika FLIM, obrazująca z wysoką rozdzielczością czasowo-przestrzenną procesy zachodzące w komórce, jest idealna do badań przyżyciowych. Natomiast użycie tej techniki w badaniach preparatów utrwalonych pozwala na ocenę właściwości wyznakowanych cząsteczek, co jest pomocne w diagnostyce medycznej i pozwala szerzej porównać próbki z tkanek zdrowych i zmienionych chorobowo. Również przy badaniu oddziaływań pomiędzy białkami, FLIM staje się kluczową techniką dopełniającą tradycyjne metody badające współwystępowanie, jak immunoprecypitacja czy chromatografia powinowactwa. Wraz ze wzrostem liczby nowych fluorochromów, białek znakowanych fluorescencyjnie czy nowych bioindykatorów dla wielu procesów chemicznych zachodzących w komórkach, należy oczekiwać dalszego rozwoju techniki FLIM jako jednej z głównych metod pomiarowych stosowanych w mikroskopii fluorescencyjnej.

## PIŚMIENNICTWO

1. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805
2. Morrison LE (2008) Basic principles of fluorescence and energy transfer. *Methods Mol Biol* 429: 3-19
3. Reits EA, Neeffjes JJ (2001) From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol* 3: 145-147
4. Goodwin JS, Kenworthy AK (2005) Photobleaching approaches to investigate diffusional mobility and trafficking of Ras in living cells. *Methods* 37: 154-164
5. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008) Chemical calcium indicators. *Methods* 46: 143-151
6. Agostiano A, Mavelli F, Milano F, Giotta L, Trotta M, Nagy L, Maroti P (2004) Ph-sensitive fluorescent dye as probe for proton uptake in photosynthetic reaction centers. *Bioelectrochem* 63: 125-128
7. Chen Y, Periasamy A (2004) Characterization of two-photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy for protein localization. *Microsc Res Tech* 63: 72-80

8. van Munster EB, Gadella TWJ (2005) Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM). *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 95: 143-175
9. Lakowicz JR (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York
10. Lee BKC, Siegel J, Webb SED, Lèveque-Fort S, Cole MJ, Jones R, Dowling K, Lever MJ, French PMW (2001) Application of the stretched exponential function to fluorescence lifetime imaging. *Biophys J* 81: 1265-1274
11. Wlodarczyk J, Kierdaszuk B (2003) Interpretation of fluorescence decays using a powerlike model. *Biophys J* 85: 589-598
12. Wouters FS, Bastiaens PI (1999) Fluorescence lifetime imaging of receptor tyrosine kinase activity in cells. *Curr Biol* 9: 1127-1130
13. Ng T, Shima D, Squire A, Bastiaens PI, Gschmeissner S, Humphries MJ, Parker PJ (1999) PKC $\alpha$  regulates  $\beta$ 1 integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic. *EMBO J* 18: 3909-3923
14. Berezovska O, Ramdya P, Skoch J, Wolfe MS, Bacskai BJ, Hyman BT (2003) Amyloid precursor protein associates with a nicastrin-dependent docking site on the presenilin 1-gamma-secretase complex in cells demonstrated by fluorescence lifetime imaging. *J Neurosci* 23: 4560-4566
15. Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown RH Jr (2003) Dysferlin Interacts with Annexins A1 and A2 and Mediates Sarcolemmal Wound-healing. *J Biol Chem* 278: 50466-50473
16. Immink RG, Gadella TW Jr, Ferrario S, Busscher M, Angenent GC (2002) Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2416-2421
17. Lee SJ, Escobedo-Lozoya Y, Szatmari EM, Yasuda R (2009) Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature* 458: 299-304
18. Larijani B, Allen-Baume V, Morgan CP, Li M, Cockcroft S (2003) EGF regulation of PIPT dynamics is blocked by inhibitors of phospholipase C and of the Ras-MAP kinase pathway. *Curr Biol* 13: 78-84
19. Hughes WE, Larijani B, Parker PJ (2002) Detecting protein-phospholipid interactions. Epidermal growth factor-induced activation of phospholipase D1b in situ. *J Biol Chem* 277: 22974-22979
20. Cremazy FG, Manders EM, Bastiaens PI, Kramer G, Hager GL, van Munster EB, Verschure PJ, Gadella TJ Jr, van Driel R (2005) Imaging in situ protein-DNA interactions in the cell nucleus using FRET-FLIM. *Exp Cell Res* 309: 390-396
21. Murata S, Herman P, Lakowicz JR (2001) Texture Analysis of Fluorescence Lifetime Images of AT- and GC-rich Regions in Nuclei. *J Histochem Cytochem* 49: 1443-1451
22. Agronskaia AV, Tertoolen L, Gerritsen HC (2004) Fast fluorescence lifetime imaging of calcium in living cells. *J Biomed Opt* 9: 1230-1237
23. Thompson RB, Peterson D, Mahoney W, Cramer M, Maliwal BP, Suh SW, Frederickson C, Fierke C, Herman P (2002) Fluorescent zinc indicators for neurobiology. *J Neurosci Methods* 118: 63-75
24. Szmazinski H, Lakowicz JR (1997) Sodium Green as a potential probe for intracellular sodium imaging based on fluorescence lifetime. *Anal Biochem* 250: 131-138
25. Szmazinski H, Lakowicz JR, Johnson ML (1994) Fluorescence lifetime imaging microscopy: homodyne technique using high-speed gated image intensifier. *Methods Enzymol* 240: 723-748
26. Carlsson K, Liljeborg A, Andersson RM, Brismar H (2000) Confocal pH imaging of microscopic specimens using fluorescence lifetimes and phase fluorometry: influence of parameter choice on system performance. *J Microsc* 199: 106-114
27. Lin HJ, Herman P, Lakowicz JR (2003) Fluorescence lifetime-resolved pH imaging of living cells. *Cytometry A* 52: 77-89
28. Vroom JM, De Grauw KJ, Gerritsen HC, Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Birmingham JJ, Allison C (1999) Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy. *Appl Environ Microbiol* 65: 3502-3511
29. Mik EG, Stap J, Sinaasappel M, Beek JF, Aten JA, van Leeuwen TG, Ince C (2006) Mitochondrial PO<sub>2</sub> measured by delayed fluorescence of endogenous protoporphyrin IX. *Nat Methods* 11: 939-945
30. Mik EG, Johannes T, Zuurbier CJ, Heinen A, Houben-Weerts JHPM, Balestra GM, Stap J, Beek JF, Ince C (2008) In vivo mitochondrial oxygen tension measured by a delayed fluorescence lifetime technique. *Biophys J* 95: 3977-3990
31. Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C, Huang P (2007) The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr* 39: 267-274
32. Tadrous PJ, Siegel J, French PM, Shousha S, Lalani N, Stamp GW (2003) Fluorescence lifetime imaging of unstained tissues: early results in human breast cancer. *J Pathol* 199: 309-317
33. Provenzano PP, Eliceiri KW, Keely PJ (2009) Multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to monitor metastasis and the tumor microenvironment. *Clin Exp Metastasis* 26: 357-370
34. Wagnières G, Mizeret J, Studzinski A, van den Bergh H (1997) Frequency-domain fluorescence lifetime imaging for endoscopic clinical cancer photodetection: Apparatus design and preliminary results. *J Fluoresc* 7: 75-83
35. Siegel J, Elson DS, Webb SE, Lee KC, Vlandas A, Gambaruto GL, Lèveque-Fort S, Lever MJ, Tadrous PJ, Stamp GW, Wallace AL, Sandison A, Watson TF, Alvarez F, French PM (2003) Studying biological tissue with fluorescence lifetime imaging: microscopy, endoscopy, and complex decay profiles. *Appl Opt* 42: 2995-3004

## Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) in biological and medical research

Jaroslav Korczynski<sup>1,✉</sup>, Jakub Wlodarczyk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Confocal Microscopy, Nencki Institute of Experimental Biology, Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Neurobiology, Nencki Institute of Experimental Biology, Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland

✉e-mail: j.korczynski@nencki.gov.pl

**Key words:** FLIM, fluorescence microscopy, FRET

### ABSTRACT

Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) is a powerful tool for producing an image based on the differences in the exponential decay rate of the fluorescence from a fluorescent sample. This technique can provide information, not only concerning the localization of specific fluorophores, but also about the local fluorophore environment. It can be used in scanning confocal, multi-photon microscopes, or in wide-field microscopes and endoscopes. FLIM systems can be implemented both in the frequency domain, using sinusoidally modulated excitation light and in the time domain, using pulsed excitation sources. The power of this technique lies in the fact that the measured fluorescent lifetime of a fluorophore is sensitive to the molecular environment of that fluorophore. Due to this phenomenon FLIM has recently found use in several applications: in the analysis of protein-protein interactions with high spatial and temporal specificity, in ion concentration imaging as well as in measuring of oxygen concentration and in medical applications.



## STRESZCZENIE

Sacharoza jest substratem do biosyntezy skrobi w bulwach ziemniaka. Transport sacharozy do bulw przebiega przez kanały symplastyczne. Akumulacja sacharozy w cytosolu inicjuje proces biosyntezy skrobi w amyloplastach. Glukoza-6-fosforan jest głównym związkiem węglowym transportowanym z cytosolu do amyloplastów. Rozkład skrobi uzależniony jest od stanu fizjologicznego bulw i może zachodzić na drodze hydrolitycznej lub fosforolitycznej. Degradacja skrobi poprzez hydrolizę odbywa się w kiełkujących bulwach, a produktami rozkładu są glukoza i maltoza. W bulwach przechowywanych w temperaturze 4°C dominuje fosforolityczny rozkład skrobi. Powstałe fosforany glukozy są metabolizowane do glukozy i fruktozy, które są odpowiedzialne za występowanie zjawiska *cold sweetening* w bulwach. Nowe strategie badawcze stwarzają szanse na uzyskanie postępu w zrozumieniu związków między zmiennością sekwencji genów o poznanej funkcji a zmiennością cechy ilościowej.

## WPROWADZENIE

U większości roślin wyższych skrobia jest głównym magazynowanym węglowodanem, przechowywanym w formie ziaren w chloroplastach i amyloplastach tkanek zapasowych. Skrobię tworzą dwa polimery glukozy: amyloza i amylopektyna. W ziemniaku amyloza stanowi około 20-30% naturalnej skrobi, jej cząsteczki składają się z kilkudziesięciu i więcej reszt glukozy, połączonych wiązaniami  $\alpha$ -1,4-glikozydowymi z nielicznymi rozgałęzieniami [1,2]. W amylopektynie połączenia glukozy między atomami węgla C1 i C4 są wzbogacone o 4-6% wiązań  $\alpha$ -1,6-glikozydowych. Miejsca rozgałęzień  $\alpha$ -1,6 nie są rozmieszczone losowo, ale determinują sposób połączenia dłuższych i krótszych cząsteczek amylopektyny oraz stopień krystalizacji ziaren skrobi [2,3]. Zawartość skrobi w ziemniakach wynosi od 12 do 24% [4].

W bulwach ziemniaka po zbiorze występuje powolna degradacja skrobi i synteza sacharozy, która jest włączana do metabolizmu komórkowego. Niska temperatura przechowywania (4°C) wzmacnia z czasem syntezę sacharozy, która ulega rozkładowi do glukozy i fruktozy, co wpływa na smak bulw (ang. *cold sweetening*). Grupy aldehydowe cukrów redukujących reagują z grupami aminowymi aminokwasów i białek, co prowadzi do ciemnienia miąższu bulw. Z kolei zbyt wysoka temperatura przechowywania sprzyja kiełkowaniu, odwodnieniu bulw oraz nasilaniu chorób przechowalniczych. W konsekwencji następuje obniżenie jakości przetwórczej bulw [5,6]. To duży problem dla przetwórstwa, zwłaszcza w produkcji frytek i chipsów [3,5,7].

Metabolizm skrobi w bulwach ziemniaka jest dobrze poznany. Zidentyfikowano enzymy szlaków biosyntezy i rozkładu skrobi, formy izoenzymatyczne i ich lokalizację subkomórkową [8,9]. Poznano sekwencje kilkudziesięciu genów, kodujących białka enzymatyczne oraz transportery cukrów, które wpływają lub mogą pośrednio oddziaływać na metabolizm węglowodanów w bulwach [10]. Ich pozycje chromosomowe po części powiązane z loci cech ilościowych (QTL, ang. *quantitative trait loci*) dla zawartości skrobi [11] i cukrów redukujących [12] w ziemniaku. Badania nadekspresji [13-15] i wyciszenia [16-23] genów znacząco poszerzyły naszą wiedzę o funkcjonowaniu szlaków syntezy i rozkładu skrobi w bulwach. Szczególnie ważne okazały się badania enzymu GBSS (ang. *granule-bound starch synthase*). W 2006 roku wyhodowano odmianę Amflora z zablokowaną ekspresją genu GBSS [24]. Uzyskano tym sposobem ziemniaki wytwarzające w bulwach skrobię bezamylozową przydatną w przemyśle nieżywnościowym. Wyzwaniem dla nauki jest identyfikacja genów węzłowych, zwłaszcza tych regulujących poziom cukrów redukujących w bulwach. W trakcie badań asocjacyjnych (ang. *associations*) zidentyfikowano allele *invGE-6f* i *invGF-4d* inwertazy [25-27], które wpływają na poziom cukrów redukujących w bulwach.

Dominika Czyżewska

Waldemar Marczewski<sup>✉</sup>

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Młochów

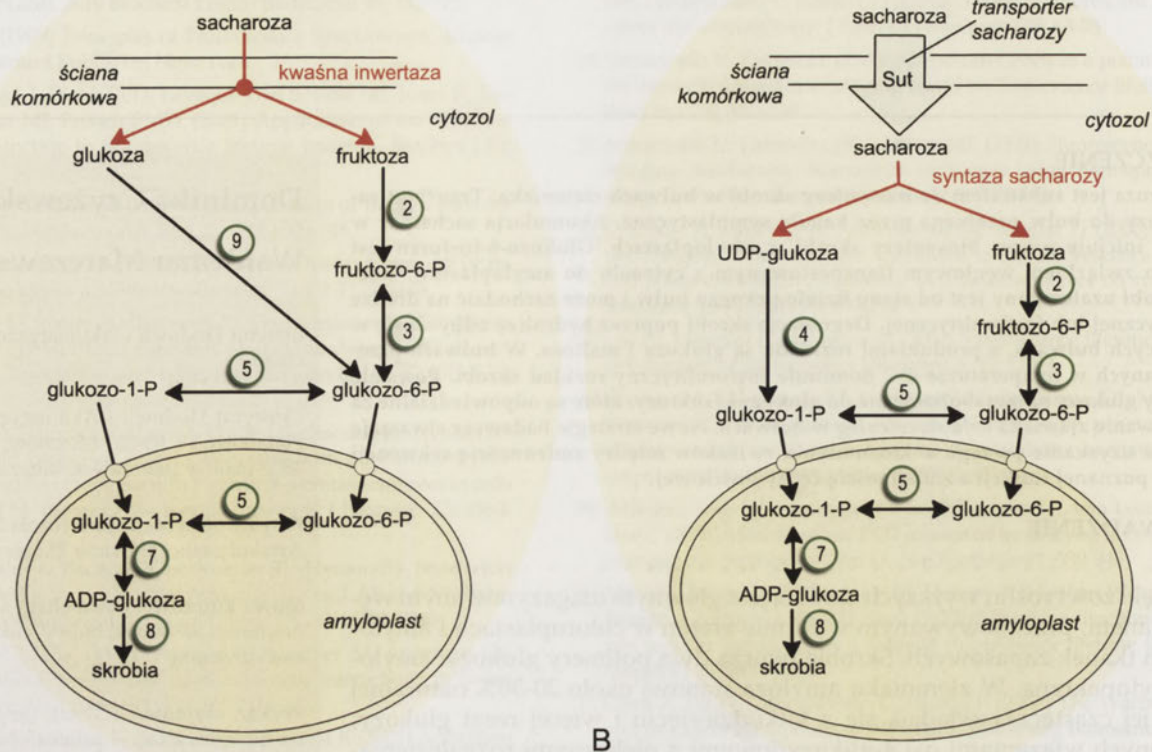
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, ul. Platanowa 19, 05-831 Młochów; tel. (22) 729 92 48, e-mail: w.marczewski@ihar.edu.pl

Artykuł otrzymano 28 stycznia 2009 r.  
Artykuł zaakceptowano 23 czerwca 2009 r.

**Słowa kluczowe:** metabolizm skrobi, *Solanum tuberosum*, ziemniak, bulwy, cukry redukujące, *cold sweetening*

**Wykaz skrótów:** AGPaza (ang. *ADP-glucose pyrophosphorylase*) – pirofosforylaza ADP-glukozy; GBSS (ang. *granule bound starch synthase*) – syntaza skrobiowa; PFK (ang. *phosphofruktokinase*) – fosfofruktokinaza; SBE (ang. *starch branching enzyme*) – enzym rozgałęziający; SP (ang. *starch phosphorylase*) – fosforylaza skrobiowa; SPS (ang. *sucrose phosphate synthase*) – syntaza fosfosacharozy; SuSy (ang. *sucrose synthase*) – syntaza sacharozy; QTL (ang. *quantitative trait loci*) – loci cech ilościowych; UGPaza (ang. *UDP-glucose pyrophosphorylase*) – pirofosforylaza UDP-glukozy; 3-PGA (ang. *3-phosphoglyceric acid*) – kwas 3-fosfoglicerynowy

**Podziękowanie:** Praca została napisana w trakcie realizacji projektu PBZ – MNiSW – 2/3/2006/18



Rycina 1. Synteza skrobi w stolonach przed rozpoczęciem tuberyzacji (A) i w bulwach ziemniaka (B). 2 – fruktokinaza; 3 – izomeraza glukozofosforanowa; 4 – pirofosforylaza UDP-glukozy; 5 – fosfoglukomutaza; 7 – pirofosforylaza ADP-glukozy; 8 – syntaza skrobiowa i enzymy rozgłębiające; 9 – heksokinaza.

Metabolizm węglowodanów w ziemniaku diploidalnym jest modelowym układem badawczym dla poznania cech ilościowych [25]. Nowe techniki szybkiego sekwencjonowania DNA, mikromacierze DNA pozwalające na kompleksowe badania ekspresji genów [28,29], są szansą na uzyskanie jakościowego postępu w zrozumieniu związków między zmiennością sekwencji genów o poznanej funkcji a zmiennością cechy ilościowej (ang. *functional candidate gene approach*) [30,31]. Celem tego opracowania jest przedstawienie metabolizmu syntezy i rozkładu w bulwach ziemniaka ze szczególnym uwzględnieniem kumulacji cukrów redukujących.

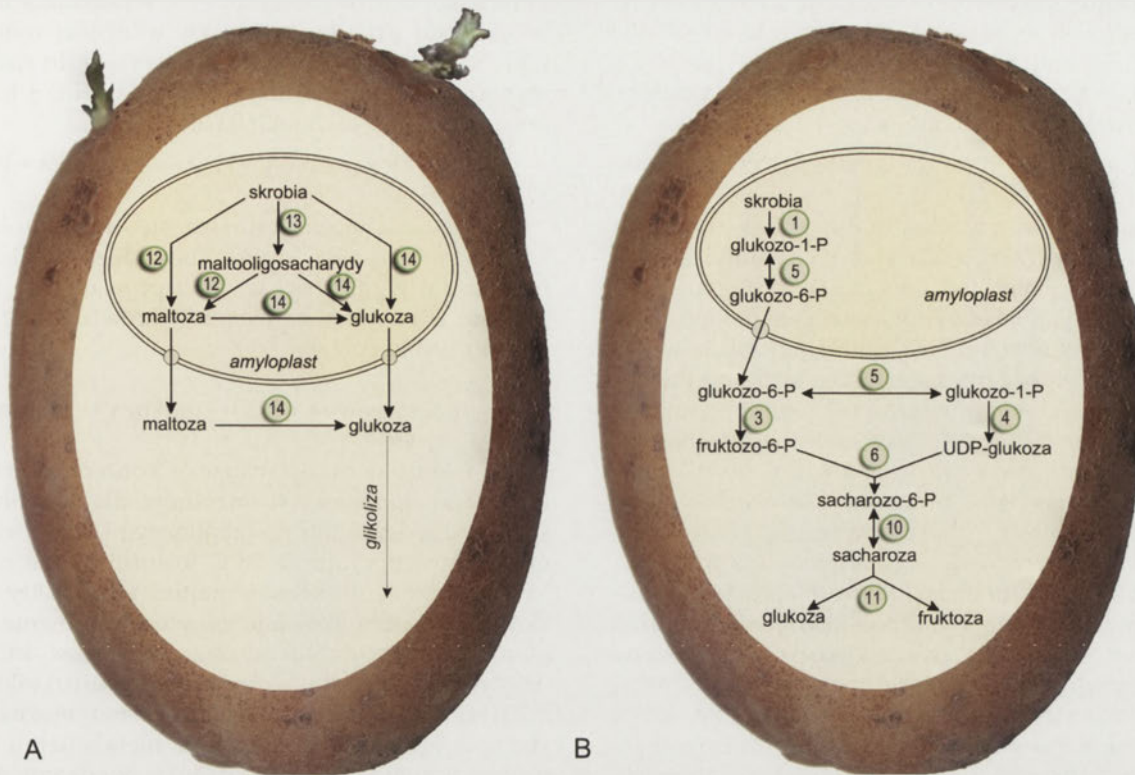
#### BIOSYNTETA SKROBI W BULWACH ZIEMNIAKA

Biosynteza skrobi w amyloplastach liści odbywa się z wykorzystaniem produktów fotosyntezy: aldehydu 3-fosfoglicerynowego, glukozo-1-fosforanu (Glu-1-P) i glukozo-6-fosforanu (Glu-6-P) [32,33]. W organach zapasowych sacharoza jest substratem wyjściowym do syntezy skrobi. Transport sacharozy do bulw ziemniaka przebiega poprzez kanały symplastyczne z aktywnym udziałem transportera sacharozy (SUT, ang. *sucrose transporter*). Kumulacja sacharozy w cytosolu bulw inicjuje proces biosyntezy skrobi [34-36]. W pierwszym etapie następuje rozkład sacharozy do heksoz. W bulwach dominuje rozszczepienie sacharozy do fruktozy i UDP-glukozy przez syntazę sacharozy (EC 2.4.1.13, SuSy, ang. *sucrose synthase*) [37] (Ryc. 1B).



Co ciekawe, w stolonach przed rozpoczęciem tuberyzacji występuje apoplastyczny transport sacharozy. Kwaśna invertaza (EC 3.2.1.26, ang. *acid invertase*), która jest zlokalizowana w ścianie komórkowej, hydrolizuje sacharozę, a aktywność SuSy jest znikoma [38] (Ryc. 1A). Wraz z rozwojem bulw maleje znaczenie hydrolitycznego rozkładu sacharozy przez kwaśną invertazę [34]. Zredukowanie poziomu ekspresji *SuSy* o 95% wskutek wprowadzenia sekwencji antysensownej tego genu, spowodowało zahamowanie syntezy skrobi w bulwach i spadek zawartości skrobi o 63% w porównaniu do typu dzikiego, przy niezmiennym poziomie sacharozy. Obserwowano ponad 40-krotny wzrost aktywności invertazy i wyraźnie zwiększony poziom glukozy i fruktozy, co jednak nie rekompensowało utraty aktywności SuSy [39].

Glu-6-P jest główną formą glukozy transportowaną w bulwach z cytosolu do amyloplastów [40]. W komórce dominują dwa szlaki syntezy Glu-6-P (Ryc. 1B). Pierwszy szlak obejmuje metabolizm fruktozy z udziałem fruktokinazy (EC 2.7.1.4, FRK, ang. *fructokinase*) i izomerazy glukozofosforanowej (EC 5.3.1.9, PGI, ang. *phosphoglucose isomerase*). Drugi szlak dotyczy przemiany UDP-glukozy do Glu-6-P z udziałem pirofosforylazy UDP-glukozy (EC 2.7.7.9, UGPaza, ang. *UDP-glucose pyrophosphorylase*) i fosfoglukomutazy (EC 5.4.2.2, PGM, ang. *phosphoglucose mutase*). Fosfoglukomutaza i izomeraza glukozofosforanowa pełnią funkcję regulatorową w syntezie Glu-6-P, a także Glu-1-P [34,36]. Glu-1-P może być także transportowany z cytosolu do amyloplastu. Izoforny PGM są obecne w obu przedziałach komórki [34,41,42].



Rycina 2. Hydrolityczny rozkład skrobi zachodzący w dojrzałych, kielkujących bulwach (A). Fosforolityczny rozkład skrobi, dominujący w bulwach przechowywanych w niskiej temperaturze (B). 1 – fosforylaza skrobiowa; 3 – izomeraza glukozofosforanowa; 4 – pirofosforylaza UDP-glukozy; 5 – fosfoglukomutaza; 6 – syntaza fosfosacharozy; 10 – fosfataza sacharozy; 11 – kwaśna inwertaza; 12 – β-amylaza; 13 – α-amylaza, izoamylaza i pullulanaza; 14 – glukoamylaza.

Pirofosforylaza ADP-glukozy (EC 2.7.7.27, AGPaza, ang. *ADP-glucose pyrophosphorylase*) katalizuje przemianę Glu-1-P do ADP-glukozy.



W bulwach ziemniaka AGPaza występuje wyłącznie w plastydach [8,43,44]. Transkrypcja genu *AGPazy* jest związana z dobowymi zmianami zawartości sacharozy w komórce i osiąga najwyższy poziom pod koniec dnia, a największy spadek występuje w nocy [45]. Enzym jest aktywowany allosterycznie przez kwas 3-fosfoglicerynowy (3-PGA), a hamowany przez  $\text{P}_i$  [8,46], co sugeruje, że inne szlaki metaboliczne są konkurencyjne w stosunku do syntezy skrobi w wykorzystywaniu fosforanów trioz [36].

Cząsteczki ADP-glukozy są wykorzystywane do syntezy amylozy i amylopektyny z udziałem izoform syntazy skrobiowej (EC 2.4.1.21, SS, ang. *starch synthase*). Zidentyfikowano pięć izoform syntazy skrobiowej. Cztery izoformy, SSI, SSII, SSIII i SSIV, należą do frakcji rozpuszczalnej i są zaangażowane w syntezę wiązań α-1,4 amylopektyny [2]. Izofорма GBSS (ang. *granule bound starch synthase*) wykazuje wyłącznie aktywność enzymatyczną w formie związanej ze strukturami ziarnistymi i jest odpowiedzialna za wydłużanie amylozy [2,47]. Przypuszcza się, że izoformy SS mają zdolność syntetyzowania łańcuchów o różnej długości: SSI, krótkich – do kilkunastu cząsteczek glukozy [48,49] a SSII, dłuższych – zbudowanych 15-45 jednostek [49-51]. W bulwach ziemniaka dominuje ak-

tywność izoformy SSIII, gdzie cząsteczkę amylozy tworzy 40-80 i więcej reszt glukozy [52].

Amyloza i amylopektyna są modyfikowane przez enzymy tworzące rozgałęzienia α-1,6 (EC 2.4.1.18, SBE, ang. *starch branching enzyme*) i enzymy znoszące rozgałęzienia α-1,6 (DBE, ang. *starch debranching enzyme*) [36,53,54]. Enzym SBE trawi wiązania α-1,4-glikozydowe i wprowadza cząsteczki glukozy poprzez wiązania α-1,6. Opisano dwie grupy izoform SBE, które powodują powstawanie rozgałęzień o różnej długości i z różną częstością. Izoformy z grupy SBEI rozgałęzają amylozę, a SBEII są specyficzne względem amylopektyny [53,55]. Do grupy enzymów DBE, które znoszą rozgałęzienia α-1-6 w skrobi należą pullulanaza (EC 3.2.1.41, ang. *pullulanase*) i izoamylaza (EC 3.2.1.68, ang. *isoamylase*) [56].

Amylopektyna jest modyfikowana poprzez fosforylację glukozy przy węglu C3 lub C6. Reakcję katalizuje di-kinaza GWD (EC 2.7.9.4, GWD, ang. *glucan water dikinase*) [35,36,57,58].



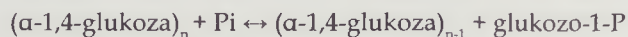
## ROZKŁAD SKROBI W BULWACH

Skrobia w bulwach ziemniaka może być magazynowana przez wiele tygodni, a nawet miesięcy. W tym czasie enzymy odpowiedzialne za rozkład skrobi są w bulwach nieaktywne. Do zainicjowania rozkładu skrobi niezbędny jest rozpad półkryształicznego układu granul,

warunkowanego głównie przez strukturę amylopektyny, co następuje dzięki jej fosforylacji przez dikinazę GWD [35,36,57-59]. Rozkład amylopektyny i amylozy zachodzi na drodze hydrolitycznej lub fosforolitycznej, w zależności od stanu fizjologicznego bulwy.

Hydroliza skrobi odbywa się w dojrzałych, kiełkujących bulwach.  $\alpha$ -amylaza (EC 3.2.1.1, Amy, ang.  $\alpha$ -amylase) hydrolizuje wiązania wewnątrz cząsteczek zbudowanych z co najmniej trzech reszt glukozy.  $\beta$ -amylaza (EC 3.2.1.2, Bmy, ang.  $\beta$ -amylase) odcina z końców łańcucha cząsteczki maltozy. Oba enzymy są aktywne wobec wiązań  $\alpha$ -1,4-glikozydowych [35,36]. Ważną funkcję w hydrolizie skrobi spełniają również izoamylaza i pullulanaza, które są aktywne wobec wiązań  $\alpha$ -1,6-glikozydowych amylopektyny i uwalniają liniowe maltooligosacharydy (Ryc. 2A). Na marginesie warto zauważyć, że u bakterii i drożdży izoamylaza i pullulanaza wykazują różne właściwości katalityczne [60]. Izoamylaza hydrolizuje wiązania  $\alpha$ -1,6-glikozydowe w glikogenie, nie trawi natomiast pullulanu. Pullulanaza, odwrotnie, rozkłada pullulan, lecz nie hydrolizuje wiązań w glikogenie. Pullulan jest to liniowy, obojętny glukan, składający się głównie z cząsteczek maltotriozy, które są połączone wiązaniami  $\alpha$ -1,6-glikozydowymi [61]. Produktami hydrolizy skrobi w amyloplastach bulw ziemniaka są glukoza i maltoza, które są transportowane do cytosolu, gdzie podlegają dalszym przemianom katabolicznym [60,62,63].

W bulwach przechowywanych w niskiej temperaturze dominuje fosforolityczny rozkład skrobi [9,64] (Ryc. 2B). Kluczowym enzymem jest fosforylaza skrobiowa (EC 2.4.1.1, SP, ang. *starch phosphorylase*), która odcina od końców łańcuchów amylozy i amylopektyny pojedyncze cząsteczki glukozy i przenosi je na  $P_i$ , tworząc Glu-1-P.

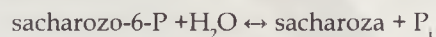


Rośliny posiadają dwa typy SP. Typ L jest obecny w plastydach, a typ H w cytosolu. W amyloplastach ziemniaka ekspresji ulegają dwie izoformy typu L: Pho 1a i Pho 1b. Nie wykazano jednak istotnych zmian ich aktywności w zależności od temperatury przechowywania bulw. Stały poziom aktywności SP typu L w amyloplastach bulw jest przesłanką, która wskazuje na znaczenie wstępnej fosforylacji skrobi dla jej degradacji w wyniku rozkładu fosforolitycznego [8]. Bez wstępnej fosforylacji, mimo obecności enzymów degradujących, skrobia nie ulega rozkładowi. Fosfoglukomutaza przekształca Glu-1-P w Glu-6-P, który jest głównym fosforanem glukozy transportowanym z amyloplastów do cytosolu [62]. Dalsze przemiany metaboliczne w cytosolu, które zachodzą przy udziale izomeryzy glukozyfosforanowej i pirofosforylasy UDP-glukozy, prowadzą do syntezy odpowiednio fruktozo-6-P i UDP-glukozy. Oba związki są substratami dla syntazy fosfosacharozy (EC 2.4.1.14, SPS, *sucrose phosphate synthase*), która katalizuje tworzenie sacharozo-6-P [60,62,63].

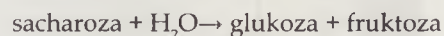


W ziemniaku zidentyfikowano kilka izoform SPS, których aktywność w bulwach nie zależy od temperatury.

Wyjątkiem jest izoforma SPS-1b, wykazująca aktywność w bulwach przechowywanych w niskiej temperaturze [65]. Sacharozo-6-P ulega defosforylacji do sacharozy w wyniku działania fosfatazy sacharozy (EC 3.1.3.24, SPP, ang. *sucrose phosphatase*) [60,62,63].



Rozkład sacharozy odbywa się w wakuolach i jest katalizowany przez kwaśną inwertazę. Reakcja osiąga maksimum wydajności w 4°C i prowadzi do kumulacji glukozy i fruktozy, głównych cukrów o właściwościach redukujących [9,62,66].



Od wielu lat uwaga badaczy koncentruje się na wytypowaniu kluczowych enzymów dla przepływu heksosów między szlakami metabolicznymi w bulwach ziemniaka. W temperaturze 25°C fosforolityczne (Glu-1-P) i hydrolityczne (glukoza i maltoza) produkty rozkładu skrobi są metabolizowane w cytosolu głównie w szlaku glikolitycznym. Zablockowanie glikolizy w 4°C wskutek drastycznego spadku aktywności fosfofruktokinazy (EC 2.7.1.11, PFK, ang. *phosphofructokinase*) można postrzegać jako przyczynę skierowania metabolizmu heksosów w kierunku syntezy sacharozy [67]. Niedawne badania z użyciem izotopów węgla wskazują jednak, że temperatura labilność PFK ma niewielki wpływ na zjawisko *cold sweetening* [62]. Zdecydowanie istotniejszy udział w akumulacji cukrów redukujących przypisuje się specyficznym izoformom SPS i  $\beta$ -amylazy [62,68,69], a także aktywności AGPazy [70], UGPazy [9] i inwertazy [66].

## PIŚMIENNICTWO

1. Leszczyński W (2004) Skrobia – surowiec przemysłowy, budowa i właściwości. Zesz Probl Post Nauk Rol 500: 69-98
2. Burrell MM (2006) Improvements in starch quality, W: Halford NG (red) Plant Biotechnology, John Wiley & Sons Ltd, str.151-163
3. Dale MFB, Bradshaw JE (2003) Progress in improving processing attributes in potato. Trends Plant Sci 8: 310-312
4. Leszczyński W (2002) Czynniki kształtujące jakość surowca do przetwórstwa na skrobię, W: Chodkowski J (red) Ekonomia i technologia produkcji ziemniaków skrobiowych. Wieś Jutra, Warszawa, str. 145-152
5. Zgórska K, Frydecka-Mazurczyk A (1996) Zmiany cech jakości ziemniaków jadalnych w czasie przechowywania. Ziemi Pol 1: 24-27
6. Zgórska K, Czerko Z (2006) Rekondycjonowanie bulw przechowywanych w niskiej temperaturze – metoda ograniczająca zawartość cukrów w bulwach ziemniaka. Zesz Probl Post Nauk Rol 511: 547-556
7. Zimnoch-Guzowska E, Flis B (2006) Genetyczne podstawy cech jakości ziemniaka. Zesz Probl Post Nauk Rol 511: 23-36
8. Solomos T, Mattoo AK (2005) Starch-sugar metabolism in potato (*Solanum tuberosum*) tubers in response to temperature variations, W: Razdan M, Mattoo A (red) Genetic Improvement of Solanaceous Crops, t. I. NH Science Publishers, Enfield, str. 209-234
9. Sowokinos JR (2001) Biochemical and molecular control of cold induced sweetening in potatoes. Amer J of Potato Res 78: 221-236
10. Chen X, Salamini F, Gebhardt C (2001) A potato molecular-function map for carbohydrate metabolism and transport. Theor Appl Genet 102: 284-295
11. Schäfer-Pregl R, Ritter E, Concilio L, Hesselbach J, Lovatti L, Walke-meier B, Thelen H, Salamini F, Gebhardt C (1998) Analysis of quantita-

- tive trait loci (QTL) and quantitative trait alleles (QTA) for potato tuber yield and starch content. *Theor Appl Genet* 97: 834-846
12. Menendez CM, Ritter E, Schäfer-Pregl R, Walkemeier B, Kalde A, Salamini F, Gebhardt C (2002) Cold-sweetening in diploid potato. Mapping QTL and candidate genes. *Genetics* 162: 1423-1434
  13. Sweetlove LJ, Burrell MM, ap Rees T (1996) Starch metabolism in tubers of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with increased ADP-glucose pyrophosphorylase. *Biochem J* 320: 493-498
  14. McKibbin RS, Muttucumar N, Paul MJ, Powers SJ, Burrell MM, Coates S, Purcell PC, Tiessen A, Geigenberger P, Halford NG (2006) Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant Biotech J* 4: 409-418
  15. Zhang L, Häusler RE, Greiten C, Hajirezaei MR, Haferkamp I, Neuhäus HE, Flüge UI, Ludewig F (2008) Overriding the co-limiting import of carbon and energy into tuber amyloplasts increases the starch content and yield of transgenic potato plants. *Plant Biotech J* 6: 453-464
  16. Lorberth R, Ritte G, Willmitzer L, Kossmann J (1998) Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nat Biotechnol* 16: 473-477
  17. Jobling SA, Westcott RJ, Tayal A, Jeffcoat R, Schwall GP (2002) Production of a freeze-thaw-stable potato starch by antisense inhibition of three starch synthase genes. *Nat Biotechnol* 20: 295-299
  18. Wischmann B, Blennow A, Madsen F, Jørgensen K, Poulsen P, Bandsholm O (2005) Functional characterization of potato starch modified by specific in planta alteration of the amylopectin branching and phosphate substitution. *Food Hydrocoll* 19: 1016-1024
  19. Kozlov SS, Blennow A, Krivandinn AV, Yuryev VP (2007) Structural and thermodynamic properties of starches extracted from GBSS and GWD suppressed potato lines. *Int J Biol Macromol* 40: 449-460
  20. Chen S, Mohamad R (2008) RNA interference-mediated repression of sucrose-phosphatase in transgenic potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) strongly affects the hexose-to-sucrose ratio upon cold storage with only minor effects on total soluble carbohydrate accumulation. *Plant Cell Environ* 31: 165-176
  21. Chi Z, Cong-Hua X, Bo-Tao S, Xun L, Jun L (2008) RNAi effects on regulation of endogenous acid invertase activity in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Chin J Agr Biotechnol* 5: 07-112
  22. Oliver SN, Tiessen A, Fernie AR, Geigenberger P (2008) Decreased expression of plastidial adenylate kinase in potato tubers results in an enhanced rate of respiration and a stimulation of starch synthesis that is attributable to post-translational redox-activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *J Exp Bot* 59: 315-325
  23. Wickramasinghe HAM, Blennow A, Noda T (2009) Physico-chemical and degradative properties of in-planta re-structured potato starch. *Carbohydr Polym* 77: 118-124
  24. <http://www.corporate.basf.com>
  25. Li L, Strahwald J, Hofferbert HR, Lübeck J, Tacke E, Junghans H, Wunder J, Gebhardt C (2005) DNA variation at the invertase locus *invGE/GF* is associated with tuber quality traits in populations of potato breeding clones. *Genetics* 170: 813-821
  26. Gebhardt C, Li L, Pajerowska-Mukhtar K, Achenbach U, Sattarzadeh A, Bormann C, Ilarionova E, Ballvora A (2007) Candidate gene approach to identify genes underlying quantitative traits and develop diagnostic markers in potato. *Crop Sci* 47: 106-111
  27. Li L, Paulo MJ, Strahwald J, Lübeck J, Hofferbert HR, Tacke E, Junghans H, Wunder J, Draffehn A, van Eeuwijk F, Gebhardt C (2008) Natural DNA variation at candidate loci is associated with potato chip color, tuber starch content, yield and starch yield. *Theor Appl Genet* 116: 1167-1181
  28. Bagnaresi P, Moschella A, Beretta O, Vitulli F, Ranalli P, Perata P (2008) Heterologous microarray experiments allow the identification of the early events associated with potato tuber cold sweetening. *BMC Genomics* 9: 176
  29. Bryan JG, Hein I (2008) Genomic resources and tools for gene function analysis in potato. *Int J Plant Genomics* 2008: ID 216513
  30. Simko I (2004) One potato, two potato: haplotype association mapping in autotetraploids. *Trends Plant Sci* 9: 441-448
  31. Moose SP, Mumm RH (2008) Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiol* 147: 969-977
  32. Strzałka K (2002) *Procesy Anaboliczne*, W: Kopcewicz J, Lewak S (red) *Fizjologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 330-386
  33. Ciereszko I (2006) Kontrola metabolizmu sacharozy u roślin w odpowiedzi na zmienne warunki środowiska. *Kosmos* 55: 229-241
  34. Fernie AR, Willmitzer L, Trethewey RN (2002) Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. *Trends Plant Sci* 7: 35-41
  35. Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* 30: 1126-1149
  36. Hofius D, Börnke AJ (2007) Photosynthesis, carbohydrate metabolism and source-sink relations, W: Vreugdenhil D (red) *Potato Biology and Biotechnology Advances and Perspectives*, Elsevier BV, str. 257-285
  37. Fernie AR, Willmitzer L (2001) Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiol* 127: 1459-1465
  38. Appeldoorn NJG, de Bruijn SM, Koot-Gronsveld EAM, Visser RGF, Vreugdenhil D, van der Plas LHW (1997) Developmental changes of enzymes involved in conversion of sucrose to hexose-phosphate during early tuberization of potato. *Planta* 202: 220-226
  39. Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, Sonnewald U (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* 7: 97-107
  40. Tauberger E, Fernie AR, Emmermann M, Renz A, Kossmann J, Willmitzer L, Trethewey RN (2000) Antisense inhibition of plastidial phosphoglucomutase provides compelling evidence that potato tuber amyloplasts import carbon from the cytosol in the form of glucose-6-phosphate. *Plant J* 23: 43-53
  41. Naeem M, Tetlow IJ, Emes MJ (1997) Starch synthesis in amyloplasts purified from developing potato tubers. *Plant J* 11: 1095-1103
  42. Wischmann B, Nielsen TH, Møller BL (1999) In vitro biosynthesis of phosphorylated starch in intact potato amyloplasts. *Plant Physiol* 119: 455-462
  43. Beckles DM, Smith AM, ap Rees T (2001) A cytosolic ADP-glucose pyrophosphorylase is a feature of graminaceous endosperms, but not of other starch-storing organs. *Plant Physiol* 125: 818-827
  44. Farré EM, Tiessen A, Roessner U, Geigenberger P, Trethewey RN, Willmitzer L (2001) Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugars, organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method. *Plant Physiol* 127: 685-700
  45. Geigenberger P, Stitt M (2000) Diurnal changes in sucrose, nucleotides, starch synthesis and AGPS transcript in growing potato tubers that are suppressed by decreased expression of sucrose phosphate synthase. *Plant J* 23: 795-806
  46. Ballicora MA, Laughlin MJ, Fu Y, Okita TW, Barry GF, Preiss J (1995) Adenosine 5'-diphosphate-glucose pyrophosphorylase from potato tuber. *Plant Physiol* 109: 245-251
  47. Denyer K, Johnson P, Zeeman S, Smith AM (2001) The control of amylose synthesis. *J Plant Physiol* 158: 479-487
  48. Delvallé D, Dumez S, Wattedled F, Roldán I, Planchot V, Berbezy P, Colonna P, Vyas D, Chatterjee M, Ball S, Mérida A, D'Hulst C (2005) Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J* 43: 398-412
  49. Edwards A, Borthakur A, Bornemann S, Venail J, Denyer K, Waite D, Fulton D, Smith A, Martin C (1999) Specificity of starch synthase isoforms from potato. *Eur J Biochem* 266: 724-736
  50. Maddelein ML, Libessart N, Bellanger F, Delrue B, D'Hulst C, Van den Koornhuysen N, Fontaine T, Wieruszewski JM, Decq A, Ball S (1994) Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Determination of granule-bound and soluble starch synthase functions in amylopectin synthesis. *J Biol Chem* 269: 25150-25157
  51. Craig J, Lloyd JR, Tomlinson K, Barber L, Edwards A, Wang TL, Martin C, Hedley CL, Smith AM (1998) Mutations in the gene encoding

- starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *Plant Cell* 10: 413-426
52. Marshall J, Sidebottom C, Debet M, Martin C, Smith AM, Edwards A (1996) Identification of the major starch synthase in the soluble fraction of potato tubers. *Plant Cell* 8: 1121-1134
  53. Jobling SA, Schwall GP, Westcott RJ, Sidebottom CM, Debet M, Gidley MJ, Jeffcoat R, Safford R. (1999) A minor form of starch branching enzyme in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers has a major effect on starch structure: cloning and characterization of multiple forms of SBE A. *Plant J* 18: 163-171
  54. Tetlow JJ, Morell MK, Emes MJ (2004) Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot* 55: 2131-2145
  55. Larsson CT, Khoshnoodi J, Ek B, Rask L, Larsson H (1998) Molecular cloning of starch-branching enzyme II from potato. *Plant Mol Biol* 37: 505-511
  56. Ishizaki Y, Taniguchi H, Maruyama Y, Nakamura M (1983) Debranching enzymes of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.): I. Purification and some properties of potato isoamylase. *Agric Biol Chem* 47: 771-779
  57. Lorberth R, Ritte G, Willmitzer L, Kossmann J (1998) Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nat Biotech* 16: 473-477
  58. Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, Steup M (2002) The starch related R1 protein is an alpha-glucan, water dikinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7166-7171
  59. Engelsen SB, Madsen AO, Blennow A, Mottawia SM, Moller BL, Larsen S (2003) The phosphorylation site in double helical amylopectin as investigated by a combined approach using chemical synthesis, crystallography and molecular modeling. *FEBS Lett* 541: 137-144
  60. Smith AM, Zeeman SC, Smith SM (2005) Starch degradation. *Annu Rev Plant Biol* 56: 73-98
  61. Delatte T, Umhang M, Trevisan M, Eicke S, Thorneycroft D, Smith SM, Zeeman SC (2006) Evidence for distinct mechanisms of starch granule breakdown in plants. *J Biol Chem* 281: 12050-12059
  62. Malone JG, Mittova V, Ratcliffe RC, Kruger NJ (2006) The response of carbohydrate metabolism in potato tubers to low temperature. *Plant Cell Physiol* 47: 1309-1322
  63. Weber APM (2004) Solute transporters as connecting elements between cytosol and plastid stroma. *Curr Opin Plant Biol* 7: 247-253
  64. Claassen PAM, Budde MAW, Van Calker MH (1993) Increase in phosphorylase activity during cold-induced sugar accumulation in potato tubers. *Potato Res* 36: 205-217
  65. Reimholz R, Geiger M, Haake V, Deiting U, Krause KP, Sonnewald U, Stitt M (1997) Potato plants contain multiple forms of sucrose-phosphatase synthase which differ in their tissue distributions, their levels during development, and their responses to low temperature. *Plant Cell Environ* 20: 291-305
  66. Greiner S, Rausch T, Sonnewald U, Herbers K (1999) Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers. *Nat Biotech* 17: 708-711
  67. ap Rees T, Burrell MM, Entwistle TG, Hammond JBW, Kirk D, Kruger NJ (1988) Effects of low temperature on the respiratory metabolism of carbohydrate by plants. *Symp Soc Exp Biol* 42: 377-393
  68. Hill LM, Reimholz R, Schroder R, Nielsen TH, Stitt M (1996) The onset of sucrose accumulation in cold-stored potato tubers is caused by an increased rate of sucrose synthesis and coincides with low levels of hexose-phosphates, an activation of sucrose phosphate synthase and the appearance of a new form of amylase. *Plant Cell Environ* 19: 1223-1237
  69. Nielsen TH, Deiting U, Stitt M (1997) A beta-amylase in potato tubers is induced by storage at low temperature. *Plant Physiol* 113: 503-510
  70. Stark DM, Timmerman KP, Barry GF, Preiss J, Kishore GM (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase. *Science* 258: 287-292

## Starch metabolism in potato tubers

Dominika Czyżewska, Waldemar Marczewski✉

Plant Breeding and Acclimatization Institute, Platanowa 19, 0 5-831 Młochów

✉e-mail: w.marczewski@ihar.edu.pl

**Key words:** starch metabolism, *Solanum tuberosum*, potato tubers, reducing sugars, cold sweetening

### ABSTRACT

Sucrose is a substrate for starch biosynthesis, unloaded symplastically into the developing potato tubers. Sucrose is converted to glucose-6-phosphate in the cytosol and exported into the amyloplasts. Starch may be degraded either hydrolytically or phosphorolytically. Glucose and maltose are products of hydrolytic starch breakdown in the sprouting tubers. Glucose phosphates are products of the phosphorolytic activity, metabolized to glucose and fructose in cold-stored tubers. Development of molecular tools for assaying potato gene function provide opportunities to receive genetic progress in the sugar-starch potato breeding.

# Mobilizacja białek zapasowych ziarniaków zbóż

## STRESZCZENIE

**M**obilizacja materiałów zapasowych jest procesem stopniowym, który doprowadza do całkowitej degradacji biopolimerów akumulowanych w czasie dojrzewania nasion. U zbóż zasadniczą rolę w hydrolizie białek zapasowych odgrywiają endopeptydazy cysteinowe i karboksypeptydazy serynowe. Peptydazy należące do innych grup katalitycznych, z nielicznymi wyjątkami, wydają się być zaangażowane w procesy niezwiązane bezpośrednio z masową degradacją białek w bielmie kiełkujących ziarniaków. Szybkość hydrolizy białek zapasowych uzależniona jest od obecności aktywnych biologicznie giberelin w tkankach ziarniaka. Warunkuje to syntezę peptydaz przez warstwę aleuronową, a także zakwaszenie bielma skrobiowego, w którym przebiega ten proces. Pomimo zaawansowanych badań na tym polu, rola wielu peptydaz w procesie degradacji białek zapasowych nie jest w pełni poznana.

## WPROWADZENIE

Ziarna zbóż stanowią około 90% nasion wszystkich uprawianych roślin. Nie dziwi więc fakt, że biologia nasion zbóż jest jednym z najintensywniej badanych aspektów fizjologii i biochemii roślin. W centrum badań znajdują się takie zagadnienia, jak wykształcanie, dojrzewanie, spoczynek czy kiełkowanie nasion. Prace te zaowocowały m. in. poznaniem sekwencji wielu genów roślin zbożowych: pszenicy, ryżu i kukurydzy, wyjaśnieniem niektórych aspektów mechanizmu hormonalnej regulacji spoczynku i kiełkowania. Scharakteryzowano wiele enzymów związanych z tymi procesami, określono ich funkcje oraz poznano mechanizmy regulacji ich aktywności. Wśród badanych enzymów od lat szczególnie zainteresowaniem cieszą się enzymy związane z degradacją materiałów zapasowych zgromadzonych w ziarniakach zbóż. Częściowo jest to podyktowane ich ważną funkcją dostarczania łatwo przyswajalnych substratów do syntez w rosnącej siewce, ale także szerokim zastosowaniem, przede wszystkim amylaz i proteaz, w przemyśle spożywczym.

Mobilizację substancji zapasowych zgromadzonych w ziarniakach zbóż można przedstawić jako proces trój etapowy. Etap pierwszy polega na degradacji białek zapasowych zdeponowanych w ciałach białkowych warstwy aleuronowej. Następnie uwolnione aminokwasy są zużywane do syntezy *de novo* hydrolaz w warstwie aleuronowej i *epithelium* tarczki zarodkowej. W trzecim etapie hydrolazy te są wydzielane do bielma skrobiowego, gdzie uczestniczą w degradacji zgromadzonych tam polisacharydów i białek, a produkty są transportowane do rozwijających się i rosnących organów młodej rośliny. Hydroliza białek zapasowych w endospermie skrobiowym następuje także pod wpływem peptydaz syntetyzowanych w trakcie wykształcania się ziarniaków, aktywowanych w czasie procesu kiełkowania [1-3].

Spśród procesów zachodzących w kiełkujących ziarniakach zbóż dwa wydają się mieć decydujący wpływ na inicjację procesu degradacji zgromadzonych w endospermie białek zapasowych. Pierwszym z nich jest obniżenie pH bielma skrobiowego pod wpływem wydzielanych przez warstwę aleuronową kwasów organicznych, co stwarza optymalne warunki działającym tam peptydazom. Z badań przeprowadzonych przez Dominguez i Cejudo [4] wynika, że po trzech dobach od momentu rozpoczęcia procesu imbibicji wartość pH w obrębie bielma skrobiowego ziarniaków pszenicy, z wyjątkiem niewielkiego obszaru bezpośrednio przylegającego do tarczki zarodkowej, pozostaje zbliżona do obojętnej. Spadek pH postępuje w kolejnych dniach kiełkowania, aby objąć całą tkankę w szóstej dobie. Procesowi temu towarzyszy postępująca równolegle degradacja tkanki bielma skrobiowego.

Drugim procesem, od którego wydaje się zależeć szybkość hydrolizy białek zapasowych podczas kiełkowania ziarniaków zbóż, jest redukcja wiązań disul-

Adam Drzymała<sup>✉</sup>

Beata Prabucka

Wiesław Bielawski

Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

<sup>✉</sup>Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 157, Budynek 37, 02-776 Warszawa; tel.: (22) 593 25 76, faks: (22) 593 25 63, e-mail: adam\_drzymala@sggw.pl

Artykuł otrzymano 8 maja 2009 r.  
Artykuł zaakceptowano 23 czerwca 2009 r.

**Słowa kluczowe:** endopeptydazy cysteinowe, hydroliza białek zapasowych, karboksypeptydazy serynowe, kiełkowanie, prolaminy, zboża

**Wykaz skrótów:** ER – siateczka śródplazmatyczna; HMW – wysoka masa cząsteczkowa; LMW – niska masa cząsteczkowa

fidowych w tych białkach przez cysteinę, glutation oraz tioredoksynę *h* wydzielane do bielma, co zwiększa podatność tych białek na hydrolizę. Davy i wsp. [5] stwierdzili, że podany egzogennie 2-merkaptoetanol może zwiększać rozpuszczalność jęczmiennej hordeiny, a przez to wpływać na jej podatność na hydrolizę. Wcześniejsze prace wskazują na udział tioredoksyny *h* w redukcji białek zapasowych [6]. 30-to krotna nadprodukcja tioredoksyny *h* w jęczmieniu powodowała wzrost ilości zredukowanej hordeiny oraz wzrost ilości białek rozpuszczalnych, co ma bezpośredni wpływ na szybkość hydrolizy białek zapasowych. Ponadto, obserwowano również podwyższoną aktywność  $\alpha$ -amylazy, co sugeruje udział tego związku w przekazywaniu sygnału z bielma skrobiowego do otaczających tkanek [7].

## ANATOMICZNY I FUNKCJONALNY PRZEGLĄD TKANEK ZIARNIAKA

Dojrzały ziarniak zbóż jest owocem posiadającym jedno bielmowe nasienie. Nasienie to składa się z bielma, które w czasie rozwoju ziarniaka zróżnicowało się na zewnętrzną warstwę aleuronową i bielmo skrobiowe, zarodka i okrywy nasiennej, która na stałe zrasta się z suchą owocnią tworząc okrywę owocowo-nasienną (Ryc. 1). Bielmo stanowi tkankę spichrzową gromadzącą substancje odżywcze dla rosnącej siewki. Rozwijają się one z komórki macierzystej, która powstaje w wyniku zapłodnienia komórki centralnej woreczka zalążkowego. U zbóż triploidalne jądro tej komórki przechodzi początkowo serię podziałów bez następujących po nich podziałów cytoplazmy, co prowadzi do nagromadzenia dużej ilości wolnych jąder w peryferycznej warstwie cytoplazmy. Gdy komórka ta osiągnie odpowiednie stadium rozwoju (u jęczmienia 5–6 dzień po zapyleniu), rozpoczyna się celularyzacja bielma, która trwa od 2 do 3 dni. Pierwsze ściany komórkowe tworzą się w peryferycznych częściach

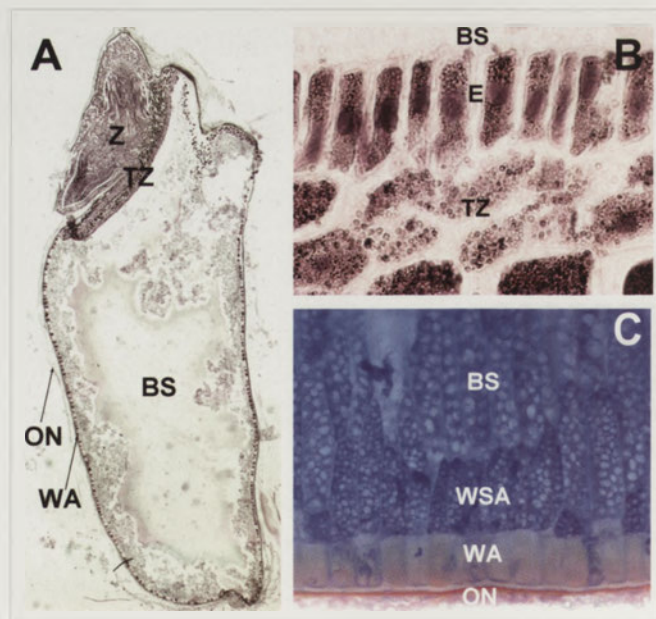
komórki, a następnie proces ten postępuje w kierunku centralnej wakuoli [8]. Przez cały okres dojrzwania z tkanek rośliny macierzystej transportowane są tu niskocząsteczkowe produkty asymilacji, które przekształcane są w wysokocząsteczkowe materiały zapasowe, kumulowane w postaci ziaren skrobi, ciał białkowych i ciał lipidowych. W końcowej fazie procesu dojrzwania bielmo skrobiowe przechodzi programowaną śmierć komórek [9], ciała białkowe ulegają zgnieceniu, a macierz białkowa wypełnia przestrzeń pomiędzy ziarnami skrobi.

Jedynymi żywymi elementami bielma dojrzałych ziarniaków są komórki warstwy aleuronowej. Wykazują one szereg różnic w stosunku do komórek bielma skrobiowego. Przede wszystkim nie występują w nich ziarna skrobi, za to obecna jest duża liczba ciał białkowych, otoczonych ciałami lipidowymi [10]. Warstwa aleuronowa otacza bielmo skrobiowe, oprócz regionów, w których bielmo skrobiowe przylega do zarodka. Złożona jest z jednej do kilku warstw komórek. Rozwój warstwy aleuronowej jęczmienia zachodzi około 14 dnia po zapyleniu [11]. Przez cały ten okres w cytoplazmie komórek tej warstwy obserwuje się liczne wakuole. Większa część materiałów zapasowych zgromadzona w tej tkance przeznaczona jest do syntezy enzymów hydrolitycznych, biorących udział w degradacji materiałów zapasowych bielma skrobiowego [10].

Suchy ziarniak zawiera w pełni rozwinięty zarodek, składający się z pędu zarodkowego, otoczonego koleptylem, korzenia okrytego koleoryzą i liścieni przekształconych w tarczkę zarodkową i epiblast. Z punktu widzenia hydrolizy materiałów zapasowych bielma, najważniejszą tkanką zarodka, odpowiedzialną za wydzielanie enzymów hydrolitycznych do bielma skrobiowego [12] oraz transport niskocząsteczkowych produktów hydrolizy do zarodka [13], jest tarczka zarodkowa. Po jej zewnętrznej stronie znajduje się pojedyncza warstwa komórek. Warstwa ta, zwana warstwą epitelialną, zbudowana jest z komórek posiadających duże ilości ciał białkowych, które, podobnie jak komórki aleuronu, nie zawierają ziaren skrobi [14]. Materiały zapasowe zgromadzone w komórkach tej warstwy wykorzystywane są głównie do syntezy enzymów hydrolitycznych. Tarczka zarodkowa uczestniczy w przekazywaniu (na zasadzie dyfuzji) wydzielanych przez zarodek giberelin, sygnału dla warstwy aleuronowej do rozpoczęcia lub przyspieszenia syntezy i wydzielania enzymów hydrolitycznych w czasie kiełkowania. Działanie tego fitohormonu na warstwę aleuronową potwierdzono dla większości badanych roślin [15,16]. Przypuszcza się również, że ten sam sygnał odpowiedzialny jest także za aktywację komórek warstwy epitelialnej tarczki zarodkowej, ale obecność giberelin wydzielanych przez zarodek utrudnia w dużym stopniu badanie tego zjawiska.

## BIAŁKA ZAPASOWE ZIARNIAKÓW ZBÓŻ

Białka zapasowe ziarniaków zbóż można podzielić na cztery typy: rozpuszczalne w wodzie i solach albuminy, rozpuszczalne w solach globuliny, rozpuszczalne w wodnych roztworach alkoholi prolaminy: gliadyny (pszenica), zeiny (kukurydza), sekaliny (żyto), hordeiny (jęczmień), aweniny (owies) i gluteliny, które rozpuszczają się w wodnych



Rycina 1. Budowa ziarniaka: A) przekrój podłużny<sup>1</sup>, B) przekrój tarczki zarodkowej<sup>1</sup>, C) przekrój przez warstwę aleuronową<sup>2</sup>. Stosowane skróty: ON – okrywa owocowo-nasienna, WA – warstwa aleuronowa, WSA – warstwa subaleuronowa, BS – bielmo skrobiowe, Z – zarodek, TZ – tarczka zarodkowa, E – warstwa epitelialna tarczki zarodkowej. <sup>1</sup>preparat barwiony safraniną i zielenią trwałą, <sup>2</sup>preparat barwiony Evans Blue, martwe komórki zabarwione na niebiesko.



roztworach zasad [17]. Najnowsza klasyfikacja białek zapasowych opiera się na związkach filogenetycznych wymienionych grup [18]. Według niej prolaminy i gluteliny, stanowiące oddzielne grupy w klasycznej klasyfikacji Osborne'a połączono w jedną grupę białek o funkcji zapasowej.

Głównymi białkami zapasowymi ryżu i owsa są globuliny, a prolaminy stanowią jedynie od 8 do 12% ogólnej puli białek zawartych w bielmie tych ziarniaków. U pozostałych zbóż wśród białek zapasowych dominują prolaminy, których zawartość sięga 40-60% [19]. Rozpuszczalne i nierozpuszczalne w solach białka ziarniaków zbóż stanowią dwie odrębne grupy, zarówno pod względem budowy, składu aminokwasowego, jak i mechanizmu syntezy i magazynowania. Białka rozpuszczalne, które można podzielić na podstawie różnej stałej sedymentacji na białka 2S (albuminy), 7S i 11S (globuliny), są szeroko rozpowszechnione w nasionach roślin jedno- i dwuliściennych. Najlepszym źródłem tych białek są nasiona dwuliściennych, dzięki czemu białka z tych nasion zostały najlepiej scharakteryzowane. Albuminy 2S rzepaku składają się z dwóch polipeptydów o masach 4 i 9 kDa. Syntetyzowane są jako pojedynczy łańcuch polipeptydowy, zawierający krótki łącznik, który w trakcie modyfikacji potranslacyjnych zostaje wycięty. Wycięte zostają również krótkie odcinki C- i N-końcowe peptydu. Oba łańcuchy dojrzałego białka połączone są mostkami dwusiarczkowymi [20]. Inna grupa białek rozpuszczalnych – globuliny 11S soi kodowane są przez rodzinę zawierającą do 20 genów. Każda z podjednostek dojrzałej formy globulin 11S kodowana jest przez inny gen z tej rodziny. Białka te syntetyzowane są na rybosomach związanych z siateczką śródplazmatyczną (ER) szorstką. W światłach kanalików siateczki usuwane są sekwencje sygnałne, a niedojrzałe proglobuliny transportowane są w postaci trimerów do wakuol zapasowych. Tam poddawane są ograniczonej proteolizie w miejscu zachowanego w ewolucji ugrupowania Asn-Gly przez endopeptydazę cysteinową, co warunkuje formowanie się heksamerycznych globulin 11S [21]. Dla porównania globuliny 7S są glikoproteinami zbudowanymi z trzech podjednostek. Charakterystyczną cechą tych białek jest brak cysteiny w składzie aminokwasowym. Podjednostki syntetyzowane są w postaci pojedynczego łańcucha polipeptydowego, który u grochu ulega fragmentacji na dwa lub trzy oddzielne łańcuchy [22].

Gluteliny pszenicy (gluteniny) można podzielić na grupy o niskiej (LMW) i o wysokiej (HMW) masie cząsteczkowej. Wśród glutenin LMW wyróżnia się trzy typy białek, wyodrębnionych na podstawie ich ruchliwości elektroforetycznej techniką SDS-PAGE. Są to gluteniny B, C i D o masie cząsteczkowej zbliżonej do gliadyn, mieszczącej się w przedziale od 30 do 50 kDa [23]. Gluteniny B i C są białkami o dużej zawartości cysteiny, w przeciwieństwie do typu D, który należy do glutenin ubogich w siarkę. Ten ostatni jest najbliższym spokrewnionym z  $\omega$ -gliadynami, przy czym w jednej pozycji posiada cysteinę, która umożliwia jego włączenie do polimerów glutenin.

Gluteniny pszenicy o wysokiej masie cząsteczkowej posiadają powtarzający się motyw wewnątrz cząsteczki, tworzący struktury  $\beta$ , podczas gdy N- i C-końcowe fragmenty mają strukturę  $\alpha$ -helikalną [24]. Białka te składają

się z dwóch typów podjednostek: x i y, różniących się zawartością cysteiny w regionach niepowtarzających się [18]. Gluteniny HMW pszenicy składają się z 3-5 podjednostek. W trakcie dojrzewania białka te przechodzą liczne modyfikacje potranslacyjne, obejmujące glikozylację i fosforylację [25,26]. Funkcja tych modyfikacji nie jest znana.

Gliadyny są najważniejszą grupą białek zapasowych pszenicy. Na podstawie ruchliwości elektroforetycznej można je podzielić na cztery frakcje  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\omega$ -gliadyny [27]. Są białkami monomerycznymi, zawierającymi w swym składzie aminokwasowym znaczne ilości proliny i glutaminy i posiadającymi ( $\alpha$ -,  $\gamma$ -gliadyny) lub nie ( $\omega$ -gliadyny) wewnętrzne wiązania disulfidowe [18]. Gliadyny typu  $\omega$  różnią się również od pozostałych gliadyn niezwykle wysoką zawartością glutaminy, kwasu glutaminowego i proliny, które razem stanowią ok. 70% wszystkich aminokwasów [28]. Charakterystyczną cechą gliadyn zawierających cysteinę jest obecność na N- i C-końcu tych białek sekwencji regulujących ich transport wewnątrz kanalików ER. N-końcowy fragment zawiera tandemowo powtórzoną (7-16 razy) sekwencję bogatą w prolinę, składającą się z 5-8 aminokwasów, natomiast C-końcowy region tych białek zawiera w 6-8 pozycjach cysteinę, tworzącą wewnętrzne mostki dwusiarczkowe [24]. C-końcowy fragment kieruje białko do aparatu Golgiego, natomiast N-końcowy fragment odpowiada za akumulację tych białek w kanalikach ER. Wstawienie dodatkowych kopii sekwencji tandemowych do regionu N-końcowego powoduje przyspieszenie procesu akumulacji [29]. Za tworzenie się nierozpuszczalnych agregatów mogą również odpowiadać oddziaływania białko-białko pomiędzy hydrofobowymi molekułami tych prolamin [30], niewykluczony jest też udział w tym procesie białek chaperonowych [31].

Gliadyny są syntetyzowane na rybosomach związanych z ER, a następnie wydzielane są do wakuol zapasowych z udziałem aparatu Golgiego [32]. Levanony i wsp. [33] zaproponowali alternatywną drogę transportu gliadyn. Hipoteza ta opiera się na stwierdzeniu obecności białek ER w ciałach białkowych, m. in. białka chaperonowego BiP (ang. *chaperones binding protein*), białkowej izomerazy grup disulfidowych i innych. Utworzone wewnątrz kanalików ER inkluzje białkowe mogłyby być wydzielane przez siateczkę śródplazmatyczną bezpośrednio do wakuol. Następnie pęcherzyki wydzielnicze ulegałyby włączeniu do wakuol zapasowych na drodze autofagocytozy. U niektórych zbóż istnieje jeszcze trzeci sposób tworzenia się wakuol zapasowych, typowy dla liścieni roślin dwuliściennych. Część prolamin ryżu transportowana jest „klasyczną” drogą wydzielania z ER, natomiast gluteliny magazynowane są w wakuolach pochodzących z fragmentacji wakuoli centralnej [34].

Prolaminy zbóż spokrewnionych z rodziną *Triticeae*, oprócz hordeiny C, posiadają regiony zachowane w ewolucji, charakterystyczne dla gliadyn. Do nadrodziny prolamin zaliczyć więc można aweniny owsa, sekaliny występujące w życie oraz  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -zeiny kukurydzy.  $\alpha$ -zeiny stanowią odrębną grupę prolamin. Wśród nich wyróżnić można dwie podklasy: 19K (24 kDa) i 22K (27 kDa). Obie grupy  $\alpha$ -zein charakteryzują się niską zawartością cysteiny, w odróżnieniu od pozostałych grup prolamin kukurydzy oraz

posiadają powtórzone 20 aminokwasowe sekwencje. Cechą unikalną tych białek jest niska homologia do innych białek z nadrodziny prolamin. Grupa ta wydaje się być spokrewniona tylko z prolaminami sorga i prosa [35,36].

W ziarniakach zbóż zaobserwowano różnice w kompozycji białek zapasowych w ciałach białkowych wyizolowanych z bielma skrobiowego i warstwy aleuronowej. W ciałach aleuronowych jęczmienia głównym białkiem zapasowym są trzy frakcje globulin 7S (25, 40 i 50 kDa) oraz białka 70 kDa [37]. Nie stwierdzono natomiast obecności hordein, dominujących w ciałach białkowych bielma skrobiowego.

W białkowych wakuolach zapasowych gromadzone są również inhibitory amylaz i proteaz, białkowe czynniki inaktywujące rybosomy (RIP) i enzymy, takie jak: syntaza sacharozy, ureaza czy liczne proteazy. Główną funkcją peptydaz może być obrona przed patogenami oraz ewentualny udział we wczesnych etapach mobilizacji białek zapasowych. Dodatkowo stanowią również źródło łatwo przyswajalnego azotu i siarki.

### MOBILIZACJA BIAŁEK ZAPASOWYCH

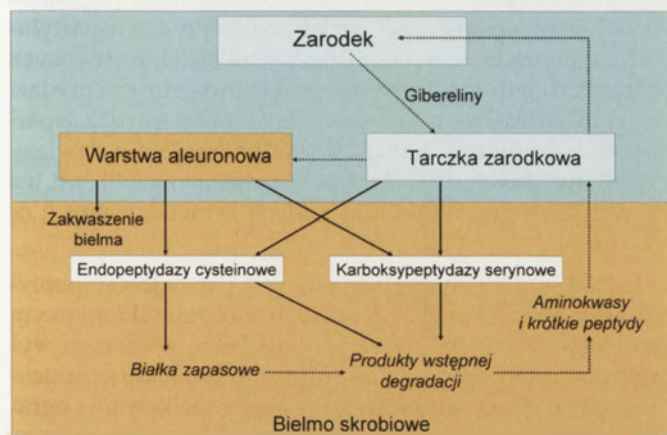
Sygnal hormonalny zarodka, w postaci giberelin, przelamuje spoczynek obniżając poziom białek związanych ze ścieżką transdukcji sygnałów kwasu abscysynowego [38]. Powoduje to ekspresję genów aktywujących proces syntezy hydrolaz, m.in. peptydaz, przez warstwę aleuronową [39] (Tab. 1). Sygnal ten odpowiada także za zakwaszenie bielma skrobiowego. W wyniku stymulacji giberelinami warstwa aleuronowa uwalnia kwasy fosforowy i cytrynowy, przez co pH bielma skrobiowego w czasie mobilizacji materiałów zapasowych zawiera się w przedziale 4-5. Stawarza to odpowiednie warunki do działania hydrolaz, których optima pH w ziarniakach zbóż oscylują w tym właśnie zakresie [2]. Jednocześnie w tarczce zarodkowej dochodzi do syntezy hydrolaz, które następnie wydzielane są do bielma skrobiowego. Degradacja białek zapasowych zbóż rozpoczyna się ograniczoną hydrolizą niektórych wiązań peptydowych, co zwiększa rozpuszczalność tych białek i ich podatność na

atak proteaz [45]. Najintensywniejsza hydroliza białek zapasowych przypada na 2-6 dzień imbibicji ziarniaków [46]. Główne białka zapasowe ziarniaków pszenicy, prolaminy i gluteniny hydrolizowane są z podobną szybkością. Po 6 dniach obie frakcje są już prawie całkowicie zdegradowane. Równocześnie albuminy i globuliny hydrolizowane są z niewielką szybkością [47]. Wykryto również różnice w szybkości hydrolizy białek, wchodzących w skład poszczególnych frakcji. Peptydazy uczestniczące w tym procesie najefektywniej hydrolizowały białka o niewielkiej ruchliwości elektroforetycznej, natomiast degradacja białek o dużej ruchliwości zachodziła wolniej [48]. W bielmie skrobiowym ziarniaków pszenicy i jęczmienia głównymi produktami hydrolizy białek zapasowych są małe peptydy i aminokwasy [49]. Aminokwasy i peptydy transportowane są do zarodka, gdzie wykorzystywane są w procesie wzrostu. U roślin występuje kilka typów transporterów peptydów: typ-ABC, transportery di-, tri-, tetra- i pentapeptydów [50]. Tarczki zarodkowe pszenicy i jęczmienia posiadają dwa niespecyficzne systemy transportu peptydów, a także transportery specyficzne dla proliny i drugi dla aminokwasów zasadowych [51]. HvPTR1 – transporter wyizolowany z tarczek zarodkowych ziarniaków jęczmienia, uczestniczy w pobieraniu aminokwasów i dipeptydów z bielma skrobiowego. Występuje on tylko w tarczce zarodkowej, a ekspresja genu kodującego to białko zachodzi najintensywniej między 6 a 12 godziną od rozpoczęcia imbibicji [52]. W tym samym czasie obserwuje się również wzrost szybkości transportu aminokwasów i peptydów przez tarczkę zarodkową. Doświadczenia izotopowe wykazały, że białko to transportuje alaninę i alanylo-feniloalaninę znakowane węglem <sup>14</sup>C. Transport regulowany jest poprzez fosforylację, a zahamowanie aktywności fosfatazy białkowej specyficznym inhibitorem powoduje represję transportu dipeptydów przez komórki warstwy epitelialnej [13].

Szybkość degradacji materiałów zapasowych obniża się po szóstym dniu imbibicji. Spowodowane jest to wyczerpnięciem białek zapasowych, a także zmniejszeniem się poziomu syntezy hydrolaz. Pod wpływem giberelin komórki warstwy aleuronowej ulegają apoptozie. Pomiędzy 4 a 8

Tabela 1. Występowanie wybranych peptydaz w czasie kiełkowania ziarniaków zbóż.

Tkanka	Grupa peptydaz	Nazwa	Organizm	Opis	Piśmiennictwo
bielmo skrobiowe + warstwa aleuronowa	endopeptydazy cysteinowe	EP A	<i>Hordeum vulgare</i>	kiełkowanie	[40]
		EP B1	<i>Hordeum vulgare</i>	kiełkowanie	[40]
		EP B4	<i>Hordeum vulgare</i>	kiełkowanie	[40]
		podobna do katepsyny B	<i>Hordeum vulgare</i>	kiełkowanie	[40]
		podobna do proteinaz nadrodziny OTU	<i>Hordeum vulgare</i>	kiełkowanie	[40]
		mRNA proteiny cysteinowej	<i>Oryza sativa</i>	wpływ giberelin	[41]
	endopeptydazy aspartyłowe karboksypeptydazy serynowe	fytopsyna (phytepsin)	<i>Hordeum vulgare</i>	kiełkowanie	[42]
		karboksypeptydaza III	<i>Hordeum vulgare</i>	kiełkowanie	[40]
		karboksypeptydaza III	<i>Oryza sativa</i>	wpływ giberelin	[43]
		karboksypeptydaza ( <i>Arabidopsis</i> )	<i>Oryza sativa</i>	wpływ giberelin	[43]
zarodek	endopeptydazy cysteinowe	EP B1	<i>Hordeum vulgare</i>	kiełkowanie	[40]
		EP B4	<i>Hordeum vulgare</i>	kiełkowanie	[40]
		podobna do katepsyny B	<i>Hordeum vulgare</i>	kiełkowanie	[40]
	endopeptydazy aspartyłowe karboksypeptydazy serynowe	oryzasyna (oryzasin)	<i>Hordeum vulgare</i>	kiełkowanie	[42]
		karboksypeptydaza serynowa	<i>Hordeum vulgare</i>	kiełkowanie	[44]
		karboksypeptydaza serynowa	<i>Hordeum vulgare</i>	kiełkowanie	[42]



Rycina 2. Schemat zdarzeń doprowadzających do mobilizacji białek zapasowych w ziarniakach zbóż.

dniem inkubacji tych komórek z kwasem giberelinowym ponad 70% protoplastów przechodzi programowaną śmierć komórki. Wysokocząsteczkowe związki komórki warstwy aleuronowej podlegają hydrolizie, a produkty transportowane są do rosnącej siewki [53] (Ryc. 2).

#### PEPTYDAZY ZIARNIAKÓW ZBÓŻ I ICH UDZIAŁ W HYDROLIZIE BIAŁEK ZAPASOWYCH

Prolaminy stanowią główną frakcję białek zapasowych w ziarniakach najważniejszych gospodarczo zbóż. Ich nietypowe właściwości: skład aminokwasowy i nierozpuszczalność w roztworach wodnych sprawiają, że zagadnienia związane z inicjacją i dalszą hydrolizą tej grupy białek w czasie kiełkowania są szczególnie interesującym przedmiotem badań. Ogólnie przyjęty mechanizm hydrolizy prolamin zakłada początkową hydrolizę niektórych wiązań peptydowych, co zwiększa rozpuszczalność tych białek, a następnie masową hydrolizę do krótkich peptydów i aminokwasów. Inicjacja tego procesu wymaga obecności w bielmie skrobiowym wyspecjalizowanych peptydaz, które są zdolne do hydrolizy nierozpuszczalnego substratu. Proteazy uczestniczące w mobilizacji białek zapasowych w czasie kiełkowania muszą spełniać trzy kryteria. Przede wszystkim muszą znajdować się w tej samej komórce lub przedziale komórkowym, co ich naturalny substrat, a pojawienie się aktywności tych enzymów w czasie kiełkowania musi wiązać się z procesem degradacji białek zapasowych. Po drugie, muszą być aktywne w warunkach miejsca działania (obecność inhibitorów, pH i potencjał redoks) oraz muszą hydrolizować naturalny substrat lub któryś z produktów jego częściowej degradacji *in vitro* [3]. Enzymami spełniającymi te wymagania są endopeptydazy o niskim optimum pH, głównie endopeptydazy cysteinowe [54], których aktywność stanowi w ziarniaku nawet do 90% ogólnej aktywności endopeptydaz, i karboksypeptydazy serynowe. Oba typy enzymów występują w bielmie w czasie kiełkowania, posiadają wysoką aktywność i mają specyficzność substratową, która pozwala im hydrolizować białka zapasowe zbóż, bądź też produkty ich częściowej degradacji. Inne proteazy (endopeptydazy o wyższym optimum pH, dipeptydazy i inne) nie posiadają takiej specyficzności albo mają zbyt niską aktywność, aby mogły odgrywać kluczową rolę w tym procesie. Niemniej jednak

nie wyklucza się możliwości uczestnictwa tych enzymów w degradacji białek zapasowych. Obserwacje na poziomie białka potwierdzają również analizy z użyciem narzędzi biologii molekularnej, które wykazały w bielmie i zarodku kiełkujących ziarniaków jęczmienia wysoki poziom ekspresji badanych genów kodujących przede wszystkim endopeptydazy cysteinowe i karboksypeptydazy serynowe [40].

#### ENDOPEPTYDAZY

W dojrzałych nasionach wielu roślin zbożowych zaobserwowano aktywności endopeptydaz należących do grup proteinaz aspartylowych, cysteinowych, serynowych i metaloendopeptydaz, zidentyfikowanych przy użyciu specyficznych inhibitorów diagnostycznych. W ziarniakach żyta czy pszenżyta, po trzech dniach od rozpoczęcia imbibicji, odnotowano wzrost całkowitej aktywności endopeptydaz względem gliadyny jako substratu [55,56]. Za inicjację procesu degradacji białek zapasowych zbóż odpowiedzialne są prawdopodobnie proteiny cysteinowe syntetyzowane *de novo* [1,3]. Jedynym opisanym wyjątkiem są nasiona gryki, u której wstępna hydroliza białek zapasowych prowadzona jest przy udziale metaloproteiny obecnej w suchych nasionach [57]. Dalsza proteoliza białek zapasowych, prolamin, ale również globulin, zachodzi pod wpływem endopeptydaz cysteinowych dominujących w bielmie skrobiowym w czasie kiełkowania [48,58].

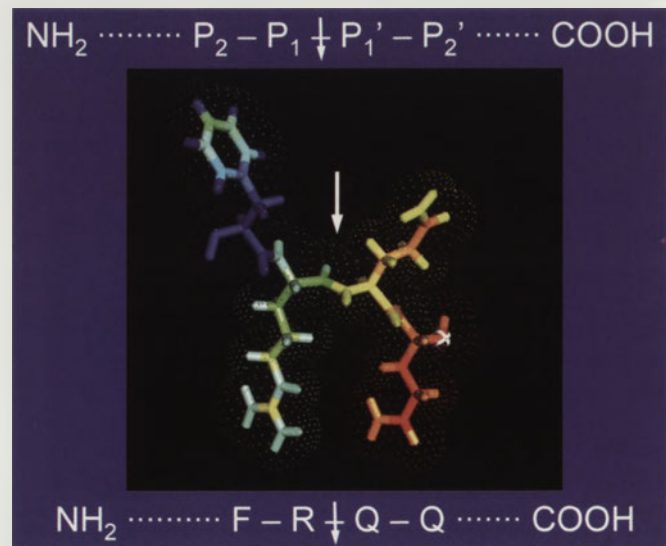
U pszenicy i innych zbóż proteiny cysteinowe są syntetyzowane w warstwie aleuronowej bielma skrobiowego oraz w tarczce zarodkowej kiełkujących ziarniaków. Synteza peptydaz w warstwie aleuronowej jest indukowana przez wydzielane przez tarczkę zarodkową gibereliny [59]. Enzymy te syntetyzowane są jako proenzymy w postaci pojedynczego łańcucha polipeptydowego zawierającego peptyd sygnałowy usuwany w początkowym etapie szlaku wydzielniczego. Niektóre z tych enzymów ulegają dalszym kilkietapowym potranslacyjnym modyfikacjom prowadzącym do powstania aktywnego enzymu o masie cząsteczkowej niższej niż masa cząsteczkowa pierwotnego łańcucha polipeptydowego [60]. Wszystkie dotychczas opisane endopeptydazy cysteinowe wyizolowane z nasion charakteryzują się niską masą cząsteczkową (21–40 kDa), niskim pI i kwaśnym optimum pH, szeroką specyficznością substratową i wysoką wrażliwością na specyficzne inhibitory [54,61,62]. Za kluczową rolę endopeptydaz cysteinowych w degradacji białek do peptydów przemawia ich aktywność rosnąca równolegle do postępującego procesu kiełkowania, wysokie powinowactwo w stosunku do naturalnych białek zapasowych oraz szeroka specyficzność substratowa [48].

Endopeptydazą, która rozpoczyna proces mobilizacji białek zapasowych oraz odpowiada również za późniejszą, intensywną degradację tych białek w nasionach zbóż jest prawdopodobnie endopeptydaza EP-A [61–63]. Enzym ten występuje u pszenicy w trzech izoformach, a jego synteza zachodzi w warstwie aleuronowej w odpowiedzi na sygnał hormonalny w postaci giberelin [59]. Masa cząsteczkowa tego enzymu wyznaczona metodą SDS-PAGE wynosi 33,5 kDa, a metodą sita molekularnego – 22 kDa. Enzym ten hydrolizuje substraty w niskim pH, w przedziale pomiędzy 4,0 a 4,5 [61,62]. Po trzeciej dobie od rozpoczęcia imbibicji

cji enzym ten przejawia główną aktywność w ziarniakach pszenżyta [56,64]. Drugim enzymem, który współdziała z endopeptydazą EP-A w całkowitej degradacji białek zapasowych do krótkich peptydów, jest endopeptydaza EP-B. Występuje w postaci dwóch izoform różniących się punktem izoelektrycznym o masie cząsteczkowej 30 kDa. Podobnie jak endopeptydaza EP-A, enzym ten wydzielany jest przez komórki warstwy aleuronowej w odpowiedzi na gibereliny, choć za syntezę i wydzielanie tego enzymu do bielma skrobiowego odpowiedzialna jest początkowo tarczka zarodkowa [65]. Enzymy te w pierwszym rzędzie hydrolizują wiązania pomiędzy resztami argininy i glutaminy w sekwencjach Phe-Arg-Gln-Gln, których obecność wykryto w hordeinie C. Sugeruje to konieczność odłączenia C-końcowego fragmentu, co zwiększa podatność tego białka na atak proteolityczny [3] (Ryc. 3). Decydujące znaczenie mają aminokwasy w pozycji P<sub>2</sub> substratu. Oba enzymy preferują duże, alifatyczne łańcuchy boczne w tej pozycji. Powinno tworo do łańcuchów bocznych w pozycji P<sub>1</sub> jest niższe, jednak obecność prolina w tej pozycji prawie całkowicie hamuje aktywność tych endopeptydaz [5].

Poza wymienionymi endopeptydazami wyizolowano i scharakteryzowano cysteinową endopeptydazę MEP-1 (29kDa) o zbliżonych właściwościach do endopeptydazy EP-B i endopeptydazy o masach 30 i 31 kDa ze słoju jęczmienia [2]. U roślin dwuliściennych wykryto obecność co najmniej kilku endopeptydaz cysteinowych, np.: endopeptydazy cysteinowej (SH-EP) z nasion *Vigna mungo* czy 4 endopeptydaz cysteinowych w nasionach wyki [1].

Wśród innych grup katalitycznych w ziarniakach zbóż wykryto obecność endopeptydaz aspartylowych [3,56,64]. Jedną z wyizolowanych i scharakteryzowanych endopeptydaz aspartylowych nasion zbóż jest jęczmienna endopeptydaza aspartylowa HvAP, która hydrolizuje gliadynę *in vitro*. Udowodniono jednak, że enzym ten występuje tylko w warstwie aleuronowej i nie jest wydzielany do bielma skrobiowego [2]. Obecność proteinaz aspartylowych została stwierdzona w nasionach wszystkich badanych dotychczas gatunków roślin w stanie spoczynku. Aktywność tych



Rycina 3. Jedno z pierwotnych miejsc hydrolizy wiązań peptydowych w hordeinie C jęczmienia.

enzymów spada znacznie w czasie kiełkowania [66,67], co wskazuje na ograniczony udział endopeptydaz aspartylowych w początkowym etapie hydrolizy białek zapasowych niektórych zbóż, lub też na inne funkcje tej grupy peptydaz. Do takich funkcji mogą należeć: udział endopeptydaz aspartylowych w hydrolizie białkowych inhibitorów  $\alpha$ -amylazy i trypsyny obecnych w słodzie jęczmiennym [68] lub też aktywacja enzymów hydrolitycznych syntetyzowanych *de novo* [69].

Udział endopeptydaz serynowych i metaloendopeptydaz w hydrolizie białek zapasowych w bielmie skrobiowym ziarniaków zbóż jest dyskusyjny. Badania, w których wykryto obecność peptydaz z tej grupy dotyczą słoju jęczmiennego. pH bielma skrobiowego w czasie kiełkowania ogranicza w znacznym stopniu możliwość ich uczestnictwa w masowej mobilizacji białek zapasowych. Jedynym znanym wyjątkiem jest wspomniana wcześniej metaloproteinaza z nasion gryki [57]. Inne scharakteryzowane endopeptydazy należące do klasy endopeptydaz serynowych nie wykazywały powinowactwa do głównej grupy białek zapasowych zbóż – prolamin [70,71].

#### KARBOKSYPEPTYDAZY

Peptydy powstałe w wyniku hydrolizy białek zapasowych przez endopeptydazy degradowane są do aminokwasów przez karboksypeptydazy serynowe [72]. Enzymy te są odpowiedzialne za uwolnienie ok. 75% wolnych aminokwasów w procesie słodowania [3]. Hydrolizują wiązania peptydowe na C-końcach peptydów w niskim pH. Grupa ta obejmuje enzymy o masie cząsteczkowej od 40 do 175 kDa i niskim punkcie izoelektrycznym. W ziarniakach jęczmienia i pszenicy wykryto obecność 5 karboksypeptydaz serynowych różniących się zarówno specyficznością substratową, jak i masą cząsteczkową [73,74]. Karboksypeptydaza I jest enzymem o masie cząsteczkowej 100 kDa u jęczmienia i 120 kDa u pszenicy, złożonym z dwóch podjednostek [75]. Enzym ten przejawia najwyższą aktywność w stosunku do substratów hydrofobowych, podobnie jak karboksypeptydaza II, która charakteryzuje się zbliżoną masą cząsteczkową (110 i 120 kDa) i budową [76], ale posiada dodatkowo zdolność hydrolizy substratów z aminokwasami o dodatnio naładowanych łańcuchach bocznych. Karboksypeptydaza III, charakteryzująca się niską masą cząsteczkową 43 kDa u jęczmienia, 40 kDa u pszenicy oraz 45 kDa u pszenżyta [77] i budową monomeryczną [77,78], z największą szybkością hydrolizuje substraty hydrofobowe z dużym łańcuchem bocznym aminokwasu C-końcowego. Natomiast karboksypeptydazy IV (170 i 165 kDa) i V (95 i 150 kDa) działają na substraty z proliną na przedostatniej pozycji, jednak ich aktywność, w porównaniu z innymi karboksypeptydazami obecnymi w bielmie skrobiowym, jest stosunkowo niska. W związku z tym karboksypeptydazy IV i V jak dotąd nie zostały oczyszczone i scharakteryzowane. Na podstawie specyficzności substratowej roślinnych karboksypeptydaz I, II i III oraz karboksypeptydazy Y z drożdży, wyodrębniono dwie grupy karboksypeptydaz serynowych C i D, do których zaliczono również inne karboksypeptydazy pochodzące z grzybów i zwierząt. Karboksypeptydazy C (karboksypeptydazy I i III) hydrolizują substraty posiadające na C-końcu aminokwasy hydrofobowe. Do karboksypeptydaz

typu D (karboksypeptydaza II) zaliczono natomiast enzymy, które prócz uwalniania aminokwasów hydrofobowych, są zdolne do hydrolizy substratów z resztą lizyny na C-końcu [79].

Karboksypeptydaza II obecna jest w suchych ziarniakach. Aktywność tego enzymu sukcesywnie spada w miarę postępu mobilizacji białek zapasowych. Silną akumulację tego enzymu obserwowano od 20 dnia po zapyleniu. Ponadto stwierdzono, że karboksypeptydaza ta występuje w trzech izoformach, przy czym jedna z nich może przejawiać aktywność względem substratów z kwasem asparaginowym lub glutaminowym [3]. Aktywność taką wykryto w suchych ziarniakach pszenżyta [80]. Karboksypeptydazy I i III syntetyzowane są *de novo* w czasie kiełkowania odpowiednio przez tarczkę zarodkową i warstwę aleuronową. Synteza karboksypeptydazy III w warstwie aleuronowej uwarunkowana jest działaniem giberelin [4,80,81], podobnie jak synteza endopeptydazy EP-A czy  $\alpha$ -amylazy. W trakcie oznaczania sekwencji regionu znajdującego się w pobliżu miejsca inicjacji transkrypcji genu kodującego karboksypeptydazę III u ryżu, stwierdzono obecność sekwencji przypominającej „element odpowiedzi na kwas giberelinowy” (ang. *gibberellic acid response element*), charakterystyczny dla genów, których ekspresja zachodzi pod wpływem tego hormonu u zbóż [81]. Opisany mechanizm regulacji ekspresji tego genu wydaje się być jednak ograniczony wyłącznie do komórek warstwy aleuronowej. Nie stwierdzono bowiem istnienia zależności syntezy karboksypeptydazy III od giberelin w liściach czy korzeniach zbóż. Proces ten może być regulowany przez inne czynniki, ale nie poznano jak dotąd specyficznych sygnałów wpływających na ekspresję genu karboksypeptydazy III w innych częściach tych roślin.

Karboksypeptydazy są syntetyzowane w postaci proenzymów, które w czasie proteolitycznych modyfikacji posttranslacyjnych zostają pozbawione odcinków C- i N-końcowych, a w przypadku karboksypeptydaz I i II również rejonu łącznika [82]. Dojrzewanie karboksypeptydaz I i III zachodzi najprawdopodobniej w miejscu ich syntezy, ponieważ w tarczce zarodkowej i warstwie aleuronowej karboksypeptydazy te występują w formie aktywnej. Główną funkcją karboksypeptydaz w mobilizacji białek zapasowych jest uwalnianie aminokwasów z peptydów będących wynikiem działania endopeptydaz [63]. Wykazano, że wstępna hydroliza prolamin przy udziale endopeptydazy cysteinowej powoduje znaczny wzrost szybkości uwalniania aminokwasów przez karboksypeptydazy, przy czym największe znaczenie w tym procesie przypada karboksypeptydazom I i III, podczas gdy karboksypeptydaza II może uczestniczyć we wstępnych etapach mobilizacji białek zapasowych [1,63]. Z drugiej strony, obecność karboksypeptydazy w mieszaninie inkubacyjnej powoduje wzrost aktywności endopeptydaz wobec prolamin [83], co świadczy o współdziałaniu tych grup enzymów w procesie hydrolizy białek zapasowych.

## PODSUMOWANIE

W kiełkujących ziarniakach zbóż występuje od kilku do nawet kilkudziesięciu aktywności endopeptydaz, w zależności od rodzaju zboża, ale również od zastosowanej me-

tody badawczej. Utrudnia to przypisanie poszczególnym enzymom jednoznacznych funkcji w mobilizacji białek zapasowych. Udało się to w przypadku endopeptydaz cysteino-EP-A i EP-B. Wykryto miejsca hydrolizy wiązań peptydowych przy udziale tych enzymów w jednej z frakcji prolamin jęczmienia, hordeiny C, co pozwala przypuszczać, że endopeptydazy EP-A i EP-B mają decydujące znaczenie w procesie mobilizacji prolamin. Specyficzność substratowa większości endopeptydaz występujących w kiełkujących ziarniakach nie jest jednak znana, chociaż wykazano, że wiele z tych enzymów posiada zdolność hydrolizy natywnych prolamin. Niskie pH bielma skrobiowego w czasie mobilizacji białek zapasowych oraz przewaga aktywności endopeptydaz cysteino-EP-A i EP-B w tej tkance sugeruje, że ta grupa endopeptydaz odpowiada za całkowitą degradację białek w bielmie, nie wyklucza to jednak uczestnictwa endopeptydaz innych grup katalitycznych w tym procesie. Drugą grupą enzymów występujących w bielmie w czasie kiełkowania są karboksypeptydazy serynowe. Biorąc udział w uwalnianiu aminokwasów z peptydów, które powstają wskutek działania endopeptydaz. Jak dotąd scharakteryzowano dokładnie karboksypeptydazy I, II i III, jednak nie wszystkie karboksypeptydazy zostały opisane w stopniu wystarczającym. Dotyczy to głównie karboksypeptydaz prolinowych, których aktywność jest w bielmie bardzo niska, ale ze względu na ich specyficzność substratową do substratów z proliną na przedostatniej pozycji może mieć decydujące znaczenie w uwalnianiu aminokwasów z prolamin, u których zawartość proliny szacuje się według różnych źródeł na kilkanaście procent. Szybkość hydrolizy białek zapasowych jest wypadkową wielu procesów, które mają miejsce w czasie kiełkowania ziarniaków zbóż. Jednym z nich jest szybkość i poziom odpowiedzi tkanek docelowych na sygnały hormonalne, co wpływa zarówno na zakwaszenie i zwiększenie potencjału oksydoredukcyjnego bielma skrobiowego, ale również na syntezę głównych peptydaz biorących udział w procesie hydrolizy białek zapasowych. Synteza hydrolaz uzależniona jest z kolei od szybkości hydrolizy białek zapasowych w warstwie aleuronowej i komórkach epitelialnych tarczki zarodkowej. Dodatkowo, na aktywność peptydaz wpływa obecność endogennych inhibitorów oraz szybkość ich degradacji. Dlatego pełne wyjaśnienie roli poszczególnych enzymów oraz poznania dokładnej sekwencji zdarzeń jakie zachodzą w czasie tego procesu będzie wymagało wielu dalszych badań.

## PIŚMIENNICTWO

1. Münz K, Belozersky MA, Dunaevsky YE, Schlereth A, Tiedemann J (2001) Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J Exp Bot* 52: 1741-1752
2. Jones BL (2005) Endoproteases of barley and malt. *J Cereal Sci* 42: 139-156
3. Simpson DJ (2001) Proteolytic degradation of cereal prolamins-the problem with proline. *Plant Sci* 161: 825-838
4. Domínguez F, Cejudo FJ (1999) Patterns of starch endosperm acidification and protease gene expression in wheat grains following germination. *Plant Physiol* 119: 81-87
5. Davy A, Sørensen MB, Svendsen I, Cameron-Mills V, Simpson DJ (2000) Prediction of protein cleavage sites by the barley cysteine endoproteases EP-A and EP-B based on the kinetics of synthetic peptide hydrolysis. *Plant Physiol* 122: 137-145

6. Kączkowski J (2000) New aspects of the cereal storage proteins synthesis and degradation including the role of thioredoxin, as well as its regulatory properties. *Acta Physiol Plant* 22: 483-494
7. Wong JH, Kim Y-B, Ren P-H, Cai N, Cho M-J, Hedden P, Lemaux G, Buchanan BB (2002) Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone. *Plant Biol* 99: 16325-16330
8. Brown RC, Lemmon BE, Olsen O-A (1994) Endosperm development in barley: microtubule involvement in the morphogenetic pathway. *Plant Cell* 6: 1241-1252
9. Young TE, Gallie DR (1999) Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals. *Plant Mol Biol* 39: 915-926
10. Fath A, Bethke P, Lonsdale J, Meza-Romero R, Jones R (2000) Programmed cell death in cereal aleurone. *Plant Mol Biol* 44: 255-266
11. Laudencia-Chingcuanco DL, Stamova, BS, You FM, Lazo GR, Beckles DM, Anderson OD (2007) Transcriptional profiling of wheat caryopsis using cDNA microarrays. *Plant Mol Biol* 63: 651-668
12. Subbarao KV, Datta R, Sharma R (1998) Amylases synthesis in scutellum and aleurone layer of maize seeds. *Phytochemistry* 49: 657-666
13. Waterworth WM, Ashley MK, West CE, Sunderland PA, Bray CM (2005) A role of phosphorylation in the regulation of the barley scutellar peptide transporter HvPTR1 by amino acids. *J Exp Bot* 56: 1545-1552
14. Bakos F, Szabo L, Olmedilla A, Barnabas B (2009) Histological comparison between wheat embryos developing *in vitro* from isolated zygotes and those developing *in vivo*. *Sex Plant Reprod* 22:15-25
15. Lovegrove A, Hooley R (2000) Gibberellin and abscisic acid signaling in aleurone. *Trends Plant Sci* 5: 102-110
16. Peng J, Harberd NP (2002) The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Curr Opin Plant Biol* 5: 376-381
17. Osborne TB (1907) The proteins of the wheat kernel. Publ. no. 84. Carnegie Institute: Washington, DC.
18. Shewry PR, Tatham AS (1997) Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *J Cereal Sci* 25: 207-227
19. Young VR, Pellett PL (1985) Wheat proteins in relation to protein requirements and availability of amino acids. *Am J Clin Nutr* 41: 1077-1090
20. Ericson ML, Rodin J, Lenman M, Glimelius K, Josefsson L-G, Rask L (1986) Structure of the rapeseed 1.7 S storage protein, napin, and its precursor. *J Biol Chem* 261: 14576-14581
21. Jung R, Scott MP, Nam Y-W, Beaman TW, Bassüner R, Saalbach I, Münz K, Nielsen N (1998) The role of proteolysis in the processing and assembly of 11S seed globulins. *Plant Cell* 10: 343-357
22. Gatehouse JA, Croy RRD, Boulter D (1984) The synthesis and structure of pea storage proteins. *CRC Crit Rev Plant Sci* 1: 287-314
23. Lew EJ-L, Kuzmicki DD, Kasarda DD (1992) Characterisation of low molecular weight subunits by reversed-phase high performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-terminal amino acid sequencing. *Cereal Chem* 69: 508-515
24. Shewry PR, Tatham AS (1990) The prolamin storage proteins of cereal seeds: Structure and evolution. *Biochem J* 267: 1-12
25. Tilley KA, Lookart GL, Hoseney RC, Mowhinney T (1993) Evidence for glycosylation of the high molecular weight subunits 2, 7, 8 and 12 from Chinese Spring and TAM 105 wheats. *Cereal Chem* 70: 602-606
26. Tilley KA, Schofield JD (1995) Detection of fosphotyrosine in the high Mr subunits of wheat glutenin. *J Cereal Sci* 22: 17-19
27. Gianibelli MC, Larroque OR, MacRitchie F, Wrigley CW (2001) Biochemical, genetic and molecular characterization of wheat endosperm proteins. *Cereal Chem* 78: 635-646
28. Kasarda DD, Autran J-C, Lew EJ-L, Nimmo CC, Shewry PR (1983) N-terminal amino acid sequences of  $\omega$ -gliadins and  $\omega$ -secalins: Implications for the evolution of prolamin genes. *Biochim Biophys Acta* 747: 138-150
29. Altschuler Y, Rosenberg N, Harel R, Galili G (1993) The N- and C-terminal regions regulate the transport of wheat  $\gamma$ -gliadin through the endoplasmic reticulum in *Xenopus* oocytes. *Plant Cell* 5: 443-450
30. Li X, Franceschi VR, Okita TW (1993) Segregation of storage protein mRNA on the rough endoplasmic reticulum membranes of rice endosperm cells. *Cell* 72: 869-879
31. Galili G, Altschuler Y, Levanony H, Giorini-Silfen S, Schimoni Y, Shani N (1995) Assembly and transport of wheat storage proteins. *J Plant Physiol* 145: 626-631
32. Kim WT, Franceschi VR, Krishnan HB, Okita TW (1988) Formation of wheat protein bodies: involvement of the Golgi apparatus in gliadin transport. *Planta* 173: 173-182
33. Levanony H, Rubin R, Altschuler Y, Galili G (1992) Evidence for a novel route of wheat storage proteins to vacuoles. *J Cell Biol* 119: 1117-1128
34. Okita TW, Rogers JC (1996) Compartmentation of proteins in the endomembrane system of plant cells. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 327-350
35. Shewry PR, Napier JA, Tatham AS (1995) Seed storage proteins: structure and biosynthesis. *Plant Cell* 7: 945-956
36. Shewry PR, Halford NG (2002) Cereal storage proteins: structure, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot* 53: 947-958
37. Yupsanis T, Burgess SR, Jackson PJ, Shewry PR (1990) Characterization of the major protein component from aleurone cells of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Exp Bot* 41: 385-392
38. Hartweck LM (2008) Gibberellin signaling. *Planta* 229: 1-13
39. Ritchie S, McCubbin A, Ambrose G, Kao T, Gilroy S (1999) The sensitivity of barley aleurone tissue to gibberellin is heterogeneous and may be spatially determined. *Plant Physiol* 120: 361-370
40. Sreenivasulu N, Usadel B, Winter A, Radchuk V, Scholz U, Stein N, Weschke W, Strickert M, Close TJ, Stitt M, Graner A, Wobus U (2008) Barley grain maturation and germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant Physiol* 146: 1738-1758
41. Tsui H, Aya K, Ueguchi-Tanaka M, Shimada Y, Nakazano M, Watanabe R, Nishizawa NK, Gomi K, Shimada A, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M (2006) GAMYB controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers. *Plant J* 47: 427-444
42. Potokina E, Sreenivasulu N, Altschmied L, Michalek W, Graner W (2002) Differential gene expression during seed germination in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Funct Integr Genomics* 2: 28-39
43. Bethke PC, Hwang Y, Zhu T, Jones RL (2006) Global patterns of gene expression in the aleurone of wild-type and *dwarf1* mutant rice. *Plant Physiol* 140: 484-498
44. Watson L, Henry RJ (2004) Microarray analysis of gene expression in germinating barley embryos (*Hordeum vulgare* L.). *Funct Integr Genomics* 5: 155-162
45. Dunaevsky YE, Belozersky MA, Voskoboynikova NE (1993) *In vitro* reconstruction of the proteolytic system responsible for hydrolysis of the 13S globulin in buckwheat seeds. *FEBS* 324: 216-218
46. Subedi CK, Bhattarai T (2003) Effect of gibberellic acid of reserve food mobilization of maize (*Zea mays* L. var Arun-2) endosperm during germination. *Him J Sci* 1: 99-102
47. Dell'Aquila A, Colaprico G, Taranto G, Carella G (1983) Endosperm protein changes in developing and germinating *T. aestivum*, *T. turgidum* and *T. monococcum* seeds. *Cereal Res Commun* 11: 107-113
48. Mikola M, Brinck O, Jones LB (2001) Characterization of oat endoproteases that hydrolyze oat avenins. *Cereal Chem* 78: 55-58
49. Capocchi A, Cinollo M, Gallechi L, Saviozzi F, Calucci L, Pinzino C, Zandomeneghi M (2000) Degradation of gluten by proteases from dry and germinating wheat (*Triticum durum*) seeds: An *in vitro* approach to storage protein mobilization. *J Agric Food Chem* 48: 6271-6279
50. Stacey G, Serry K, Granger C, Becker JM (2002) Peptide transport in plants. *Trends Plant Sci* 7: 257-263

51. Salmenkallio M, Sopanen T (1989) Amino acid and peptide uptake in the scutella of germinating grains of barley, wheat, rice and maize. *Plant Physiol* 89: 1285-1291
52. West CE, Waterworth WM, Stephens SM, Smith CP, Bray CM (1998) Cloning and functional characterization of a peptide transporter expressed in the scutellum of barley grain during the early stages of germination. *Plant J* 15: 221-229
53. Bethke PC, Lonsdale JE, Fath A, Jones RL (1999) Hormonally regulated programmed cell death in barley aleurone cells. *Plant Cell* 11: 1033-1045
54. Bottari A, Capocchi A, Fontanini D, Galleschi L (1996) Major proteinase hydrolysing gliadin during wheat germination. *Phytochem* 43: 39-44
55. Brijis K, Bleukx W, Delcour JA (1999) Proteolytic activities in dormant rye (*Secale cereale* L.) grain. *J Agric Food Chem* 47: 3572-3578
56. Bielawski W, Prabucka B (2001) Endopeptidases of triticale seeds. *Biol Plant* 44: 283-288
57. Belozersky MA, Dunaevsky YE, Voskoboynikova NE (1990) Isolation and properties of a metalloproteinase from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) seeds. *Biochem J* 272: 677-682
58. Mikola M, Jones BL (2000) Characterization of oat endoproteases that hydrolyze oat globulins. *Cereal Chem* 77: 572-577
59. Jivotovskaya AV, Hortsmann C, Vaintraub IA (1997) Detection of the isoenzymes of wheat grain proteinase A. *Phytochem* 45: 1549-1553
60. Okamoto T, Minamikawa T (1998) A vacuolar cysteine endopeptidase (SH-EP) that digest seed storage globulin: characterization, regulation of gene expression, and posttranslational processing. *J Plant Physiol* 152: 675-682
61. Koehler SM, Ho T-HD (1988) Purification and characterisation of gibberellic acid - induced cysteine endoproteases in barley aleurone layers. *Plant Physiol* 87: 95-103
62. Koehler SM, Ho T (1990) A major gibberellic acid-induced barley aleurone cysteine proteinase which digest hordein. Purification and characterization. *Plant Physiol* 94: 251-258
63. Drzymala A, Beata Prabucka B, Ilona Gajo I, Wieslaw Bielawski W (2008) Endogenous action of cysteine endopeptidase and three carboxypeptidases on triticale prolamins. *Cereal Chem.* 85: 366-371
64. Prabucka B, Bielawski W (2004) Purification and partial characteristic of a major gliadin-degrading cysteine endopeptidase from germinating triticale seeds. *Acta Physiol Plant* 26: 383-391
65. Kiyosaki T, Matsumoto I, Asakura T, Funaki J, Kuroda M, Misaka T, Arai S, Abe K (2007) Gliadain, a gibberellin-inducible cysteine proteinase occurring in germinating seeds of wheat, *Triticum aestivum* L., specifically digests gliadin and is regulated by intrinsic cystatins. *FEBS J* 274: 1908-1917
66. Mutlu A, Gal S (1999) Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiol Plant* 105:569-576
67. Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Romero-Puertas MC, McCarthy I, del Rio LA (2002) Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol Biochem* 40: 521-530
68. Zhang N, Jones BL (1999) Polymorphism of aspartic proteinases in resting and germinating barley seeds. *Cereal Chem* 76: 134-138
69. Okamoto T, Yuki A, Mitsuhashi N, Minamikawa T (1999) Asparaginyl endopeptidase (VmPE-1) and autocatalytic processing synergistically activate the vacuolar cysteine proteinase (SH-EP). *Eur J Biochem* 246: 223-232
70. Fontanini D, Jones BL (2002) SEP-1 - a subtilisin-like serine endopeptidase from germinated seeds of *Hordeum vulgare* L. cv. Morex. *Planta* 215: 885-893
71. Terp N, Thomsen KK, Svendsen I, Davy A, Simpson DJ (2000) Purification and characterization of hordolisin, a subtilisin-like serine endoprotease from barley. *J Plant Physiol* 156: 468-476
72. Schaller A (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220: 183-197
73. Mikola L (1983) Germinating barley grains contain five acid carboxypeptidases with complementary substrate specificities. *Biophys Acta* 747: 241-252
74. Mikola L (1986) Acid carboxypeptidases in grains and leaves of wheat, *Triticum aestivum* L. *Plant Physiol* 81: 823-829
75. Breddam K, Sørensen SB, Ottesen M (1983) Isolation of carboxypeptidase from malted barley by affinity chromatography. *Carlsberg Res Commun* 48: 217-230
76. Bullock TL, Branchaud B, Remington SJ (1994) Structure of the complex of L-benzylsuccinate with wheat serine carboxypeptidase II at 2.0-Å resolution. *Biochem* 33: 11127-11134
77. Drzymala A, Bielawski W (2009) Isolation and characterization of carboxypeptidase III from germinating triticale grains. *Acta Biochim Biophys Sin* 41: 69-78
78. Sørensen SB, Svendsen I, Breddam K (1989) Primary structure of carboxypeptidase III from malted barley. *Carlsberg Res Commun* 54: 193-202
79. Remington SJ, Breddam K (1994) Carboxypeptidases C and D. *Methods Enzymol* 244: 231-248
80. Drzymala A, Prabucka B, Bielawski W (2005) Carboxypeptidases of germinating triticale grains. *Acta Physiol Plant* 24: 539-547
81. Washio K (2001) Identification of Dof proteins with implication in the gibberellin-regulated expression of a peptidase gene following the germination of rice grains. *Biochim Biophys Acta* 1520: 54-62
82. Doan NP, Fincher GB (1988) The A- and B-chains of carboxypeptidase I from germinated barley originate from a single precursor polipeptide. *J Biol Chem* 263: 11106-11110
83. Dunayevsky YE, Belozersky MA (1989) The role of cysteine proteinase and carboxypeptidase in the breakdown of storage proteins in buckwheat seeds. *Planta* 179: 316-322

## Mobilization of storage proteins in cereal grains

Adam Drzymala<sup>✉</sup>, Beata Prabucka, Wiesław Bielawski

Department of Biochemistry, Warsaw University of Life Sciences – SGGW, Nowoursynowska 157, 02-776 Warsaw, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: adam\_drzymala@sggw.pl

**Key words:** cereal, cysteine endopeptidase, germination, prolamins, serine carboxypeptidase, storage proteins breakdown

### ABSTRACT

Mobilization of seed reserves is a gradual process leading to the total degradation of accumulated biopolymers. In cereals cysteine endopeptidases and serine carboxypeptidases play essential role in hydrolysis of storage proteins. Peptidases of other catalytic groups seem to take part in regulatory processes or various processes that are not directly connected with storage proteins breakdown in the endosperm of germinating grains. The rate of the hydrolysis depends on the presence of biologically active gibberellins in the grain tissues. The presence of gibberellins determines peptidases synthesis in the aleurone layer, and acidification of starchy endosperm where the process occurs. Although the researches are highly advanced the functions of many peptidases in the storage proteins degradation are still not identified.

Cytometry Przepływowe

BD LSRFortessa™

BD LSR II™



Helping all people  
live healthy lives

**Jedynie urządzenia pozwalające  
na 18-kolorową analizę cytometryczną**

**Jeżeli chcesz dowiedzieć się więcej, skontaktuj się z nami**

Becton Dickinson Polska Sp. z o.o., ul. Królowej Marysienki 90, 02-954 Warszawa

Tel.: 022 651 62 52 Faks: 022 651 75 89

Adres e-mail: [amelia\\_niewodzka@europe.bd.com](mailto:amelia_niewodzka@europe.bd.com)

<http://rcin.org.pl>



# Cytometria Przepływowa BD

BD Biosciences, San Jose, CA

Spis Treści

Analiza Komórkowa

Cytometria Przepływowa

Jak Działa Cytometria Przepływowa

Sortowanie

Pomiary Cech Komórek

Przeciwciała Monoklonalne

Fluorescencja jako Marker Komórek  
i Aktywności Komórkowej

Wielokolorowa Cytometria  
Przepływowa

Podsumowanie

## Analiza Komórek

Najnowsze postępy w biologii molekularnej i komórkowej – w badaniu komórek obejmującym ich funkcję, struktury jakie zawierają, oddziaływania z otoczeniem oraz cykl życia, podział i śmierć – pomogły naukowcom zyskać głębsze zrozumienie chorób człowieka. Coraz lepsze poznawanie różnych rodzajów populacji komórek, sposobów działania komórek i różnic pomiędzy rodzajami komórek ma fundamentalne znaczenie z punktu widzenia badania biologii komórkowej i chorób oraz stanowi podstawowe zastosowanie aparatów i odczynników opracowywanych przez BD Biosciences.

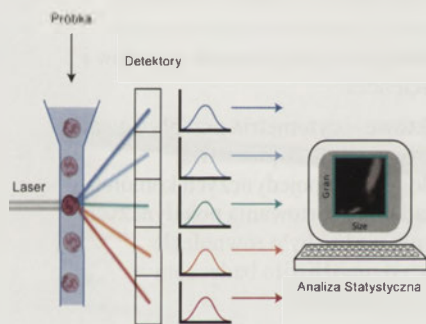
Technologia wzmacniająca nasze oferty produktowe – cytometria przepływowa – odgrywa kluczową rolę w pogłębianiu tego zrozumienia. Cytometria przepływowa – pierwsza technika stworzona do analizy pojedynczych komórek – stanowi zaawansowaną technologię liczenia, badania i sortowania pojedynczych komórek. Z punktu widzenia tego postępu równie ważne było równoległe odkrycie i rozwój przeciwciał monoklonalnych, co umożliwiło badaczom wykrywanie i oznaczanie specyficznych populacji komórek.

Połączenie tych dwóch technologii – skomercjalizowanych mniej więcej w tym samym czasie – wywołało gwałtowny rozwój rynku cytometrii przepływowej.



## Cytometria Przepływowa

Cytometria przepływowa oferuje badaczom i klinicyście trzy istotne możliwości. Po pierwsze, cytometria przepływowa analizuje populację komórek na zasadzie „komórka po komórce” (ang. *cell-by-cell*) – zdolność o decydującym znaczeniu z punktu widzenia dzisiejszych badaczy i klinicyście, którzy szukają bardzo niewielu komórek wśród wielu komórek w próbce (często jak igieł w stogu siana), co umożliwia im zdiagnozowanie, monitorowanie lub badanie choroby bądź procesu biologicznego. Po drugie, cytometria przepływowa jest nadzwyczaj szybka. Tempo rutynowej analizy próbek może sięgać 10 000 komórek na sekundę – jest to niewiarygodny postęp względem historycznych metod wzrokowego badania i zliczania komórek. W końcu, cytometria przepływowa posiada zdolność jednoczesnego mierzenia wielu parametrów (tzw. multipleksing) pojedynczych komórek. Multipleksing pozwala badaczom i klinicyście zebrać więcej informacji z jednej próbki szybciej, niż kiedykolwiek wcześniej. Możliwości te uczyniły z cytometrii przepływowej potężne narzędzie o wielu zastosowaniach, zarówno dla badaczy, jak i klinicyście.



Rycina 1. Zasada cytometrii przepływowej

## Jak działa cytometria przepływowa?

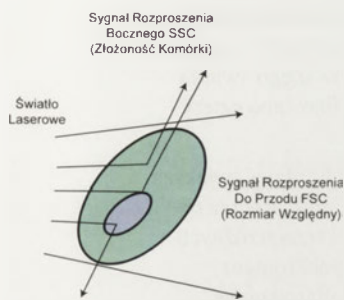
Cytometry przepływowe zawierają trzy główne układy – płynowy, optyczny i elektroniczny.

Układ płynowy przepuszcza próbkę komórek (na przykład próbkę krwi człowieka) przez komorę przepływową w taki sposób, że komórki przechodzą pojedynczo przez wiązkę laserową. Każda komórka przechodzi przez wiązkę, rozprasza światło i może emitować światło fluorescencyjne. Te sygnały świetlne są zbierane przez układ optyczny i kierowane do rozmaitych detektorów. Sygnały otrzymywane przez detektory są następnie przekształcane w wartości numeryczne przez układ elektroniczny. Wyniki mogą być wyświetlane na ekranie lub zapisane dla celów przyszłej analizy przy użyciu specjalnie zaprojektowanego oprogramowania.

Gdy każda komórka przechodzi przez wiązkę, jej parametry (cechy) są mierzone i zapisywane wraz z czasem przejścia przez wiązkę. Zwykle dane zbierane są co najmniej dla 10 000 komórek na próbkę. Podstawowe zasady działania cytometrów przepływowych są przedstawione na rycinie 1.

## Sortowanie

System BD FACSAria™ II może zarówno sortować, jak i analizować populacje komórek. Jest to cenne, gdy badacz musi zbadać konkretny rodzaj komórki. Najpierw parametry ustawiane są w taki sposób, aby cytometr przepływowy mógł identyfikować komórki interesujące badacza. Gdy tylko zidentyfikowana zostanie populacja komórek, które mają być poddane sortowaniu, strumień cieczy zawierający próbkę jest przekierowywany przy wysokim ciśnieniu przez układ płynowy w jeden strumień w taki sposób, że komórki przechodzą pojedynczo przez wiązkę laserową, gdzie wykrywane są informacje o komórkach. Jeśli komórka odpowiada określonym parametrom, cytometr generuje ładunek elektryczny. W efekcie naładowana komórka jest odchylana do probówki do zbierania. Badacz może wziąć interesujące go komórki i poddać je hodowli lub zbadać przy użyciu innych testów. Nienaładowane kropelki kierowane są wraz ze strumieniem do pojemnika na odpady. Proces ten przebiega szybko i może zostać zrealizowany w tempie 20 000 komórek na sekundę. System BD FACSAria™ II może sortować jednocześnie do czterech populacji.



Rycina 2. Rozproszenie światła

### Pomiary cech komórek

W momencie przechodzenia komórki przez wiązkę laserową, światło ulega rozproszeniu w różnych kierunkach, co ilustruje rycina 2. Ilość światła i kierunek, w jakim światło to jest rozpraszane pomagają badaczom określić zarówno rozmiar, jak i wewnętrzną złożoność komórki. Informacje te wyświetlane są w formie wizualnej na pewnego rodzaju wykresie, zwanym wykresem kropkowym, gdzie każda kropka reprezentuje pojedynczą komórkę. Na wykresie kropkowym, przedstawionym na rycinie 3, różne rodzaje komórek krwi – neutrofile, monocyty i limfocyty – można odróżnić poprzez sposób przedniego i boczno rozpraszania światła. Obecnie cytometria przepływową umożliwia badaczom jednoczesne badanie więcej niż jednej populacji komórek i uzyskanie informacji wykraczających znacznie poza jeden parametr.

### Przeciwciała monoklonalne

W momencie pojawienia się cytometrii przepływową przypadkowo wytyczono również sposoby wytwarzania przeciwciał monoklonalnych. Późniejsze połączenie przeciwciał monoklonalnych z cytometrią przepływową ujawniło rzeczywistą siłę technologii przepływową i pobudziło szybki postęp w zakresie zastosowań cytometrii przepływową.

Przeciwciała monoklonalne pozwalają badaczom wykrywać i oznaczać – „znakować” – określone populacje komórek. Technologia obejmuje tworzenie odczynnika przeciwciała, który będzie wiązać się do określonej struktury (antygeny), o której wiadomo, że jest obecna na danym rodzaju komórki interesującej badacza. Technologia ta stanowi klucz do opracowywania odczynników biologicznych, które można stosować nie tylko w celu identyfikowania komórek, ale również oznaczania zmian związanych z funkcją tej komórki.

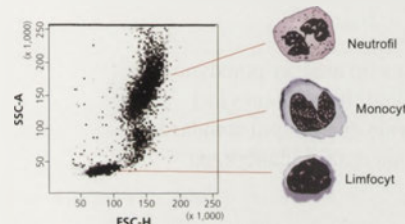
Wraz z możliwością przyglądania się wielu komórkom i parametrom, badacze potrzebowali sposobu identyfikowania i grupowania komórek. Aby osiągnąć ten cel, do bazowej technologii cytometrii przepływową włączono użycie fluorescencji i wielokolorowego barwienia. Efektem tego mariażu technologii jest zrewolucjonizowanie współczesnych badań biologicznych.

### Fluorescencja jako marker komórek i aktywności komórkowej

Przeciwciała monoklonalne są często łączone z barwnikiem fluorescencyjnym (fluorochromem), który po pobudzeniu przez laser będzie emitować światło fluorescencyjne. Fluorochrom umożliwia badaczowi śledzenie, które komórki wiążą się do przeciwciała lub znacznika.

Większość komórek naturalnie nie emituje światła fluorescencyjnego. Jednakże jeśli przeciwciało monoklonalne oznaczone fluorochromem wiąże się z antygenem prezentowanym na powierzchni komórki, w momencie przechodzenia tej komórki przez wiązkę laserową cytometru przepływowego odebrany zostanie sygnał światła fluorescencyjnego.

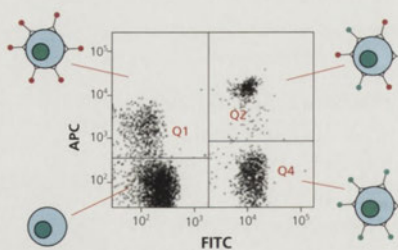
Fluorochromy różnią się między sobą pod względem koloru emitowanego światła. Na przykład FITC, jeden z fluorochromów oferowanych przez BD, po ekspozycji na działanie lasera stosowanego w naszych cytometrach przepływowych będzie emitować zielone światło, zaś PE, inny spośród oferowanych przez BD odczynników znakowanych fluorochromami, będzie emitować światło pomarańczowe. Te różnice pomiędzy fluorochromami są istotne, ponieważ pomagają badaczom odróżniać populacje komórek lub różne aktywności komórkowe.



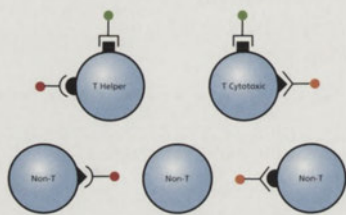
Rycina 3. Wykres kropkowy różnych rodzajów komórek krwi

Fluorochrom	Kolor Emisji Fluorescencyjnej
BD Horizon™ V450	Niebieski
Pacific Blue™	Niebieski
AmCyan	Zielony
Alexa Fluor® 488	Zielony
FITC	Zielony
PE	Żółty
PE-Texas Red®	Pomarańczowy
Texas Red®	Pomarańczowy
APC	Czerwony
Alexa Fluor® 647	Czerwony
PE-Cy™5	Czerwony
PerCP	Czerwony
PerCP-Cy™5.5	Daleka Czerwień
Alexa Fluor® 700	Daleka Czerwień
PE-Cy™7	Podczerwień
APC-Cy7	Podczerwień

Rycina 4. Popularne fluorochromy



Rycina 5. Wykres kropkowy fluorescencji



Rycina 6. Trójkolorowe barwienie limfocytów

### Wielokolorowa cytometria przepływowa

Komórki różnych rodzajów posiadają różne kombinacje antygenów i będą wiązać się z różnymi kombinacjami przeciwciał. Jeśli każde przeciwciało monoklonalne stosowane w badaniu próbki komórek jest związane z innym fluorochromem, to poszczególne rodzaje komórek można odróżnić od siebie na podstawie kombinacji kolorów emitowanych w momencie przechodzenia przez wiązkę laserową. Rycina 5 przedstawia wykres kropkowy komórek zabarwionych dwoma różnymi odczynnikami przeciwciał monoklonalnych, z których każdy związany jest z innym kolorem fluorochromu. Na podstawie ilości emitowanego światła każdego koloru (FITC - zielone lub APC - czerwone), zidentyfikowano cztery różne populacje.

Równoczesne zastosowanie kombinacji wielu kolorów jeszcze bardziej zwiększa zdolność rozróżniania różnych (heterogennych) populacji komórek. Rycina 6 ilustruje przykład, w którym w badaniu próbki komórek użyto trzech różnych przeciwciał monoklonalnych — każde znakowane innym fluorochromem — celem szukania limfocytów T. Widocznych było pięć różnych rodzajów komórek. Użycie wielu kolorów nie tylko umożliwiło zidentyfikowanie komórek T, ale również pozwoliło wykryć dwa różne rodzaje komórek T: limfocytów T pomocniczych i limfocytów T cytotoksycznych. Znajomość liczby i proporcji tych dwóch rodzajów limfocytów T jest bardzo ważne w badaniu niedoboru odporności i w opiece nad pacjentami z chorobami niedoboru odporności, np. HIV.

### Podsumowanie

Cytometria przepływowa, pierwsza technika stworzona do analizy pojedynczych komórek, łączy w sobie elastyczność i czułość technologii fluorescencyjnej z szybkością i możliwościami integracji danych. Stała się ona złotym standardem w analizie komórkowej i jest obecnie stosowana jako narzędzie analityczne w wielu sektorach nauk biologicznych.

W miarę rozwoju badań w dziedzinie biologii komórkowej cytometria przepływowa w coraz szerszym zakresie wspiera te badania. Aby sprostać temu wyzwaniu, zespół ds. Analizy Komórkowej w BD Biosciences kontynuuje wprowadzanie innowacji — rozwijając bardziej niż kiedykolwiek skomplikowane testy i aparaty, które są bardziej zaawansowane i łatwiejsze w użyciu.



**BD Biosciences**  
 ul. Królowej Marysieńki 90  
 02-954 Warszawa  
 tel.: + 48 22 651 62 52  
 faks: + 48 22 651 75 89  
[www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)

# Wybór Odczynników do Wielokolorowej Cytometrii Przepływowej

Holden Maecker i Joe Trotter  
BD Biosciences, San Jose

***Cytometry przepływowe wykrywające sześć, osiem i więcej kolorów pobudziły rozwój nowych fluorochromów i koniugatów przeciwciał wykorzystujących te możliwości. Jednakże wybór kombinacji fluorochromów optymalnej dla specyficzności konkretnego przeciwciała jest procesem złożonym. Niniejsza notatka dot. stosowania dostarcza pewnych prostych wytycznych, mających pomóc w wyborze zestawu odczynników do wielokolorowej cytometrii przepływowej, uniknięciu cykli prób i błędów oraz zwiększeniu szans na przeprowadzenie udanego eksperymentu.***

## Spis treści

Podstawy: Znać swój aparat

Fluorochromy: Zdecyduj się na jasne

Kolory i specyficzność: Zdefiniuj właściwe kombinacje

Barwniki tandemowe: Uwaga na degradację

Dobór kontroli do weryfikacji zestawu odczynników

Odczynniki do wielokolorowej cytometrii przepływowej

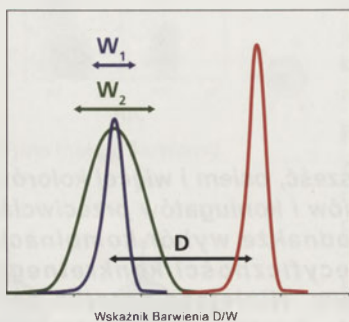
## Podstawy: Znać swój aparat

Dobór odczynników rozpoczyna się od konfiguracji aparatu. Rodzaj i liczba laserów oraz detektorów decyduje o tym, czy układ optyczny może wzbudzić dany fluorochrom i właściwie wykryć daną kombinację fluorochromów. Na skuteczność wykrywania poszczególnych barwników wpływa również projekt układu optycznego, podobnie jak ustawienia aparatu, w tym napięcia PMT. (Patrz nowa funkcja BD Cytometer Setup and Tracking [CS&T] oprogramowania BD FACSDiva™ 6.x na stronie [bdbiosciences.com/facsdiva](http://bdbiosciences.com/facsdiva)). I wreszcie, na faktyczną jasność jednego fluorochromu względem innego w dużym stopniu wpływa wybór filtrów optycznych, stosowanych z każdym detektorem. Wybór filtra to proces wzajemnych ustępstw: stosowanie szerszego filtra pasmowoprzepustowego może zwiększyć zdolność wykrywania danego fluorochromu, ale może również zwiększyć wielkość rozlanego tła, na jakie wpłynęły w tym detektorze sąsiadujące fluorochromy. Dobrym sposobem wizualizacji tych efektów jest wirtualne testowanie kombinacji filtrów przy użyciu narzędzia internetowego, takiego jak przeglądarka na stronie [bdbiosciences.com/spectra](http://bdbiosciences.com/spectra). Narzędzie to ilustruje przewidywane rozlanie (ang. *spillover*)\* w przypadku poszczególnych kombinacji fluorochromów i filtrów.

\* Przewidywany „wyciek” stanowi znormalizowany procent emitowanej fluorescencji, który może niekoniecznie odpowiadać procentowi stosowanemu do kompensacji z uwagi na skutki różnych współczynników wzmocnienia detektorów.



## Fluorochromy: Zdecyduj się na jasne...



**Rycina 1.** Rzeczywisty stopień jasności odczynnika zależy od różnicy pomiędzy populacją pozytywną i negatywną ( $D$ ) i rozproszenia populacji negatywnej ( $W$ ). Wskaźnik barwienia stanowi użyteczny miernik znormalizowanego sygnału ponad tło.

Biorąc pod uwagę wiele różnic w konfiguracji aparatów, niemożliwe jest uniwersalne określenie „najlepszych” fluorochromów do stosowania w kombinacjach 6, 8 lub większej liczby kolorów. Jednakże w przypadku konkretnego cytometru, jak aparat BD™ LSR II, możliwe jest uszeregowanie dostępnych barwników według stopnia ich jasności na tym aparacie (gdy jest konfigurowany za pomocą określonego zestawu laserów i filtrów). Ale jak właściwie definiujemy i mierzymy jasność? Dobra funkcjonalna definicja stopnia jasności odczynnika powinna zawierać określenie skutków wpływu tła lub tego, w jaki sposób sygnał rozkłada się nad niezabarwionymi populacjami komórek. Na tło w konkretnych detektorach wpływają poziomy sygnałów, autofluorescencja komórek, barwienie niespecyficzne, szum elektryczny i tło optyczne z innych fluorochromów (rozlanie). Zwiększają one szerokość (wariancję lub  $OS^2$ ) populacji negatywnej w takim stopniu, w jakim każdy z tych czynników wpływa na zakłócenia i/lub sygnał (patrz **Ryc. 1**). W tym sensie dobrym znormalizowanym miernikiem funkcjonalnym stopnia jasności odczynnika jest wskaźnik barwienia (ang. *stain index*)<sup>1</sup>, definiowany jako  $D/W$ , gdzie  $D$  jest różnicą pomiędzy populacją pozytywną a negatywną, a  $W$  jest równe  $2 \cdot OS$  populacji negatywnej.

Gdy to samo przeciwciało jest sprzężone z różnymi barwnikami, aby wyrobić sobie opinię na temat względnego stopnia jasności barwników na danym aparacie można porównać ich wskaźniki barwienia. Opiera się to na założeniu, że właściwości chemiczne koniugacji w przypadku wszystkich odczynników zostały zoptymalizowane. Wykorzystując to założenie, **Tabela 1** przedstawia wskaźnik barwienia dla kilku różnych koniugatów CD4 przy użyciu określonych filtrów na standardowym cytometrze przepływowym BD LSR II.

Informacje w tej tabeli dają wyobrażenie o względnym stopniu jasności różnych fluorochromów na tej platformie. Prowadzi to do określenia pierwszej zasady wyboru odczynników: należy wybierać najjaśniejsze fluorochromy spośród dostępnych. Załóżmy, że posiadasz czterokolorowy panel składający się z odczynników sprzężonych z FITC, PE, PerCP-Cy™5,5 oraz APC i chcesz dodać piąty kolor. Oczywistym wyborem jest PE-Cy™7, ponieważ jest to najjaśniejszy fluorochrom, którego nie ma jeszcze w twoim panelu.

Fluorochrom	Klon	Wskaźnik barwienia
<sup>1</sup> PE-Cy5	RPA-T4	353
PE	RPA-T4	302
<sup>2</sup> APC	RPA-T4	278
<sup>2</sup> Alexa Fluor® 647	RPA-T4	214
PE-Cy7	RPA-T4	139
<sup>1</sup> PerCP-Cy5.5	RPA-T4	107
<sup>3</sup> BD Horizon™ V450	RPA-T4	85
<sup>3</sup> Pacific Blue™	RPA-T4	80
<sup>4</sup> Alexa Fluor® 488	RPA-T4	73
Alexa Fluor® 700	RPA-T4	61
<sup>4</sup> FITC	RPA-T4	56
<sup>5</sup> APC-Cy7	RPA-T4	37
<sup>1</sup> PerCP	RPA-T4	37
AmCyan	RPA-T4	25
<sup>5</sup> APC-H7	RPA-T4	24

**Tabela 1.** Przeciętny wskaźnik barwienia różnych koniugatów fluorochromów obsługiwanych zarówno na cytometrze przepływowym BD LSR II, jak i BD FACSCanto II

<sup>1,2,3,4,5</sup> Fluorochromy wymienione z tą samą liczbą w indeksie górnym są rejestrowane w tym samym detektorze, toteż normalnie nie byłyby stosowane w skojarzeniu.

### ...ale minimalizuj wzajemne nakładanie się widm

Tylko sam stopień jasności idzie tak daleko. Indeksy barwienia wymienione w **Tabeli 1** są obliczane z odczynnikami uruchamianymi pojedynczo, a nie w ramach koktajlu. Gdy tylko dodane zostaną inne odczynniki, problemem staje się nakładanie widm. Im więcej kolorów próbuje się zastosować, z tym większym nakładaniem tych kolorów będzie trzeba sobie poradzić. Ze zjawiskiem tym radzimy sobie poprzez zastosowanie kompensacji, która wprowadza korektę wszystkich sygnałów w taki sposób, że na przykład populacja komórek emitujących jedynie fluorescencję PE nie wykaże żadnej fluorescencji FITC. Choć jest to w ogólności prawdziwe dla populacji, pojedyncze komórki będą wpadać powyżej lub poniżej średniej, i to poszerzenie danych jest większe, gdy nakładanie widm wprowadza dodatkowe zakłócenie.<sup>1</sup> Kompensacja nie usuwa niestety tego szumu, choć korygowana jest mediana, ponieważ pozostaje rozproszenie danych (wariancja) wynikające z rejestracji (statystyki) fotoelektronów. Skutkiem rozproszenia danych jest więc zmniejszenie czułości rozdzielczości, i stąd też indeksu barwienia w detektorze fluorescencji, na który wpływają sygnały z innych detektorów. Tak więc druga zasada wyboru odczynników brzmi: wybierając kombinację odczynników należy minimalizować potencjalne nakładania widm. Może to kolidować z zasadą pierwszą, czyli wybieraniem najjaśniejszych fluorochromów. Na przykład, PE-Cy5 jest bardzo jasny jeśli chodzi o indeks barwienia (**Tabela 1**), ale charakteryzuje się znaczącym udziałem (tj. dodaje tła) do detektora APC. Choć te dwa fluorochromy można stosować łącznie, czułość rozdzielczości w przypadku APC zostanie zredukowana na przykład w porównaniu z kombinacją PerCP-Cy5.5 i APC. Dzieje się tak w sytuacji, gdy zechcesz poświęcić pewien poziom jasności w jednym detektorze w celu uniknięcia rozmycia (i utraty czułości rozdzielczości) w innym.

### Kolory i specyficzność: Zdefiniuj właściwe kombinacje

Biorąc pod uwagę te dwie zasady, wygenerowaliśmy zestaw fluorochromów, które stanowią uzasadnione opcje wyboru do stosowania w eksperymentach wymagających 6, 8 lub większej liczby kolorów (**Tabela 2**). Należy zwrócić uwagę, że te opcje wyboru opierają się na aparatach BD (BD LSR II, sorterze komórek BD FACSAria™ II lub cytometrze przepływowym BD FACSCanto™ II) i na odczynnikach, które zwykle można nabyć z katalogu jako koniugaty przeciwciał.

Po zdefiniowaniu fluorochromów, które mają być zastosowane, można zacząć dopasowywanie specyficzności przeciwciał do poszczególnych fluorochromów, aby wybrać faktyczne koniugaty, które mają zostać zastosowane. W tym celu kwestiami kluczowymi pozostają stopień jasności i nakładanie, co ilustruje następujący przykład.

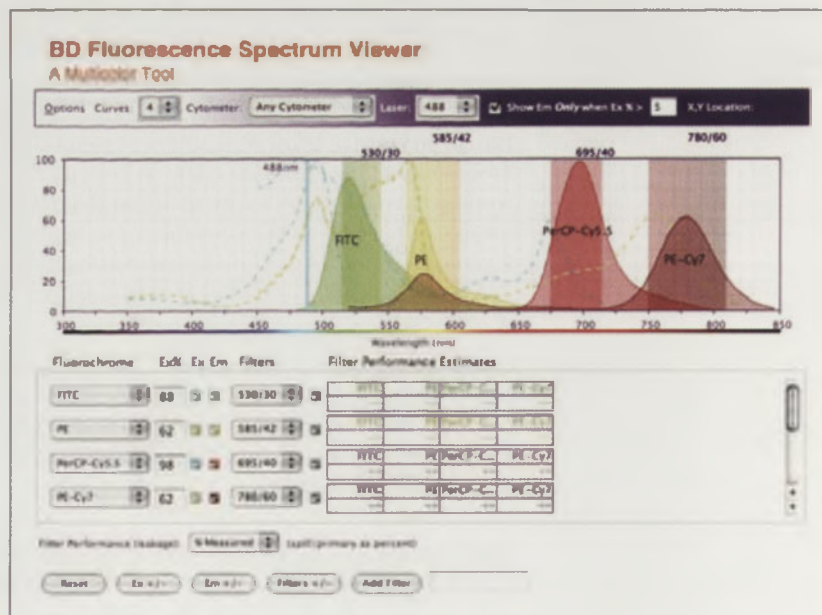
6-kolorowy	8-kolorowy	10-kolorowy
FITC or Alexa Fluor® 488	FITC or Alexa Fluor® 488	FITC or Alexa Fluor® 488
PE	PE	PE
		PE-Texas Red® or PE-Alexa Fluor® 610
PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5
PE-Cy7	PE-Cy7	PE-Cy7
APC or Alexa Fluor® 647	APC or Alexa Fluor® 647	APC or Alexa Fluor® 647
		Alexa Fluor® 680 or 700
APC-Cy7 or APC-H7	APC-Cy7 or APC-H7	APC-Cy7 or APC-H7
	AmCyan	AmCyan
	BD Horizon V450	BD Horizon V450

Tabela 2. Popularne opcje wyboru dla 6-, 8- i 10-kolorowych eksperymentów

Załóżmy, że chcesz przyjrzeć się barwieniu CD62L na komórkach T CD8+. Podczas, gdy białko CD8 obecne jest w dużej ilości i przeciwciała przeciw niemu barwią komórki bardzo jasno, CD62L jest względnie „ciemne” (białko nie występuje zbyt licznie na powierzchni komórki, i/lub dostępne przeciwciała wykazują małe powinowactwo). Początkowo należy rozważyć zastosowanie najjaśniejszego fluorochromu spośród dostępnych, PE, w przypadku CD62L, stosując jednocześnie ciemniejszy fluorochrom, jak FITC w przypadku CD8. FITC daje jednak znaczący udział do detektora PE (patrz Ryc. 2). W efekcie, w przypadku komórek CD8+, które są mocno zabarwione w detektorze FITC, wpływ na czułość rozdzielczości w przypadku PE jest negatywny w tym sensie, że rozdzielczość CD62L może być poniżej optymalnej. Istnieje wiele potencjalnych rozwiązań tego problemu, na przykład:

- 1) Przesunięcie CD8 do fluorochromu, który wykazuje mniejsze nakładanie widma z PE (jak PerCP-Cy5.5 lub APC).
- 2) Przesunięcie CD62L do detektora, który jest nadal relatywnie jasny, ale nie nakłada się z FITC (jak APC lub PE-Cy5). Należy zwrócić uwagę, że w tym przykładzie w detektorze FITC mocno zabarwione są tylko komórki CD8+, więc tylko komórki CD8+ przyczyniają się do rozproszenia danych w detektorze PE. Jeśli interesuje cię barwienie CD62L tylko na komórkach CD4+ (CD8-), pierwotna kombinacja odczynników (CD8 FITC, CD62L PE) będzie odpowiednia.

Przykład ten ilustruje dwie dodatkowe zasady wyboru odczynników: należy zachować najjaśniejsze fluorochromy dla ciemnych przeciwciał i odwrotnie, ale uniknąć wpływu sygnału z populacji jasnych komórek do detektorów wymagających wysokiej czułości w przypadku tych populacji.



Rycina 2. Zachodzenie spektralne FITC na detektor PE. Pobrałe ze strony [bdbiosciences.com/spectra](http://bdbiosciences.com/spectra)

### Barwniki tandemowe: Uwaga na degradację

Ostatnim tematem, jaki należy rozważyć, jest możliwość degradacji barwników tandemowych. W obecności światła, utrwalacza i podwyższonych temperatur, APC-Cy7 i w mniejszym stopniu PE-Cy7 mogą ulegać degradacji, a więc mogą one świecić w detektorze macierzystego barwnika (APC lub PE). Proces ten rozpoczyna się często od małej subpopulacji komórek, prowadząc do zdarzeń fałszywie pozytywnych w APC lub PE.<sup>1</sup>



Problemu tego można w dużym stopniu uniknąć minimalizując ekspozycję próbek na światło, ciepło i utrwalacze na bazie formaldehydu. Dodatkowo, BD Biosciences stworzyło APC-H7, analog APC-Cy7 o zwiększonej trwałości przy ekspozycji na światło, ciepło i utrwalacze na bazie formaldehydu. Mimo to w przypadku pewnych zastosowań, istnieje dodatkowa zasada: należy wziąć pod uwagę konsekwencje degradacji barwników tandemowych oraz to, czy wpłynie to negatywnie na odczyty w detektorach APC lub PE. Jeśli tak, można zastosować różne inne konfiguracje odczynników. W sytuacjach, w których konieczne jest ostateczne utrwalenie próbek (np. próbki niosące zagrożenie biologiczne), dostępny jest stabilizujący utrwalacz, który pomaga zapobiegać degradacji APC-Cy7, utrwalający jednocześnie komórki (BD Biosciences Nr Kat. 338036). Jeśli chodzi o bardziej trwałe barwniki tandemowe, BD oferuje obecnie skoniugowane przeciwciała APC-H7.

### **Dobór kontroli do weryfikacji zestawu odczynników**

Po uwzględnieniu tych wszystkich czynników jesteś gotów, aby przetestować wielokolorowy koktajl odczynników. Aby to zrobić, istnieją dwa rodzaje kontroli, które możesz zdecydować włączyć do wstępnego testowania: kontrole dokładności i kontrole fluorescencji minus jeden (fluorescence-minus-one - FMO).<sup>2</sup> Kontrole dokładności wykorzystują dane przeciwciała samo (lub z minimum dodatkowych odczynników bramkujących) i porównują wyniki w przypadku wykorzystania tego przeciwciała w kompletnym koktajlu. Na podstawie tego można zaobserwować wpływ dodatkowych odczynników na interesujący nas odczyt, aby uzyskać pewność, że inne odczynniki nie wpływają negatywnie na ten odczyt. Kontrole FMO łączą wszystkie odczynniki w danym koktajlu, z wyjątkiem jednego interesującego nas odczynnika. Są one przydatne do mierzenia czułości poszczególnych detektorów w kontekście innych odczynników. Można je również wykorzystywać do rutynowego bramkowania tych detektorów, w przypadku których zastosowanie innych sposobów ustawiania bramek nie jest możliwe lub praktyczne. Ogólnie rzecz biorąc, w właściwym zweryfikowaniu zestawu odczynników nie ma konieczności codziennego przeprowadzania wszystkich tych kontroli.

Podsumowując, w niniejszym artykule określono zasady wyboru odczynników do wielokolorowej cytometrii przepływowej. W celu uzyskania możliwie najlepszych wyników należy zrównoważyć te zasady:

---

**Zasada 1:** Należy wybrać najjaśniejszy zestaw fluorochromów dla konkretnej konfiguracji aparatu.

---

**Zasada 2:** Należy wybierać fluorochromy w taki sposób, aby zminimalizować potencjalne nakładanie widm.

---

**Zasada 3:** Należy zachowywać najjaśniejsze fluorochromy dla słabych przeciwciał i odwrotnie.

---

**Zasada 4:** Należy unikać wpływu sygnału z populacji jasnych komórek do detektorów wymagających wysokiej czułości w przypadku tych populacji.

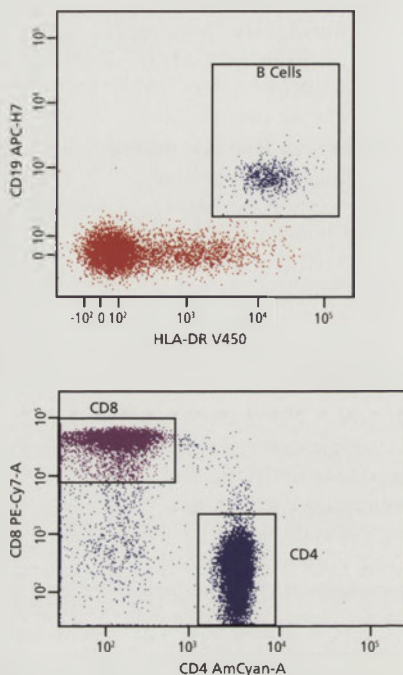
---

**Zasada 5:** Należy podjąć kroki, aby uniknąć degradacji barwników tandemowych i uwzględnić ich wpływ na wyniki.

---

Z czasem dostępne staną się sprawdzone panele odczynników wielokolorowych, zarówno w oparciu o źródła w literaturze, jak i od producentów. Projektując panele odczynników, wielu użytkowników nie będzie musiało zaczynać od zera. Niemniej jednak, biorąc pod uwagę ogromną różnorodność zastosowań wielokolorowej cytometrii przepływowej, większość badaczy znajdzie się czasem w sytuacji, w której będą musieli samodzielnie wybrać wielokolorowe odczynniki. Mamy nadzieję, że te zasady okażą się pomocne.

W celu uzyskania szerszych informacji na temat odczynników do wielokolorowej cytometrii przepływowej, prosimy odwiedzić stronę [bdbiosciences.com/colors](http://bdbiosciences.com/colors).



**Rycina 3.** Przykład wykorzystania odczynników bramkujących (CD4, CD8, CD19) przy użyciu niekonwencjonalnych koniugatów z fluorochromami wzbudzonymi przez laser niebieski, czerwony i fioletowy.

### Odczynniki do wielokolorowej cytometrii przepływowej

Rozszerz swoją cytometrię wielokolorową o opcje wykraczające poza pięć typowych kolorów.

- BD Biosciences nadal rozszerza ofertę wielokolorowych odczynników, aby pomóc w wytyczających nowe drogi badaniach przy wykorzystaniu rozszerzonych możliwości detekcji fluorescencji w naszych cytometrach przepływowych.
- Oferujemy przeciwciała sprzężone bezpośrednio z fluorochromami, które wykraczają poza naszych pięć typowych kolorów, dostarczając kolorów do laserów fioletowych, czerwonych i niebieskich. Obejmują one koniugaty AmCyan, BD Horizon V450, Alexa Fluor® 700 i PE-Cy7, mające wspomóc barwienie 9-kolorowe gotowymi odczynnikami.
- Program BD Biosciences Custom Conjugation\* oferuje więcej opcji wyboru do projektowania wielokolorowych eksperymentów. Program oferuje wiele kolorów, co przedstawiono w **Tabeli 3**.

\* W celu uzyskania szerszych informacji na temat programu Custom Conjugation Program, prosimy skontaktować się z przedstawicielem BD ds. sprzedaży

Fluorochrom	Ex Max (nm)
Alexa Fluor® 488	495
Alexa Fluor® 594	590
Alexa Fluor® 647	650
Alexa Fluor® 680	679
Alexa Fluor® 700	696
AmCyan	457
APC	650
APC-Cy7	650
BD APC-H7	650
BD Horizon V450	404
FITC	494
Pacific Blue™	401
PE-Cy5	496, 564
PE-Cy7	496, 564
PerCP	482
PerCP-Cy5.5	482
PE-Texas Red®	496, 564
Texas Red®	595

**Tabela 3.** Koniugaty dostępne w BD Biosciences w programie Custom

### Piśmiennictwo

1. Maecker HT, Frey T, Nomura LE, Trotter J (2004) Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytometry A* 62:169-173

2. Baumgarth N, Roederer M (2000) A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* 243:77-97

Tabela 4. Specyfikacje fluorochromów BD Biosciences

Fluorochrom	Kolor Emisji Fluorescencji	Ex-Max (nm)	Linia Lasera Wzbudzającego (nm)	Em-Max (nm)	BD FACScan™	BD FACSCalibur™	BD FACSCanto™	BD FACSCanto™ II	BD FACSVantage™ SE	BD™ LSR	BD™ LSR II	BD FACSAria™ family	BD FACSAria™	BD influx™
BD Horizon V450	Niebieski	404	405, 407	448				•	•		•	•		•
Pacific Blue™	Niebieski	401	405, 407	452				•	•		•	•		•
AmCyan	Zielony	457	405, 407	491				•	•		•	•		•
Alexa Fluor® 488	Zielony	495	488	519	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
FITC	Zielony	494	488	519	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
PE	Żółty	496, 564	488, 532	578	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
PE-Texas Red®	Pomarańczowy	496, 564	488, 532	615	•					•	•	•	•	•
Texas Red®†	Pomarańczowy	595	595	615					•					
APC*	Czerwony	650	595, 633, 635, 647	660		•	•	•	•	•	•	•	•	•
Alexa Fluor® 647	Czerwony	650	595, 633, 635, 647	668		•	•	•	•	•	•	•	•	•
PE-Cy5*	Czerwony	496, 564	488, 532	667	•	•			•	•	•	•	•	•
PerCP	Czerwony	482	488, 532	678	•	•	•	•		•	•	•	•	•
PerCP-Cy5.5	Daleka Czerwień	482	488, 532	695	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Alexa Fluor® 700	Daleka Czerwień	696	633, 635	719					•	•	•	•		•
PE-Cy7	Podczerwień	496, 564	488, 532	785	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
APC-Cy7	Podczerwień	650	595, 633, 635, 647	785			•	•	•	•	•	•	•	•
BD APC-H7	Podczerwień	650	595, 633, 635, 647	785			•	•	•	•	•	•	•	•

\* APC i PE-Cy5 mogą być stosowane łącznie na aparatach z kompensacją międzylaserową.  
 † Detekcja Texas Red® wymaga lasera barwnikowego w przypadku wzbudzenia 595-600 nm.



**BD Biosciences**  
 ul. Królowej Marysieńki 90  
 02-954 Warszawa  
 tel.: + 48 22 651 62 52  
 faks: + 48 22 651 75 89  
[www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)



## Abcam: przodujący dostawca produktów-odczynników stosowanych w naukach przyrodniczych

Przodujący interaktywny dostawca oferujący przeciwciała pierwszorzędowe i drugorzędowe naukowcom na całym świecie. Zróżnicowany katalog Abcamu zawiera więcej niż 55000 produktów aby wspierać państwa w badaniach.

### Katalog Abcamu – wysokiej jakości produkty dla państwa laboratorium

- 43000 przeciwciał pierwszorzędowych oraz prawie 900 przeciwciał drugorzędowych
- 630 zestawów do: ELISA, ELIPAIR, ELISPOT, zestawy do przeprowadzania badań nad apoptozą, zestawy do badań immunohistochemicznych oraz ChIPu.
- 7200 białek i peptyd
- 2300 lizat i 260 preparatów tkankowych

### Wspieramy państwa badania

Najłatwiejsze do zrozumienia karty charakterystyki zawierające recenzje klientów, referencje oraz zapytania techniczne. Jeżeli państwa przeciwciała nie działają w taki sam sposób jak opisane jest to na karcie charakterystyki proszę zawiadomić nas w ciągu 4 miesięcy od daty dostawy to zaoferujemy państwu wymianę produktu lub zwrot pieniędzy.

### Poczuj różnicę z Abcamem

- Niezrównany asortyment białek docelowych w państwa zakresie badań
- Bezpośredni kontakt z biurem obsługi klienta oraz wsparcie techniczne w języku angielskim
- Szybka dostawa dostępnych produktów do Polski w ciągu 48-miu godzin
- Materiały gotowe do pobrania: ponad 60 protokołów oraz wskazówki w jaki sposób należy rozwiązać kwestie techniczne

Zbiór protokołów: [www.abcam.com/protocols](http://www.abcam.com/protocols)

Zbiór plakatów: [www.abcam.com/posters](http://www.abcam.com/posters)

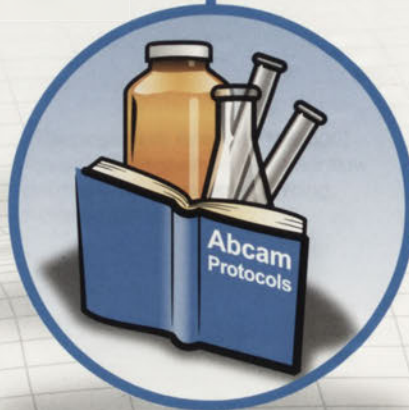
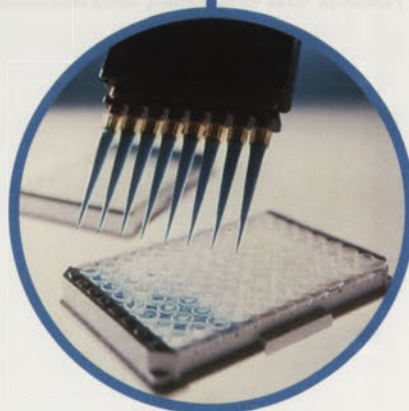
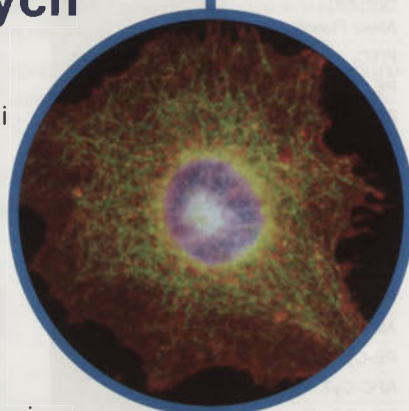
### Można skontaktować się z nami lub złożyć zamówienie w następujący sposób:

Proszę zalogować się on-line [www.abcam.com](http://www.abcam.com)

Wysłać maila: [orders@abcam.com](mailto:orders@abcam.com)

Wysłać fax: 0044 1223 771600

Telefonicznie: 0044 1223 696000



# Agaroza Prona

Produkty firmy Prona to efekt długoletnich badań instytutu – **PRONA Marine Research Institute** założonego w 1946 roku – nad polisacharydami wyizolowanymi z glonów występujących u wybrzeża Hiszpanii. Wysoka jakość i bogata oferta zadowoli nawet najbardziej wymagającego klienta.



## Zalety agarozy Prona:

- Wyjątkowa wytrzymałość.
- Klarowność przygotowywanych żeli.
- Wysoki stopień oczyszczenia.
- Większa stabilność termiczna żeli osiągnięta dzięki wysokiej histerezie (różnicy pomiędzy temperaturą topnienia i stężenia agarozy).
- Niska absorpcja odczynników barwiących.
- Nietoksyczność – przewaga użycia agarozy nad neurotoksycznym akrylamidem.

## Zastosowania agarozy Prona:

- Elektroforeza konwencjonalna, jak i immunoelektroforeza oraz ogniskowanie izoelektryczne.
- Immunodyfuzja.
- Chromatografia żelowa – powinowactwa i jonowymienna.
- Hodowle tkankowe roślinne i zwierzęce.
- Tworzenie kryształów do badań krystalograficznych.

AGAROZA	Zakres rozdziału	Temperatura topnienia °C	Temperatura tężenia °C
<b>BASICA LE, LE GQT, ME, HE, SHE, QS</b>	≥ 1000 bp	88 ± 1,5	36 ± 1,5
<b>TECNICA</b>	≥ 1000 bp	88 ± 1,5	36 ± 1,5
<b>FORENSICA</b>	≥ 1000 bp	88 ± 1,5	36 ± 1,5
<b>PLUS</b>	≥ 1000 bp	88 ± 1,5	36 ± 1,5
<b>PROTEA LE.</b>	≥ 1000 bp	87 ± 1,5	42 ± 1,5
<b>PROTEA LE., L.V.</b>	≥ 1000 bp	87 ± 1,5	41 ± 1,5
<b>REDUCTA LM.</b>	≥ 1000 bp	≤ 65,5	24–28
<b>REDUCTA S.LM.</b>	≥ 1000 bp	≤ 62	≤ 20
<b>REDUCTA E.LM.</b>	≥ 1000 bp	≤ 60	≤ 13
<b>REDUCTA GQT</b>	≥ 1000 bp	≤ 65,5	24–28
<b>REDUCTA NU</b>	≤ 1000 bp	≤ 65	≤ 35
<b>MICROPOR DELTA</b>	≤ 500 bp	≤ 76	≤ 31
<b>MICROPOR NU</b>	15–1200 bp	≤ 80	≤ 35,5
<b>MICROPOR GAMMA</b>	≤ 1500 bp	≤ 93	≤ 40,5
<b>MICROPOR OMEGA</b>	10–1200 bp	≤ 75	≤ 35
<b>RESOLVA GQT</b>	50–1000 bp	≤ 65	≤ 35



abo Grażyna Tarnowska Boreysza  
ul. Podleśna 6a, 80-255 Gdańsk  
Biuro: ul. Wichrowe Wzgórze 123, 80-293 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>

**PRONA**  
**AGAROSE**

Szukasz lepszego sposobu  
na zabezpieczenie preparatów  
wybarwionych fluorescencyjnie?

Tak! Wybierz odczynnik  
**FluorSave™**, który zapewni  
najlepsze wyniki.

That's what's in it for you.

Merck Chemicals

### Cechy:

- Wodne medium do zamykania preparatów mikroskopowych.
- Zabezpiecza skrawki tkanek lub komórki wybarwione fluorescencyjnie.
- Preparaty przechowywane w 4°C w ciemności są zabezpieczone przed wygaszaniem sygnału fluorescencji przez kilka miesięcy.
- Używany z następującymi znacznikami fluorescencyjnymi: fluoresceina, rodamina lub fikobiloproteiny.
- Nie zawiera glicerolu.
- Łatwy w użyciu.

[www.merck-chemicals.pl](http://www.merck-chemicals.pl)

