

# POSTĘPY BIOCHEMII

2012  
POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
WARSZAWA 2011  
TOM 57  
NUMER 3

Polimorfizm a zmienność fenotypowa  
Krypty komórkowe  
Białka opiekuńcze a choroby neurodegeneracyjne  
Transportery ABC *S. cerevisiae*



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

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

**Rozmiar: Nano. Możliwości: Mega.**



Poznaj zupełnie nowe wymiary real-time PCR:  
[www.lightcycler-nano.com](http://www.lightcycler-nano.com)

**LightCycler®**

Produkt przeznaczony tylko do badań naukowych.  
Nie stosować w procedurach diagnostycznych.

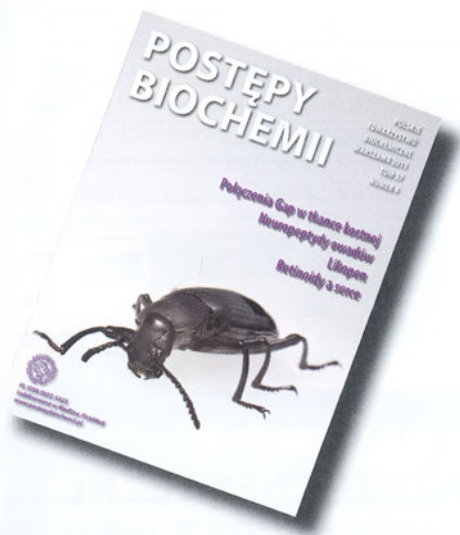
LIGHTCYCLER jest znakiem handlowym Roche.

<http://rcin.org.pl>

Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.  
ul. Wybrzeże Gdyńskie 6B  
01-531 Warszawa  
[www.roche.pl](http://www.roche.pl)



© 2011 Roche Diagnostics  
Wszystkie prawa zastrzeżone.



## W NASTĘPNYM NUMERZE:

**Rola połączeń typu Gap w komórkach tkanki kostnej**

Edyta Wróbel, Joanna Leszczyńska, Jacek Przybylski

**Retinoidy: ich metabolity, działanie i rola w rozwoju serca**

Emilia Stachurska, Anna Ratajska

**Charakterystyka molekularna i fizjologiczna neuropeptydów owadów z rodziny pirokinin**

Paweł Marciniak, Joanna Pacholska-Bogalska, Monika Szymczak, Grzegorz Rosiński

**Likopen: występowanie, właściwości oraz potencjalne zastosowanie**

Agnieszka Belter, Małgorzata Giel-Pietraszuk

## Fotografia na okładce:

Komórki linii CCD-1070SK z wybarwionymi: białkiem APPL2 (przeciwciała pierwszorzędowe skierowane przeciw APPL2 i przeciwciała drugorzędowe sprzężone z barwnikiem Alexa Fluor 647 – kolor zielony), F-aktyną (falloidyna sprzężona z barwnikiem Alexa Fluor 568 – kolor czerwony) i jądrem (DAPI – kolor niebieski). Skala 20 um. Zdjęcie wykonała dr Anna Urbańska z Laboratorium Biologii Komórki Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie (wykorzystano za zgodą Autorki).

## Wiadomości krajowe

pod red. Teresy Wesołowskiej

231

## ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

**Wpływ polimorfizmu liczby kopii na zmienność fenotypową człowieka**

Małgorzata Marcinkowska, Piotr Kozłowski

240

**Rola piRNA oraz białek Piwi w regulacji rozwoju komórek płciowych**

Dorota Kowalczykiewicz, Jan Wrzesiński

249

**Zaburzenia różnicowego składania pierwotnego transkryptu w kancerogenezie**

Hanna Wiszomirska, Agnieszka Piekiełko-Witkowska, Alicja Nauman

257

**Budowa krypt komórkowych i ich rola w funkcjonowaniu komórki oraz w oporności wielolekowej nowotworów**

Witold Szaflarski, Michał Nowicki, Maciej Zabel

266

**System kontroli jakości białek w cytoplazmie – rola białek opiekuńczych w biologii chorób neurodegeneracyjnych**

Izabela Guenther, Sabina Kędzierska-Mieszkowska

274

**Patogeneza molekularna choroby Charcot-Marie-Tooth 2**

Katarzyna Kotruchow, Dagmara Kabzińska, Kamila Karpińska, Andrzej Kocharński

283

**Rola enzymów metabolizujących ektonukleotydy w sygnalizacji z udziałem puryn**

Dorota Porowińska, Joanna Czarnańska, Michał Komoszyński

294

**Kompleks dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej i wielopłaszczyznowa regulacja aktywności kompleksu**

Adam Tylicki, Victoria I. Bunik Sławomir Strumiło

304

**Mechanizmy regulacji biosyntezy kwasów żółciowych – autoregulacyjna rola kwasów żółciowych**

Areta Hebanowska

314

**ABC transportery *Saccharomyces cerevisiae***

Donata Wawrzycka

324

Events/Opinions/Comments	231
<b>REVIEWS</b>	
The influence of copy number polymorphism on the human phenotype	240
The role of piRNA and Piwi proteins in regulation of germline development	249
Disturbances of alternative splicing in cancer	257
The structure of cellular vaults, their role in the normal cell and in the multidrug resistance of cancer	266
Cytosolic protein quality control system – the role of molecular chaperones in the biology of neurodegenerative diseases	274
Molecular pathogenesis of hereditary motor and sensory neuropathy	283
The role of ectonucleotides metabolizing enzymes in purinergic signaling	294
2-oxoglutarate dehydrogenase complex and its multipoint control	304
Mechanisms of bile acid biosynthesis regulation – autoregulation by bile acids	314
The ABC transporters of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	324

## POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE Składki członkowskie w 2012 roku

Szanowni Państwo!

1. Przypominamy, że 31 marca mija termin opłacania składki członkowskiej za 2012 r. Wysokość składki wynosi 100 zł (50 zł w przypadku składek ulgowych). Bardzo prosimy o terminowe opłacenie składek. Członkowie, którzy są na emeryturze zwolnieni są z płacenia składek, nie otrzymują kwartalnika "Postępy Biochemii", ale mogą go zaprenumerować po ulgowej cenie 50 zł rocznie.
2. Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską do 31 marca 2012 r. mają zapewnioną bezpłatną prenumeratę kwartalnika "Postępy Biochemii". Członkowie, którzy opłacą składkę po 31 marca powinni liczyć się z faktem, że mogą nie otrzymać wszystkich zeszytów rocznika 2012 r. (będą otrzymywać kwartalnik do czasu wyczerpania nakładu).
3. Przypominamy także osobom, które zalegają ze składkami od roku 2010, że opłata zaległych składek do 31 marca 2012 r., uchroni przed wszczęciem procedury skreślenia tych osób z listy członków Towarzystwa. Apelujemy o uregulowanie zaległych składek za 2011 rok.

Jeszcze raz serdecznie zachęcamy do skorzystania z przywilejów, jakie daje opłata składki członkowskiej w terminie.

Prenumerata "Postępów Biochemii" w 2012 roku

1. Prenumeratory instytucjonalni płacą za prenumeratę "Postępów Biochemii" 180 zł rocznie.
2. Osoby fizyczne nie będące członkami Towarzystwa mogą zaprenumerować "Postępy Biochemii" w cenie 120 zł rocznie.
3. Studenci i doktoranci nie będący 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.

Joanna Bandorowicz-Pikuła  
Skarbnik PTBioch

PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII

**OLYMPUS**

Your Vision, Our Future

**MERCK**

Redaktor naczelny: Sławomir Pikuła; e-mail: s.pikuła@nencki.gov.pl, Redaktor senior: Zofia Zielinska

Redaktor działu krajowego: Teresa Wesolowska; e-mail: redbioch@sci.pam.szczecin.pl, Redaktor działu „Forum Młodych Biochemików”: Grzegorz Bartosz; e-mail: gbartosz@biol.uni.lodz.pl  
Redaktorzy: Joanna Bandorowicz-Pikuła, Jolanta Barańska, Andrzej Dżugaj, Krystyna Grzelak, Lilla Hryniewiecka, Danuta Hulanicka, Andrzej Jerzmanowski, Andrzej Kasprzak, Wanda Kłopocka, Paweł Pomorski, Aleksander F. Sikorski, Anna Szakiel, Adam Szewczyk, Tomasz Twardowski, Marek Zembala, Krzysztof Zabiłocki, Alija Żylicz

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

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

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

Kwartalnik "Postępy Biochemii" jest wydawany z pomocą finansową Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego

"Postępy Biochemii" są indeksowane w Medline, IndexCopernicus i Agrobibrex. Nakład 1000 egz.

**Odnowienie doktoratu profesora Andrzeja Kajetana Wróblewskiego** (Fot. 1), światowej sławy fizyka, jednego z głównych twórców warszawskiej szkoły fizyki cząstek, która zy-



Fot. 1. Prof. Andrzej Kajetan Wróblewski i prof. Katarzyna Chalasińska-Macukow, rektor Uniwersytetu Warszawskiego.

skąła uznanie na świecie. Promotorem odnowienia doktoratu prof. Andrzeja Kajetana Wróblewskiego był prof. Jan Królikowski z Wydziału Fizyki UW. Uroczystość odbyła się 23 maja br.; było to wielkie święto Uniwersytetu Warszawskiego, któremu Jubilat poświęcił lata intelektualnej pracy twórczej. Uchwałę o odnowieniu doktoratu Senat UW podjął 15 grudnia 2010 r. Recenzentami dorobku naukowego wybitnego uczonego zostali profesorowie: Ryszard Sosnowski z Instytutu Problemów Jądrowych im. Andrzeja Sołtana, Kacper Zalewski z Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Danuta Kisielewska z Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie. Kariera naukowa prof. Wróblewskiego była związana z Uniwersytetem Warszawskim, gdzie sprawował ważne funkcje. Był dyrektorem Instytutu Fizyki Doświadczalnej, dziekanem Wydziału Fizyki oraz rektorem UW w latach 1989-1993. Wielokrotnie przebywał w zagranicznych uczelniach jako *visiting professor*, m.in. na University of Washington w Seattle oraz na Uniwersytetach w Antwerpii, Dortmundzie i Siegen. Dołączając do zespołu naukowców w Europejskim Centrum Badań Jądrowych CERN, którzy prowadzili badania z zastosowaniem nowatorskiej na owe

czasu, techniki komór pęcherzykowych, odbył tam staż naukowy. Po powrocie z CERN prof. Wróblewski wprowadził tę metodę badania cząstek elementarnych do warszawskiego ośrodka naukowego. Do największych osiągnięć uniwersyteckiego fizyka należy znalezienie opisu liczby cząstek produkowanych w zderzeniach wielkich energii, nazywanego w światowej literaturze „zależnością Wróblewskiego”. Profesor wsławił się również tym, że wyprowadził i zbadał współczynnik tłumienia częstości pojawiania się w wysokoenergetycznych zderzeniach kwarków  $s$ , który znany jest jako „współczynnik Wróblewskiego”. Profesor Andrzej Kajetan Wróblewski jest autorem lub współautorem ponad 200 publikacji naukowych, z czego ośmiu z nich przypisano kategorię tzw. *Famous papers*. Uczony był wielokrotnie zapraszany jako prelegent na międzynarodowe konferencje. Jako jeden z niewielu Polaków wygłosił referat plenarny na „Konferencji Rochesterkiej”, będącej najważniejszą konferencją poświęconą fizyce wysokich energii. Profesora pasjonuje również historia fizyki. Opublikował na ten temat wiele prac, szczególnie znane są jego książki pt. „Historia fizyki od czasów najdawniejszych do współczesności” oraz „Prawda i mity w fizyce”. Niegasnącym zainteresowaniem studentów nie tylko kierunków ścisłych, ale i humanistycznych cieszy się wykład prof. Wróblewskiego na temat historii fizyki. Znana i doceniona jest działalność Profesora Wróblewskiego związana z oceną stanu polskiej nauki. Profesor był zastępcą przewodniczącego Komitetu Badań Naukowych. Nie wszystkim wiadomo, ale to właśnie za jego sprawą w Polsce zaczął funkcjonować termin „lista filadelfijska” dla określenia spisu czasopism indeksowanych w bibliograficznych bazach danych, tworzonych przez Instytut Informacji Naukowej ISI w Filadelfii. Profesor Wróblewski przewodniczył

radom naukowym Centrum Badań Kosmicznych PAN oraz Instytutu Historii Nauki PAN. Współtworzył też Extended Scientific Council w Ośrodku Niemieckiego Synchrotronu Elektronowego DESY w Hamburgu oraz Scientific Policy Committee w Europejskim Laboratorium Fizyki Cząstek CERN. Obecnie jest wiceprezesem Polskiej Akademii Umiejętności. Profesor Andrzej Kajetan Wróblewski otrzymał liczne wyróżnienia, m.in. nagrodę Prezesa Rady Ministrów za wybitny dorobek naukowy, nagrodę im. Marii Skłodowskiej-Curie przyznaną przez PAN, medal im. M. Smoluchowskiego Polskiego Towarzystwa Fizycznego. Został odznaczony Krzyżem Komandorskim z Gwiazdą Orderu Odrodzenia Polski oraz Krzyżem Oficerskim Orderu Zasługi Republiki Francuskiej. Tytuł doktora honoris causa przyznał Profesorowi, m.in. Uniwersytet w Siegen, Chapman University w Orange, Uniwersytet w Glasgow, a w kwietniu br. także Politechnika Warszawska.

**Druga edycja Konkursu Biochemicznego dla młodzieży ze szkół ponadgimnazjalnych**, odbyła się 1 kwietnia 2011 roku w Lublinie. Organizatorem konkursu był Zakład Biochemii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod patronatem merytorycznym Oddziału Lubelskiego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Obecna edycja konkursu spotkała się z jeszcze większym zainteresowaniem wśród szkół niż w roku 2010, co wymusiło ograniczenie liczby uczestników. Po etapie wstępnym, przeprowadzonym w zainteresowanych szkołach, w konkursie wzięło udział 68 uczniów z 17 liceów z województwa lubelskiego (I LO w Białej Podlaskiej, LO w Dęblinie, LO w Hrubieszowie, II LO w Krasnymstawie, LO w Kraśniku, I, II i V LO w Lublinie, I i IV LO w Łukowie, I i III LO w Puławach, I LO w Radzy-

niu Podlaskim, I LO w Rykach, I LO w Świdniku, I i II LO w Zamościu) (Fot. 2). Uczniowie mieli do rozwiązania 14 zadań o charakterze pytań testowych, a także schematów, cykli oraz tablic do uzupełnienia lub opisanie. Nowością w obecnej edycji było wprowadzenie zagadnień z biochemii stosowanej, obejmującej elementy biotechnologii i inżynierii genetycz-



Fot. 2. Uczestnicy Konkursu Biochemicznego w Lublinie.

nej. Wszystkie zadania konkursowe zostały opracowane przez Radę Naukową Konkursu w składzie: prof. dr hab. Teresa Jakubowicz (kierownik Zakładu Immunologii Bezkręgowców UMCS), dr hab. Anna Jarosz-Wilkołazka (adiunkt w Zakładzie Biochemii UMCS, przewodnicząca Oddziału Lubelskiego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego) oraz mgr chemii i mgr biologii Tadeusz Walczyński (doktorant w Zakładzie Biochemii UMCS). W przerwie poprzedzającej ogłoszenie wyników, uczestnicy wysłuchali kilku krótkich wykładów autorstwa studentów kół



Fot. 3. Laureat Konkursu Biochemicznego Piotr Horoszewicz (po prawej) i przedstawiciel firmy Genore Konrad Stepien (po lewej).

naukowych UMCS (biochemicznego i biotechnologicznego). Komisja oceniająca, składająca się z pracowników naukowych Zakładu Biochemii, na podstawie uzyskanych wyników wyłoniła laureatów (Fot. 3). Dyplomy i nagrody (1-3 miejsce) w postaci atrakcyjnych książek otrzymali: I miejsce – Piotr Horoszewicz z I LO w Białej Podlaskiej, II miejsce – Sylwia Stylińska z I LO w Lublinie, III miejsce – Agnieszka Kwiatkowska z I LO w Białej Podlaskiej. Dyplomy i drobne upominki otrzymały również osoby wyróżnione: I wyróżnienie – Katarzyna Kuźlik z I LO w Rykach, II wyróżnienie – Agnieszka Goral z I LO w Lublinie, III wyróżnienie – Ewelina Rybak z I LO w Puławach, IV wyróżnienie – Ryszard Górski z I LO w Łukowie. Ponadto wśród uczestniczących szkół odbyło się losowanie „biochemicznych upominków”. Fundatorami nagród byli: Polskie Towarzystwo Biochemiczne Oddział Lubelski, Zakład Biochemii UMCS, Firma GENORE, Firma SIGMA-ALDRICH, Centrum Innowacji i Transferu Technologii Lubelskiego Parku Naukowo-Technologicznego Sp. z o. o. oraz Stowarzyszenie Pomocy Rodzinie Zagrożonej Patologią Społeczną „Postis” w Lublinie. Zwycięzcom serdecznie gratulujemy, a fundatorom dziękujemy za ufundowanie atrakcyjnych nagród. Organizatorzy dziękują pracownikom naukowym z Zakładu Biochemii UMCS za ich ogromny wysiłek w pracach komisji oceniającej oraz studentom z kół naukowych Wydziału BiNoZ UMCS, za zaangażowanie w realizację Konkursu. W przyszłym roku planowana jest trzecia edycja Konkursu, a Organizatorzy zapraszają wszystkich zainteresowanych! (wg opracowania autorstwa Anny Jarosz-Wilkołazkiej i Tadeusza Walczyńskiego – UMCS; zdjęcia Grzegorz Janusz).

my i nagrody (1-3 miejsce) w postaci atrakcyjnych książek otrzymali: I miejsce – Piotr Horoszewicz z I LO w Białej Podlaskiej, II miejsce – Sylwia Stylińska z I LO w Lublinie, III miejsce – Agnieszka Kwiatkowska z I LO w Białej Podlaskiej. Dyplomy i drobne upominki otrzymały również osoby wyróżnione: I wyróżnienie – Katarzyna Kuźlik z I LO w Rykach, II wyróżnienie – Agnieszka Goral z I LO w Lublinie, III wyróżnienie – Ewelina Rybak z I LO w Puławach, IV wyróżnienie – Ryszard Górski z I LO w Łukowie. Ponadto wśród uczestniczących szkół odbyło się losowanie „biochemicznych upominków”. Fundatorami nagród byli: Polskie Towarzystwo Biochemiczne Oddział Lubelski, Zakład Biochemii UMCS, Firma GENORE, Firma SIGMA-ALDRICH, Centrum Innowacji i Transferu Technologii Lubelskiego Parku Naukowo-Technologicznego Sp. z o. o. oraz Stowarzyszenie Pomocy Rodzinie Zagrożonej Patologią Społeczną „Postis” w Lublinie. Zwycięzcom serdecznie gratulujemy, a fundatorom dziękujemy za ufundowanie atrakcyjnych nagród. Organizatorzy dziękują pracownikom naukowym z Zakładu Biochemii UMCS za ich ogromny wysiłek w pracach komisji oceniającej oraz studentom z kół naukowych Wydziału BiNoZ UMCS, za zaangażowanie w realizację Konkursu. W przyszłym roku planowana jest trzecia edycja Konkursu, a Organizatorzy zapraszają wszystkich zainteresowanych! (wg opracowania autorstwa Anny Jarosz-Wilkołazkiej i Tadeusza Walczyńskiego – UMCS; zdjęcia Grzegorz Janusz).

**SUPERHELISA 2011.** W dniach 13-14 maja 2011 roku przeprowadzono po raz ósmy Konkurs Wiedzy Biochemicznej dla studentów Uczelni Medycznych (Fot. 4 i 5). Organizatorem tegorocznego Konkursu był Zakład Biochemii Ogólnej Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Honorowy Patronat nad Konkursem objęła Prezydent Miasta Zabrza pani Małgorzata Mańka-Szulik. Konkurs odbywał się w Ośrodku Konferencyjno-Szkoleniowym INNOWACJA w Zabrzu. W konkursie wzięły udział zespoły reprezentujące dziesięć Uczelni Medycznych tj.

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu,



Fot. 4. Uczestnicy Konkursu Wiedzy Biochemicznej SUPERHELISA 2011.

Gdański Uniwersytet Medyczny, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu oraz Śląski Uniwersytet Medyczny. Warszawski Uniwersytet Medyczny był reprezentowany przez niezależne drużyny z dwóch Wydziałów. Inauguracja Konkursu odbyła się 13 maja 2011 r. W imieniu Władz Uczelni uczestników Konkursu powitała profesor Ewa Birkner, kierownik Zakładu Bioche-



Fot. 5. SUPERHELISA 2011 - zwiedzanie kopalni.

mii Ogólnej Wydziału Lekarskiego w Zabrzu ŚUM w Katowicach. Pierwszy dzień konkursu składał się z części testowej, trwającej 120 minut i części pisemnej trwającej 60 minut. W czasie trwania konkursu dyskutowano nad zagadnieniami dydaktycznymi w biochemii. Oceny prac dokonała Komisja Konkursu w Zakładzie Biochemii; w tym czasie studenci zwiedzali zabytkową kopalnię „Guido” w Zabrzu. W

pierwszym dniu Konkursu wyłoniono zwycięzców w kategorii zespołowej. Pierwsze miejsce zajął Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, drugie miejsce – Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, trzecie miejsce – Gdański Uniwersytet Medyczny. Drugi dzień Konkursu, część ustna, wyłonił zwycięzców w kategorii indywidualnej. Zostali nimi (w kolejności zajmowanych miejsc) studenci: Marta Szymoniak z Poznania, Łukasz Dziurkowski z Gdańska i Sylwia Michalik z Poznania. Uroczysto wręczono nagrody indywidualne i zespołowe, a wszyscy laureaci otrzymali pamiątkowe dyplomy (wg relacji dr hab. Sławomira Kasperczyka).

**Stypendia konferencyjne Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej**, na dofinansowanie uczestnictwa polskich uczonych w międzynarodowych kongresach, sympozjach i konferencjach naukowych w Polsce lub za granicą. O stypendium mogli ubiegać się pracownicy lub doktoranci krajowej szkoły wyższej lub innej instytucji prowadzącej badania naukowe, którzy zamierzali wygłosić na konferencji zaaprobowany przez organizatorów referat, komunikat, lub przedstawić plakat, a jednocześnie mieli udokumentowany dorobek naukowy w dziedzinie odpowiadającej tematycznie konferencji. Stypendia przeznaczone są dla obywateli polskich, w wieku do 35 lat. Procedurą konkursową związaną z przyznawaniem stypendiów konferencyjnych FNP zajmuje się Towarzystwo Naukowe Warszawskie. Laureatami drugiej edycji, wiosennej, programu „stypendia konferencyjne” 2011 roku zostali m.in.: Wojciech Brzezicki (fizyka) z UJ, wyjazd do Hiszpanii; Rafał Bułdak (biochemia) z SUM w Katowicach, wyjazd do Japonii; Michał Chmielewski (chemia) z Uniwersytetu Warszawskiego, wyjazd do Wielkiej Brytanii; Beata Filip (biologia medyczna) z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, wyjazd do Szwecji; Krzysztof Goryński (farmaceutyka i farmakologia) z Collegium Medicum w Bydgoszczy, wyjazd do Włoch; Radosław Kamiński (chemia) z Uniwersytetu Warszawskiego, wyjazd do Hiszpanii; Piotr

Korcył (fizyka) z UJ, wyjazd do USA; Anna Kurek (biologia) z Uniwersytetu Warszawskiego, wyjazd do Szwajcarii; Piotr Kwiatkowski (chemia) z Uniwersytetu Warszawskiego, wyjazd do Grecji; Marta Lemieszek (biologia medyczna) z Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie, wyjazd do Chorwacji; Marek Łuczowski (chemia) z Uniwersytetu we Wrocławiu, wyjazd do Hiszpanii; Michał Marszał (farmaceutyka i farmakologia) z Collegium Medicum w Bydgoszczy, wyjazd do Brazylii; Magdalena Milczarek (biologia medyczna) z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu, wyjazd do Sztokholmu; Renata Modzelewska-Łagodzin (fizyka) z Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach, wyjazd do Chin; Ilona Nenko (biologia) z Uniwersytetu Jagiellońskiego, wyjazd do Francji; Paweł Paśko (nauki o żywieniu) z UJ, wyjazd do Hiszpanii; Aneta Pobudkowska-Mirecka (chemia) z Politechniki Warszawskiej, wyjazd do Chorwacji; Paweł Paśko (nauki o żywieniu) z CM UJ, wyjeżdżający do Hiszpanii; Aneta Pobudkowska-Mirecka (chemia) z Politechniki Warszawskiej, wyjazd do Chorwacji; Anna Ptak (biologia) z UJ, wyjazd do Francji; Agnieszka Rak-Mardyła (biologia) z UJ, wyjazd do Francji; Katarzyna Szot (chemia) z Instytutu Chemii Fizycznej PAN, wyjazd do Japonii; Monika Walczak (fizyka) z Instytutu Fizyki PAN, wyjazd do Chin; Halina Waś (biologia medyczna) z UJ, wyjazd do Francji; Benedykt Władyka (biologia) z UJ, wyjazd do Szwajcarii. Rozpatrzeniem wniosków złożonych do 30 września 2011 roku Fundacja kończy finansowanie programu Stypendia konferencyjne.

**W drugiej edycji Konkursu „Droga na Harvard” dla uczniów i studentów** (Fot. 6) zwycięzcami zostali: Adrianna Wiącek z Lublina, Jakub Nagrodzki z Konarzyc, Tomasz Wdowik z Warszawy i Agnieszka Szefer z Lubichowa. Laureaci pojedną we wrześniu na 10-dniową wycieczkę do Bostonu i odwiedzą Uniwersytet Harvarda. Spotkają się tam m.in. z profesorami i studentami,

wezmą udział w wykładach, a także odwiedzą uczelniane laboratoria. Dwudziestu najlepszych uczestników konkursu zostanie objętych programem mentorskim, który zapewnia im dostęp do wiedzy i doświadczenia 270 polskich absolwentów Uniwersytetu Harvarda. Program mentorski ma na celu wsparcie laureatów konkursu w ich staraniach o miejsce w najlepszych uczelniach na świecie. Konkurs zorganizował Harvard Club of Poland. W konkursie mogli wziąć udział uczniowie gimnazjów i szkół średnich, studenci uczelni państwowych i prywatnych oraz absolwenci szkół, którzy chcieli studiować na uczelniach amerykańskich, zwłaszcza na Uniwersytecie Harvarda. Harvard Club of Poland jest stowarzyszeniem; zrzesza ono prawie 270 polskich studentów, absolwentów oraz byłych i obecnych pracowników Uniwersytetu Harvarda w Cambridge w Stanach Zjednoczonych. Celem Harvard Club of Poland jest popularyzowanie wśród młodych zdolnych Polaków idei studiowania na najlepszych uczelniach świata. W tym roku Stowarzyszenie rozpoczęło budowę Funduszu Stypendialnego dla Polaków na Harvardzie. Darczyńcami pierwszego 1 miliona dolarów są Anna i Dariusz Mioduscy z Warszawy. W tym roku, po raz pierwszy w Polsce odbędzie się prestiżowa konferencja europejskich absolwentów Harvardu, European Leadership Conference. Gala Finałowa konkursu odbyła się 15 czerwca w Pałacu Sobańskich, w obecności marszałka Sejmu Grzegorza Schetyny.



Fot. 6. Laureaci Konkursu „Droga na Harvard”.

Szczegóły na temat projektu można znaleźć na stronie: <http://www.drogaharvard.pl/>.

W drugim etapie tegorocznej edycji konkursu GreenEvo, tzw. akceleratora zielonych technologii Minister-

stwa Środowiska wybrano spośród 36 zgłoszeń 21 technologii w dziedzinie ochrony środowiska, które mają szansę na światową promocję. W dziedzinie ochrony powietrza uznanie jurorów zdobyły palniki ograniczające zanieczyszczenie przy spalaniu ciężkich paliw ciekłych, biopaliw i mieszanin paliw ropopochodnych z biopaliwem i wodą oraz technologia termicznej utylizacji niskokalorycznych gazów odpadowych. W dziedzinie gospodarki odpadami firma zaproponowała technologię energetycznego recyklingu biomasy i odpadów komunalnych, przemysłowych i szpitalnych. Wszystkie trzy technologie, wybrane do udziału w drugim etapie konkursu zgłosiła jedna firma – spółka ZBUS-TKW Combustion z Głowna (woj. Łódzkie). W ochronie powietrza do dalszej części konkursu zakwalifikowano Reduxco, katalizator poprawiający efektywność spalania paliw węglowodorowych przygotowany przez firmę Dagas z Warki (woj. Mazowieckie). Dwie wybrane technologie gospodarki odpadami przedstawiła firma Multichem Eko z Pyrzyc (woj. Zachodniopomorskie). Jej produkt FuelCal pozwala na wykorzystanie odpadów z produkcji rolnej do pozyskiwania energii, albo do nawożenia. W drugim etapie konkursu znalazła się też technologia unieszkodliwiania odpadów niebezpiecznych metodą mikrofalową firmy Aton HT z Wrocławia, które pozwalają unieszkodliwić m.in. azbest, odpady poubojowe i zanieczyszczenia ze spalania paliw konwencjonalnych oraz redukujące przykre zapachy. W grupie technologii dotyczących odnawialnych źródeł energii na liście 21 opracowań są systemy zasilania z ogniwem paliwowym firmy APS Energia z Zielonki koło Warszawy, palenisko kotła do spalania granulowanego paliwa tzw. peletów firmy Fu-Wi z Elbląga, linia do brykietowania słomy LTBS firmy POL-MOT Warfama z Dobrego Miasta. Jest też technologia do oczyszczania biogazu Biosulfex firmy Zespół Innowacyjny PROMIS z Warszawy oraz „zapora” elektryczna w wodzie, chroniąca ryby przed wplynięciem do urządzeń elektrowni wodnych, przygotowana w firmie PROCOM SYSTEM z Wrocławia. Cztery rozwiązania wspierają oszczędność energii – sterownik zdalnej kontroli

urządzeń elektrycznych firmy APANET Andrzej Lis, Piotr Leszczyński z Wrocławia, oprogramowanie wspierające optymalizacją zużycia mediów energetycznych firmy NMG z Bydgoszczy, system lamp solarnych PPHU R. Macek W. Wichary z Zabrze oraz geotermalna pompa ciepła VASTRA opracowana w WSK Kraków.

W dziedzinie gospodarki wodno-ściekowej do dalszej części konkursu wybrano 5 technologii. Są to: metoda „PROTEfos” blokująca fosfor w osadach dennych zbiorników wodnych przy użyciu koagulantów przygotowana w firmie PROTE Technologie dla Środowiska z Poznania, miesadła stosowane w oczyszczalniach ścieków firmy Redor z Bielska Białej i hybrydowe suszarnie osadów ściekowych firmy EKOTOP Roman Sobczyk z Piły. W tej grupie jest też technologia biologiczno-mechaniczna zastosowana w kontenerowej oczyszczalni ścieków firmy CTE Carbotech Engineering ze Szczecina oraz technologia oczyszczania ścieków przemysłowych Chemadex warszawskiej firmy o tej samej nazwie. Firmy, które opracowały wybrane technologie, skorzystają z bezpłatnych szkoleń, obejmujących zagadnienia z zakresu transferu technologii, strategicznych rynków zagranicznych oraz rynku krajowego, czy zasad promocji. Po szkoleniach nastąpi kolejna selekcja firm i wybór laureatów, których technologie będą promowane za granicą na targach i wystawach oraz poprzez sieć polskich ambasad i przedstawicielstw handlowych. Ministerstwo stworzyło akcelerator, by znaleźć na polskim rynku i wypromować za granicą innowacyjne technologie firm zajmujących się ekologią. Celem resortu jest stworzenie marki GreenEvo, która ma gwarantować wysoką jakość zielonych technologii z Polski. Ministerstwo zakłada, że uczestniczące w tym konkursie firmy uzyskają większy prestiż i zaufanie na światowym rynku. Informacje o akceleratorze można znaleźć na stronie internetowej [greenevo.gov.pl](http://greenevo.gov.pl). W ubiegłorocznej edycji konkursu wybrano 13 firm laureatów.



Fot. 7. Dr hab. inż. Andrzej Borodziński.

**Doktor hab. inż. Andrzej Borodziński** (Fot. 7) z Instytutu Chemii Fizycznej PAN w Warszawie prowadzi badania nad ogniwami paliwowymi zasilanymi kwasem mrówkowym; są tanie, lżejsze od dotychczasowych i zapewniają możliwość ciągłej pracy. Mają wszelkie szanse unowocześnić

rynek przenośnej elektroniki. Ogniwko paliwowe to urządzenie przetwarzające energię chemiczną w elektryczną. Prąd powstaje bezpośrednio wskutek spalania paliwa w obecności katalizatorów, stosowanych na anodzie i katodzie ogniwa. Katalizator wydajny i trwały, zapewniający stabilność ogniwa, został opracowany w Instytucie Chemii Fizycznej PAN. Najlepsze istniejące obecnie ogniwa,

wodorowe, w praktyce dochodzą do 60% zamiany energii chemicznej na elektryczną, a w paliwowych ogniwach ta teoretyczna sprawność może sięgać 100%. Na drodze do komercjalizacji ogniw wodorowych czy metalicznych stoją problemy techniczne i bezpieczeństwa (toksyczność, wysoka temperatura reakcji, warunki przechowywania). Alternatywnym rozwiązaniem okazują się ogniwa paliwowe działające na kwasie mrówkowym (można stosować kwas mrówkowy o niskiej czystości, reakcja w temperaturze pokojowej, łatwość przechowywania i transportu kwasu); kwas mrówkowy można produkować z biomasy i uzyskiwać w ten sposób bardzo tanie oraz ekologiczne paliwo do ogniwa. Zdaniem naukowców z IChF PAN, ogniwa paliwowe na kwasie mrówkowym znalazłyby liczne zastosowania, przede wszystkim w przenośnych urządzeniach elektronicznych, telefonach komórkowych, laptopach, urządzeniach GPS. Ogniwa te mogłyby być instalowane także jako źródła zasilania pojazdów, od wózków inwalidzkich, przez elektryczne rowery, po jachty. W Instytucie Chemii Fizycznej PAN rozpoczynają się badania nad pierwszymi bateriami zbudowanymi z ogniw paliwowych na kwasie mrówkowym. Przewiduje się, iż prototyp komercyjnego urządzenia powinien być gotowy w ciągu kilku lat. (Źródło: IChF PAN/Grzegorz Krzyżewski)



Polskie centra badawcze złożyły 5 spośród 20 zwycięskich projektów umieszczonych na głównej liście rankingowej konkursu Potencjał Badawczy w ramach 7. Programu Ramowego. Polskie projekty uzyskały łączne dofinansowanie przekraczające 18 mln euro, czyli blisko jedną czwartą całkowitej wartości budżetu konkursu. W ciągu ostatnich czterech lat ponad 34 mln euro dofinansowania trafiło do 13 polskich centrów badawczych. W wyniku rozstrzygniętego w kwietniu b.r. konkursu, pieniądze na zakup aparatury badawczej, zatrudnienie doświadczonych uczonych, międzynarodową wymianę pracowników naukowych oraz organizację warsztatów, konferencji i działań promocyjnych otrzymają: Instytut Chemii Fizycznej PAN na projekt NOBLESSE o budżecie 3715640 euro, Instytut Energetyki na projekt SENERES o budżecie 2683464 euro, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego na projekt OMICRON o budżecie 4387839 euro, Instytut Nauk Geologicznych PAN na projekt ATLAB o budżecie 3942524 euro oraz Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego na projekt WULS Plant Health o budżecie 4466897 euro. Wysoko oceniony został również projekt złożony przez Europejskie Regionalne Centrum Ekohydrologii Międzynarodowego Instytutu PAN, który znalazł się na rezerwowej liście projektów. Finansowana w ramach projektu wymiana pracowników naukowych, konferencje i warsztaty oraz inne przedsięwzięcia prowadzone wraz z najlepszymi europejskimi centrami badawczymi zwiększają szansę polskich jednostek na dołączenie do konsorcjów naukowych składających projekty badawcze zarówno w ramach 7 PR oraz innych systemów wsparcia UE. Przeciętna wartość dofinansowania dla polskich jednostek uzyskiwana w 7. PR, największym europejskim mechanizmie finansowania badań, nie przekracza 200 tys. euro. Wynika to z faktu, że w projektach 7 PR bierze udział kilkunastu partnerów, stąd, mimo dużych budżetów projektowych, do pojedynczych partnerów trafiają względnie niskie kwoty. Środki finansowe trafiające do polskich jednostek w ramach konkursu Potencjał Badawczy są ponad 20-krotnie wyższe niż średnia war-

tość dofinansowania uzyskiwanego w pozostałych konkursach 7 PR (wg portalu Nauka w Polsce).

Mobilność naukowców i studentów, przyszłość europejskich uniwersytetów, innowacje w gospodarce i badania finansowane ze środków UE to główne tematy naukowe i akademickie, które będą poruszane na spotkaniach w czasie polskiej prezydencji. Polski rząd zorganizuje podczas polskiego przewodnictwa w Radzie UE kilka spotkań poświęconych problematyce nauki i szkolnictwa wyższego. 20 lipca br. w Sopocie odbyła się konferencja ministerialna na temat Europejskiej Przestrzeni Badawczej. Dzień później, również w Sopocie, obradowała na nieformalnym posiedzeniu Rada UE ds. konkurencyjności. Sopot będzie też gościł 24–25 października konferencję na temat modernizacji uniwersytetów. Na koniec września zaplanowano spotkanie poświęcone unijnemu programowi stypendialnemu dla naukowców „Marie Curie” i zjazd jego uczestników w 15. rocznicę utworzenia tego programu wspierającego badaczy europejskich. Spotkanie organizuje Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Towarzyszyć mu będzie sympozjum „Nauka – pasja, misja, odpowiedzialność”.

6 i 7 lipca w warszawskim Centrum Nauki Kopernik odbyła się konferencja „Wschodni Wymiar Mobilności”, poświęcona edukacji i nauce, w aspekcie zwiększenia mobilności między Unią Europejską i krajami objętymi programem Partnerstwa Wschodniego. Organizatorami byli: Ministerstwo Kultury i Dziedzictwa Narodowego, Ministerstwo Edukacji Narodowej, Ministerstwo Sportu i Turystyki oraz Komisja Europejska; natomiast partnerami spotkania: Instytut Adama Mickiewicza, Punkt Kontaktowy Programu Kultura, Punkt Kontaktowy Programu Europa dla Obywateli, Urząd Miasta Stołecznego Warszawa. Osobna seria spotkań będzie dotyczyć dotychczasowych wyników działania 7. Programu Ramowego do spraw Badań i Rozwoju, czyli głównego mechanizmu finansowania badań w UE. Poświęconych temu będzie siedem międzynarodowych konferencji naukowych, począwszy od sympozjum zaplanowanego na 5-8

września w Gdańsku, a związanego z (bio)technologiami dla ochrony środowiska. Na konferencję zapraszał profesor dr hab. Korneliusz Miksch z Katedry Biotechnologii Środowiskowej Politechniki Śląskiej.

W dniach 20 i 21 września w Warszawie zaplanowano największą europejską konferencję dotyczącą badań na rzecz bezpieczeństwa: Security Research Conference 2011, organizowaną przez Przemysłowy Instytut Automatyki i Pomiarów (PIAP). Podczas sesji tematycznych zostaną zaprezentowane innowacyjne rozwiązania wypracowane w ramach międzynarodowych i krajowych projektów, takich jak na przykład systemy „Proteus” i „TALOS”. Konferencji będzie towarzyszyć wystawa naukowo-przemysłowa. Pomiędzy 22 i 23 września, też w Warszawie, zorganizowana zostanie konferencja poświęcona materiałom przyszłości, które mają sprostać „wyzwaniom naszych czasów”. Sympozjum Fumat 2011 organizują m.in. Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN i Politechnika Warszawska. Kolejna konferencja, w dniach 19 i 20 października, będzie dotyczyć procesu integracji europejskiej. Projekt EUINTEGRATIO prowadzi profesor Ewa Latoszek ze Szkoły Głównej Handlowej w Warszawie. O współpracy naukowej Unii Europejskiej z krajami Europy Wschodniej i Azji Środkowej (EU-EECA) będzie mowa 15 i 16 listopada w Warszawie. Osiągnięcia Europejskich Inicjatyw Przemysłowych oraz efekty wprowadzonych przez nich planów z zakresu wytwarzania energii zostaną zaprezentowane 28 i 29 listopada w Warszawie na konferencji poświęconej europejskiemu strategicznemu planowi w dziedzinie technologii energetycznych SET-Plan. Odbędzie się też wiele zebrań eksperckich, poświęconych poszczególnym zagadnieniom polityki naukowej i akademickiej UE oraz trzy formalne spotkania ministrów w Brukseli: dwa posiedzenia Rady UE do spraw konkurencyjności we wrześniu i w grudniu oraz Rady UE ds. edukacji, młodzieży, kultury i sportu w listopadzie (wg informacji zawartej na portalu Nauka w Polsce).

Academia Europaea, zrzeszająca 2,5 tys. naukowców, w tym 50 laureatów Nagrody Nobla, otwiera we Wrocławiu swoje drugie, po Londynie, biuro. List intencyjny podpisali prezydent Wrocławia Rafał Dutkiewicz i prezes Akademii prof. Lars Walloe (Fot. 8). Academia Europaea rozważała otwarcie biura w m.in. Monachium, Barcelonie i Strasburgu, aby ostatecznie zdecydować o wyborze Wrocławia; doceniono tym samym konsekwentne wdrażania strategii Wrocławia polegającej na wspieraniu rozwoju gospodarki opartej na wiedzy. Wrocławskie biuro będzie nosić nazwę Centrum Wiedzy Academia Europaea (Academia Europaea Knowledge Hub). Academia Europaea jest europejską instytucją skupiającą naukowców z 35 krajów. Powstała w 1988 roku, a pełni doradczą i opiniotwórczą rolę w zakresie nauki. Do Akademii należy 40 polskich naukowców, w tym dwóch z Wrocławia. Według informacji prezydenta Dutkiewicza złożonej podczas konferencji prasowej biuro zostanie otwarte jeszcze w bieżącym roku, a siedzibę będzie miało prawdopodobnie na wrocławskim Rynku. Rafał Dutkiewicz uważa, iż dzięki otwarciu biura do Wrocławia będą przyjeżdżać znani naukowcy, nobliści, będą się odbywać różnego rodzaju konferencje, sympozja naukowe, i być może będzie można też zwiększyć zasilania finansowe nauki polskiej (nie wydarzy się to od razu). Prof. Lars Walloe przed podpisaniem listu intencyjnego mówił o wrażeniu jakie na nim zrobił wrocławski entuzjazm środowisk naukowych i całe miasto. Dodał, że liczy na współpracę ze środowiskami akademickimi, instytucjami naukowymi, ale przede wszystkim liczy na młodych wrocławskich, polskich naukowców zainteresowanych rozszerzeniem i zdobywaniem wiedzy (wg informacji uzyskanej z Urzędu Miasta Wrocław).



Fot. 8. Prof. Lars Walloe i prezydent Wrocławia Rafał Dutkiewicz (zdjęcie pochodzi z <http://wroclaw.gazeta.pl/>)

### Fingolimod w terapii stwardnienia rozsianego. Wyniki badań mię-

dzynarodowego programu klinicznego z zastosowaniem fingolimodu w terapii stwardnienia rozsianego (SM) omawiano podczas konferencji neurologicznej na początku czerwca b.r. w Warszawie. Obiecujące wyniki badań zaprezentowali prof. dr hab. Krzysztof Selmaj (Fot. 9), kierownik Katedry i Kliniki Neurologii UMŁ i zarazem prezes Polskiego Towarzystwa Neurologicznego oraz dr Andrew Chan z Kliniki Neurologii Uniwersytetu Ruhry, St. Joseph w Bochum w Niemczech. Fingolimod hamuje

postęp SM; badania kliniczne wykazały jego znaczną skuteczność terapeutyczną. Jak wyjaśniał prof. dr hab. Krzysztof Selmaj, fingolimod zatrzymuje limfocyty w węzłach chłonnych i zmniejsza ilość operatywnych limfocytów, które z węzłów chłonnych docierają do mózgu. Fingo-

limod jest antagonistą receptora sfin-gozy. Receptory te zostały odkryte około 10 lat temu i ciągle jest badane ich znaczenie biologiczne. Występują one na różnych komórkach, również układu nerwowego, w tym na samych neuronach. W pracach doświadczalnych potwierdzono wpływ fingolimodu nie tylko na proces zapalny, który zapoczątkowuje rozsiane zmiany w mózgu, ale i na ośrodkowy układ nerwowy. Badania kliniczne z udziałem ludzi, polegają na ocenie atrofii (zaniku) mózgu, co pośrednio może potwierdzić ochronny wpływ terapii. W konsekwencji zapalenia komórki ulegają degeneracji. W badaniach prowadzonych na pacjentach z SM wykazano, że fingolimod wpływa na procesy chorobowe w centralnym układzie nerwowym, silnie hamując atrofię. Według prof. Selmaja lek obecnie jest badany w grupie 15 proc. pacjentów z odmianą SM, gdzie uważa się, że zapalenie odgrywa mniejszą rolę niż procesy degeneracyjne. Jeże-

li ten lek rzeczywiście ma potencjał działania naprawczego, to w tej populacji pacjentów, powinien również wykazać skuteczność. To więcej niż nadzieje, bo są już wyniki naukowe. Potwierdzenie wyników naukowych zajmie 2-3 lata, wyniki mogą być poznane za 4 lata. Według współprowa-

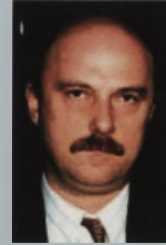
dzącego badania, dr Chana, oddziaływanie preparatu zawierającego fingolimod bada się także w tych postaciach SM, gdzie do tej pory nie można było mówić w ogóle o żadnych terapiach (wg informacji zawartej na portalu Nauka w Polsce).

### Mechanizm wywołający lęk wywołany stresem zachodzący w mózgu odkrył zespół naukowców kierowany

przez dr Roberta Pawłaka z Uniwersytetu w Leicester w Anglii. Współautorami sukcesu naukowego są badacze z grupy prof. Ryszarda Przewłockiego (Fot. 10) z Zakładu Neurofarmakologii Molekularnej Instytutu Farmakologii PAN i prof. Sadao Shio-saka z Instytutu Nauki i Technologii w japońskiej Narze. Wyniki swoich badań naukowcy opublikowali niedawno w czasopiśmie „Nature”.

Według wypowiedzi prof. Ryszarda Przewłockiego, do powstawania zmian neuroplastycznych wywołanych stresem i przebudowy połączeń nerwowych w mózgu niezbędne jest białko o nazwie neuropsyna. Neuropsyna powstaje w jądrze migdałowatym, czyli mózgowym ośrodku emocji, w reakcji na stres. Badania mechanizmu powstawania lęku trwały

trzy lata; m.in. badano wpływ zmian molekularnych powstałych w wyniku stresu w jądrze migdałowatym na zachowanie myszy. W odpowiedzi na stres zwierzęta starają się unikać zagrożenia. Farmakologiczne zahamowanie działania neuropsyny lub genetyczne usunięcie białka niweluje zmiany zachowania wywołane przez stres. Badacze wykazali, że usunięcie z komórek nerwowych neuropsyny, lub jej molekularnych partnerów, prowadzi do zablokowania neuronalnego mechanizmu powstawania lęku. Wszystkie elementy szlaku działania neuropsyny występujące u gryzoni



Fot. 9. Prof. dr hab. Krzysztof Selmaj.



Fot. 10. Prof. Ryszard Przewłocki.

można znaleźć także w ludzkim mózgu, zatem mogą one pełnić podobną rolę u człowieka. Dalsze badania powinny ocenić możliwości potencjalnej terapii wywołanych stresem zachowań. Według autorów wyniki pracy opublikowanej w „Nature” pozwalają przypuszczać, że neuropsychyna może stanowić cel nowej terapii przeciwstresowej. Praca stwarza nadzieję na rozwój takiego leczenia i może przyczynić się do zapobiegania wywołanych stresem zaburzeń neuropsychiatrycznych. Istnieją indywidualne różnice w podatności na stres, który coraz częściej staje się przyczyną wielu chorób psychiatrycznych, ale przeżycia traumatyczne tylko u niektórych rozwijają zależne od stresu choroby, tj. depresję, zespół stresu pourazowego, zaburzenia lękowe, fobie, zespoły paniki, czy uogólnionego lęku. Zdaniem prof. Przewłockiego, współautora badań, sposób funkcjonowania neuropsychyny może przynajmniej w części odpowiadać za te różnice i występowanie chorób wywołanych stresem. Do tej pory sugerowano istotny udział neuropsychyny w procesach uczenia się i pamięci, niewiele wiadomo o biochemicznym mechanizmie działania neuropsychyny w procesach przetwarzania emocji. Praca „*Neuropsin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety*” opublikowana w „Nature” wyjaśnia tę kwestię.

Badania nad wpływem warunków zewnętrznych na tworzenie się różnych komórek tłuszczowych rozpocznie wkrótce w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności w Olsztynie zespół amerykańskiego biologa dr Leslie Kozaka (Fot. 11), który przyjechał do Polski w ramach programu „Welcom” Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej. Celem jego prac będzie zbadanie mechanizmów genetycznych, które decydują o tworzeniu się tkanki tłuszczowej w zależności od warunków zewnętrznych, a zwłaszcza od temperatury otoczenia. Wiadomo, że nadmiar tkanki tłuszczowej powstaje przy nadmiarze energii, której organizmowi dostarczamy w

pożywieniu. Ciało nie jest w stanie jej całej spalić i odkłada na zapas w postaci tkanki tłuszczowej. Mówiąc o zużyciu energii przez organizm mamy zwykle na myśli aktywność fizyczną. W rzeczywistości dostosowanie temperatury ciała do niższej temperatury otoczenia również zwiększa wydatkowanie energii. Na pewno nie w stopniu takim jak przy podjętej aktywności fizycznej, ale wynik jest warty zauważenia. Doświadczenia pokazały, że obniżenie temperatury (np. przez założenie chłodzącej kamizelki) wokół chorej osoby, nie mogącej podjąć ćwiczeń gimnastycznych, daje możliwość spalania części tłuszczu, bo organizm musi wtedy zużywać więcej energii dla ogrzania się. Dr Kozak poinformował, że badania w Olsztynie będą prowadzone na myszach. Zwierzęta będą podzielone na grupy i hodowane w różnych warunkach, np. jedna grupa w otoczeniu o temperaturze niecałych 30°C, w której organizm nie musi wcale zużywać energii na podtrzymywanie ciepłoty ciała, a druga w temperaturze obniżonej do około 17-18°C, kiedy trzeba zużyć dużo energii na podtrzymywanie temperatury ciała. Myszy będą ponadto żyły w warunkach sprzyjających otyłości, czyli będą miały ograniczoną możliwość ruchu i wysokokaloryczny pokarm. Po zakończeniu doświadczenia tkanki tłuszczowe, biała i brązowa, myszy zostaną zbadane. O tym, jakiego rodzaju komórki tłuszczowe powstaną w organizmie, decyduje specjalny mechanizm różnicowania się. Wiąże się to z ekspresją poszczególnych genów. Zespół dr Leslie Kozaka będzie badał m.in. właśnie ekspresję genów w komórkach tkanek tłuszczowych myszy. Poznanie mechanizmów różnicowania tkanki tłuszczowej

może też pomóc w tworzeniu doskonalszych leków, pomagających w zwalczaniu otyłości; dla niektórych otyłych ludzi terapia farmakologiczna jest jedynym wyjściem w walce z otyłością. Przy badaniach dr Kozaka

znajdzie zatrudnienie czterech doktorów i sześciu magistrów oraz asystent kierownika całego projektu. Czasowo potrzebni będą też studenci. Łącznie na ich prowadzenie biolog otrzymał 7,2 mln zł. Są to środki pochodzące z Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej i Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (wg portalu Nauka w Polsce).

**Magister Katarzyna Zamelczyk (Fot. 12), absolwentka Uniwersytetu Szczecińskiego, obecnie**

**doktorantka** na Wydziale Geologii Uniwersytetu w Tromsø w Norwegii jest współautorką artykułu *Enhanced Modern heat transfer to the Arctic by warm Atlantic Water* w czasopiśmie „Science”. Wspólnie z międzynarodową grupą badaczy dowodzi, że zmniejszanie się pokrywy lodowej na oceanie Arktycznym oraz gwałtowne ocieplenie klimatu w Arktyce to efekt zwiększonej wymiany ciepła z wodami Atlantyku. Badania dotyczą wzrostu temperatury w cieśninie Fram, jako bezprecedensowego zjawiska w ciągu ostatnich dwóch tysięcy lat. Tezę tę udowadniają badania osadów morskich, które przeprowadziła międzynarodowa grupa naukowców. Uczni zbadali morskie mikroskopijne i skamieniałe organizmy, otwornice. Wydobyli je z rdzenia osadowego w zachodniej części wybrzeża Svalbardu i wykorzystali ich preferencje ekologiczne oraz liczebność do rekonstrukcji temperatury wody w cieśninie Fram. Otwornice żyją na głębokości wody od 50 do 200 metrów i budują wapienne skorupki. Gdy umierają, puste skorupki gromadzą się na dnie morza wraz z cząstkami osadu. Różne gatunki otwornic preferują określone warunki termiczne wód, w których żyją; grupy gatunków zawartych w próbkach osadów pomagają określić warunki oceaniczne i klimatyczne panujące w przeszłości. Analiza składu chemicznego wapiennych skorupek, w których żyły otwornice pozwala na rekonstrukcję temperatury wody. Wykorzystanie tych dwóch niezależnych metod, pozwoliło grupie naukowców na odkrycie ciepłych i



Fot. 12. Mgr Katarzyna Zamelczyk.



Fot. 11. Dr. Leslie Kozak.

chłodnych okresów w cieśninie Fram w ciągu ostatnich dwóch tysięcy lat i wykazanie wzrostu temperatury o około 2°C w ciągu ostatnich stu lat. W międzynarodowej grupie badawczej znaleźli się naukowcy z Instytutu do Badań Morza IFM-GEOMAR w Leibniz, Instytutu Alfreda Wegenera Badań Polarnych i Morskich w Bremerhaven, Akademii Nauk Humanistycznych i Literatury w Moguncji oraz Uniwersytetów w Tromsø (Norwegia) i z Boulder (USA) (wg informacji zawartej na portalu Nauka w Polsce).

We wrześniu w Sztokholmie zostanie otwarta wystawa „Marie

Skłodowska/Mme Curie”. Informację o wydarzeniu podało Muzeum Noblowskie; kuratorem wystawy jest Anna Stenkula. Wystawa ma przypomnieć Szwedom, że noblistka była Polką. W Szwecji Maria Skłodowska-Curie znana jest przede wszystkim, jako Marie Curie, i tak jest zanotowana informacja o Uczonej w szwedzkich encyklopediach i podręcznikach. Wystawa ma być pretekstem do dyskusji nad tożsamością narodową noblistów. Jedną z części wystawy poświęcona zostanie sytuacji współczesnych kobiet nauki. W tym celu przedstawiciele Muzeum Noblowskiego przeprowadzili wywiady z kobietami naukowcami w Pol-

sce, Francji oraz Szwecji. Odwiedzili również Muzeum Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. Ekspozycja o powierzchni 300 m<sup>2</sup> przedstawi także dokonania Marii Skłodowskiej-Curie, jej pracę w laboratorium oraz problem promieniotwórczości. Wystawę „Marie Skłodowska/Mme Curie” będzie można odwiedzać od 16 września do stycznia 2012 roku w prestiżowym Muzeum Noblowskim. Każdego roku laureaci Nagrody Nobla przed ceremonią wręczenia (10 grudnia) zwiedzają muzeum wraz z rodzinami i przyjaciółmi. Wystawa otrzyma logo polskiej prezydencji.

Pod redakcją Teresy Wesołowskiej

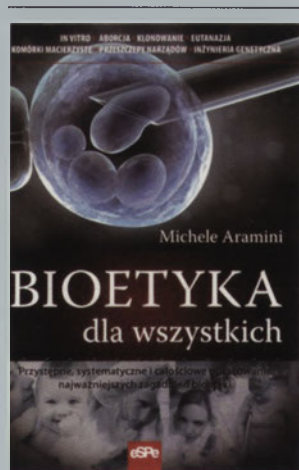
## Bioetyka dla wszystkich. Przystępne, systematyczne i całościowe opracowanie najważniejszych zagadnień bioetyki.

Michele Aramini. Wydawnictwo eSPe, ISBN 978-83-7482-388-3, Kraków 2011, 336 stron

Dynamiczny rozwój innowacyjnych technologii połączony jest zarówno z gospodarką jak i zagadnieniami społecznymi. Powstanie i duże znaczenie ekonomiczne nowych technik w zakresie produkcji leków (jak hormony), diagnostyka (przeciwciała monoklonalne), przeszczepy (homo-, hetero- i ksenotransplantacje), produkcja żywności, nanotechnologie i wiele innych muszą prowadzić do dyskusji społecznych, zaangażowania przedstawicieli „starych”, klasycznych dziedzin nauk społecznych i humanistycznych: socjologów, psychologów, moralistów, filozofów, etyków, teologów. W odniesieniu do biotechnologii i dziedzin pokrewnych w Polsce brak jest literatury i dyskusji takich ekspertów, jak również niejednokrotnie obserwujemy brak przygotowania merytorycznego zapalonych dyskutantów. Książka „Bioetyka dla wszystkich” mogłaby wypełniać bardzo istotną lukę na rynku wydawniczym i społecznym. Celowo i świadomie używam sformułowania „mogłaby”, bowiem pozycję można byłoby rekomendować i polecić szerokim kręgom czytelników,

jeżeli dana pozycja spełniałaby określone kryteria wydawnicze i merytoryczne.

Zgodnie z zapowiedzią na okładce „Bioetyka dla wszystkich” omawia zagadnienia z zakresu inżynierii genetycznej, aborcji, przeszczepów, klonowania i komórek macierzystych.



Spektrum zagadnień jest bardzo szerokie i dyskusja dotyczy rzeczywiście bardzo gorących społecznie zagadnień, a przy tym szalenie istotnych gospodarczo. Ogromnym walorem książki jest podejmowanie zagadnień, w stosunku do których w zasadzie nikt nie jest obojętny. Przecież problemy czystości naszego środowiska, wykorzystania najnowszych osiągnięć biologii molekularnej do wyżywienia ludzkości czy też „części zastępczych” dla naszego organizmu lub zapłodnienie *in vitro* – to problemy dotyczące nas osobiście lub naszych bliskich.

Autor, jak i Wydawnictwo, podkreślają i jednoznacznie akcentują, że zagadnienia są omawiane z pozycji i zgodnie z filozofią i nauczaniem Kościoła

Rzymsko-katolickiego. Pozycja posiada zresztą imprimatur (*nihil obstat*) Zakonu Pijarów. Natomiast natychmiast nasuwa się pytanie, dlaczego zignorowane są inne religie i inne światopoglądy? Czy nie byłoby zasadne przedstawienie poglądów innych kościołów? Aczkolwiek jest przywilejem i prawem Autora zajęcie określonego stanowiska, to dla czytelnika byłoby bardzo cenne poznanie także innej, odmiennej opinii czy też stanowiska. Jednakże jestem przekonany, że w tej konkretnej kwestii w odniesieniu do polskiego czytelnika, gdzie ogromna większość z nas ma korzenie w tym właśnie Kościele, nie jest to zbyt istotna kwestia. Bardzo ważne i cenne jest sformułowanie celów i zadań bioetyki, aczkolwiek przedstawienie krytyki innych poglądów i autorytatywne uznanie tych innych poglądów za błędne wydaje się niewłaściwe i niegodne pozycji uczonego (str. 32). Natomiast zasadnicze zastrzeżenia budzi zawężenie rozważań do sytuacji legislacyjnej i społecznej Włoch, z marginalnym uwzględnieniem Francji oraz Niemiec, jak również w minimalnym stopniu z odniesieniem do Unii Europejskiej. Przede wszystkim w przypadku legislacji oraz opinii publicznej to dla polskiego czytelnika podstawowe znaczenie ma sytuacja w naszym kraju w kontekście Unii Europejskiej. Niewątpliwie jest bardzo ciekawe poznanie specyfiki włoskiej, ale z pewnością jest to sprawa

wtórna. Ma to szczególne znaczenie w odniesieniu do tak ważnych kwestii jak przykładowo „wyrażenie woli” dotyczące naszej przyszłości, a w szczególności traktowania naszego ciała – jest to przedmiot szerokiej i poważnej dyskusji społecznej i uregulowań prawnych, które mają istotne znaczenie dla krajowej medycyny i transplantologii. W odniesieniu do transplantologii Autor całkowicie pominał zagadnienia bulwersujące opinię publiczną, a mianowicie ksenotransplantację, czyli przeszczepy odzwierzęce (str. 237). Jednoznacznie Autor wskazuje na brak dostępnych organów do przeszczepów (w książce stosowany jest zwrot „w naszym kraju” co oznacza we Włoszech, str. 237, ale podobna sytuacja ma miejsce w Polsce), natomiast nie wskazuje i rozważa jakże ciekawego problemu możliwości wykorzystania zupełnie nowego podejścia opartego na osiągnięciach nowoczesnej biologii molekularnej: osłabienia bariery immunologicznej i chorób odzwierzęcych, aby wykorzystać zwierzęta (świnie) jako źródło materiału do przeszczepów.

Osobnym, przykrym zagadnieniem są liczne błędy merytoryczne i językowe, zwłaszcza w zakresie biologii molekularnej i inżynierii genetycznej. Z pewnością nie jest zadaniem recenzenta wyszukiwanie takowych, ale wskazanie szczególnie istotnych jest bardzo ważne dla oceny książki i determinuje jej wartość jako ewentualnego podręcznika. Przykładowo na stronie 75 autorytatywnie stwierdzono, „... władza medycyny nad chorobą jest faktem ...” a „... inżynieria genetyczna posługuje się rDNA w celu wytwarzania enzymów niesyntetyzowanych przez organizm ludzki, takich jak np. insulina ...” – osobście wątpię we władzę medycyny nad chorobami, a jestem pewny, że mój organizm (a jestem człowiekiem) biosyntetyzuje insulinę. Na stronach 122-123 inżynieria genetyczna jest definiowana jako „... każdy zabieg zmierzający do zmodyfikowania dziedzictwa genetycznego ...”, a na stronie 126 „... inżynieria genetyczna łączy dwie komórki w jedną w celu uzyskania hybrydy ...”, a głównym celem takiego zabiegu jest „... tak właśnie powstają tzw. przeciwciała monoklonalne ...”. Prawdziwą perełką jest definicja zawarta na stronie 127 „... krótkie sekwencje zasad poprzedzające gen, zwane enhancerami, zbudowane z występujących w natu-

rze protein zwiększających prędkość transkrypcji”. Na tejże stronie są metody „diagnostyczne przedkonceptyjne”. Zapewne także do grupy błędów tłumacza należy zaliczyć omawianie komórek macierzystych „pluripotencyjnych” i „totipotencyjnych” (winno być: potentnych), str. 161. Inna kwestia, że mają miejsce sprzeczności logiczne w ramach jednego rozdziału: omawiając prawa własności intelektualnej Autor myli na stronach 145 i 146 patentowanie produktu i procesu. Stwierdzenie, „... należy uznać za niedopuszczalne uzyskiwanie patentów dla ludzkiej istoty jako takiej...” jest bez znaczenia, bowiem zarówno włoskie, jak i polskie prawo patentowe, a także wzmiankowana Konwencja Monachijska wykluczają patentowanie człowieka *per se*. Natomiast zdolność patentową mają nie tylko mikroorganizmy genetycznie zmodyfikowane, ale również organizmy wyższe jak rośliny i zwierzęta (str. 146). Inna sprawa, że wbrew opinii prezentowanej w książce *Konwencja z Rio de Janeiro* nie podejmuje zagadnień własności intelektualnej i zdolności patentowej (str. 147). Z całym naciskiem należy podkreślić, że tego typu błędy prowadzą do zasadniczych nieporozumień merytorycznych, co doskonale ilustruje sformułowanie zawarte na str. 137: „... poprzez analizę genetyczną można poznać swe genetyczne przeznaczenie ...”. Sądzę, że tego typu „determinizm genetyczny” sprzeczny jest nie tylko z podstawami biologii molekularnej ale także z nauczaniem Kościoła. Podawanie definicji, które nie są poprawne jest częste w całej książce, ale w zakresie biologii wydaje się szczególnie częste, jak np. zdefiniowanie „... klonowanie jest owocem techniki sztucznego zapłodnienia ...” (str. 150). Zapewne Autor nic nie wie o klonowaniu np. fragmentów DNA, co jest standardową procedurą przemysłową, a być może Autor jak i Wydawca, zażywają leki pozyskiwane w ten sposób. Trudno zaakceptować inne fragmenty książki, bardzo wartościowe, w sytuacji gdy prezentowane są tak „ciekawe” definicje procedur i procesów szczegółowo opisane w podstawowych podręcznikach akademickich, zarówno w języku polskim jak i włoskim, a zatem dostępne zarówno dla Autora jak i dla Tłumacza.

Do zasadniczych braków książki zaliczam także całkowite zignorowa-

nie (co już wzmiankowałem) polskiej opinii publicznej oraz polskiego (a przez to także europejskiego) stanu prawnego. Z pewnością właściwe byłoby zawarcie aneksu lub odnośników przedstawiających aktualną sytuację w naszym kraju w kontekście Unii Europejskiej, niezależnie od doskonałe przedstawionego stanu prawnego Włoch. Jestem głęboko przekonany, że ten polski aspekt omawianych zagadnień ma zasadnicze znaczenie dla polskiego czytelnika. Przecież normy prawne regulujące wykorzystanie materiału ludzkiego do przeszczepów, zasady pracy z GMO czy też prawa własności intelektualnej są w Polsce uregulowane i zgodne z kodyfikacją unijną.

Wartościowym uzupełnieniem książki byłaby notka biograficzna Autora (ku memu zaskoczeniu nie znalazłem nazwiska i informacji biograficznej autora tej pozycji na stronach WWW korzystając z wyszukiwarki Google). Dla czytelnika ważne byłoby również opracowanie słowniczka terminów oraz indeksu rzeczowego, jak również spisu literatury polskiej dotyczącej omawianych zagadnień.

Odnoszę wrażenie, że poglądy i sposób myślenia Autora tej książki doskonale ilustruje zwrot ze strony 315: „bioetyka i ekologia to dyscypliny, które skutecznie wprowadzają temat (środowiska) do dyskusji prowadzonych na poziomie kulturowym i społecznym”. A zatem z pominięciem aspektów naukowych, czyli reprodukcyjnych i obiektywnie sprawdzalnych. Takie stanowisko nie może prowadzić do weryfikowalnych i możliwych do reprodukcyjnego udowodnienia konkluzji. Szkoda, że tak wartościowa tematyka, tak cenna książka, zawiera tak wiele usterek, błędów oraz pomija tak wiele zasadniczych i ważkich aspektów. Te braki merytoryczne i wydawnicze uniemożliwiają rekomendację tej pozycji do szerokiego rozpowszechniania.

Recenzja została przygotowana na prośbę Wydawcy, a jedyną formą gratyfikacji jest bezpłatny egzemplarz książki otrzymany z Wydawnictwa.

**Tomasz Twardowski**

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

Małgorzata Marcinkowska

Piotr Kozłowski✉

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

✉Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, ul. Z. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań; e-mail: kozlowp@yahoo.com

Artykuł otrzymano 13 września 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 4 grudnia 2010 r.

**Słowa kluczowe:** zmienność liczby kopii (CNV), NAHR, gen *AMY1*, osteoporoza, łuszczyca, HIV/AIDS

**Wykaz skrótów:** aCGH (ang. *array comparative genome hybridization*) – porównawcza hybrydyzacja genomowa do macierzy; CNV (ang. *copy number variation/variants*) – zmienność/warianty liczby kopii; MLPA (ang. *multiplex ligation-dependent probe amplification*) – zależna od ligacji multipleksowa amplifikacja sond; NAHR (ang. *non-allelic homologous recombination*) – niealleliczna rekombinacja homologiczna; OR (ang. *odd ratio*) – iloraz szans SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu

**Podziękowanie:** Publikacja została przygotowana w trakcie realizacji projektu badawczego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr N N302 278937.

## STRESZCZENIE

Zmienność fenotypowa populacji człowieka determinowana jest w większości przez dwa uzupełniające się czynniki: wpływ środowiska oraz wpływ informacji genetycznej. Za zmienność genetyczną odpowiedzialne są różnice (polimorfizmy, mutacje) występujące w genomie człowieka. Do niedawna uważano, że większość tych różnic stanowią niewielkie zmiany jednego lub kilku nukleotydów (SNP), których miliony występują w genomie człowieka. Najnowsze badania całych genomów pokazały jednak, że w genomie człowieka występują również polimorfizmy, obejmujące setki tysięcy par zasad DNA. Takie warianty sekwencji, określane mianem polimorfizmu liczby kopii (CNV), często obejmują geny i inne funkcjonalne elementy genomu. W artykule tym, na tle ogólnej charakterystyki polimorfizmu liczby kopii, przedstawiamy kilka przykładów wpływu tego polimorfizmu na fenotyp człowieka.

## WPROWADZENIE

Genom człowieka obejmuje blisko 3 miliardy nukleotydów. Ich charakterystyczny układ zawiera informację genetyczną, będącą wspólną cechą genomów wszystkich ludzi. Mimo tego podobieństwa, porównanie genomów reprezentujących różne ludzkie populacje, jak również bezpośrednie porównanie indywidualnych genomów nawet blisko spokrewnionych osób, wykazuje istnienie szeregu różnic, czyli polimorfizmu. To właśnie polimorfizm genetyczny w znacznym stopniu odpowiedzialny jest za zróżnicowanie w obrębie naszej populacji. Zróżnicowanie to dotyczy większości cech fenotypowych, takich jak wygląd zewnętrzny, poziom markerów biochemicznych czy stan zdrowia. Polimorfizm genetyczny może determinować występowanie chorób, modyfikować ich ryzyko, ostrość objawów, przebieg oraz reakcje na stosowane terapie. Polimorfizmy o bardzo niskiej częstości w populacji lub polimorfizmy o bardzo silnym oddziaływaniu na fenotyp nazywa się mutacjami.

Do niedawna sądzono, że główną przyczyną genetycznej zmienności w populacji ludzkiej jest polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP), który stanowi najpowszechniejszą formę polimorfizmu w genomie człowieka. Z tego powodu podjęto szereg wieloosrodkowych projektów (np. International HapMap Project, Programs for Genomic Applications NHLBI-PGA), zmierzających do dokładnego scharakteryzowania tego polimorfizmu w genomie człowieka [1,2]. Obecnie baza danych dbSNP zawiera ponad 11 milionów SNP w genomie człowieka [3], co odpowiada częstości ponad 1 SNP na 300 pz.

Analiza asocjacji setek tysięcy markerów SNP, doprowadziła w ostatnich latach do identyfikacji szeregu miejsc w genomie (*loci*), których polimorfizm związany jest z różnymi, powszechnie występującymi chorobami lub ich fenotypami składowymi (ang. *subphenotypes*). W przypadku fenotypów o charakterze ilościowym (np. wysokość, czy masa ciała), takie *loci* określa się mianem QTL (ang. *quantitative trait loci*). Przykładami największych osiągnięć w tym zakresie jest identyfikacja *loci*, których związek z takimi chorobami jak cukrzyca, choroby krążenia, astma czy rak płuca, piersi i prostaty, został potwierdzony w kilku różnych populacjach [4-8]. Pomimo tych osiągnięć, dotychczas wykryte sygnały asocjacji (markery SNP korelujące z chorobą) tłumaczą zaledwie niewielki procent (<5%) zmienności genetycznej badanych chorób, a w wielu przypadkach, pomimo wykrycia sygnału asocjacji, nie udało się zidentyfikować funkcjonalnych wariantów sekwencji, faktycznie modyfikujących ryzyko choroby.

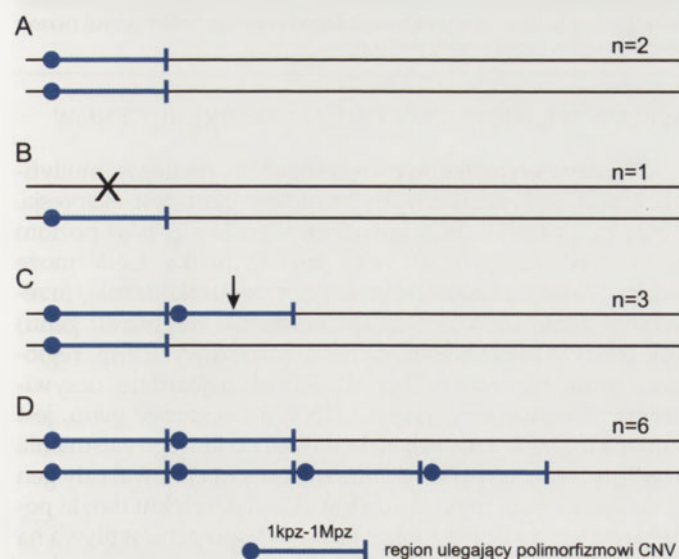
Nowe spojrzenie na polimorfizm genomu człowieka pojawiło się w 2004 roku, kiedy to w dwóch niezależnych pracach wykazano, że duże zmiany strukturalne mogą powszechnie występować w genomie człowieka [9,10]. Takie zmiany nazywane są zmiennością liczby kopii lub wariantami liczby kopii (CNV). Wcześniej, tak zdefiniowane warianty sekwencji znane były głównie,

jako mutacje utraty funkcji w genach związanych z chorobami człowieka.

## STRUKTURA I CHARAKTERYSTYKA POLIMORFIZMU LICZBY KOPII

Warianty liczby kopii definiowane są, jako segmenty DNA o wielkości od 1 kpz do kilku Mpz, w których zaobserwowano relatywne zwiększenie lub zmniejszenie liczby kopii w porównywanych genomach [11]. CNV mogą występować zarówno w postaci delekcji (Ryc. 1B), jak i insercji (Ryc. 1C). Większość insercji to duplikacje znanych fragmentów genomu. Takie duplikacje zwykle mają charakter bezpośrednich, tandemowych powtórzeń i często występują w formie powtórzeń wielokrotnych (Ryc. 1D). Część CNV ma charakter bardziej złożonych rearanżacji, często będących wynikiem wielokrotnych insercji, delekcji i inwersji. Dodatkowym typem zmian strukturalnych są inwersje i translokacje, które jednak nie prowadzą do zmiany liczby kopii.

Jako że miejsca pęknięć chromosomu (końce CNV) często występują w obrębie segmentowych duplikacji, zwanych również powtórzeniami o niskiej liczbie kopii LCR (ang. *low-copy repeat*), najczęściej dyskutowanym mechanizmem powstawania CNV jest niealleliczna rekombinacja homologiczna (NAHR) [12-14]. Segmentowe duplikacje definiuje się, jako długie (>10 kpz) odcinki DNA, występujące w genomie w kilku kopiach charakteryzujących się wysokim stopniem homologii (>95%). Odpowiednie umiejscowienie tych kopii może indukować NAHR, a tym samym prowadzić do powstawania delekcji lub duplikacji flankowanego przez segmentowe duplikacje odcinka DNA [15]. NAHR najczęściej zachodzi pomiędzy segmentowymi duplikacjami leżącymi w ramieniu tego samego chromosomu (zwykle w odległości <1 Mpz). Systematyczne badania przeprowadzone w skali całego genomu wykazały, że CNV występują około 4-krotnie częściej w rejonach o wielkości 50 kpz-10 Mpz, otoczonych przez segmentowe duplikacje [16]. Nie



Rycina 1. Najczęściej występujące typy polimorfizmu CNV. (A) Genotyp referencyjny – dwie kopie w diploidalnym genomie, (B) delekcja, (C) insercja (duplikacja), (D) polimorfizm liczby tandemowych powtórzeń. Niebieska pogrubiona linia reprezentuje polimorficzny region o zmiennej liczbie kopii.

wszystkie znane CNV można jednak wytłumaczyć indukowaną przez segmentowe duplikacje NAHR.

Więcej światła na mechanizm powstawania CNV rzuciły wyniki najnowszych badań, w których z wykorzystaniem masowego sekwencjonowania precyzyjnie (z nukleotydową rozdzielczością) zidentyfikowano pozycje setek CNV [17]. Badania te pokazały, że tylko 10-15% CNV może być wytłumaczonych mechanizmem NAHR. Końce pozostałych CNV (i) w około 50% wykazywały mikrohomologie (homologia odcinków DNA o długości 1-10 nt), (ii) w 10-15% zlokalizowane były w obrębie regionów o zmiennej liczbie tandemowych powtórzeń (VNTR, ang. *variable number tandem repeats*), (iii) w 30% zawierały krótsze lub dłuższe insercje, a (iv) w 5% były zakończone tępo (ang. *blunt ends*). Częste występowanie mikrohomologii w obrębie końców CNV sugeruje, że znacząca część CNV może powstawać w wyniku błędów replikacji polegających na uwolnieniu syntetyzowanej nici i przeniesieniu jej do innych widełek replikacyjnych, gdzie od miejsca wykazującego niewielką homologię kontynuowana jest replikacja. Proces ten określany jest mianem FoSTeS (ang. *replication fork stalling and template switching*) [18].

Prowadzone w wielu ośrodkach badania, pozwoliły na dokładniejsze poznanie strukturalnego polimorfizmu genomu człowieka i wykazały, że przynajmniej część polimorfizmów CNV ma charakter założycielski i cechuje się podobnymi właściwościami jak powszechne polimorfizmy SNP: dziedziczenie mendelowskie w rodzinie, dystrybucja w populacji zgodna z zasadą Hardy'ego-Weinberga, podobny jak SNP rozkład częstości, zakres nierównowagi sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium*, LD) oraz występowanie w tych samych haplotypach w różnych populacjach ludzkich [12,16,19,20].

## POLIMORFIZM LICZBY KOPII W GENOMIE CZŁOWIEKA

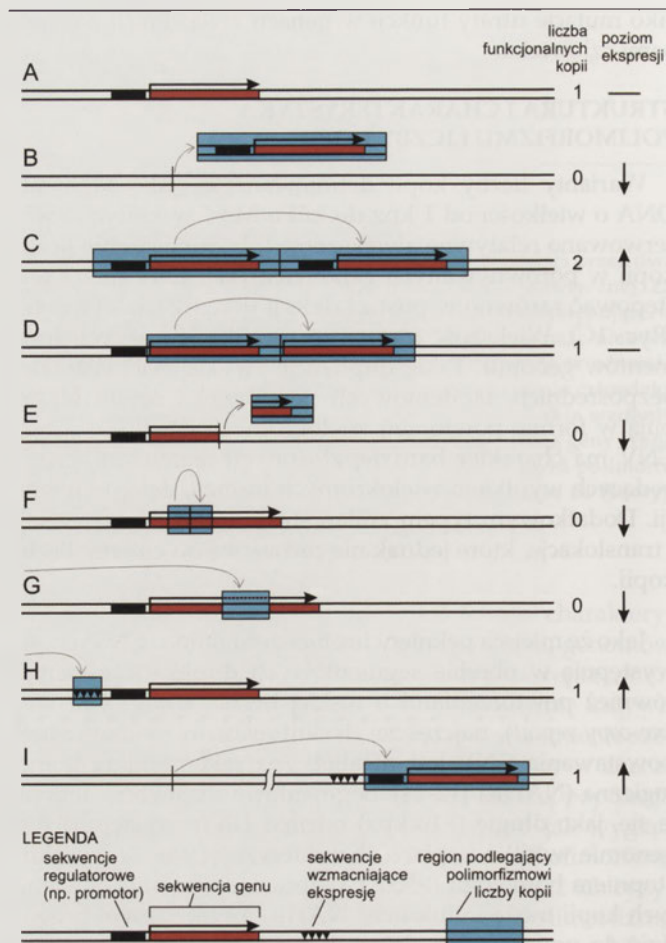
Zidentyfikowanie pojedynczych przypadków CNV spowodowało wzrost zainteresowania poznaniem struktury i funkcjonalnego znaczenia CNV w genomie człowieka. Dotychczas do identyfikacji CNV w skali całego genomu najczęściej wykorzystywano takie narzędzia jak: porównawcza hybrydyzacja genomowa do macierzy (aCGH) [13], mikromacierze SNP [19] czy analiza błędów dziedziczenia markerów SNP (w regionach CNV polimorfizmu SNP częściej wykazują niezgodność z równowagą Hardy'ego-Weinberga lub brak zgodności z zasadami dziedziczenia mendelowskiego) [21,22]. W przypadku zastosowania aCGH i mikromacierzy SNP, CNV identyfikowane są na podstawie porównania sygnałów hybrydyzacyjnych dwóch genomów, z których jeden traktowany jest jako genom referencyjny. Dodatkowo mikromacierze SNP pozwalają na identyfikację CNV w oparciu o wzory genotypów sąsiadujących ze sobą SNP. Przykładowo, nadreprezentacja (zgrupowanie) w określonym regionie genomu markerów SNP o genotypie homozygotycznym, sugeruje występowanie delekcji jednego allelu. Ostatnio do identyfikacji CNV zastosowano również technologię masowego sekwencjonowania [17,23]. Metodami, stosowanymi do charakterystyki pojedynczych CNV są: zależna od ligacji multipleksowa amplifikacja sond (MLPA) [24], ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR, ang. *quantitative PCR*) [25], fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

(FISH, ang. *fluorescence in situ hybridization*) oraz PRT (ang. *paralogue ratio test*) [26]. W metodzie MLPA liczba kopii badanego regionu genomu określana jest na podstawie intensywności sygnałów amplifikacji specjalnie przygotowanych sond, z których każda składa się z dwóch oligonukleotydów (pół-sond), rozpoznających bezpośrednio sąsiadujące sekwencje w genomie. Tylko pół-sondy prawidłowo rozpoznające sekwencje docelowe mogą podlegać ligacji, a sygnał ich amplifikacji jest proporcjonalny do liczby kopii badanego regionu w genomie [27,28]. FISH jest metodą cytogenetyczną, która umożliwia bezpośrednią obserwację badanych regionów genomu, rozpoznawanych przez wyznakowane fluorescencyjnie sondy. Chociaż metoda ta charakteryzuje się niską rozdzielczością, pozwala ona nie tylko na określenie liczby kopii badanego regionu, ale również na określenie jego orientacji i pozycji w genomie. Metoda PRT, która została zastosowana do analizy genu *DEFB4*, polega na porównaniu intensywności sygnałów amplifikacji fragmentów genu, podlegającego zmienności liczby kopii oraz niepolimorficznych paralogów tego genu [26].

Zastosowanie wyżej wymienionych metod pozwoliło na identyfikację tysięcy wariantów CNV w różnych populacjach ludzkich. Przykładowo, Redon i wsp., z wykorzystaniem aCGH i mikromacierzy SNP, zidentyfikowali 1447 regionów CNV w czterech populacjach z Europy, Afryki i Azji [19]. Sumaryczna długość tych regionów wynosi 360 Mbp, co stanowi około 12% całkowitej długości genomu człowieka. Do tej pory w największej bazie danych polimorfizmu strukturalnego (Database of Genomic Variants, DGV) zgromadzono informacje o ponad 14 tys. regionów CNV, obejmujących około 30% genomu człowieka. Prawdopodobnie jednak, przynajmniej część z opisanych polimorfizmów CNV jest fałszywie pozytywnymi artefaktami lub reprezentuje bardzo rzadkie, „prywatne” warianty sekwencji. Wyniki ostatnich prac uzyskane za pomocą metod umożliwiających dokładne mapowanie końców CNV i precyzyjne genotypowanie poszczególnych CNV [13,29], pozwalają oszacować, że częsty (>1%) polimorfizm typu CNV obejmuje około 10% genomu człowieka.

#### ZWIĄZEK CNV Z FENOTYPEM CZŁOWIEKA

Chociaż wielokrotnie wykazano, że CNV (szczególnie delecje) częściej występują w regionach genomu o małym lub nieznanym znaczeniu funkcjonalnym, to jednak w obrębie znanych regionów CNV znajdują się setki ważnych, funkcjonalnych elementów genomu (np. geny kodujące białka). Przykładowo, w obrębie CNV zidentyfikowanych przez Redon i wsp. znajduje się blisko 3 tys. genów kodujących białka, w tym 285 genów związanych z chorobami człowieka, zaklasyfikowanych do bazy danych OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Ponadto w regionach tych zlokalizowanych jest wiele innych, funkcjonalnych (lub potencjalnie funkcjonalnych) elementów genomu, w tym 50 sekwencji ultrakonserwatywnych, ponad 130 tys. zachowawczych elementów niekodujących oraz 67 sekwencji niekodujących RNA [19]. W innych badaniach, w wysoce polimorficznych obszarach CNV zidentyfikowano ponad 600 genów [13]. Takie CNV mogą wpływać na poziom ekspresji oraz funkcje genów i innych elementów funkcjonalnych, znajdujących się w ich obrębie.



Rycina 2. Wpływ polimorfizmu CNV na strukturę i funkcję genu. (A) Allel referencyjny z jedną funkcjonalną kopią genu. (B) Delecja genu powoduje zmniejszenie liczby funkcjonalnych kopii genu (zmniejszenie dawki genu). (C) Insercja (duplikacja) genu wraz z regionem regulatorowym, powoduje zwiększenie liczby funkcjonalnych kopii genu (zwiększenie dawki genu). (D) Duplikacja genu bez regionu regulatorowego nie powoduje zmiany liczby funkcjonalnych kopii genu (dawka genu pozostaje bez zmian). (E, F i G) Delecje lub insercje fragmentów genu prowadzące do uszkodzenia struktury genu. Większość tego typu wariantów sekwencji prowadzi do utraty funkcji genu (zmniejszenie dawki genu). (H) Translokacja/duplikacja sekwencji regulatorowej wzmacniającej ekspresję w pobliżu genu (wzrost poziomu ekspresji bez zmiany dawki genu). (I) Translokacja genu w pobliżu sekwencji wzmacniającej ekspresję - efekt pozycji (wzrost poziomu ekspresji bez zmiany dawki genu).

#### WPLYW POLIMORFIZMU CNV NA EKSPRESJĘ GENÓW

Podstawowym fenotypem, mogącym podlegać modyfikacji pod wpływem zmiany struktury genu jest ekspresja, która na poziomie molekularnym wyraża się, jako poziom transkrybowanego RNA oraz poziom białka. CNV może oddziaływać na ekspresję genu poprzez: uszkodzenie/przerwanie genu, efekt pozycji (przeniesienie fragmentu genu) lub modyfikowanie elementów regulatorowych (np. regionów promotorowych) (Ryc. 2). Jednak najbardziej oczywistym mechanizmem wpływu CNV na ekspresję genu, jest zmiana liczby kopii, czyli efekt dawki, do którego zaistnienia niezbędne jest, aby region polimorficzny obejmował cały gen wraz z regionem regulatorowym. Zjawisko efektu dawki polega na tym, że liczba funkcjonalnych kopii genu wpływa na poziom jego transkryptu (mRNA), a tym samym na poziom kodowanego przez ten gen białka (Ryc. 3). Efekt dawki został potwierdzony dla wielu CNV, zarówno na poziomie transkryptu, jak i na poziomie białka [30-34].



## Liczba kopii koreluje z poziomem ekspresji wielu genów

W celu kompleksowego zbadania, w jaki sposób CNV wpływa na ekspresję genów kodujących białka, porównano ekspresję (poziom transkryptu mRNA) ponad 14000 genów z liczbą kopii ponad 1300 najlepiej potwierdzonych regionów CNV w czterech populacjach ludzkich. Znaczącą korelację między CNV a poziomem mRNA zaobserwowano dla 99 genów. Dla blisko połowy tych genów, leżących w obszarach polimorficznych, wpływ CNV na ekspresję wynikał najprawdopodobniej z efektu dawki (pozytywna korelacja). Pozostałe geny albo leżały poza obszarem polimorficznym, z którym korelował poziom ich ekspresji albo ich ekspresja wykazywała negatywną korelację z liczbą kopii zasocjowanego polimorfizmu. Sugeruje to, że zmienne poziomy ekspresji tych genów nie były skutkiem efektu dawki, ale wynikały z innych form oddziaływania CNV na ekspresję, np. uszkodzenia struktury genów, efektu pozycji, czy oddziaływania na sekwencje regulujące ekspresję genów [35]. Bardziej szczegółowe badania, w których porównano poziomy transkrypcji kilku genów, leżących w obrębie delecyjnych polimorfizmów CNV, wykazały, że obserwowane różnice w ekspresji tych genów w znacznym stopniu korelowały z liczbą kopii. Zmienność poziomu mRNA w 26–88% wynikała ze zmienności dawki (liczby kopii) poszczególnych genów. Zmniejszenie liczby kopii badanych genów o jeden powodowało obniżenie poziomu mRNA o 30–38% [21]. W innych badaniach oszacowano, że zróżnicowanie ekspresji (poziomu mRNA) genów leżących w obrębie CNV w około 50% wynika ze zmienności liczby kopii tych genów [36].

Wpływ CNV na poziom mRNA sugeruje, że zmiana liczby kopii może również modyfikować poziom powstającego w procesie translacji białka. W literaturze przedstawiono kilka przykładów pozytywnej korelacji między liczbą kopii genów a poziomem kodowanych przez te geny

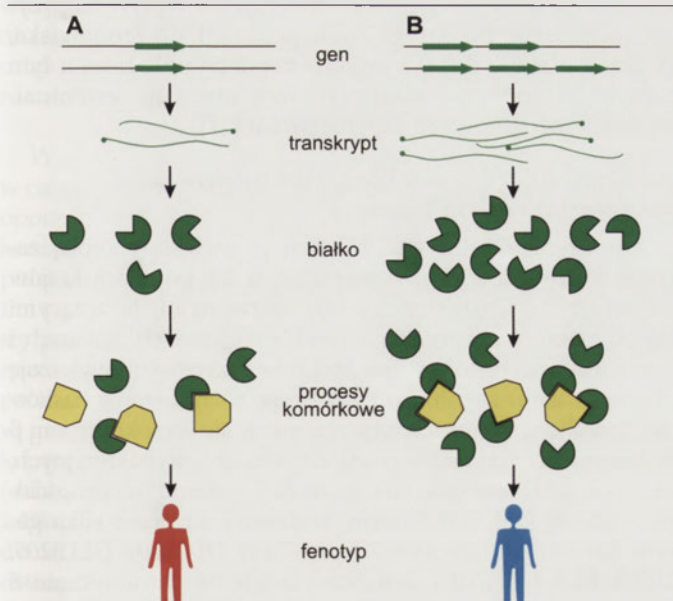
białek [31,33,36–38]. Przykładem takiej korelacji jest CNV genu *FCGR3B*, znajdującego się na chromosomie 1 (1q23.3). Gen *FCGR3B* koduje receptor FcγRIIIb występujący na powierzchni komórek układu odpornościowego człowieka (głównie neutrofilów, czyli granulocytów obojętnochłonnych), który umożliwia im przyleganie do powierzchni pokrytych immunoglobulinami G (IgG) podczas wtórnej odpowiedzi immunologicznej. Przeprowadzone badania wykazały, że liczba receptorów FcγRIIIb na powierzchni neutrofilów pozytywnie koreluje z liczbą kopii genu *FCGR3B*. Ponadto u osób z wyższą liczbą kopii genu *FCGR3B* obserwowano cztery razy wyższy poziom adhezji neutrofilów do powierzchni pokrytych przeciwciałami IgG [38]. W innych badaniach obserwowano różnice w poziomach hormonów steroidowych, które wynikały z liczby kopii genu *UGT2B17*, kodującego enzym UDP-glukuronozylotransferazę, biorący udział w inaktywacji hormonów steroidowych [33].

Jednak nie zawsze zmiana liczby kopii genu musi prowadzić do zmiany poziomu jego ekspresji [35]. Przykładem takiego polimorfizmu jest CNV, w obrębie którego znajduje się gen *OPN1MW*. Gen ten koduje światłoczuły barwnik – opsynę, obecną w czopkach siatkówki oka, które odpowiedzialne są za widzenie barw. Pojedynczy allel (chromosom X) zawiera zwykle od 1 do 3 kopii genu *OPN1MW*. Obserwowany brak korelacji między liczbą kopii a poziomem ekspresji genu *OPN1MW* może wynikać z faktu, iż region polimorficzny obejmuje wyłącznie sekwencję genu, natomiast nie obejmuje regionu regulatorowego, zlokalizowanego 40 kbp powyżej tego genu. W związku z tym, bez względu na całkowitą liczbę kopii, tylko pierwsza kopia genu *OPN1MW* jest kopią funkcjonalną, kolejne, z powodu zbyt dużego dystansu od regionu regulatorowego, nie ulegają ekspresji [39,40].

CVN genów mikroRNA może mieć istotny udział w modyfikacji fenotypu człowieka

Jak już wcześniej wspomniano, polimorfizm liczby kopii może modyfikować nie tylko ekspresję genów kodujących białka, ale również sekwencje regulatorowe, m.in. niekodujące RNA, w tym mikroRNA. MikroRNA (miRNA) są to krótkie, jednoniciowe cząsteczki RNA (~21 nt), regulujące ekspresję genów na poziomie translacji, poprzez, nie w pełni komplementarne, oddziaływanie miRNA z regionem 3'UTR cząsteczek mRNA. Szacuje się, że u człowieka występuje około 1000 różnych miRNA, regulujących ekspresję przynajmniej 30% genów.

Autorzy niniejszego artykułu przeprowadzili badania, mające na celu identyfikację genów miRNA, leżących w polimorficznych obszarach CNV (CNV-miRNA, ang. *copy number variable microRNA genes*). W badaniach tych porównano lokalizację wszystkich znanych genów miRNA z lokalizacją znanych CNV [60]. Porównanie to pozwoliło na identyfikację 209 miRNA, z których 11 zlokalizowanych jest w grupie wysokopolimorficznych CNV. Wśród zidentyfikowanych CNV-miRNA występują: delecje (np. hsa-mir-384, hsa-mir-1324), duplikacje (np. hsa-mir-1972, hsa-mir-1977) i wielokrotne duplikacje (np. hsa-mir-1233, hsa-mir-1268), a liczba kopii tych miRNA waha się od 0 do 8. Dodatkowo, porównanie frakcji genomu objętej polimorfizmem CNV oraz frakcji miRNA zlokalizowanych w tych regionach, po-



Rycina 3. Wpływ polimorfizmu CNV na fenotyp za pośrednictwem efektu dawki. Porównanie efektu dwóch kopii genu (A) i zwiększonej liczby (5) kopii tego genu (B). Polimorfizm CNV zmienia liczbę funkcjonalnych kopii genu, co z kolei ma wpływ na poziom transkryptu oraz poziom kodowanego przez ten gen białka. Zmiana poziomu białka wpływa na regulowane przez to białko procesy komórkowe, co w konsekwencji może prowadzić do modyfikacji fenotypu człowieka.

zwoliło ustalić, że geny miRNA występują rzadziej w rejonach podlegających częstemu polimorfizmowi liczby kopii. Wynik ten sugeruje, że CNV podlegają negatywnej selekcji w regionach występowania genów miRNA, co potwierdza funkcjonalny charakter tych ostatnich.

Zmienność liczby kopii genów miRNA, poprzez efekt dawki, może modyfikować poziom dojrzałych miRNA, które z kolei mogą mniej lub bardziej efektywnie wyciszać translację białek z docelowych cząsteczek mRNA. Zmiana poziomu białka może mieć wpływ na szereg modyfikowanych przez te białka procesów/fenotypów. Funkcje wielu miRNA, zidentyfikowanych jako CNV-miRNA, zostały wcześniej powiązane z różnymi ważnymi fenotypami człowieka. Wśród fenotypów tych występują m.in.: męska niepłodność (hsa-mir-383) [41], odrzucanie przeszczepów (hsa-mir-142) [42], czy stwardnienie rozsiane (hsa-mir-1275) [43]. W szeregu prac wykazano również, że zidentyfikowane CNV-miRNA mogą odgrywać ważną rolę w kancerogenezie [44-47].

#### PRZYKŁADY WPLYWU POLIMORFIZMU CNV NA FENOTYP CZŁOWIEKA

W związku z tym, że polimorfizm CNV może modyfikować poziom ekspresji genów, można założyć, że będzie on również ważnym czynnikiem modyfikującym fenotyp człowieka, zarówno w stanie normy i w stanach chorobowych. Poniżej zostanie opisanych kilka przykładów związku polimorfizmu CNV z fenotypem człowieka.

Polimorfizm CNV modyfikuje przystosowanie do zmiennych warunków środowiskowych

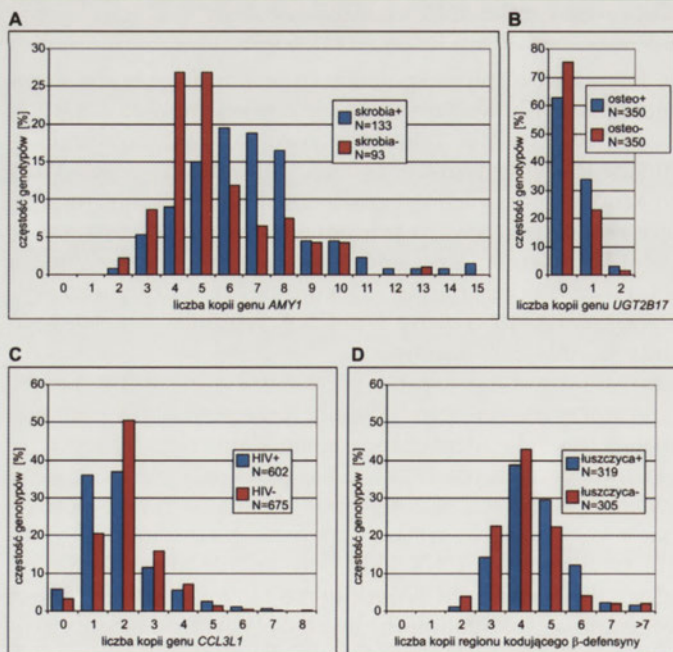
Przykładem genu, którego CNV modyfikuje fenotyp w sposób pozwalający na przystosowanie populacji do śro-

dowiska, jest gen *AMY1* (1p21.1) [31]. Gen *AMY1* koduje amylazę, enzym obecny w ślinie i soku trzustkowym, który odpowiedzialny jest za hydrolizę skrobi i innych wielocukrów. Gen *AMY1* znajduje się w obrębie CNV, którego liczba kopii różni się znacząco zarówno między poszczególnymi osobami jak i między różnymi populacjami. Liczba kopii genu *AMY1* w diploidalnym genomie człowieka może wynosić od dwóch do nawet 15. Analiza liczby kopii genu *AMY1* (analiza qPCR) oraz ilości amylazy w ślinie (analiza Western blot) u 50 osób pochodzenia europejskiego, ujawniła pozytywną korelację ( $R^2=0.351$ ;  $P<0.0001$ ) między liczbą kopii *AMY1* a poziomem amylazy w ślinie [31]. Jako że efektywność trawienia skrobi, na którą wpływa aktywność amylazy, jest czynnikiem mogącym podlegać różnicowanej selekcji w różnych populacjach, podjęto badania mające na celu porównanie liczby kopii genu *AMY1* między populacjami różniącymi się pod względem stosowanej diety. Badania przeprowadzono na grupie 133 osób z trzech populacji tradycyjnie stosujących dietę wysokoskrobiową (społeczeństwa rolnicze oraz zbieracze, których dieta oparta jest o korzenie i bulwy) oraz na grupie 93 osób z czterech populacji tradycyjnie stosujących dietę o niskiej zawartości skrobi (społeczeństwa zamieszkujące lasy deszczowe, jedzące dużo owoców oraz populacje północne, których podstawą żywienia są zwierzęta hodowlane i ryby). Przeprowadzona analiza wykazała, że osoby z populacji tradycyjnie spożywających dużo produktów skrobiowych miały średnio więcej (6,7) kopii genu *AMY1* w diploidalnym genomie niż osoby z populacji o niskiej konsumpcji skrobi (średnio 5,4) [31] (Ryc. 4A).

Istnienie różnicy w liczbie kopii *AMY1* i poziomie amylazy między poszczególnymi populacjami potwierdziło hipotezę, że w populacjach o diecie wysokoskrobiowej dobór naturalny faworyzował większą liczbę kopii genu *AMY1*, a tym samym wyższy poziom amylazy. W tym przypadku, zależna od CNV modyfikacja fenotypu ma wpływ na przystosowanie się poszczególnych populacji do środowiska, poprzez ułatwienie trawienia dostępnego pokarmu, a tym samym złagodzenie niekorzystnych objawów ewentualnych chorób jelitowych (np. biegunki) [31].

Polimorfizm CNV genów kodujących  $\beta$  defensyny zwiększa ryzyko łuszczycy

Łuszczycza (OMIM #177900) jest przewlekłą chorobą zapalną skóry człowieka, występującą u 2% populacji krajów rozwiniętych. Charakteryzuje się czerwonymi, łuszczącymi się plamami, występującymi zwykle na łokciach, kolanach i torsie. Badania histologiczne zmian łuszczycowych wykazują obecność stanu zapalnego i zakłócone różnicowanie naskórka. Ponadto w zmianach tych obserwuje się wysoki poziom  $\beta$  defensyn, małych białek o właściwościach antybakteryjnych, które odgrywają ważną rolę w inicjacji systemu odpornościowego skóry [36].  $\beta$  defensyny kodowane są przez kilka genów (*DEFB1*, *DEFB4*, *SPAG11*, *DEFB103*, *DEFB104*, *DEFB105*, *DEFB106* i *DEFB107*) zlokalizowanych na chromosomie 8 (8p23.1). Wszystkie te geny, z wyjątkiem *DEFB1*, znajdują się w dużym, powtórzonem regionie, obejmującym około 300 kpz, który w różnych populacjach ludzkich występuje zwykle w 2 do 7 kopiach w diploidalnym genomie. Spotykane są jednak genotypy zawierające nawet 12 kopii tego regionu (Ryc. 4D). W związku z antybakteryjnymi i prozapalnymi



**Rycina 3.** Wpływ polimorfizmu CNV na fenotyp za pośrednictwem efektu dawki. Porównanie efektu dwóch kopii genu (A) i zwiększonej liczby (5) kopii tego genu (B). Polimorfizm CNV zmienia liczbę funkcjonalnych kopii genu, co z kolei ma wpływ na poziom transkryptu oraz poziom kodowanego przez ten gen białka. Zmiana poziomu białka wpływa na regulowane przez to białko procesy komórkowe, co w konsekwencji może prowadzić do modyfikacji fenotypu człowieka.

właściwościami  $\beta$  defensyn, wnioskując się, że zmiana liczby kopii kodujących je genów może modyfikować ryzyko zapadalności na choroby infekcyjne i zapalne, m.in. łuszczycę. W przeprowadzonych badaniach asocjacji typu *case-control*<sup>1</sup> porównano liczbę kopii genów  $\beta$  defensyn u chorych na łuszczycę oraz w odpowiednio dobranych próbkach kontrolnych z Niemiec i Holandii [36]. Wykonane analizy pokazały, że liczba kopii genów  $\beta$  defensyn w grupach chorych na łuszczycę jest wyższa (średnio 4,51 i 4,54, odpowiednio w populacji niemieckiej i holenderskiej) w porównaniu z grupami osób zdrowych (4,14 i 4,18) ( $t$ -test,  $p=2,95 \times 10^{-5}$  i  $p=1,65 \times 10^{-6}$ ). Oszacowano, że każda dodatkowa kopia (powyżej 2) grupy genów  $\beta$  defensyn, zwiększa relatywne ryzyko zachorowania na łuszczycę o około 34%. Wynika to najprawdopodobniej z efektu dawki jednego, kilku lub wszystkich genów  $\beta$  defensyn w regionie polimorficznym. Wyższa liczba kopii powoduje zwiększoną ekspresję  $\beta$  defensyn, a te z kolei intensywniej stymulują keratynocyty do uwalniania szeregu interleukin, które mają właściwości prozapalne. To prowadzi do podwyższenia podstawowego poziomu czynników zapalnych, zwiększając ryzyko wystąpienia łuszczycy. W związku z tym, że region polimorficzny obejmuje kilka genów  $\beta$  defensyn, trudno jednak jednoznacznie określić, efekt którego genu (lub genów) jest związany z ryzykiem łuszczycy [36].

Polimorfizm CNV genu *UGT2B17* modyfikuje ryzyko osteoporozy

Osteoporoza (OMIM #166710) to najpowszechniejsza choroba kości charakteryzująca się występowaniem szeregu fenotypów składowych: niską gęstością mineralną kości (BMD, ang. *bone mineral density*), osłabieniem struktury przestrzennej kości (zmniejszeniem grubości kory kości (CT, ang. *cortical thickness*) i podwyższeniem wskaźnika odkształcenia (BR, ang. *buckling ratio*) oraz występowaniem złamań osteoporotycznych (OF, ang. *osteoporotic fracture*). Chociaż wszystkie powyższe fenotypy składowe w znacznym stopniu determinowane są przez czynniki genetyczne, do tej pory udało się zidentyfikować zaledwie kilka genów lub SNP, które mogą zwiększać ryzyko rozwoju osteoporozy.

W związku z powyższym, przeprowadzono analizę CNV w całym genomie w grupie 350 osób ze zdiagnozowaną osteoporozą oraz w grupie 350 odpowiednio dobranych osób kontrolnych (niewykazujących symptomów choroby) z populacji chińskiej. Analiza asocjacji w badaniach typu *case-control* wszystkich zidentyfikowanych CNV ujawniła jeden cząsty polimorfizm delecyjny w *locus* 4q13.2, który wykazywał znaczące różnice w rozkładzie genotypów w badanych grupach. Częstość obserwowanych genotypów w *locus* 4q13.2 w grupie badanej oraz kontrolnej wynosiła odpowiednio: 0 kopii (delecje homozygotyczne) 62,9% i 75,5%, jedna kopia (delecje heterozygotyczne) 34% i 23,1% oraz 2 kopie 3,1% i 1,4% (Ryc. 4B). Wyniki te pokazują, że posiadanie jednej lub dwóch kopii tego regionu, zwiększa ryzyko wystąpienia osteoporozy w porównaniu do osób nieposiadających żadnej kopii tego regionu (iloraz szans  $OR=1,73$ ,  $p=2,0 \times 10^{-4}$ ). Powyższe wyniki zostały potwierdzone również w innych badaniach typu *case-control*, zarówno w innych populacjach azjatyckich jak i w populacji europejskiej [33].

<sup>1</sup>W polskiej literaturze naukowej takie badania określa się często jako badania kliniczno-kontrolne.

Chociaż w *locus* 4q13.2 znajduje się pięć genów (*UGT2B17*, *YTHDC1*, *TMPRSS11E*, *TMPRSS11E2* i *UGT2B15*), dokładna analiza wykazała, że polimorfizm CNV obejmuje region 150 kbp i obejmuje tylko gen *UGT2B17* [33]. W dalszych badaniach przeanalizowano więc asocjację polimorfizmu genu *UGT2B17* w *locus* 4q13.2 z poszczególnymi fenotypami składowymi w patogenezie osteoporozy. Wyniki analiz w populacji chińskiej i europejskiej wyraźnie wskazały, że liczba kopii genu negatywnie koreluje z fenotypami BMD oraz CT, natomiast pozytywnie koreluje z fenotypem BR [33]. Z powyższych analiz wynika, że wpływ liczby kopii genu *UGT2B17* na ryzyko osteoporozy odbywa się poprzez modyfikację fenotypów składowych związanych z metabolizmem i strukturą kości.

Analiza funkcji genu *UGT2B17* pozwoliła na ustalenie mechanistycznego związku między liczbą kopii tego genu a ryzykiem wystąpienia osteoporozy. Gen *UGT2B17* koduje enzym z grupy UDP-glukuronylotransferaz, który odgrywa kluczową rolę w utrzymywaniu homeostazy i metabolizmie wielu endogennych molekuł, w tym hormonów steroidowych [48]. Niektóre z tych hormonów, androgeny i ich pochodne estrogeny, odgrywają znaczącą rolę w utrzymywaniu integralności kości gąbczastej i mają właściwości stymulujące formowanie kości. Wykazano, że wyższa liczba kopii genu *UGT2B17* powoduje podwyższenie poziomu syntezy enzymu inaktywującego androgeny, a w konsekwencji obniżenie poziomu hormonów steroidowych (testosteron, estradiol). To z kolei zwiększa ryzyko osteoporozy w wyniku nieprawidłowego formowania lub wzmożonej resorpcji kości [33].

Wyższa liczba kopii genu chemokiny *CCL3L1* obniża ryzyko infekcji wirusem HIV

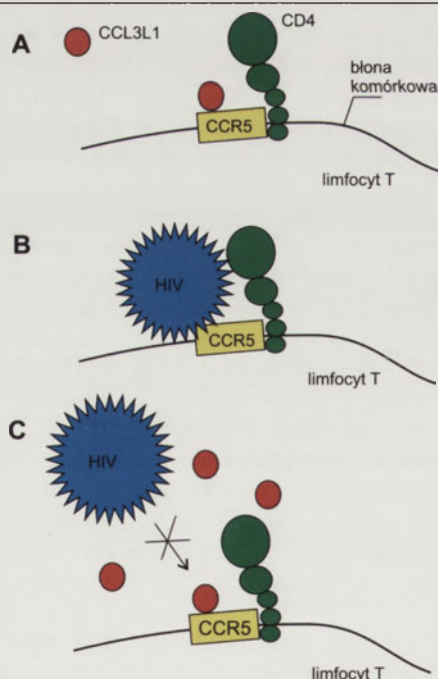
Wirus HIV czyli wirus niedoboru odporności człowieka (ang. *human immunodeficiency virus*), to wirus, który atakuje głównie limfocyty T-pomocnicze i wywołuje zespół nabytego niedoboru odporności, czyli AIDS (OMIM #609423). Przebieg zakażenia wirusem HIV jest wynikiem oddziaływania między czynnikami wirusowymi (poziom wirerii, wirulencja, zdolność transmisji, tropizm komórkowy wirusa) oraz czynnikami zależnymi od gospodarza, które w znacznym stopniu determinowane są genetycznie [49]. Jednym z takich czynników jest polimorfizm CNV na chromosomie 17. Polimorfizm ten obejmuje dwa geny: *CCL3L1* i *CCL4L1*, które kodują chemokiny *CCL3L1* i *CCL4L1*. Głównym receptorem chemokiny *CCL3L1* jest receptor CCR5. Ze wszystkich znanych ligandów receptora CCR5, chemokina *CCL3L1* wykazuje do niego największe powinowactwo. Jednocześnie receptor CCR5 wraz z koreceptorem CD4 jest miejscem rozpoznawania przez wirusa HIV, które umożliwia integrację i wnikanie wirusa do komórki [50].

Liczba kopii genu *CCL3L1* wykazuje dużą zmienność zarówno w obrębie populacji, jak i między populacjami. Analiza CNV genu *CCL3L1* u 1064 osób pochodzących z 57 różnych populacji pozwoliła na identyfikację genotypów zawierających od 0 do 14 kopii tego genu. Jednocześnie wykazano, że populacje afrykańskie charakteryzują się znacznie większą średnią liczbą kopii genu *CCL3L1* (średnio 6 kopii) niż populacje nieafrykańskie. Przykładowo, populacje europejskie (np. Hiszpanie, Francuzi) mają średnio dwie kopie, populacje centralno- i południowoazjatyckie mają średnio trzy kopie, a populacje wschodnioazjatyckie (np. Japończy-

cy, Chińczycy) i amerykańskie (np. Kolumbijczycy) mają średnio cztery kopie genu *CCL3L1*. Ustalono że, geograficzny region zamieszkiwania lub pochodzenia badanych osób tłumaczy blisko 35% zmienności rozkładu liczby kopii genu *CCL3L1* w populacjach ludzkich [37].

Podjęte badania typu *case-control* osób zakażonych HIV (HIV<sup>+</sup>) oraz osób niezakażonych (HIV<sup>-</sup>), pochodzących z czterech różnych populacji ludzkich wykazały, że we wszystkich tych populacjach średnia liczba kopii genu *CCL3L1* była wyższa u osób zdrowych niż u nosicieli wirusa HIV (Ryc. 4C). Wynik ten sugeruje, że wyższa liczba kopii genu *CCL3L1* może mieć działanie ochronne, zmniejszające ryzyko zakażenia wirusem HIV. Oszacowano, że każda dodatkowa kopia tego genu obniża ryzyko zakażenia wirusem HIV o 4,5–10%. Wynika to najprawdopodobniej z efektu dawki genu *CCL3L1*. Zwiększenie liczby kopii *CCL3L1*, wpływa na zwiększoną syntezę chemokiny CCL3L1, która jako ligand o wysokim powinowactwie, konkuruje z wirusem HIV o dostęp do receptora CCR5, tym samym utrudnia wiązanie wirusa do receptora, co w konsekwencji zmniejsza szanse infekcji i ryzyko zakażenia wirusem HIV (Ryc. 5). Dalsze badania wykazały, że liczba kopii genu *CCL3L1* wpływa nie tylko na obniżenie ryzyka infekcji wirusem HIV, ale również na przebieg choroby. Analiza liczby kopii genu *CCL3L1* u nosicieli wirusa HIV wykazała, że osoby z wyższą liczbą kopii tego genu, później rozwijały pełne objawy AIDS oraz wykazywały niższą śmiertelność w badanych przedziałach czasowych [37].

Wyższa liczba kopii genu *CCL3L1*, a tym samym wyższy poziom chemokiny CCL3L1, zmniejsza ryzyko infekcji wirusem HIV oraz prawdopodobnie innych chorób infekcyjnych. Jednak te same allele (wyższa liczba kopii genu



Rycina 5. Wpływ poziomu chemokiny CCL3L1 na efektywność infekcji wirusa HIV. (A) Chemokina CCL3L1 jest ligandem wykazującym największe powinowactwo do receptora CCR5, znajdującego się na powierzchni limfocytów pomocniczych T. (B) Receptor CCR5 wraz z koreceptorem CD4 jest miejscem rozpoznawanym przez wirusa HIV, które umożliwia integrację i wnikanie wirusa do komórki. (C) Zwiększony, w wyniku efektu dawki, poziom chemokiny CCL3L1 utrudnia dostęp wirusa HIV do receptora CCR5, a tym samym zmniejsza ryzyko infekcji.

*CCL3L1*) zwiększają ryzyko wystąpienia chorób zapalnych i autoimmunologicznych. Podobne zjawisko obserwuje się także w przypadku innych polimorfizmów, których allele obniżają ryzyko chorób infekcyjnych. Podjęte badania typu *case-control* wykazały, że osoby z wyższą liczbą kopii genu *CCL3L1* mają większe ryzyko wystąpienia ostrej choroby zapalnej Kawasaki [51] oraz dwóch chorób autoimmunologicznych: reumatoidalnego zapalenia stawów (RA, ang. *rheumatoid arthritis*) [52] i układowego toczenia rumieniowatego (SLE, ang. *systemic lupus erythematosus*) [53].

Polimorfizm CNV genu *CYP2D6* wpływa na szybkość metabolizmu wielu leków

Innym przykładem wpływu polimorfizmu na fenotyp człowieka jest modyfikacja metabolizmu leków. Zmienność indywidualnej zdolności metabolizowania leków może mieć daleko idące konsekwencje, zarówno w kontekście toksyczności leków, jak również ich skuteczności w leczeniu. W metabolizmie leków znaczną rolę odgrywa cytochrom P450, katalizujący rozkład leków. P450 występuje w wielu formach izoenzymatycznych (szerzej opisanych w [54]), z których najważniejsze to CYP3A4 oraz CYP2D6 [55]. Enzym CYP2D6 jest zaangażowany w metabolizm 20-25% zatwierdzonych obecnie leków [56], w tym leków antydepresyjnych, przeciwbólowych, leków usuwających nudności, neuroleptycznych, leków przeciw arytmiom serca oraz leków przeciwnowotworowych (np. tamoxifen) [57].

Gen kodujący enzym CYP2D6 (*CYP2D6*) zlokalizowany jest na chromosomie 22 (22q13.2) i występuje u człowieka w różnej liczbie tandemowych powtórzeń [58]. Liczba kopii (powtórzeń) genu *CYP2D6* w diploidalnym genomie waha się od jednego do nawet 12. Wykazano, że liczba funkcjonalnych kopii genu *CYP2D6* wpływa na poziom jego ekspresji, a ta z kolei jest silnie skorelowana z szybkością metabolizowania leków. Osoby nieposiadające funkcjonalnych kopii genu *CYP2D6*, należą do grupy charakteryzującej się wolnym metabolizmem leków (PM, ang. *poor metabolizers*). W przeciwieństwie do nich, osoby posiadające dużą liczbę kopii genu *CYP2D6* (więcej niż 4 w diploidalnym genomie) charakteryzują się fenotypem bardzo szybkiego metabolizmu leków (UM, ang. *ultra-rapid metabolizers*). Fenotyp ten związany jest z brakiem odpowiedzi na terapię przy standardowych dawkach leków. Dodatkowym czynnikiem modyfikującym powyższe zależności, są mutacje punktowe, wpływające na poziom ekspresji i funkcjonalność poszczególnych kopii genu *CYP2D6* [59].

Poza dużym zróżnicowaniem osobniczym, średnia liczba kopii genu *CYP2D6*, a tym samym efektywność metabolizmu leków, różni się znacząco także między różnymi ludzkimi populacjami. Przykładowo, 30% populacji etiopskiej czy populacji saudyjskiej charakteryzuje się fenotypem UM, co koreluje z częstym występowaniem w tej populacji alleli zawierających 2, 3, 4 czy nawet 5 funkcjonalnych kopii genu *CYP2D6* i jednoczesnym brakiem w tej populacji osób nieposiadających ani jednej funkcjonalnej kopii tego genu. W przeciwieństwie do populacji wymienionych powyżej, fenotyp UM występuje bardzo rzadko w populacjach północno-europejskich i praktycznie nie występuje w populacjach azjatyckich, co koreluje z bardzo niską częstością alleli, zawierających więcej niż jedną kopię genu *CYP2D6* w tych populacjach [57,59].

## PODSUMOWANIE

Polimorfizm liczby kopii w genomie człowieka jest intensywnie badanym zjawiskiem w wielu ośrodkach naukowych. Wymienione w niniejszej pracy przykłady związków tego polimorfizmu z fenotypem człowieka, to zaledwie kilka spośród obecnie znanych. Dotychczas prowadzone badania, identyfikujące coraz to nowsze CNV i ich wpływ na fenotyp człowieka, są jednak w znacznym stopniu ograniczone przez brak odpowiednich metod, pozwalających na precyzyjne określenie liczby kopii pojedynczych CNV w indywidualnych próbkach. Pewne nadzieje w tym zakresie można wiązać z zastosowaniem do genotypowania CNV metod masowego sekwencjonowania. Chociaż wiedza dotycząca udziału polimorfizmu CNV w zmienności fenotypu człowieka jest jeszcze niepełna, to jednak już teraz można stwierdzić, że polimorfizm liczby kopii jest istotnym czynnikiem modyfikującym nasz fenotyp.

## PIŚMIENNICTWO

1. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, Boudreau A, Hardenbol P, Leal SM et al (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449: 851-861
2. Lee K, Kohane IS, Butte AJ (2003) PGAGENE: integrating quantitative gene-specific results from the NHLBI programs for genomic applications. *Bioinformatics* 19: 778-779
3. Sherry ST, Ward M, Sirotkin K (1999) dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome Res* 9: 677-679
4. Weiss ST, Raby BA (2004) Asthma genetics 2003. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1: R83-89
5. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, Struwing JP, Morrison J, Field H, Luben R et al (2007) Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447: 1087-1093
6. Wang Y, Broderick P, Webb E, Wu X, Vijaykrishnan J, Matakidou A, Qureshi M, Dong Q, Gu X, Chen WV, Spitz MR, Eisen T, Amos CI, Houlston RS (2008) Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. *Nat Genet* 40: 1407-1409
7. Doria A, Patti ME, Kahn CR (2008) The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. *Cell Metab* 8: 186-200
8. Romeo S, Pennacchio LA, Fu Y, Boerwinkle E, Tybjaerg-Hansen A, Hobbs HH, Cohen JC (2007) Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL. *Nat Genet* 39: 513-516
9. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36: 949-951
10. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305: 525-528
11. Scherer SW, Lee C, Birney E, Altshuler DM, Eichler EE, Carter NP, Hurler ME, Feuk L (2007) Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat Genet* 39: S7-15
12. Locke DP, Sharp AJ, McCarroll SA, McGrath SD, Newman TL, Cheng Z, Schwartz S, Albertson DG, Pinkel D, Altshuler DM, Eichler EE (2006) Linkage disequilibrium and heritability of copy-number polymorphisms within duplicated regions of the human genome. *Am J Hum Genet* 79: 275-290
13. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, Fitzgerald T, Hu M, Ihm CH, Kristiansson K, Macarthur DG, Macdonald JR, Onyiah I, Pang AW, Robson S, Stirrups K, Valsesia A, Walter K, Wei J, Tyler-Smith C, Carter NP, Lee C, Scherer SW, Hurler ME (2009) Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 464: 704-712
14. Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G (2009) Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet* 10: 551-564
15. Shaw CJ, Lupski JR (2004) Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1: R57-64
16. Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, Vallente RU, Pertz LM, Clark RA, Schwartz S, Segreaves R, Oseroff VV, Albertson DG, Pinkel D, Eichler EE (2005) Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet* 77: 78-88
17. Conrad DF, Bird C, Blackburne B, Lindsay S, Mamanova L, Lee C, Turner DJ, Hurler ME (2010) Mutation spectrum revealed by breakpoint sequencing of human germline CNVs. *Nat Genet* 42: 385-391
18. Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR (2007) A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 131: 1235-1247
19. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W et al (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444: 444-454
20. Eichler EE (2006) Widening the spectrum of human genetic variation. *Nat Genet* 38: 9-11
21. McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH, Sabeti PC, Zody MC, Barrett JC, Dallaire S, Gabriel SB, Lee C, Daly MJ, Altshuler DM (2006) Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet* 38: 86-92
22. Conrad DF, Andrews TD, Carter NP, Hurler ME, Pritchard JK (2006) A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat Genet* 38: 75-81
23. Chiang DY, Getz G, Jaffe DB, O'Kelly MJ, Zhao X, Carter SL, Russ C, Nusbaum C, Meyerson M, Lander ES (2009) High-resolution mapping of copy-number alterations with massively parallel sequencing. *Nat Methods* 6: 99-103
24. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30: e57
25. Weaver S, Dube S, Mir A, Qin J, Sun G, Ramakrishnan R, Jones RC, Livak KJ (2010) Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution. *Methods* 50: 271-276
26. Armour JA, Palla R, Zeeuwen PL, den Heijer M, Schalkwijk J, Hollox EJ (2007) Accurate, high-throughput typing of copy number variation using paralogue ratios from dispersed repeats. *Nucleic Acids Res* 35: e19
27. Kozłowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ (2008) New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis* 29: 4627-4636
28. Laczmsanska I, Laczmsanski L (2009) Metoda MLPA oraz jej zastosowanie w diagnostyce chorób uwarunkowanych genetycznie. *Postępy Biol Kom* 36: 555-563
29. McCarroll SA, Kuruwilla FG, Korn JM, Cawley S, Nemes J, Wysoker A, Shapero MH, de Bakker PI, Maller JB, Kirby A et al (2008) Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat Genet* 40: 1166-1174
30. Mileyko Y, Joh RI, Weitz JS (2008) Small-scale copy number variation and large-scale changes in gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16659-16664
31. Perry GH, Dominy NJ, Claw KG, Lee AS, Fiegler H, Redon R, Werner J, Villanea FA, Mountain JL, Misra R, Carter NP, Lee C, Stone AC (2007) Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet* 39: 1256-1260
32. Auer H (2008) Expression divergence and copy number variation in the human genome. *Cytogenet Genome Res* 123: 278-282
33. Yang TL, Chen XD, Guo Y, Lei SF, Wang JT, Zhou Q, Pan F, Chen Y, Zhang ZX, Dong SS et al (2008) Genome-wide copy-number-variation study identified a susceptibility gene, UGT2B17, for osteoporosis. *Am J Hum Genet* 83: 663-674

34. Henrichsen CN, Chaingat E, Reymond A (2009) Copy number variants, diseases and gene expression. *Hum Mol Genet* 18: R1-8
35. Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, Redon R, Bird CP, de Grassi A, Lee C, Tyler-Smith C, Carter N, Scherer SW, Tavare S, Deloukas P, Hurles ME, Dermitzakis ET (2007) Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science* 315: 848-853
36. Hollox EJ, Huffmeier U, Zeeuwen PL, Palla R, Lascorz J, Rödijk-Olthuis D, van de Kerkhof PC, Traupe H, de Jongh G, den Heijer M, Reis A, Armour JA, Schalkwijk J (2008) Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nat Genet* 40: 23-25
37. Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, Nibbs RJ, Freedman BI, Quinones MP, Bamshad MJ et al (2005) The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 307: 1434-1440
38. Willcocks LC, Lyons PA, Clatworthy MR, Robinson JI, Yang W, Newland SA, Plagnol V, McGovern NN, Condliffe AM, Chilvers ER, Adu D, Jolly EC, Watts R, Lau YL, Morgan AW, Nash G, Smith KG (2008) Copy number of FCGR3B, which is associated with systemic lupus erythematosus, correlates with protein expression and immune complex uptake. *J Exp Med* 205: 1573-1582
39. Yamaguchi T, Motulsky AG, Deeb SS (1997) Visual pigment gene structure and expression in human retinae. *Hum Mol Genet* 6: 981-990
40. Deeb SS (2006) Genetics of variation in human color vision and the retinal cone mosaic. *Curr Opin Genet Dev* 16: 301-307
41. Lian J, Zhang X, Tian H, Liang N, Wang Y, Liang C, Li X, Sun F (2009) Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol* 7: 13
42. Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, Hummel A, Snopkowski C, Dadhania D, Seshan SV, Suthanthiran M (2009) MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 5330-5335
43. Keller A, Leidinger P, Lange J, Borries A, Schroers H, Scheffler M, Lenhof HP, Ruprecht K, Meese E (2009) Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. *PLoS One* 4: e7440
44. Guo C, Sah JF, Beard L, Willson JK, Markowitz SD, Guda K (2008) The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 47: 939-946
45. Rossi S, Sevigiani C, Nnadi SC, Siracusa LD, Calin GA (2008) Cancer-associated genomic regions (CAGRs) and noncoding RNAs: bioinformatic and therapeutic implications. *Mamm Genome* 19: 526-540
46. Ju X, Li D, Shi Q, Hou H, Sun N, Shen B (2009) Differential microRNA expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 26: 1-10
47. Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI (2008) Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res* 14: 2588-2592
48. Xue Y, Sun D, Daly A, Yang F, Zhou X, Zhao M, Huang N, Zerjal T, Lee C, Carter NP, Hurles ME, Tyler-Smith C (2008) Adaptive evolution of UGT2B17 copy-number variation. *Am J Hum Genet* 83: 337-346
49. Fellay J, Ge D, Shianna KV, Colombo S, Ledergerber B, Cirulli ET, Urban TJ, Zhang K, Gumbs CE, Smith JP et al (2009) Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans. *PLoS Genet* 5: e1000791
50. Arenzana-Seisdedos F, Parmentier M (2006) Genetics of resistance to HIV infection: Role of co-receptors and co-receptor ligands. *Semin Immunol* 18: 387-403
51. Burns JC, Shimizu C, Gonzalez E, Kulkarni H, Patel S, Shike H, Sundel RS, Newburger JW, Ahuja SK (2005) Genetic variations in the receptor-ligand pair CCR5 and CCL3L1 are important determinants of susceptibility to Kawasaki disease. *J Infect Dis* 192: 344-349
52. McKinney C, Merriman ME, Chapman PT, Gow PJ, Harrison AA, Highton J, Jones PB, McLean L, O'Donnell JL, Pokorny V, Spellerberg M, Stamp LK, Willis J, Steer S, Merriman TR (2008) Evidence for an influence of chemokine ligand 3-like 1 (CCL3L1) gene copy number on susceptibility to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67: 409-413
53. Mamtani M, Rovin B, Brey R, Camargo JF, Kulkarni H, Herrera M, Correa P, Holliday S, Anaya JM, Ahuja SK (2008) CCL3L1 gene-containing segmental duplications and polymorphisms in CCR5 affect risk of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 67: 1076-1083
54. Niemira M, Wisniewska A, Mazerska Z (2009) Rola polimorfizmu i zróznicowanej ekspresji genów cytochromów P450 w metabolizmie ksenobiotyków. *Postepy Biochem* 55: 279-289
55. Maréchal JD, Kemp CA, Roberts GCK, Paine MJL, Wolf CR, Sutcliffe MJ (2008) Insights into drug metabolism by cytochromes P450 from modelling studies of CYP2D6-drug interactions. *Br J Pharmacol* 153: S82-S89
56. Ingelman-Sundberg M (2005) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 5: 6-13
57. Knight JC (2009) Human genetic diversity. Functional consequences for health and disease. Oxford University Press Oxford, UK: 105-124
58. Steen VM, Molven A, Aarskog NK, Gulbrandsen AK (1995) Homologous unequal cross-over involving a 2.8 kb direct repeat as a mechanism for the generation of allelic variants of human cytochrome P450 CYP2D6 gene. *Hum Mol Genet* 4: 2251-2257
59. Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjöqvist F, Ingelman-Sundberg M (1993) Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11825-11829
60. Marcinkowska et al. (2011) Copy number variation of microRNA genes in the human genome. *BMC Genomics* 12: 183

## The influence of copy number polymorphism on the human phenotype

Malgorzata Marcinkowska, Piotr Kozłowski<sup>✉</sup>

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

<sup>✉</sup>e-mail: kozlowp@yahoo.com

**Key words:** copy number variation (CNV), NAHR, *AMY1*, osteoporosis, psoriasis, HIV/AIDS

### ABSTRACT

The variability of human populations in a large part is determined by two complementary factors: environment and genetic information. Genetic variation is caused by different genetic variants (polymorphisms and mutations) present in the human genome. Until recently it was thought that most of these variants are small changes of one or several nucleotides (SNPs) which in their millions are present in the human genome. However, it was recently shown that there are also polymorphisms that extend over hundreds of thousands of DNA base pairs in the human genome. Such alternations called copy number variation (CNV) often include genes and other functional genetic elements. In this article we present the general characteristics of copy number polymorphism and we discuss some examples of CNVs that influence human phenotypes.

# Rola piRNA oraz białek Piwi w regulacji rozwoju komórek płciowych

## STRESZCZENIE

**N**owa grupa małych, niekodujących cząsteczek RNA, piRNA, o długości 24–30 nukleotydów, występuje przede wszystkim w komórkach płciowych. Cząsteczki te tworzą kompleksy z białkami Piwi, należącymi do rodziny Argonaute. W przeciwieństwie do większości niskocząsteczkowych RNA, powstają bez udziału RNazy Dicer. Ich obecność stwierdzono w komórkach linii płciowej męskiej i w żeńskiej różnych organizmów, od owadów do człowieka. Mechanizm biogenezy piRNA nie został do końca poznany, jednak zakłada się, że powstają one z długich, jednoniciowych prekursorów RNA, kodowanych przez występujące w genomie sekwencje powtarzające się. Znaczna część piRNA odpowiada sekwencjom retrotranspozonów, co wskazuje na ich udział w wyciszaniu ekspresji elementów ruchomych i utrzymaniu integralności genomu komórek płciowych. Natomiast zakłócenia szlaku syntezy piRNA oraz mutacje białek Piwi powodują aktywację transpozonów oraz liczne defekty w przebiegu gametogenezy, czemu towarzyszą zaburzenia rozrodu. W niniejszym artykule przeglądowym przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat struktury, biogenezy i funkcji cząsteczek piRNA oraz oddziałujących z nimi białek Piwi.

## WPROWADZENIE

Dzięki projektom sekwencjonowania genomów odkryto, że liczba genów, jak i długość sekwencji kodujących białka u zwierząt nie wykazują znacznych różnic, pomimo ogromnej różnorodności tych organizmów [1]. Zbudowany z około 1000 komórek nicienia *Caenorhabditis elegans* posiada w przybliżeniu 20 tysięcy genów [2], podobnie jak człowiek, u którego 100 bilionów komórek tworzy precyzyjnie uformowane tkanki [3]. Jaki zatem mechanizm powoduje tak znaczne zróżnicowanie organizmów zwierzęcych? Po części może to wynikać z częstszego wykorzystania mechanizmu różnicowego składania pierwotnego transkryptu (ang. *alternative splicing*) przez bardziej złożone organizmy, w celu powiększenia proteomu. Jednakże hipoteza ta nie została w pełni potwierdzona z uwagi na brak danych pochodzących z sekwencjonowania transkryptomu organizmów na różnych stadiach ich rozwoju [4]. Inna hipoteza dotyczy regulacji ekspresji informacji genetycznej oraz przekształcania komórek zawierających identyczny genom w komórki zróżnicowane fenotypowo i funkcjonalnie przy udziale niekodującego RNA (ncRNA) [5]. Większość genomu (ponad 70%) ulega transkrypcji, jednak tylko niewielka część transkryptomu koduje sekwencje białek. Wydaje się zatem, że ncRNA, którego zawartość wzrasta wraz ze złożonością organizmu, może pełnić funkcje regulatorowe w komórkach eukariotycznych.

Zidentyfikowano wiele elementów regulatorowych działających na poziomie RNA, które można podzielić na elementy kontroli ekspresji genów typu *cis* i *trans*. Sekwencje regulatorowe działające *in cis* kontrolują transkrypcję, przetwarzanie mRNA, jego lokalizację i stabilność, a także translację. Zalicza się do nich m. in. sekwencje promotorowe wraz z sekwencjami wzmacniającymi i osłabiającymi transkrypcję, rejony, które nie ulegają translacji (UTR), sygnały poliadenylacji i regulatory splicingu [6]. Natomiast badania prowadzone w ostatnich latach dostarczyły wielu informacji na temat roli elementów typu *trans*, głównie niskocząsteczkowych RNA<sup>1</sup>. Organizmy eukariotyczne produkują różne typy małych cząsteczek RNA o długości od 19 do 30 nukleotydów (nt), które uczestniczą w wielu szlakach komórkowych. Oddziałując z białkami z rodziny Argonaute, biorą udział w rozpoznaniu specyficznej sekwencji nukleotydowej, co w konsekwencji może doprowadzić do degradacji mRNA, zahamowania translacji lub tworzenia heterochromatyny [7]. Jak dotąd dobrze scharakteryzowano dwie klasy niskocząsteczkowych RNA: microRNA (miRNA) oraz krótkie interferencyjne RNA (siRNA). Powstają one z dwuniciowych prekursorów RNA jako

<sup>1</sup>W ostatnich latach ukazało kilka artykułów przeglądowych w języku polskim poświęconych temu zagadnieniu: Warkocki Z, Figlerowicz M (2006) Krótkie interferencyjne RNA działające *in trans*. *Postepy Biochem* 52: 253-259; Filip A (2007) MikroRNA nowe mechanizmy regulacji ekspresji genów. *Postepy Biochem* 53: 413-419; Sobkowiak Ł, Szarzyńska B, Szweykowska-Kulińska Z (2008) Biogeneza roślinnych mikro RNA. *Postepy Biochem* 54: 308-316.

Dorota Kowalczykiewicz

Jan Wrześniński<sup>✉</sup>

Pracownia Biochemii RNA, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

<sup>✉</sup>Pracownia Biochemii RNA, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań; tel: (61) 852 85 03, e-mail: wrzesinj@ibch.poznan.pl

Artykuł otrzymano 6 kwietnia 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 14 sierpnia 2010 r.

**Słowa kluczowe:** piRNA, białka Piwi, komórki płciowe, wyciszanie transpozonów

**Wykaz skrótów:** dsRNA (ang. *double stranded RNA*) – dwuniciowy RNA; LINE (ang. *long interspersed nuclear elements*) – długie rozproszone sekwencje jądrowe; ncRNA (ang. *non-protein-coding RNA*) – niekodujące RNA; nt – reszty nukleotydowe; rasiRNA (ang. *repeat-associated small interfering RNA*) krótkie interferujące RNA związane z powtarzającymi się sekwencjami; RISC (ang. *RNA induced silencing complex*) – kompleks rybonukleoproteinowy, biorący udział w hamowaniu translacji; RNaza – rybonukleaza; SINE (ang. *short interspersed nuclear elements*) – krótkie rozproszone sekwencje jądrowe; UTR (ang. *untranslated region*) – rejon, który nie ulega translacji

**Podziękowanie:** Artykuł powstał w trakcie realizacji projektu badawczego Nr N N303 414237 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

**Tabela 1.** Porównanie właściwości wybranych klas niskocząsteczkowych RNA.

Właściwości	miRNA	siRNA	piRNA
Długość	~ 21 nt	~ 22 nt	~ 24-30 nt
Pochodzenie	egzogenny RNA	endogenny RNA	endogenny RNA
Struktura	dwuniciowy RNA	jednociowy RNA	jednociowy RNA
Liczba w komórce	brak danych	kilkaset	~ 50 000
Występowanie	nie występuje w tkankach i komórkach	różne tkanki i komórki	spermatocyty, spermatydy
Cząsteczki wiążące	białka Ago	białka Ago	białka Piwi
Udział RNazy Dicer	wymagany	wymagany	nie wymagany
Funkcja	udział w mechanizmie interferencji RNA	regulacja ekspresji genów	represja retrotranspozonów i regulacja potranskrypcyjna

produkty działania RNazy Dicer. Wiążąc się z docelową sekwencją mRNA, powodują jego degradację lub represję translacji. Najnowsze doniesienia wskazują, że biogeneza niektórych miRNA i siRNA może zachodzić także bez udziału RNazy Dicer [8,9]. Podobnie jak to stwierdzono w przypadku odkrytej w ostatnich latach, nowej klasy niskocząsteczkowych RNA – piRNA [10]. Ta nowa grupa małych RNA oddziałuje z podrodziną białek Piwi i wykazuje wiele różnic w porównaniu z siRNA oraz miRNA (Tab. 1).

#### CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK NALEŻĄCYCH DO RODZINY ARGONAUTE

Białka Argonaute stanowią główny składnik białkowy kompleksów RISC biorących udział w wyciszaniu ekspresji genów w procesie interferencji RNA [11]. Łączą się one z niskocząsteczkowymi RNA w celu rozpoznania specyficznej, docelowej sekwencji nukleotydowej. Jak dotąd, najlepiej scharakteryzowanymi partnerami dla tych białek są miRNA, które biorą udział głównie w potranskrypcyjnym wyciszaniu genów oraz siRNA, które uczestniczą zarówno w transkrypcyjnej, jak i potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów [12]. W oparciu o podobieństwo sekwencji aminokwasowej, rodzinę Argonaute można podzielić na trzy podrodziny. Największa z nich to podrodzina Ago, której nazwa pochodzi od białka Ago1 z rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*). Białka należące do tej podrodziny są

syntetyzowane w wielu różnych tkankach i komórkach i wiążą się z miRNA oraz siRNA. Druga podrodzina, to podrodzina Piwi, której nazwa pochodzi od białka Piwi (ang. *P-element induced wimpy testis*) występującego u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*). W przeciwieństwie do białek Ago, synteza białek Piwi jest ograniczona głównie do komórek płciowych. Trzecią podrodzinę białek Argonaute stanowi podrodzina Class 3, która zawiera wyłącznie białka występujące u *C. elegans* [13].

Białka Argonaute to zasadowe białka o masie cząsteczkowej około 90 kDa, których sekwencja aminokwasowa została zachowana w ewolucji organizmów eukariotycznych. Posiadają one dwie główne domeny białkowe: domenę PAZ (Piwi Argonaute i Zwillle) oraz domenę PIWI [11]. Domena PAZ, zbudowana z około 100–200 reszt aminokwasowych (aa), wiąże jednociowe kwasy nukleinowe. Odpowiada ona za oddziaływanie z końcem 3' niskocząsteczkowych RNA. Natomiast domena PIWI o długości 400–600 aa wykazuje strukturalne podobieństwo do domeny rybonukleazy H. W przypadku niektórych białek może ona działać jako endonukleaza rozpoznająca specyficzne dwuniciowe sekwencje i przecinać mRNA komplementarne do niskocząsteczkowych RNA [13]. Co ciekawe, motyw pełniący funkcje katalityczne jest różny u różnych białek. RNazy H w domenie katalitycznej zawierają motyw Asp-Asp-Glu, podrodzina Ago posiada motyw Asp-Asp-His, natomiast podrodzina Piwi motyw Asp-Asp-Leu [14]. Niektóre białka Ago (np. Ago2) oraz białka Piwi u *D. melanogaster* wykazują aktywność endonukleolityczną [15]. Białka Argonaute posiadają również domenę MID zbudowaną z około 150 aa odpowiedzialną za wiązanie grupy fosforanowej znajdującej się na końcu 5' niskocząsteczkowych RNA [13].

**Tabela 2.** Porównanie białek Argonaute i oddziałujących z nimi niskocząsteczkowych RNA u *D. melanogaster* i myszy.

	Podrodzina Ago		Podrodzina Piwi	
	mysz	<i>D. melanogaster</i>	mysz	<i>D. melanogaster</i>
Członkowie	Ago1-4	Ago1, Ago2	Mili, Miwi, Miwi2	Piwi, Ago3, Aub
Synteza	w wielu tkankach i komórkach	w wielu tkankach i komórkach	komórki płciowe (głównie jądra)	żeńskie i męskie komórki płciowe
Małe RNA, wielkość	miRNA i egzogenne siRNA, 21-23 nt	miRNA (Ago1), wirusowe siRNA (Ago2), 21-23 nt	piRNA, 26-30 nt	piRNA, 24-28 nt
Aktywność przecinania RNA	Ago2	Ago1, Ago2	Nieznana	Piwi, Aub, Ago3
Biogeneza małych RNA	miRNA: Drosha, Dicer	miRNA: Drosha, Dicer-1 siRNA: Dicer-2	<u>pierwotne piRNA</u> : mechanizm nieznan; <u>drugorzędowe piRNA</u> : aktywność hydrolityczna białek Piwi oraz nieznan <u>czynnik przetwarzający</u> koniec 3'	
Funkcja	miRNA: represja translacji i degradacja endogenego mRNA; egzogenne siRNA: RNAi	miRNA: represja translacji i degradacja endogenego mRNA; wirusowe siRNA: hamowanie wirusowej replikacji	wyciszanie transpozonów, metylacja powtórzeń DNA?	wyciszanie transpozonów, regulacja heterochromatyny?



Białka Piwi występują w wielu różnych zwierząt, od owadów do człowieka, a ich obecność jest ściśle skorelowana z pojawieniem się wyspecjalizowanych komórek rozrodczych. Na wczesnym etapie rozwoju u większości zwierząt dochodzi do rozdzielenia komórek linii płciowej i somatycznej, a synteza białek Piwi zostaje ograniczona tylko do komórek płciowych [16]. U płazińców białka Piwi są syntetyzowane w komórkach rozrodczych oraz neoplastach, czyli niezróżnicowanych komórkach macierzystych odpowiedzialnych za zdolności regeneracyjne tych organizmów [17]. Chociaż neoplasty są uważane za somatyczne komórki macierzyste, to mogą one dać początek komórkom płciowym. A zatem zachowana ewolucyjnie obecność białek Piwi w różnych organizmach świadczy o ich ważnej funkcji w komórkach płciowych.

U *D. melanogaster* występują trzy białka należące do podrodziny Piwi: Piwi, Aubergine (Aub) oraz Argonaute 3 (Ago3). Syntetyzowane są one w męskich i żeńskich komórkach płciowych (Tab. 2). Obecność białka Piwi stwierdzono również w komórkach somatycznych, które pozostają w bliskim kontakcie z komórkami płciowymi [15,18,19]. Z kolei synteza trzech białek myszy: Miwi, Mili i Miwi2 (znanych również jako Piwil1, Piwil2 i Piwil4) jest ograniczona głównie do męskich komórek płciowych [20,21]. Białka te są syntetyzowane na różnych etapach spermatogenezy [22,23]. Białko Miwi2 jest obecne tylko w prenatalnych komórkach macierzystych linii płciowej, które nie ulegają podziałom mitotycznym. Ponadto, ulega syntezie w komórkach podporowych kanalików nasiennych (komórkach Sertoliego), jednak nie jest to niezbędne dla podtrzymania funkcji rozrodczych organizmu [20]. Natomiast synteza białka Mili rozpoczyna się już w pierwotnych komórkach płciowych i trwa aż do stadium okrągłej spermatydy (Ryc. 1). Z kolei

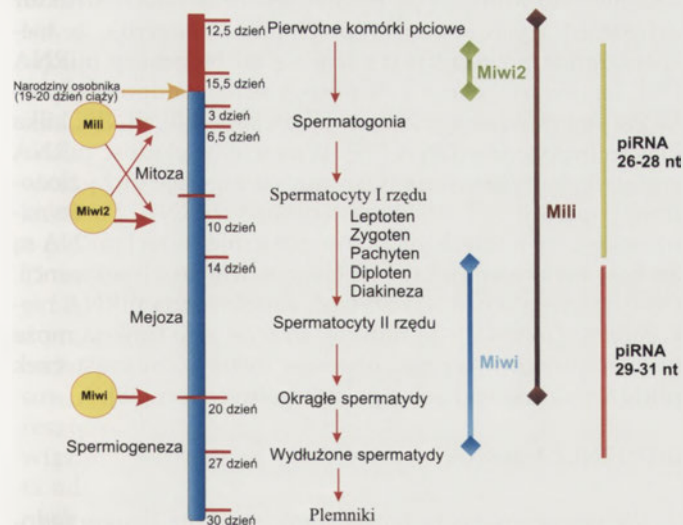
białko Miwi jest wykrywane od stadium pachytenu profazy pierwszego podziału mejotycznego, aż do stadium wydłużonej spermatydy [24]. Zgodnie ze zróżnicowanym czasem syntezy również moment zatrzymania spermatogenezy u myszy z mutacjami powodującymi dezaktywację białek Piwi jest różny. W przypadku mutacji genu kodującego białko Miwi2 spermatogeneza jest blokowana w profazie pierwszego podziału mejotycznego, w stadium leptotenu. Również u tych myszy obserwuje się degenerację spermatogonii, co może wskazywać na rolę tego białka w utrzymaniu populacji komórek macierzystych linii płciowej [20]. Z kolei defekt białka Mili powoduje zatrzymanie spermatogenezy na etapie wczesnego pachytenu, w profazie pierwszego podziału mejotycznego, podczas gdy u myszy z mutacją w genie kodującym białko Miwi dochodzi do zatrzymania spermatogenezy w fazie okrągłej spermatydy (Ryc. 1).

W celu lepszego zrozumienia funkcji białek Piwi przeprowadzono liczne badania z wykorzystaniem osobników posiadających zmutowane bądź nieaktywne (zastosowano technikę „knock-out”) geny kodujące białka Piwi. Odkryto, że retrotranspozon L1, występujący w genomie myszy, nie jest metylowany u osobników posiadających białko Mili z defektami będącymi wynikiem mutacji, co sugeruje, że białko to może brać udział w metylacji pewnych rejonów DNA. Podobnie, nie dochodzi do metylacji DNA niektórych transpozonów u myszy z nieaktywnym genem kodującym białko Miwi2 [25]. Wyniki tych badań wskazują, że białka Piwi mogą brać udział w transkrypcyjnym wyciszaniu genów z wykorzystaniem procesu metylacji DNA.

Interesujące cechy posiada białko Piwil1 występujące u człowieka (znane również jako Hiwi), będące ortologiem białka Miwi myszy. Jak dotąd, nie zidentyfikowano niskocząsteczkowych RNA, które oddziaływałyby z tym białkiem. Występuje ono w męskich komórkach płciowych, a także w tkankach somatycznych, a jego wzmożony poziom został zaobserwowany w kilku rodzajach nowotworów [26,27].

## ODKRYCIE I CHARAKTERYSTYKA piRNA

Pierwsze wzmianki dotyczące nowej, odrębnej populacji niskocząsteczkowych RNA oddziałujących z białkami Piwi, pochodzą z badań prowadzonych na muszce owocowej. Obecność frakcji 25-27 nt RNA homologicznych do bogatego w powtórzenia locus *Stellate* została powiązana z wyciszaniem jego ekspresji. Ponadto proces ten wymagał obecności białek z podrodziny Piwi [28]. Profilowanie ekspresji niskocząsteczkowych RNA podczas rozwoju muszki owocowej umiejscowiło specyficzne dla locus *Stellate* małe RNA w obrębie szerszej klasy rasiRNA [29]. Niskocząsteczkowe RNA przypominające rasiRNA zostały także zidentyfikowane w jądrach i jajnikach ryby danio pręgowany (*Danio rerio*) oraz w jądrach ssaków i nazwano je piRNA (ang. *Piwi-interacting RNAs*) [30]. Chociaż te niskocząsteczkowe RNA posiadały kilka cech wspólnych z rasiRNA, to istniały również znaczne różnice m. in. brak sekwencji odpowiadających elementom powtarzającym się w genomie. Obecnie wiadomo jednak, że piRNA mogą wywodzić się zarówno z elementów powtarzających się, jak i z unikatowych sekwencji DNA, i że rasiRNA stanowią podklasę piRNA [31].



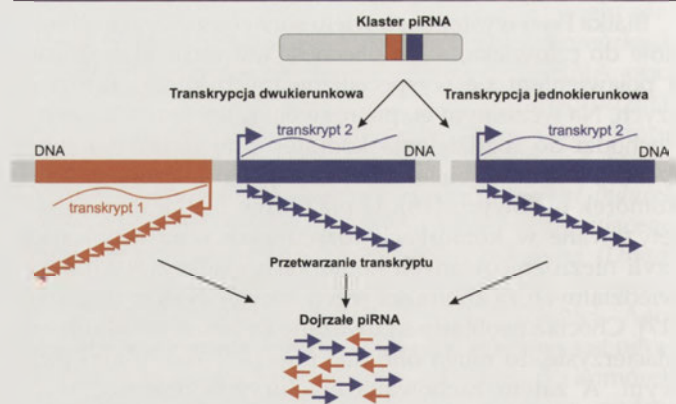
Rycina 1. Ekspresja piRNA i synteza białek Piwi podczas spermatogenezy u myszy. Po lewej stronie kolorem czerwonym oznaczono prenatalny okres życia osobnika oraz dzień narodzin, natomiast kolorem niebieskim okres od narodzin do osiągnięcia dojrzałości płciowej. Na schemacie wyróżniono poszczególne stadia spermatogenezy. Zarówno intensywne podziały mitotyczne spermatogonii, jak i wytwarzanie plemników zachodzą przez całe życie osobnika. Kolorem żółtym oznaczono moment zatrzymania spermatogenezy w przypadku mutacji poszczególnych białek Piwi. Po prawej stronie z kolei zaznaczono syntezę białek Miwi, Mili i Miwi2 oraz dwóch populacji piRNA na poszczególnych etapach spermatogenezy. Opracowano na podstawie [24,37], szczegółowy opis w tekście.

Cząsteczki piRNA zostały wyizolowane z jąder myszy (*Mus musculus*) w 2006 roku przez cztery niezależne grupy badawcze. Rozdział w żelu całkowitego RNA izolowanego z jąder doprowadził do wstępnej identyfikacji frakcji piRNA zawierającej cząsteczki o długości około 30 nt piRNA. Było to możliwe, ponieważ w komórkach płciowych występuje znacznie więcej piRNA niż pozostałych niskocząsteczkowych RNA [32-35]. Oszacowano, że około milion cząsteczek piRNA przypada na jeden spermatocyt lub wczesną spermatydę [32].

W celu zidentyfikowania niskocząsteczkowych RNA oddziałujących z białkiem Miwi przeprowadzono analizy, które doprowadziły do odkrycia cząsteczek RNA o nieoczekiwanej wielkości (29-30 nt). W wyniku sekwencjonowania otrzymano ponad 50 tysięcy sekwencji RNA. Wiele z nich pojawiło się tylko raz, co świadczy o dużym zróżnicowaniu populacji piRNA [33]. Odkryte piRNA ulegały precypitacji z przeciwciałem skierowanym przeciwko białku Miwi, co wskazuje, że białko to wiąże się z tą klasą niskocząsteczkowych RNA i jest niezbędne do ich akumulacji w komórce [35]. Zauważono także, że 30 nt cząsteczki piRNA nie były wykrywane u myszy z mutacją powodującą całkowitą utratę funkcji genu *miwi* [35]. Natomiast, przeprowadzając immunoprecypitację z przeciwciałem rozpoznającym białko Mili odkryto 26-28 nt piRNA oddziałujące z tym białkiem oraz dodatkową populację cząsteczek RNA dłuższych średnio o 3 nt, która nie oddziaływała z białkiem Mili [32].

Rozkład wielkości zidentyfikowanych RNA wskazuje, że istnieją dwie odrębne populacje piRNA [32-35]. Pierwsza grupa zawiera piRNA o długości od 29 do 31 nt, oddziałujące z białkiem Miwi. Ich ekspresja zbiega się w czasie z syntezą białka Miwi czyli od połowy pachytenu profazy pierwszego podziału mejotycznego do stadium wczesnej spermatydy. Druga grupa zawiera nieco krótsze piRNA (26-28 nt), które specyficznie wiążą się z białkiem Mili [32]. Ulegają one ekspresji już w stadium spermatogonii i zaczynają zanikać w stadium okrągłej spermatydy (Ryc. 1). U dorosłych myszy pierwsza grupa zawierająca dłuższe cząsteczki jest liczniejsza niż druga grupa krótszych piRNA. Obie grupy mogą być generowane z tych samych loci, ale w odmienny sposób, gdyż sondy dla niektórych piRNA wykrywają zarówno 30 nt, jak i 26 nt cząsteczki RNA [32,34]. Analiza metodą RACE (ang. *rapid amplification of cDNA ends*), polegająca na wykorzystaniu kilku reakcji PCR z odpowiednio dobranymi starterami w celu ustalenia sekwencji jednego z końców cDNA [36], wykazała, że końce 5' piRNA są identyczne, podczas gdy końce 3' są krótsze o 2 nt w przypadku piRNA wiążących się z białkiem Mili [32]. Jak dotąd nie wiadomo, czy te dwie grupy piRNA pełnią różne funkcje.

Cząsteczki piRNA mają kilka interesujących cech. Po pierwsze, te niskocząsteczkowe RNA są dłuższe niż miRNA i siRNA. Po drugie, znaczna większość piRNA (około 96%) występuje w genomie w postaci klastrów, które mają długość od 1 tys. do 100 tys. par zasad i zawierają od 10 do 4 500 niskocząsteczkowych RNA, co oznacza że tysiące piRNA może powstawać z tego samego locus [37]. Klastry te wykazują ciekawe właściwości. Niektóre z nich są jednokierunkowe, co oznacza, że wszystkie piRNA są kodowane

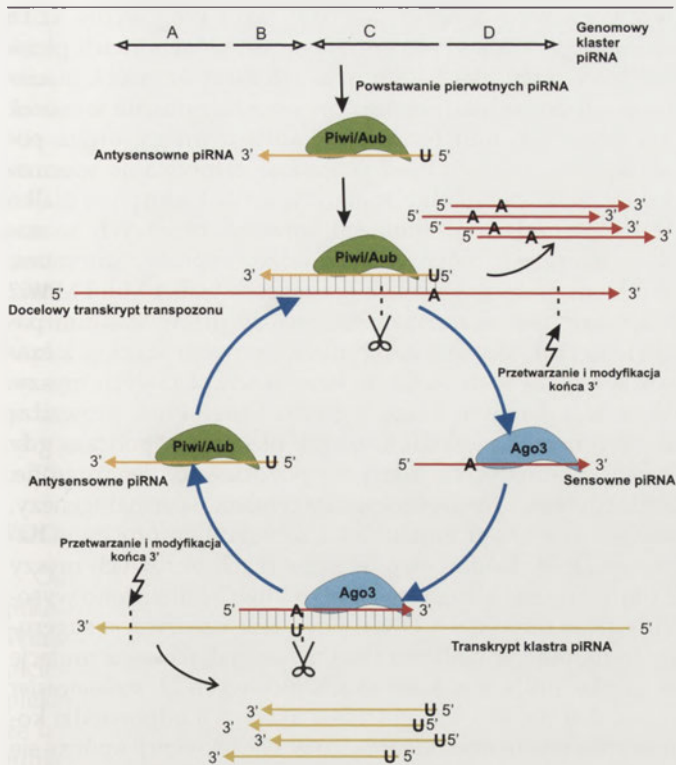


**Rycina 2.** Biogeneza piRNA. Klaster piRNA ulega jedno- lub dwukierunkowej transkrypcji, w wyniku której powstają długie, pierwotne transkrypty przetwarzane następnie do dojrzałych cząsteczek piRNA. Mechanizm obróbki jednokierunkowych prekursorów piRNA do dojrzałych cząsteczek nie został poznany. Opracowano na podstawie [24,37].

przez jedną z nici, podczas gdy wiele klastrów jest dwukierunkowych, w których centralny rejon ubogi w piRNA oflankowany jest piRNA kodowanymi przez przeciwne nici (Ryc. 2). Klastry są z reguły zlokalizowane w międzygenowych lub ubogich w geny rejonach genomu [24]. Po trzecie, analiza sekwencji piRNA wiążących białka Miwi i Mili wykazała obecność w wielu cząsteczkach reszty urydyny na końcu 5' piRNA. Cecha ta jest również charakterystyczna dla siRNA i miRNA, które są przetwarzane z dwuniciowych prekursorów przez enzymy o aktywności RNazy III. Jednakże analiza komputerowa, z użyciem programów do zwijania cząsteczek RNA w struktury drugorzędowe, nie wykazała obecności struktur typu „spinka do włosów” w rejonach flankujących piRNA. W przypadku biogenezy miRNA, RNaza Dicer przekształca około 70 nt pre-miRNA tworzące charakterystyczną strukturę typu „spinka do włosów” do krótkich 22 nt dsRNA. Brak takich struktur drugorzędowych w transkryptach piRNA sugeruje, że mechanizm ich powstawania różni się od biogenezy miRNA [38]. Po czwarte, około 17% piRNA ssaków odpowiada sekwencjom powtarzającym się, takim jak LINE, SINE i kilka klas transpozonów DNA [39]. Wreszcie, większość piRNA została zidentyfikowana tylko raz, co sugeruje dużą złożoność populacji tych niskocząsteczkowych RNA. Porównanie sekwencji różnych genomów pokazuje, że loci piRNA są zachowane w ewolucji w przeciwieństwie do ich sekwencji. Obserwacja ta może wskazywać, że sekwencja piRNA niekoniecznie określa jego funkcję, a raczej jego funkcja może być determinowana przez obecność dużej liczby cząsteczek piRNA produkowanych z poszczególnych loci [38].

## BIOGENEZA piRNA

Jak wspomniano powyżej, brak struktur drugorzędowych w pierwotnych transkryptach piRNA oraz długość dojrzałych cząsteczek piRNA (24-30 nt) wskazują, że nie są one generowane przez rybonukleazę Dicer, która wytwarza zazwyczaj cząsteczki o długości 21-23 nt [40]. Także ostatnio przeprowadzone analizy genetyczne *D. rerio* i *D. melanogaster* dowodzą, że rybonukleaza Dicer nie jest zaangażowana w produkcję piRNA [30,41]. Zrozumienie mechanizmu biogenezy piRNA stało się możliwe dzięki



Rycina 3. Model potranskrypcyjnej amplifikacji piRNA u *D. melanogaster*. piRNA tworzące kompleks z Piwi lub Aub odpowiadają antysensownej nici DNA i posiadają resztę U na końcu 5'. Z kolei Ago3 oddziałuje z piRNA, które odpowiadają nici sensownej, posiadają resztę A w pozycji 10 i są komplementarne do antysensownych piRNA na długości 10 nt. Zatem kompleksy Ago3/piRNA mogą rozpoznawać i przecinać antysensowne transkrypty generując nowe antysensowne piRNA, które po związaniu z Piwi/ Aub biorą udział w wyciszaniu mRNA transpozono- w, tworząc tym samym pętlę amplifikacyjną. Opracowano na podstawie [16,38]; szczegółowy opis w tekście pracy.

badaniom nad ich genomowym pochodzeniem oraz oddziaływaniem z białkami Argonaute u *D. melanogaster*. W jajnikach muszki owocowej znaczna większość piRNA wywodzi się z telomerowych i pericentromerowych rejonów bogatych w sekwencje retrotranspozono- w [18]. Najlicniejszą grupę stanowią piRNA pochodzące z antysensownej nici transpozono- w. Częsteczki te specyficznie oddziałują z białkami Piwi i Aub. Z kolei piRNA odpowiadające sensownej nici transpozono- w wiążą się z białkiem Ago3 [18,19]. Białka Piwi, Aub i Ago3 w kompleksie z piRNA mogą przecinać docelowy RNA pomiędzy 10 i 11 nukleotydem od końca 5' nici naprowadzającej (ang. *guide strand*) [15,19]. Zaobserwowano również, że piRNA z przeciwnych nici są do siebie komplementarne na końcach 5' na długości 10 nukleotydo- w. Co więcej, antysensowne piRNA oddziałujące z Piwi i Aub na końcu 5' mają resztę urydyny (U), podczas gdy w sensownych piRNA wiążących Ago3, w pozycji 10 najczęściej występuje reszta adenozy- ny (A). Zatem, reszta A w pozycji 10 sensownych piRNA jest komplementarna do reszty U na końcu 5' antysensownych piRNA. Na podstawie tych obserwacji dwie grupy badawcze równocześnie zaproponowały model biogenezy piRNA [18,19]. Według tego modelu, wzajemne oddziaływanie transkrypto- w pochodzących z genomowych klastrów piRNA oraz mRNA transpozono- w przy udziale białek Piwi prowadzi do wytworzenia cyklu, w trakcie którego dochodzi do potranskrypcyjnej amplifikacji cząsteczek piRNA (Ryc. 3). Cykl ten, zwany

pętlą amplifikacyjną „ping-pong”, rozpoczyna się przetwarzaniem pierwotnych piRNA, które pochodzą z wadliwych kopii transpozono- w znajdujących się w rejonach heterochromatynowych. Białka Piwi przecinają sekwencję docelową pomiędzy nukleotydami 10 i 11 od końca 5' piRNA, a niezidentyfikowana endonukleaza generuje koniec 3' prekursora piRNA. Pierwotne piRNA są antysensowne i wiążą się z białkiem Piwi lub Aub. Kompleks Piwi/ Aub-piRNA rozpoznaje i przecina docelowe transkrypty transpozono- w, wyciszając ekspresję geno- w oraz generując nowe sensowne piRNA, które oddziałują z białkiem Ago3. Następnie kompleks sensowny piRNA/Ago3 katalizuje cięcie nici antysensownej, będącej transkryptem klastra piRNA, w miejscu sparowania A-U, generując tym samym nowe antysensowne piRNA, zdolne do wiązania się z białkami Piwi lub Aub [18,19]. Cykl ten trwa tak długo, jak kompleksy zawierające antysensowne piRNA rozpoznają i przecinają docelowe sekwencje transpozono- w, generując nowe sensowne piRNA. Model ten oparty jest na badaniach przeprowadzonych u *D. melanogaster*, ale doniesienia literaturowe sugerują, że podobny mechanizm może działać w komórkach płciowych myszy [42].

Białka, które biorą udział w zaproponowanym modelu produkcji piRNA, nie zostały jeszcze zidentyfikowane, aczkolwiek wyniki ostatnich badań dostarczają informacji, które mogą pomóc w ich odkryciu. Na przykład, u muszki owocowej mutacje w genach *zucchini* i *squash* kodujących nukleazy, zaburzają powstawanie piRNA, w wyniku czego nie dochodzi do wyciszenia retrotranspozono- w [43]. Zatem, produkty geno- w *zucchini* i *squash* mogą brać udział w przycinaniu transkrypto- w piRNA od końca 3', generując dojrzałe cząsteczki piRNA o odpowiedniej długości. Dodatkowo koniec 3' dojrzałych piRNA jest metylowany [44,45]. U *D. melanogaster* reakcja ta jest przeprowadzana przez metylotransferazę RNA Hen1 i zdaje się zachodzić po związaniu piRNA z białkami Argonaute [46,47]. Mutacja w genie *hen1* redukuje długość i trwałość piRNA, co sugeruje, że metylacja ma wpływ na tworzenie prawidłowego końca 3' piRNA oraz zwiększa stabilność tych cząsteczek [46]. Modyfikacja ta może również wpływać na oddziaływania pomiędzy piRNA a innymi składnikami szlaku piRNA. Jednakże, muszki owocowe ze zmutowanym genem *hen1* są płodne, co wskazuje, że metylacja nie jest niezbędna dla funkcji piRNA w rozrodzie [47].

Obecnie model potranskrypcyjnej amplifikacji stanowi atrakcyjną hipotezę opartą głównie na analizach bioinformatycznych i wymaga on doświadczalnego potwierdzenia. Wiele pytań wciąż pozostaje bez odpowiedzi. Czy mechanizm „ping-pong” jest aktywny wyłącznie w cytoplazmie? Czy białka z podrodziny Piwi wykazują aktywność nukleolityczną *in vivo*? Jakie kofaktory są niezbędne dla tej aktywności? Czy transpozony kiedykolwiek są degradowane do sekwencji krótszych niż cząsteczki piRNA? Jak piRNA są transportowane z jednych rybonukleoprotein do innych oraz czy białka Ago3 i Aub są wyłącznie zlokalizowane w cytoplazmie? Czy powstałe piRNA, a przynajmniej ta ich część, która asocjuje z białkiem Piwi, są transportowane z powrotem do jądra? Odpowiedzi na te pytania w znacznym stopniu pozwolą dokładniej wyjaśnić mechanizm biogenezy piRNA.

## CZĄSTECZKI piRNA I BIAŁKA PIWI JAKO REGULATORY AKTYWNOŚCI TRANSPOZONÓW

Ostatnie doniesienia literaturowe prezentują liczne dowody na udział piRNA i białek podrodziny Piwi w regulacji aktywności transpozonów. Po pierwsze, znaczna większość wyizolowanych do tej pory piRNA odpowiada rejonom kodującym transpozony [48]. Po drugie, na podstawie badań u muszki owocowej zaproponowano model wyjaśniający wyciszenie transpozonów przy udziale piRNA. Mobilność trzech retroelementów występujących u *D. melanogaster*: *gypsy*, *Idefix* i *ZAM* jest kontrolowana przez rejon *flamenco* będący specyficznym heterochromatynowym locus występującym na chromosomie X. Pomimo intensywnych badań tego rejonu, nie udało się zidentyfikować w jego obrębie żadnej sekwencji pełniącej funkcję represorową w stosunku do transpozonów. Zawierał on raczej mieszaninę różnych typów elementów ruchomych, ale dokładny sposób, w jaki te elementy mogły być zaangażowane w obronę przeciwko transpozonom, pozostawał niejasny [38]. Później wykazano, że wyciszenie retroelementu *gypsy* przy udziale *flamenco* przebiega w sposób zależny od białka Piwi [49] oraz, że *flamenco* koduje jeden z największych klastrów piRNA u *D. melanogaster*, a jego mutacja prowadzi do spadku ekspresji piRNA i w konsekwencji zwiększonej aktywności transpozonów [18]. Uważa się, że locus *flamenco* tworzą wadliwe transpozony, których transkrypcja prowadzi do powstania długiego transkryptu stanowiącego matrycę w biogenezie piRNA. Setki piRNA generowanych z tego locus odpowiada elementom powtarzającym się rozproszonym po całym genomie. Zgodnie z obecnie panującym modelem, powstałe piRNA oddziałują z białkami Piwi w komórkach płciowych i prowadzą do przecięcia docelowych sekwencji transpozonów [38]. Klonowanie piRNA oraz zastosowanie metod „głębokiego sekwencjonowania”, pozwoliło na scharakteryzowanie piRNA występujących podczas rozwoju zarodkowego myszy, które w większości reprezentują sekwencje transpozonowe, chociaż ich znaczenie biologiczne pozostaje nadal nieznanne [25].

U *D. melanogaster* białka Piwi oddziałują z białkiem HP1 (ang. *Heterochromatin Protein 1*), które uczestniczy w tworzeniu heterochromatyny. Natomiast brak oddziaływania między nimi powoduje dekondensację heterochromatyny [50]. Również u kręgowców białka Piwi pełnią funkcje epigenetyczne. W komórkach myszy nie dochodzi do metylacji rejonów kodujących transpozony, gdy brakuje białek Mili i Miwi2, co prowadzi do wzrostu aktywności transpozonów. A zatem brak funkcjonalnych białek Piwi powoduje brak metylacji DNA i utratę kontroli epigenetycznej [42]. Również piRNA mogą odgrywać rolę w represji transpozonów, gdyż delekcja małych klastrów piRNA w komórkach myszy prowadzi do wzrostu ich aktywności [51]. Dowody na potranskrypcyjną amplifikację piRNA w komórkach ssaków także potwierdzają ich zachowaną w ewolucji funkcję w regulacji transpozonów.

## FUNKCJA BIAŁEK PIWI I piRNA W ROZWOJU KOMÓREK PŁCIOWYCH

Analiza osobników ze zmutowanymi białkami Piwi wskazuje na udział tych białek w rozwoju komórek płcio-

wych, zarówno u bezkręgowców, jaki i kręgowców. U *D. melanogaster* białko Piwi potrzebne jest w komórkach płciowych i w komórkach stanowiących niszę komórek macierzystych do regulacji podziałów oraz utrzymania komórek macierzystych linii płciowej. Z kolei u myszy utrata poszczególnych białek Piwi powoduje zatrzymanie spermatogenezy. W przypadku mutacji w genie kodującym białko Miwi dochodzi do eliminacji komórek płciowych w stadium okrągłej spermatydy na drodze apoptozy. Natomiast, skutkiem mutacji w genach kodujących białka Mili i Miwi2 jest wcześniejsze zatrzymanie mejozy już w stadium pachytenu [16]. Moment zatrzymania rozwoju koreluje z czasową syntezą tych białek w komórkach płciowych myszy. Mutacje w każdym z trzech genów białek Piwi prowadzą do degeneracji męskich komórek płciowych, podczas gdy komórki somatyczne zdają się pozostawać nienaruszone. Podobny efekt fenotypowy, zatrzymania spermatogenezy, zaobserwowano u mutantów z zaburzonym procesem naprawy DNA. Dodatkowo, w komórkach płciowych myszy z mutacją genu kodującego białko Miwi2 zauważono wysoki poziom uszkodzeń DNA. Powyższe obserwacje sugerują, że mutacje w białkach Piwi myszy, jak również mutacje w szlaku piRNA w komórkach płciowych *D. melanogaster* prowadzą do uszkodzeń DNA i aktywacji odpowiedzi komórkowej na te uszkodzenia, co w konsekwencji kończy się apoptozą i degeneracją komórek płciowych [31]. Kluczowym pytaniem jest, czy obserwowane efekty mutacji genów kodujących białka Piwi mogą być wyjaśnione wyłącznie na podstawie ich udziału w kontroli aktywności transpozonów, czy może białka Piwi pełnią inne, dotąd nie poznane, funkcje w gametogenezie. U muszki owocowej większość piRNA ma sekwencje odpowiadające transpozonom i innym elementom powtarzającym się. Mutacje w szlaku piRNA u tych organizmów powodują uszkodzenia DNA komórek płciowych w wyniku nadekspresji retrotranspozonów [18,41]. Obserwacje te wskazują, że uszkodzenie DNA komórek płciowych jest spowodowane przez mobilizację transpozonów, chociaż nie zostało to ostatecznie udowodnione. Natomiast piRNA występujące w jądrach dorosłych myszy są prawie pozbawione sekwencji powtarzających się. Aczkolwiek, wyniki ostatnich badań umożliwiły identyfikację populacji piRNA pojawiającej się przed stadium pachytenu w trakcie spermatogenezy, która oddziałuje z białkiem Mili oraz zawiera znaczną liczbę sekwencji retrotranspozonowych i innych elementów repetytywnych [42]. Co więcej, mutacje genów kodujących białka Mili i Miwi2 powodują, że nie dochodzi do inaktywacji transkryptów retrotranspozonów. Zatem szlak piRNA może uczestniczyć w wyciszeniu retrotranspozonów i w ten sposób zapobiegać uszkodzeniom DNA komórek płciowych oraz w konsekwencji ich apoptozie. Jednakże, w przeciwieństwie do muszki owocowej, pojedyncze mutacje w genach kodujących białka podrodziny Piwi myszy nie uszkadzają żeńskich komórek płciowych. Możliwe zatem, że w żeńskich komórkach płciowych ssaków istnieje odrębny szlak, który spełnia tę funkcję [31].

Genetyczne i biochemiczne analizy wskazują, na udział białek Piwi przede wszystkim w kontroli transpozonów. Jednak, istnieją również takie właściwości szlaku piRNA/Piwi, które trudno wyjaśnić tylko na podstawie regulacji transpozonów. Populacja piRNA występująca u ssaków w

stadium pachytenu jest uboga w sekwencje powtarzające się, a nawet ta część, która zawiera sekwencje transpozono-  
nów, jest bardzo zróżnicowana, dlatego mało prawdopodobne jest, by brała ona udział w supresji transpozono-  
nów. Nie wykryto również aktywacji transpozono-  
nów w przypadku mutacji białka Miwi, z którym ta populacja oddziałuje [16]. Zatem funkcja pojawiających się w pachytenie piRNA pozostaje jak na razie tajemnicą. Ważną rolę podczas spermatogenezy u ssaków odgrywa regulacja potranskrypcyjna mRNA. Utratę białka Miwi powiązano ze zmianami w zawartości pewnych mRNA ważnych dla rozwoju komórek haploidalnych [23]. Jest więc prawdopodobne, że wyjątkowa różnorodność pojawiających się w pachytenie piRNA może umożliwiać białkom Miwi i Mili wywieranie wpływu na transkryptom przy udziale mechanizmu podobnego do miRNA.

## PODSUMOWANIE

Odkrycie białek Piwi, a zwłaszcza oddziałujących z nimi piRNA, ukazało nowy wymiar regulacji ekspresji genów. Wiadomo, że białka te są zaangażowane w rozwój komórek płciowych wielu gatunków zwierząt oraz, że tworzą kompleksy z piRNA i są niezbędne dla ich biogenezy. Jednakże udział białek Piwi w powstawaniu piRNA, jak również funkcje tej nowej klasy niskocząsteczkowych RNA, nie są dokładnie poznane. Badania przeprowadzone nad piRNA wskazują na ich udział w utrzymaniu integralności genomu komórek płciowych. Co ciekawe, piRNA są tylko o kilka nukleotydów dłuższe od znacznie lepiej zbadanych miRNA i siRNA, a ich rolą wydaje się być wyciszenie retrotranspozono-  
nów, elementów powtarzających się i rejonów heterochromatynowych, podczas gdy rolą miRNA i siRNA jest obniżenie ekspresji genów. Z pewnością jednym z ważniejszych zadań stojących przed badaczami będzie dokładne wyjaśnienie mechanizmu biogenezy cząsteczek piRNA. Konieczne będzie również zbadanie funkcji białek Piwi w regulacji epigenetycznej i translacyjnej, a także sposobu powiązania tych mechanizmów z funkcjami biologicznymi, takimi jak wyciszenie transpozono-  
nów, powstawanie komórek płciowych, utrzymanie macierzystych komórek płciowych, przebieg mejozy i gametogenezy. Ważne będzie także ustalenie, w jaki sposób piRNA uczestniczą w funkcjach białek Piwi oraz czy piRNA pełnią jakąś samodzielną, niezwiązaną z białkami Piwi, rolę. Odpowiedzi na te pytania z pewnością, w znaczący sposób, pozwolą na lepsze zrozumienie molekularnych mechanizmów regulacji rozro-  
du.

## PIŚMIENNICTWO

1. Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS (2007) The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays* 29: 288-299
2. Stein LD, Bao Z, Blasiar D, Blumenthal T, Brent MR et al (2003) The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *PLoS Biol* 1: E45
3. Andersen BB, Gundersen HJ, Pakkenberg B (2003) Aging of the human cerebellum: a stereological study. *J Comp Neurol* 466: 356-365
4. Graveley BR (2001) Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* 17: 100-107
5. Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mattick JS (2008) The eukaryotic genome as an RNA machine. *Science* 319: 1787-1789
6. Amaral PP, Mattick JS (2008) Noncoding RNA in development. *Mamm Genome* 19: 454-492

7. Filip A (2007) MikroRNA: nowe mechanizmy regulacji ekspresji genów. *Postępy Biochem* 53: 413-419
8. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ (2010) A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465: 584-589
9. Lee H, Li L, Gu W, Xue Z, Crosthwaite SK, Pertsemlidis A, Lewis ZA, Freitag M, Selker EU, Mello CC, Liu Y (2010) Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Molecular Cell* 38: 803-814
10. He Z, Kokkinaki M, Pant D, Gallicano GI, Dym M (2009) Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction* 137: 901-911
11. Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ (2002) The Argonaute family: Tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 16: 2733-2742
12. Seto AG, Kingston RE, Lau NC (2007) The coming of age for Piwi proteins. *Molecular Cell* 26: 603-609
13. Farazi TA, Juranek SA, Tuschl T (2008) The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development* 135: 1201-1214
14. Samji T (2009) Piwi, piRNAs, and germline stem cells: What's the link? *Yale journal of biology and medicine* 82: 121-124
15. Saito K, Nishida KM, Mori T, Kawamura Y, Miyoshi K, Nagami T, Siomi H, Siomi MC (2006) Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev* 20: 2214-2222
16. Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J (2007) The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* 318: 761-764
17. Reddien PW, Oviedo NJ, Jennings JR, Jenkin JC, Sánchez Alvarado A (2005) Smedwi-2 is a Piwi-like protein that regulates planarian stem cells. *Science* 310: 1327-1330
18. Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ (2007) Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128: 1089-1103
19. Gunawardane LS, Saito K, Nishida KM, Miyoshi K, Kawamura Y, Nagami T, Siomi H, Siomi MC (2007) A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* 315: 1587-1590
20. Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, Hannon GJ (2007) Miwi2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell* 12: 503-514
21. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri TW, Hata K, Li E, Matsuda Y, Kimura T, Okabe M, Sakaki Y, Sasaki H, Nakano T (2008) DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members Mili and Miwi2 in murine fetal testes. *Genes Dev* 22: 908-917
22. Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Yomogida K, Kuroiwa A, Tadoro Y, Fujita Y, Sato M, Matsuda Y, Nakano T (2001) Two mouse piwi-related genes: *miwi* and *mili*. *Mech Dev* 108: 121-133
23. Deng W, Lin H (2002) *miwi*, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell* 2: 819-830
24. Thomson T, Lin H (2009) The biogenesis and function of Piwi proteins and piRNAs: progress and prospect. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 355-376
25. Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, Bestor T, Hannon GJ (2008) A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to *de novo* DNA methylation in mice. *Mol Cell* 31: 785-799
26. Qiao D, Zeeman AM, Deng W, Looijenga LH, Lin H (2002) Molecular characterization of *hiwi*, a human member of the *piwi* gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene* 21: 3988-3999
27. Liu X, Sun Y, Guo J, Ma H, Li J, Dong B, Jin G, Zhang J, Wu J, Meng L, Shou C (2006) Expression of *hiwi* gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells. *Int J Cancer* 118: 1922-1929

28. Aravin AA, Naumova NM, Tulin AV, Vagin VV, Rozovsky YM, Gvozdev VA (2001) Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr Biol* 11: 1017-1027
29. Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T (2003) The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* 5: 337-350
30. Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E, Cronembold D, Girard A, van den Elst H, Filippov DV, Blaser H, Raz E, Moens CB, Plasterk RH, Hannon GJ, Draper BW, Ketting RF (2007) A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in *Zebrafish*. *Cell* 129: 69-82
31. Klattenhoff C, Theurkauf W (2007) Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development* 135: 3-9
32. Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T et al (2006) A novel class of small RNAs bind to Mili protein in mouse testis. *Nature* 442: 203-207
33. Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA (2006) A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 442: 199-202
34. Watanabe T, Takeda A, Tsukiyama T, Mise K, Okuno T, Sasaki H, Minami N, Imai H (2006) Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev* 20: 1732-1743
35. Grivna ST, Beyret E, Wang Z, Lin H (2006) A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev* 20: 1709-1714
36. Bertioli D (2000) Rapid amplification of cDNA ends. *The Nucleic Acid Protocols Handbook*, Humana Press Inc, Totowa, NJ, str. 613-617
37. Kim VN (2006) Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes. *Genes Dev* 20: 1993-1997
38. O'Donnell KA, Boeke JD (2007) Mighty Piwis defend the germline against genome intruders. *Cell* 129: 37-44
39. Choudhuri S (2009) Lesser known relatives of miRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 388: 177-180
40. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366
41. Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD (2006) A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* 313: 320-324
42. Aravin AA, Sachidanandam R, Girard A, Fejes-Toth K, Hannon GJ (2007) Developmentally regulated piRNA clusters implicate Mili in transposon control. *Science* 316: 744-747
43. Pane A, Wehr K, Schupbach T (2007) *Zucchini* and *squash* encode two putative nucleases required for rasiRNA production in the *Drosophila* germline. *Dev Cell* 12: 851-862
44. Kirino Y, Mourelatos Z (2007) Mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated at their 3' termini. *Nat Struct Mol Biol* 14: 347-348
45. Ohara T, Sakaguchi Y, Suzuki T, Ueda H, Miyauchi K, Suzuki T (2007) The 3' termini of mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated. *Nat Struct Mol Biol* 14: 349-350
46. Horwich MD, Li C, Matranga C, Vagin V, Farley G, Wang P, Zamore PD (2007) The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr Biol* 17: 1265-1272
47. Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Siomi H, Siomi MC (2007) Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev* 21: 1603-1608
48. Girard A, Hannon GJ (2008) Conserved themes in small-RNA-mediated transposon control. *Trends Cell Biol* 18: 136-148
49. Sarot E, Payen-Groschene G, Bucheton A, Pelisson A (2004) Evidence for a piwi-dependent RNA silencing of the gypsy endogenous retrovirus by the *Drosophila melanogaster* flamenco gene. *Genetics* 166: 1313-1321
50. Brower-Toland B, Findley SD, Jiang L, Liu L, Yin H, Dus M, Zhou P, Elgin SC, Lin H (2007) *Drosophila* Piwi associates with chromatin and interacts directly with HP1a. *Genes Dev* 21: 2300-2311
51. Xu M, You Y, Hunsicker P, Hori T, Small C, Griswold MD, Hecht NB (2008) Mice deficient for a small cluster of Piwi-interacting RNAs implicate Piwi-interacting RNAs in transposon control. *Biol Reprod* 79: 51-57

## The role of piRNA and Piwi proteins in regulation of germline development

Dorota Kowalczykiewicz, Jan Wrzesinski✉

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

✉e-mail: wrzesinj@ibch.poznan.pl

**Key words:** piRNA, Piwi proteins, germline cells, transposon silencing

### ABSTRACT

A new group of small noncoding RNAs of 24-30 nucleotides in length, piRNAs, are mainly expressed in germline cells. They form complexes with Piwi proteins, members of the Argonaute family and unlike other small RNAs they are created without RNase Dicer participation. They are present in male and female germinal cells of numerous animals, from flies to humans. The piRNA biogenesis mechanism is unknown, however, it is postulated that they are formed from long single-stranded RNA precursors coded by repetitive sequences occurring in the genome. A large part of piRNA corresponds to retrotransposon sequences, which may indicate their participation in silencing the mobile elements and maintaining genome integrity of germinal cells. However, disruption of the piRNA biosynthesis pathway and mutations genes encoding Piwi proteins cause the activation of transposons and a number of defects in the course of gametogenesis, resulting in reproduction disturbance. In this review, the current state of knowledge on the structure, biogenesis and function of piRNA and their interactions with Piwi proteins is presented.

# Zaburzenia różnicowego składania pierwotnego transkrypty w kancerogenezie

## STRESZCZENIE

**S**kładanie (ang. *splicing*) pierwotnego transkrypty to jeden z etapów obróbki potranskrypcyjnej, polegający na wycinaniu z RNA intronów i łączeniu ze sobą eksonów. Kolejne etapy składania RNA są katalizowane przez dynamiczny kompleks składający (ang. *spliceosome*). Eksony mogą być ze sobą łączone na różne sposoby, dzięki czemu na matrycy jednego genu może powstawać więcej niż jedno białko. Proces różnicowego składania pierwotnego transkrypty (ang. *alternative splicing*) podlega regulacji, w której udział biorą elementy *cis*, zlokalizowane wewnątrz eksonów bądź intronów oraz czynniki *trans*. Do tych ostatnich należą elementy kompleksu składającego, między innymi czynniki splicingowe z rodzin białek SR i hnRNP. W niniejszej pracy omówiono mutacje w elementach *cis* bądź nieprawidłowe działanie czynników *trans*, które prowadzą do zaburzeń różnicowego składania transkryptów genów m.in. kontrolujących proliferację komórkową i procesy przetrzutowania. Przedstawiono również możliwości potencjalnego wykorzystania nieprawidłowych wariantów splicingowych jako markerów diagnostycznych i celów dla terapii przeciwnowotworowej.

## WPROWADZENIE

U organizmów eukariotycznych pierwotny transkrypt składa się zarówno z sekwencji kodujących, eksonów, jak i z sekwencji niekodujących, do których należą introny. Istnieje kilka grup intronów, różniących się sekwencjami najwyższej zgodności i mechanizmem wycinania, specyficznych dla poszczególnych typów cząsteczek RNA [1]. Introny grupy I występują w jądrowych cząsteczkach pre-rRNA (rybosomowym pre-RNA) oraz w pre-rRNA i pre-mRNA (pre-RNA kodujących białka) mitochondriów i chloroplastów. Grupa II również obejmuje introny wchodzące w skład pierwotnego transkrypty organelli komórkowych. Cechą charakterystyczną intronów należących do obu grup jest to, że działają one jako rybozomy, czyli cząsteczki RNA o zdolnościach katalitycznych. Oprócz dwóch wymienionych grup intronów istnieją też inne, a wśród nich odrębną grupę tworzą introny wchodzące w skład jądrowych cząsteczek pierwotnego transkrypty kodujących białka (pre-mRNA). Niniejsza praca poświęcona jest intronom tej ostatniej grupy.

Jednym z etapów obróbki potranskrypcyjnej jest składanie pre-mRNA (ang. *pre-mRNA splicing*) czyli proces, w którym introny są wycinane, a eksony łączone są ze sobą. [1]. Można wyróżnić dwa typy składania pre-mRNA: kanoniczne i różnicowe. Podczas składania kanonicznego (ang. *constitutive splicing*) eksony są zawsze składane w jednakowy sposób, co prowadzi do powstania tylko jednego rodzaju cząsteczek mRNA, a co za tym idzie jednego rodzaju cząsteczek białkowych. Natomiast podczas składania różnicowego (ang. *alternative splicing*) eksony mogą być składane na różne sposoby, dzięki czemu może powstawać wiele wariantów mRNA, a w konsekwencji wiele wariantów cząsteczek białek i peptydów, różniących się właściwościami biologicznymi i biochemicznymi [2] (Ryc. 1). To dzięki różnicowemu składaniu pre-mRNA możliwa jest synteza tak wielu izoform hormonów białkowych, receptorów czy enzymów [3].

Różnicowe składanie pre-mRNA może zachodzić na kilka różnych sposobów. Jednym z nich jest pominięcie eksonu albo wybór jednego z dwóch eksonów podczas składania pre-mRNA. Innym sposobem jest wybór alternatywnego miejsca splicingowego 5' lub 3' przez kompleks składający. Podczas różnicowego składania eksonów może również dochodzić do zatrzymania intronu w cząsteczce mRNA [4,5] (Ryc. 1).

## MECHANIZM SKŁADANIA PRE-mRNA U CZŁOWIEKA


Aby introny zostały poprawnie wycięte z pierwotnego transkrypty muszą posiadać określone elementy w swojej budowie. Są to sekwencje najwyższej

Hanna Wiszomirska

Agnieszka Piekietko-Witkowska

Alicja Nauman 

Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

 Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99/103, 01-813 Warszawa; tel.: (22) 56 93 813, e-mail: [anauman@cmkp.edu.pl](mailto:anauman@cmkp.edu.pl)

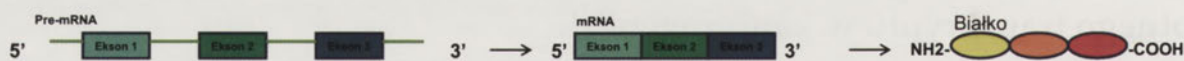
Artykuł otrzymano 29 czerwca 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 4 października 2010 r.

**Słowa kluczowe:** apoptoza, kancerogeneza, onkogen, różnicowe składanie pierwotnego transkrypty, supresor nowotworowy

**Wykaz skrótów:** białka SR – białka bogate w reszty seryny i argininy; hnRNP – heterogenna rybonukleoproteina; NMD (ang. *nonsense mediate mRNA decay*) – degradacja transkryptów z przedwczesnym kodonem STOP; pre-mRNA – pierwotny transkrypt; PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy; snRNP – małe jądrowe rybonukleoproteiny

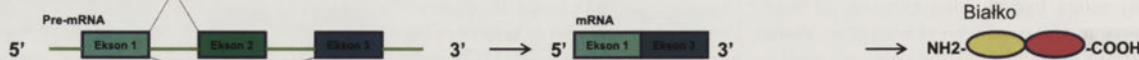
**Podziękowania:** Praca została wykonana w trakcie realizacji projektu badawczego MNiSW N N401071939.

## KANONICZNE SKŁADANIE pre-mRNA

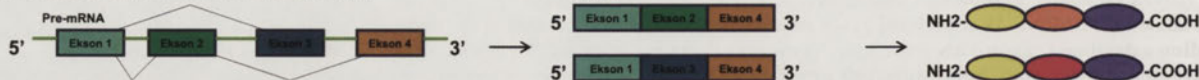


## RÓŻNICOWE SKŁADANIE pre-mRNA

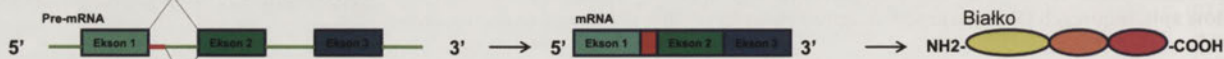
### POMINIĘCIE EKSONU



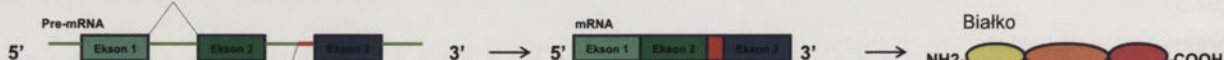
### WZAJEMNIE WYKLUCZAJĄCE SIĘ EKSONY



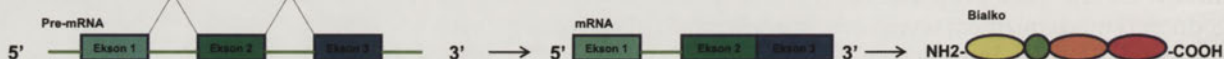
### ALTERNATYWNE MIEJSCE 5' SPLICINGOWE



### ALTERNATYWNE MIEJSCE 3' SPLICINGOWE



### ZATRZYMANIE INTRONU



Rycina 1. Typy składania pre-mRNA. Składanie kanoniczne: pre-mRNA składany jest zawsze w taki sam sposób, co powoduje, że na matrycy jednego genu zawsze powstaje jedno białko. Składanie różnicowe: pre-mRNA może być składany na różne sposoby. W rezultacie, na matrycy jednego genu może powstawać wiele produktów białkowych. Wzajemnie wykluczające się eksony: do cząsteczki mRNA włączany jest alternatywnie jeden z dwóch eksonów (tu: ekson 2 lub 3). Alternatywne miejsce 5' splicingowe: w wyniku wykorzystania miejsca 5' splicingowego położonego bliżej bądź dalej 5' może powstać dłuższa bądź krótsza cząsteczka mRNA. Alternatywne miejsce 3' splicingowe: analogicznie do alternatywnego wyboru miejsca 5' splicingowego, mogą powstać cząsteczki mRNA różnej długości. Zatrzymanie intronu: sekwencja niekodująca nie jest usuwana lecz wchodzi w skład cząsteczki mRNA.

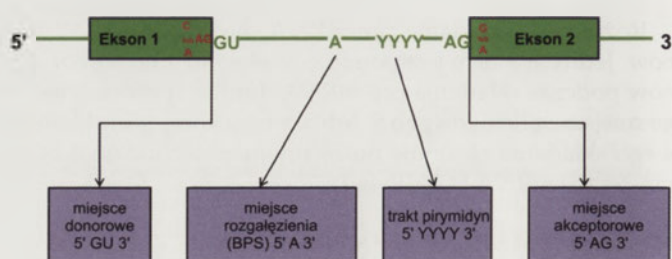
zgodności, do których należy miejsce donorowe, tworzone przez sekwencję GU na końcu 5' intronu i miejsce akceptorowe, tworzone przez sekwencję AG na końcu 3' intronu ((inne, rzadziej spotykane warianty sekwencji to np. 5'-AU-AC-3'). Ponadto wewnątrz intronu występują inne sekwencje biorące udział w procesie składania pre-mRNA. Jest to miejsce rozgałęzienia (ang. *BPS-Branch Point Sequence*) z nukleotydem adeninowym i trakt pirymidyn zlokalizowane na końcu 3' intronu [6] (Ryc. 2).

Kolejne etapy składania pierwotnego transkryptu są katalizowane przez kompleks składający, który powstaje z białek i pięciu matych jądrowych snRNA (ang. *small nuclear RNA*), tworzących razem małe jądrowe rybonukleoproteiny snRNP zwane: U1, U2, U4, U5 i U6 [7]. Jego formowanie u człowieka (Ryc. 3) przebiega wieloetapowo, z wytworzeniem kompleksów pośrednich: E, A, B i aktywnego katalitycznie kompleksu C. Kompleks E powstaje w momencie, w którym snRNP U1 przyłącza się do miejsca splicingowego 5', a do końca 3' intronu wiąże się cząsteczka U2AF. Cząsteczka ta składa się z dwóch podjednostek, z których większa o masie 65 kDa przyłącza się do traktu pirymidyn, a mniejsza o masie 35 kDa do miejsca splicingowego 3'. Cząsteczka U2AF pełni funkcję pomocniczą w wiązaniu snRNP U2 z miejscem rozgałęzienia [8]. Gdy dochodzi do związania U2 z miejscem rozgałęzienia powstaje kompleks A. Następnie przyłącza się do niego zespół rybonukleopro-

tein U4/5/6-tri snRNP, co prowadzi do uformowania kompleksu B, który podlega przekształceniom w aktywny katalitycznie kompleks C. W trakcie tych przekształceń snRNP U1 i U4 oddysocjują od kompleksu B, a pozostały zespół rybonukleoprotein U2/5/6-tri snRNP katalizuje dwie reakcje transestryfikacji, w wyniku których dochodzi do wycięcia intronu i połączenia ze sobą eksonów [9] (Ryc. 3).

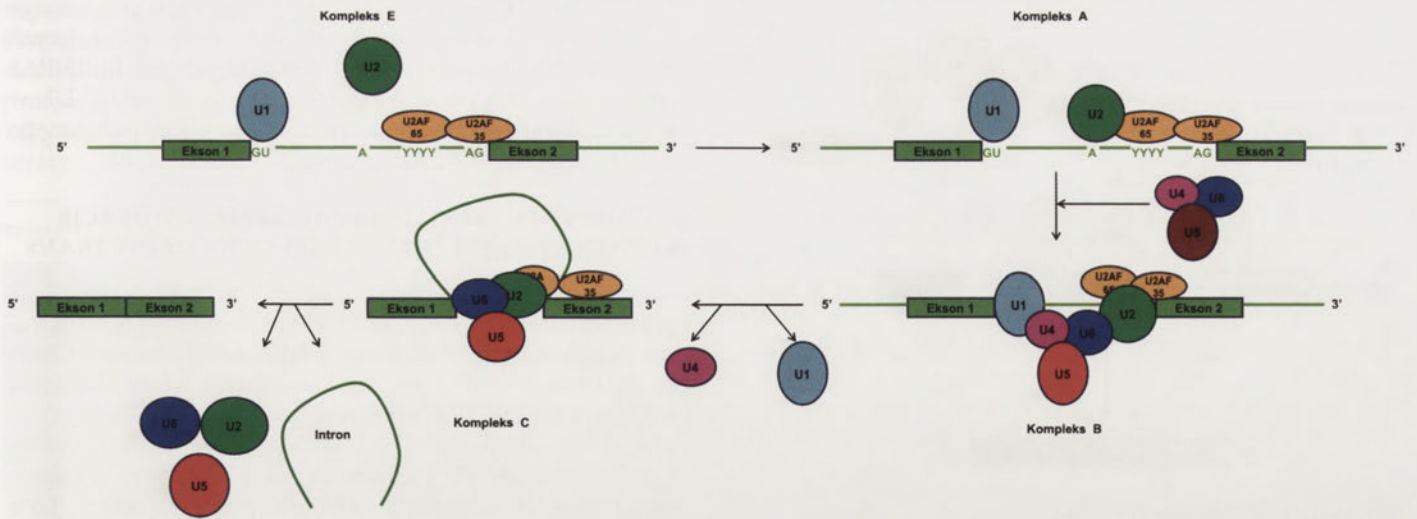
W pierwszej reakcji transestryfikacji grupa 2'-OH reszty adeniny w miejscu rozgałęzienia dokonuje ataku nukleofilowego na wiązanie 3'-5' fosfodiestrowe w miejscu 5' splicingowym. Następuje przecięcie połączenia ekson-intron w

### Pre-mRNA



Rycina 2. Sekwencje najwyższej zgodności w procesie wycinania intronów GU-AG z pre-mRNA.





Rycina 3. Etapy składania pre-mRNA katalizowane przez kompleks składający u człowieka. Formowanie kompleksu składającego u człowieka przebiega z wytworzeniem kompleksów pośrednich: E, A, B i aktywnego katalitycznego kompleksu C, który katalizuje reakcję wycinania intronu z pierwotnego transkryptu. Kompleksy formowane są przez cząstki snRNP U1, U2, U4-U6, wiążące się ze specyficznymi nukleotydami w obrębie intronu i na granicy intron-ekson. Wycięty w formie lasa intron podlega degradacji.

tym miejscu, powstanie eksonu 5' z wolną grupą hydroksylową na końcu 3' i utworzenie przez intron pętli przyłączonej do miejsca rozgałęzienia. W drugiej reakcji transestryfikacji wolna grupa hydroksylowa na końcu 3' eksonu 5' atakuje wiązanie 3'-5' fosfodiestrowe w miejscu 3' splicingowym. Dochodzi do przecięcia połączenia ekson-intron w tym miejscu i zastąpienia pętli intronu grupą 3'OH. Następnie intron zostaje uwolniony w formie lasa, a eksony połączone ze sobą [10].

### REGULACJA SKŁADANIA PRE-mRNA

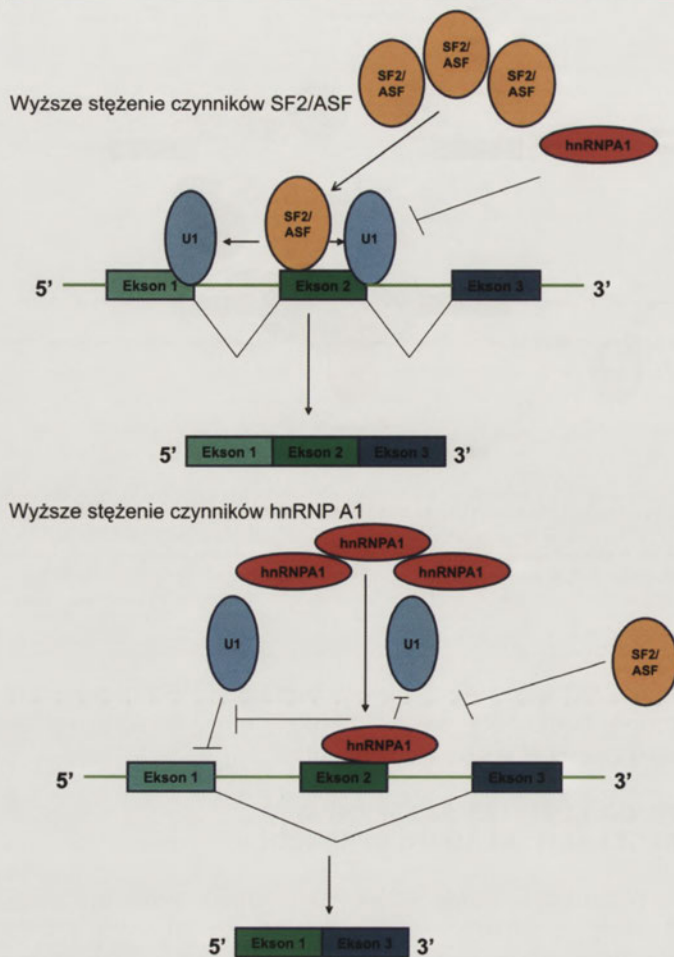
Wykazano, że ponad 90% genów człowieka posiada wiele różnych form splicingowych, co jest dowodem na to, że różnicowe składanie pre-mRNA jest jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za kompletowanie zestawu białek w komórce [11]. Zatem, aby każda komórka była wyposażona w prawidłowy i kompletny zestaw białek niezbędny do jej prawidłowego funkcjonowania, proces ten musi podlegać kontroli. Jego regulacja związana jest m.in. z typem komórki, stadium rozwojowym, płcią, odpowiedzią komórki na sygnały zewnątrzkomórkowe [12]. W regulacji różnicowego składania pre-mRNA genów biorą udział elementy *cis* i czynniki *trans*. Do elementów *cis* można zaliczyć miejsca splicingowe 5' i 3', a także wzmacniacze (ang. *enhancers*) i wyciszacze (ang. *silencers*) zlokalizowane wewnątrz eksonu (ESEs, ang. *exonic splicing enhancers*; ISEs, ang. *intronic splicing enhancers*) lub intronu, najczęściej w pobliżu miejsc splicingowych (ESSs, ang. *exonic splicing silencers*; ISSs, ang. *intronic splicing silencers*). Pomagają one w lokalizacji złącz ekson/intron przez kompleks składający. Współdziałają z nimi czynniki *trans*, do których należą liczne czynniki splicingowe, wśród których można wyróżnić białka SR i cząsteczki należące do rodziny heterogennych rybonukleoprotein hnRNP (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*). Czynniki splicingowe oddziałując z elementami *cis* wpływają na wiązanie elementów kompleksu składającego. Białka SR oddziałują zwykle z sekwencjami ESE i stymulują składanie pierwotnego transkryptu, podczas gdy cząsteczki

ki hnRNP wiążą się z sekwencjami ESS i ISS i hamują ten proces. Białka SR i cząsteczki hnRNP mogą konkurować ze sobą o wiązanie się z elementami *cis* [13].

### FUNKCJA BIAŁEK SR I hnRNP W REGULACJI SKŁADANIA PRE-mRNA

W budowie białek SR można wyróżnić jedną lub dwie domeny rozpoznające i wiążące RNA (tzw. domeny RRM), zlokalizowane na aminowym końcu cząsteczki białka oraz domenę bogatą w reszty seryny i arginy (tzw. domena RS), zlokalizowaną na karboksylowym końcu cząsteczki białka i odpowiedzialną za oddziaływanie z innymi białkami. Białka SR, oprócz regulacji składania pre-mRNA, biorą udział również w regulacji transkrypcji, transporcie mRNA z jądra do cytoplazmy oraz regulacji translacji [14]. Czynnikiem wpływającym na procesy, w których uczestniczą białka SR jest ich fosforylacja. Decyduje ona również o ich lokalizacji w komórce. Wśród białek SR można wyróżnić dwie grupy. Jedną z nich, to białka „wędrujące” między jądrem a cytoplazmą. Białka te cały czas pozostają związane z transkrypcją mRNA i biorą udział w kolejnych etapach obróbki potranskrypcyjnej. Drugą to białka „niewędrujące”, które oddysocjują od gotowego transkryptu i nie biorą udziału w dalszym dojrzewaniu mRNA np. w jego transporcie z jądra do cytoplazmy [15].

Białka SR uczestniczą w regulacji składania pre-mRNA na sposób zarówno kanoniczny, jak i różnicowy. W składaniu kanonicznym umożliwiają rozpoznawanie eksonów i odróżnienie ich od intronów przez kompleks składający. Białka SR oddziałując z ESE, pośredniczą w przyłączaniu snRNP U1 do miejsca splicingowego 5', cząsteczki U2AF do traktu pirymidyn i snRNP U2 do miejsca rozgałęzienia na końcu 3' intronu. Dodatkowo biorą udział w rekrutacji zespołu U4/5/6-tri snRNP i pośredniczą w wycinaniu intronu. W różnicowym składaniu pre-mRNA białka SR oddziałując z ESE wpływają na wybór alternatywnych miejsc splicingowych 3' i 5' przez kompleks składający. O tym, w jaki sposób ostatecznie połączą się eksony w procesie skła-



Rycina 4. Wpływ białek SF2/ASF i hnRNP A1 na wybór miejsca 5' splicingowego wg [20]. Wyższe stężenie czynników SF2/ASF promuje wiązanie cząsteczki snRNP U1 z miejscami 5' splicingowymi i wybór miejsca 5' splicingowego bliższego podczas składania pre-mRNA. Wyższe stężenie cząsteczek hnRNP A1 blokuje wiązanie snRNP U1, co powoduje wybór miejsca 5' splicingowego położonego dalej.

dania pre-mRNA, decyduje wybór bliżej bądź dalej położonych miejsc 3' i 5' splicingowych. Czynniki SR regulują wybór tych miejsc, a więc bezpośrednio wpływają na końcowy efekt różnicowego składania pre-mRNA. Białka SR działają antagonistycznie w stosunku do czynników hnRNPs [16,17]. Istnieją również pary białek SR, które działają antagonistycznie względem siebie [18].

W budowie białek hnRNP można wyróżnić domenę RRM rozpoznającą i wiążącą RNA oraz domenę pomocniczą odpowiedzialną za oddziaływanie z innymi białkami. Białka hnRNP biorą udział w regulacji różnicowego składania pre-mRNA, transkrypcji, transporcie mRNA z jądra do cytoplazmy i regulacji translacji [19].

Regulacja różnicowego składania pre-mRNA przez białka SR, których przedstawicielem jest czynnik SF2/ASF i białka hnRNP, do których należy czynnik hnRNP A1, związana jest z ich konkurowaniem o wybór miejsca 5' splicingowego i zależy od stężenia tych cząsteczek w komórce (Ryc. 4). Wyższe stężenie cząsteczek SF2/ASF promuje wiązanie cząsteczki snRNP U1 z miejscami 5' splicingowymi

i ostatecznie wybór miejsca 5' splicingowego położonego bliżej, czego skutkiem jest łączenie ze sobą sąsiadujących eksonów. Natomiast wyższe stężenie cząsteczek hnRNP A1 blokuje taką aktywność SF2/ASF i wiązanie snRNP U1, w wyniku czego dochodzi do pominięcia bliżej położonego eksonu podczas składania pre-mRNA [20] (Ryc. 4).

## ZABURZENIA SKŁADANIA PRE-mRNA – MUTACJE ELEMENTÓW CIS I ZABURZENIA CZYNNIKÓW TRANS

Nieprawidłowa regulacja składania pre-mRNA powoduje zaburzenia tego procesu, które mogą prowadzić do powstania nieprawidłowych izoform mRNA. Gdy przestają działać podstawowe mechanizmy kontrolujące jakość składania mRNA, takie jak NMD (ang. *nonsense mediated decay*), czyli proces degradacji cząsteczek mRNA, zawierających przedwczesne kodony STOP, dochodzi do translacji tych cząsteczek i syntezy skróconych, niefunkcyjnych białek. To z kolei może skutkować zaburzeniami w funkcjonowaniu komórki i w konsekwencji może prowadzić do rozwoju procesu chorobowego, m.in. nowotworów [21,22]. Źródłem zaburzeń składania pre-mRNA mogą być mutacje w elementach *cis*, bądź nieprawidłowości w działaniu czynników *trans* [23].

Mutacje w elementach *cis* można podzielić na dwie grupy. Pierwsza to mutacje które występują w miejscach splicingowych. Prowadzą one do modyfikacji bądź utraty kanonicznych miejsc splicingowych i powstania pseudomiejsc splicingowych lub utworzenia całkiem nowych, alternatywnych miejsc splicingowych. Skutkiem tych mutacji może być pomijanie kanonicznych eksonów lub włączanie intronów do transkryptu mRNA, co może doprowadzić do zmiany ramki odczytu lub pojawienia się przedwcześnie kodonu STOP i zaburzenia syntezy właściwych komórce białek [24]. Mutacje *cis* mogą też dotyczyć sekwencji wzmacniających lub wyciszających położonych w eksonach bądź intronach. Uniemożliwia to wiązanie się z tymi elementami czynników *trans*, czego skutkiem jest najczęściej zaburzona regulacja składania pre-mRNA, co prowadzi do zmiany stosunków między prawidłowymi a nieprawidłowymi izoformami mRNA/białek w komórce [25-27].

Zaburzenia czynników *trans* dotyczą przede wszystkim elementów kompleksu składającego oraz czynników regulujących składanie pre-mRNA. Zaburzenia te polegają głównie na zmianie stężeń, aktywności, jak również lokalizacji komórkowej czynników *trans*. Zmiany w funkcjonowaniu tych czynników wpływają negatywnie na regulację procesu składania pre-mRNA i mogą nawet powodować całkowite zahamowanie ekspresji [28].

## ZABURZENIA SKŁADANIA PRE-mRNA A PROCES NOWOTWORZENIA

Nieprawidłowości podczas różnicowego składania pre-mRNA są szczególnie często obserwowane w nowotworach. Zaburzenia te polegają na powstawaniu nieprawidłowych wariantów splicingowych bądź zaburzaniu stosunków ilościowych pomiędzy prawidłowymi izoformami (Tab. 1).

Szczególne znaczenie mają zaburzenia składania pre-mRNA prowadzące do zmian właściwości onkogenów,

supresorów nowotworowych i regulatorów apoptozy. Przykładem takiej sytuacji jest zaburzenie różnicowego składania pre-mRNA genu BIN1. Białko Bin1 oddziałuje z protoonkogenem c-myc, hamując jego onkogenne działanie. Włączenie eksonu 12A do transkryptu Bin1 prowadzi do utraty tych supresorowych właściwości Bin1. Nadekspresję

wariantów transkrypcyjnych zawierających ekson 12A zaobserwowano w czerniaku [29].

Zaburzenie różnicowego składania pre-mRNA mogą prowadzić do powstawania wariantów splicingowych produktów tego samego genu o przeciwstawnych właściwościach: promujących bądź hamujących kancerogenezę.

Tabela 1. Zaburzenia różnicowego składania pre-mRNA w nowotworach.

Białko	Funkcja	Efekty zaburzeń składania pre-mRNA	Konsekwencje na poziomie białka i komórki	Nowotwór	Piśmiennictwo
Bin1	supresor nowotworowy	izoforma Bin1 z eksonem 12A	białko pozbawione właściwości supresorowych	czerniak	[29]
KLF6	czynnik splicingowy	izoforma KLF-SV1	białko o właściwościach onkogennych	rak prostaty, piersi, jajnika	[30]
Ron	receptor o aktywności kinazy tyrozynowej	izoforma $\Delta$ Ron	wpływ na przerzutowanie nowotworu	rak piersi, jajnika	[31]
GLI1	czynnik transkrypcyjny	izoforma tGLI1	wpływ na migrację i inwazyjność komórek nowotworowych	glejak wielopostaciowy	[32]
Rac1	białko G regulujące proliferację komórek	izoforma Rac1b	białko o właściwościach onkogennych	rak jelita grubego	[36]
BRCA1	supresor nowotworowy	skrócone izoformy BRCA1	białko pozbawione właściwości supresorowych	rak piersi	[39,40]
APC	supresor nowotworowy	skrócone izoformy APC	białko pozbawione właściwości supresorowych	zespół gruczolakowatej polipowatości rodzinnej (FAP)	[42]
hMLH1	białko naprawy DNA	izoforma hMLH1 bez fragmentu eksonu 1	białko pozbawione zdolności naprawy niesparowanych zasad w DNA	dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością (HNPCC)	[44]
Ceacam1	białko regulujące proliferację, adhezję i apoptozę komórek	zaburzony stosunek izoform Caecam1: krótkiej Caecam1S i długiej Caecam1L	zaburzona regulacja adhezji, proliferacji i apoptozy komórek	rak piersi i jelita grubego	[64,65]
Kaspaza 9	regulator apoptozy	zaburzony stosunek izoform kaspazy-9: proapoptotycznej 9a i antyapoptotycznej 9b	zaburzona regulacja procesu apoptozy	rak nerki typu jasnokomórkowego	[47]
Surwiwina	regulator apoptozy	zaburzony stosunek izoform surwiwiny: proapoptotycznej surwiwiny-2B i antyapoptotycznej surwiwiny- $\Delta$ Ex3	brak informacji	rak nerkowokomórkowy (RCC)	[66]
CD44	receptor uczestniczący w adhezji komórkowej	izoformy CD44v powstające w wyniku różnicowego składania środkowych eksonów	wpływ na przerzutowanie	rak płuca, prostaty, żołądka	[67-69]
VEGF	czynnik wzrostu śródblonka naczyniowego	obniżona ekspresja izoformy VEGF <sub>183</sub> b	obniżona ekspresja czynnika anty-angiogenego	rak nerkowokomórkowy (RCC)	[70]

Przykładem takiego genu jest *KLF6*, należący do wielkiej rodziny czynników transkrypcyjnych KLF (ang. *Krüppel-like zinc finger transcription factors*). Wariant splicingowy KLF6-SV1 ma właściwości onkogenne i jego synteza jest podwyższona w szeregu nowotworów. Nasiloną synteza KLF6-SV1 jest złym prognostykiem w raku prostaty, piersi i jajnika. KLF6-SV1 działa antagonistycznie w stosunku do KLF6, który ma właściwości supresorowe [30].

Nieprawidłowe składanie pre-mRNA może też wpływać na przerzutowanie nowotworów, co wykazano na przykładzie białek Ron i GLI1. Białko Ron jest receptorem o aktywności kinazy tyrozynowej, wiążącym białko stymulujące makrofagi (MSP, ang. *macrophage stimulating protein*). Ron wpływa przede wszystkim na zanikanie połączeń między komórkami, ich przemieszczanie się i inwazję sąsiednich tkanek, co ma miejsce podczas organogenezy lub w czasie przerzutowania nowotworów. Zaburzenia różnicowego składania pierwotnego transkryptyu genu Ron wynikające np. z nadprodukcji czynnika splicingowego SF2/ASF prowadzą do ciągłego usuwania eksonu 11 z transkryptów Ron i powstawania izoform  $\Delta$ Ron, które powodują zwiększoną migrację i inwazyjność komórek nowotworowych. Zwiększoną syntezę  $\Delta$ Ron zaobserwowano w raku piersi i jelita grubego [31]. Białko Gli1 należy do czynników transkrypcyjnych będących częścią szlaku sygnałowego białek hedgehog (HH), który odgrywa istotną rolę podczas proliferacji, podziałów i apoptozy komórek, przede wszystkim w okresie embriogenezy. W komórkach glejaka wielopostaciowego zidentyfikowano wariant splicingowy tGLI1, który aktywując ekspresję genu CD24 powoduje nasiloną ruchliwość i inwazyjność komórek nowotworowych [32].

Białko Rac1 należy do rodziny białek GTPaz podobnych do białek Rho (ang. *Rho-like GTPases*), które poprzez regulację aktywności budującej cytoszkielet wpływają na komórkową adhezję, migrację i inwazję. Rac1 wpływa również na transkrypcję wielu genów oraz proliferację komórkową. W raku piersi i jelita grubego zidentyfikowano izoformę Rac1b powstającą w wyniku różnicowego składania pre-mRNA genu Rac1 [33,34]. Wykazano, że Rac1b pozostaje cały czas w formie aktywnej, związanej z GTP i może powodować transformację komórek mysich fibroblastów [35] oraz wpływać na przeżywalność komórek nowotworowych jelita grubego [36].

#### PRZYCZYNY ZABURZEŃ RÓZNICOWEGO SKŁADANIA PIERWOTNEGO TRANSKRYPTU W NOWOTWORACH

Jedną z przyczyn powstawania nieprawidłowych wariantów splicingowych w nowotworach są mutacje elementów *cis*. Liczne mutacje tego typu wykryto w genie kodującym supresor nowotworowy BRCA1, którego produkt białkowy uczestniczy w naprawie DNA. Wszelkie nieprawidłowości w działaniu genu BRCA1, w tym zaburzenia różnicowego składania pre-mRNA zwiększają prawdopodobieństwo zachorowania na raka piersi. Do tej pory zidentyfikowano szereg nieprawidłowości zachodzących podczas składania pre-mRNA BRCA1. Stwierdzono m.in. występowanie mutacji nonsensownej w eksonie 18, która blokuje wiązanie się czynnika SF2/ASF z ESE oraz mutację punktową w eksonie 5. Obie te mutacje powodują usunięcie tych eksonów z transkryptów BRCA1 [37,38]. Oprócz tego zidentyfikowa-

no wiele mutacji w miejscach splicingowych genu BRCA1. Mutacje te powodują na przykład usunięcie eksonu 3 lub 5 z mRNA, co prowadzi do syntezy białka pozbawionego kilkunastu aminokwasów tworzących N-kończącą domenę RING odpowiedzialną za oddziaływanie białka BRCA1 z białkami BARD1 i BAP1 (oddziaływanie to jest decydujące dla supresorowych właściwości białka BRCA1). Mutacje miejsc splicingowych, w wyniku których dochodzi do usuwania eksonu 18 i 19 oraz 20 powodują natomiast powstawanie przedwczesnych kodonów STOP i degradację takich transkryptów na drodze mechanizmu NMD [39,40]. Zaobserwowano również różne profile składania pre-mRNA czterech głównych izoform genu BRCA1 w komórkach nowotworowych i prawidłowych, co sugeruje, że zaburzenia składania pre-mRNA genu BRCA1 mogą wpływać na rozwój raka piersi [41].

W zespole gruczolakowatej polipowatości rodzinnej (FAP, ang. *familial adenomatous polyposis*), który stanowi stan przedrakowy, prowadzący do raka jelita grubego, również stwierdzono liczne zaburzenia różnicowego składania pre-mRNA genu APC, kodującego białko pełniące funkcję supresora nowotworowego w jelicie grubym. Składanie pre-mRNA genu APC decyduje o jego aktywności, zatem wszelkie nieprawidłowości podczas tego procesu mogą prowadzić do powstania niefunkcjonalnego białka APC i transformacji nowotworowej. Zidentyfikowano szereg mutacji w miejscach splicingowych oraz w ESE w eksonach 4, 14 oraz 15 (który stanowi 70% sekwencji kodującej), prowadzących do usunięcia ich w całości lub w części z transkryptu APC i utratę przez białko APC właściwości supresorowych [42]. Na przykład mutacja punktowa w eksonie 14 zachodzi w rejonie ESE i uniemożliwia wiązanie się w tym miejscu czynnika SF2/ASF. Powoduje to usunięcie eksonu 14 z transkryptu APC, co prowadzi do przesunięcia ramki odczytu i powstania przedwczesnego kodonu STOP, a w konsekwencji syntezę skróconego białka APC, które jest pozbawione możliwości hamowania nadmiernego wzrostu komórek [43].

W dziedzicznym raku jelita grubego niezwiązanym z polipowatością (HNPCC, ang. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) zaobserwowano zaburzenia składania pre-mRNA jednego z genów naprawy DNA, hMLH1, który koduje białko MLH1, biorące udział w naprawie niesparowanych zasad. W eksonie 1 genu hMLH1 stwierdzono występowanie mutacji punktowej, która prowadzi do utraty kanonicznego miejsca splicingowego i powstania pseudomiejścia splicingowego [44]. Powoduje to przesunięcie ramki odczytu i usunięcie 17 kodonów z transkryptu hMLH1, a w konsekwencji prowadzi do syntezy skróconego białka MLH1, posiadającego krótszą domenę odpowiedzialną za wiązanie ATP, która decyduje o możliwości przemieszczania się białka MLH1 wzdłuż cząsteczki DNA do miejsca niesparowania.

Oprócz mutacji elementów *cis* prowadzących do powstawania nieprawidłowych wariantów splicingowych, częstą przyczyną nieprawidłowości w różnicowym składaniu eksonów są zaburzenia syntezy czynników splicingowych. Co więcej, zmiany te mogą być bezpośrednią przyczyną procesu nowotworzenia. Karni i wsp. [45] wykazali, że gen kodujący czynnik splicingowy SF2/ASF należący do rodziny białek SR jest typowym protoonkogenem, którego

synteza jest podwyższona w szeregu nowotworów, m. in. raku jelita grubego, tarczycy, jelita cienkiego, nerki i płuca. Nadsynteza SF2/ASF w mysich fibroblastach powoduje ich nowotworową transformację i formowanie guzów nowotworowych u myszy. Proces ten jest hamowany wskutek wyłączenia syntezy SF2/ASF. Na poziomie molekularnym onkogenne działanie SF2/ASF polega m.in. na regulacji składania pre-mRNA supresora nowotworowego Bin1 w kierunku syntezy wariantu pozbawionego aktywności supresorowej. SF2/ASF reguluje też składanie transkryptów innych supresorów nowotworowych (BRCA1/2) oraz onkogenów (MKNK2, S6K1, C-myb, B-myb) [45].

Różne prace sugerują, że zaburzenia różnicowego składania pre-mRNA w nowotworach wynikają z nieprawidłowej syntezy całych grup czynników splicingowych. Tak jest na przykład w raku nerki, w którym wykazano zaburzenie syntezy siedmiu czynników splicingowych z grupy SR oraz białka hnRNP A1 [46,47]. Zaburzeniom tym towarzyszą nieprawidłowości w składaniu pre-mRNA regulatorów genów uczestniczących w kontroli procesu nowotworzenia: RON, CEACAM1, Rac1, kaspazy 9 i GIL1, a także genu kodującego jodotyroninową dejodynazę typu 1, enzymu biorącego udział w aktywacji hormonów tarczycy [46,47]. Nasiloną syntezę białek SR SF2/ASF, SRp20 i SC35 stwierdzono w raku szyjki macicy [48]. W raku jelita grubego wykazano nieprawidłową syntezę czynników splicingowych SF2/ASF, SRp40, SRp55 i SRp75 wraz z zaburzonym składaniem produktu genu CD44 [49]. Podobne wyniki uzyskano analizując mysim modelem raka piersi [50], w którym zmiany w składaniu pre-mRNA genu CD44 towarzyszyły zaburzeniom ekspresji kilku czynników SR, m.in. SRp20. W mysim modelu raku płuca stwierdzono zaburzenia syntezy antagoniście działających czynników SF2/ASF i hnRNP A1, czemu towarzyszyła synteza związanego z przerzutowaniem wariantu splicingowego CD44 [51]. W raku jajnika wykazano podwyższoną syntezę czynników splicingowych PTB i SRp20 oraz zaburzone składanie produktu genu MRP1 (ang. *multidrug resistant protein 1*) [52].

## ZABURZENIA RÓŻNICOWEGO SKŁADANIA PRE-mRNA – IMPLIKACJE KLINICZNE

Obserwowane w licznych typach nowotworów zaburzenia różnicowego składania pre-mRNA coraz częściej skłaniają badaczy do podejmowania prób wykorzystania tej wiedzy w opracowaniach nowych testów diagnostycznych i metod leczenia. Najbardziej efektywną metodą poszukiwania splicingowych markerów nowotworowych są masowe analizy na poziomie transkryptomu. Najpopularniejszą metodą takiej analizy są mikromacierze oparte na oligonukleotydach z wykorzystaniem sond zawierających połączenia ekson-intron. Wyniki mikromacierzy są następnie weryfikowane tradycyjną metodą wykorzystującą reakcję odwrotnej transkrypcji i PCR (RT-PCR). Wykorzystując tę metodę poszukiwano markerów nowotworowych chłoniaka Hodgkina [53], białaczki [54], linii komórkowych raka piersi [55], raka jelita grubego [56], nowotworów mózgu [57] i raka płuca [58]. Wyniki tych analiz pokazały, że istnieją specyficzne dla grup komórek nowotworowych wzory wariantów splicingowych pozwalające niekiedy nawet na klasyfikowanie nowotworów zgodnie ze stopniem zróżnicowania histopatologicznego.

Przykładem analizy łączącej tradycyjne podejście mikromacierz-weryfikacja RT-PCR jest LISA (ang. *layered and integrated system for splicing annotation*), będąca platformą pozwalającą na wykonywanie i analizowanie 3000 reakcji RT-PCR dziennie. Wykorzystując platformę LISA zidentyfikowano wzory wariantów splicingowych specyficznych dla raka jajnika i wykazano, że wzory te są skutecznym narzędziem diagnostycznym pozwalającym na odróżnienie komórek prawidłowych od nowotworowych. [59]. To samo podejście zastosowane do raka piersi pozwoliło na opracowanie testu pozwalającego na identyfikację komórek nowotworowych z 96% skutecznością, a także na uszeregowanie nowotworów według stopnia zróżnicowania histopatologicznego [60].

Udowodnione specyficzne anty- bądź proproliferacyjne działanie poszczególnych wariantów splicingowych stanowi punkt wyjścia do prób manipulowania składaniem eksonów *in vivo*, w celu uzyskania przewagi wariantów hamujących kancerogenezę. Przykładem takiego podejścia jest praca Mercatante i wsp. [61], w której zastosowanie antysensownych oligonukleotydów pozwoliło na zmianę wzoru składania pre-mRNA genu Bcl-x, którego dwa warianty splicingowe wykazują przeciwstawne działanie: Bcl-xL hamuje apoptozę, a Bcl-xS ją promuje. Przesunięcie reakcji składania pre-mRNA genu Bcl-x w kierunku wariantu Bcl-xS spowodowało indukcję apoptozy w liniach komórkowych wywodzących się z raka piersi i raka prostaty. Zmiana składania pierwotnego transkryptu tego genu uwrażliwiła również badane komórki na chemioterapeutyki stosowane w terapii antynowotworowej [61]. Podobne wyniki uzyskano zwiększając ekspresję proapoptotycznego wariantu genu surwiwiny 2B, co spowodowało zahamowanie wzrostu komórek ostrej białaczki limfocytarnej i uwrażliwienie ich na indukowaną doksorubicyną apoptozę [62].

Fakt, że nasiloną syntezą czynników splicingowych może być bezpośrednią przyczyną nowotworzenia powoduje podejmowanie prób obniżenia syntezy tych białek w celu zahamowania proliferacji nowotworowej. W 2003 r. wykazano, że obniżenie poziomu syntezy białek hnRNP A1/A2 powoduje indukcję apoptozy w liniach komórkowych wywodzących się z raków szyjki macicy, jelita grubego, piersi, jajnika i nowotworów mózgu [63]. We wspomnianej wcześniej pracy [45] wykazano, że zahamowanie ekspresji SF2/ASF prowadzi do zmniejszenia guzów nowotworowych wywoływanych doświadczalnie u myszy.

## PODSUMOWANIE

Nieprawidłowości różnicowego składania pierwotnego transkryptu są molekularnymi zaburzeniami często obserwowanymi w komórkach nowotworowych. Najważniejsze kierunki badań nad tymi zaburzeniami skupiają się na ich wykorzystaniu jako narzędzi diagnostycznych; trwają też badania (głównie *in vitro*) nad manipulacją składaniem pre-mRNA w komórce w celu uzyskania efektu terapeutycznego. Najpoważniejsze ograniczenia wydają się wynikać ze znacznych różnic indywidualnych we wzorach splicingu, różniących się pomiędzy poszczególnymi chorymi z tymi samymi typami nowotworów. Przyszłościowa wobec tego może się okazać molekularna diagnostyka i terapia „szyta na miarę pacjenta” i dobór odpowiednich strategii zmienia-

jących reakcję składania pre-mRNA w zależności od indywidualnego profilu wariantów splicingowych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Brown TA (2002) Genomes, Garland Science, New York and London
2. Faustino NA, Cooper TA (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 17: 419-437
3. Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Hang Z, Toiber D, Thanaraj TA, Soreq H (2005) Function of alternative splicing. *Gene* 344: 1-20
4. Sygnet CW, Kent WJ, Ares M Jr, Haussler D (2004) Transcriptome and genome conservation of alternative splicing events in humans and mice. *Pac Symp Biocomput* 66-77
5. Ast G (2004) How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet* 5: 773-782
6. Warf MB, Berglund JA (2010) Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends Biochem Sci* 35: 169-178
7. Jurica MS, Moore MJ (2003) Pre-mRNA splicing: a wash in a sea of proteins. *Mol Cell* 12: 5-14
8. Ritchie DB, Schellenberg MJ, MacMillan AM (2009) Spliceosome structure: piece by piece. *Biochim Biophys Acta* 1789: 624-633
9. House AE, Lynch KW (2008) Regulation of alternative splicing: more than just the ABCs. *J Biol Chem* 283: 1217-1221
10. Black DL (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72: 291-336
11. Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD (2003) Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* 302: 2141-2144
12. Kalnina Z, Zayakin P, Silina K, Line A (2005) Alterations of pre-mRNA splicing in cancer. *Genes Chromosomes Genes* 42: 342-357
13. Jensen CJ, Oldfield BJ, Rubio JP (2009) Splicing, cis genetic variation and disease. *Biochem Soc Trans* 37: 1311-1315
14. Shepard PJ, Hertel KJ (2009) The SR protein family. *Genome Biol* 10: 242
15. Piekietko-Witkowska A (2006) Plejotropowy efekt fosforylacji białek wiążących RNA bogatych w serynę i argininę. *Postepy Biochem* 52: 383-389
16. Sanford JR, Ellis J, Cáceres JF (2005) Multiple roles of arginine/serine-rich splicing factors in RNA processing. *Biochem Soc Trans* 33: 443-446
17. Long JC, Cáceres JF (2009) The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J* 417: 15-27
18. Chandradas S, Deikus G, Tardos JG, Bogdanov VY (2010) Antagonistic roles of four SR proteins in the biosynthesis of alternatively spliced tissue factor transcripts in monocytic cells. *J Leukoc Biol* 87: 147-152
19. He Y, Smith R (2009) Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cell Mol Life Sci* 66: 1239-1256
20. Cáceres JF, Kornblihtt AR (2002) Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* 18: 186-193
21. Scholzová E, Malík R, Sevcík J, Kleibl Z (2007) RNA regulation and cancer development. *Cancer Lett* 246: 12-23
22. Dzikiewicz A, Szweykowska-Kuklińska Z (2006) Degradacja mRNA noszących przedwczesny kodon STOP (NMD) - na straży jakości mRNA. *Postepy Biochem* 52: 390-398
23. Ward AJ, Cooper TA (2010) The pathobiology of splicing. *J Pathol* 220: 152-163
24. Krawczyk M, Thomas NS, Hundrieser B, Mort M, Wittig M, Hampe J, Cooper DN (2007) Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Hum Mutat* 28: 150-158
25. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3: 285-298
26. Baralle D, Baralle M (2005) Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet* 42: 737-748
27. Pozzoli U, Sironi M (2005) Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell Mol Life Sci* 62: 1579-1604
28. Matlin AJ, Clark F, Smith CWJ (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 386-398
29. Ge K, DuHadaway J, Du W, Herlyn M, Rodeck U, Prendergast GC (1999) Mechanism for elimination of a tumor suppressor: aberrant splicing of a brain-specific exon causes loss of function of Bin1 in melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9689-9694
30. DiFeo A, Martignetti JA, Narla G (2009) The role of KLF6 and its splice variants in cancer therapy. *Drug Resist Updat* 12: 1-7
31. Ghigna C, Giordano S, Shen H, Benvenuto F, Castiglioni F, Comoglio PM, Green MR, Riva S, Biamonti G (2005) Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Mol Cell* 20: 881-890
32. Lo HW, Zhu H, Cao X, Aldrich A, Ali-Osman F (2009) A novel splice variant of GLI1 that promotes glioblastoma cell migration and invasion. *Cancer Res* 69: 6790-6798
33. Schnelzer A, Prechtel D, Knaus U, Dehne K, Gerhard M, Graeff H, Harbeck N, Schmitt M, Lengyel E (2000) Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* 19: 3013-3020
34. Jordan P, Brazão R, Boavida MG, Gespach C, Chastre E (1999) Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene* 18: 6835-6839
35. Singh A, Karnoub AE, Palmby TR, Lengyel E, Sondek J, Der CJ (2004) Rac1b, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation. *Oncogene* 23: 9369-9380
36. Matos P, Jordan P (2008) Increased Rac1b expression sustains colorectal tumor cell survival. *Mol Cancer Res* 6: 1178-1184
37. Liu HX, Cartegni L, Zhang MQ, Krainer AR (2001) A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat Genet* 27: 55-58
38. Yang Y, Swaminathan S, Martin BK, Sharan SK (2003) Aberrant splicing induced by missense mutations in BRCA1: clues from a humanized mouse model. *Hum Mol Genet* 12: 2121-2131
39. Claes K, Poppe B, Machackova E, Coene I, Foretova L, De Paepe A, Messiaen L (2003) Differentiating pathogenic mutations from polymorphic alterations in the splice sites of BRCA1 and BRCA2. *Genes Chromosomes Cancer* 37: 314-320
40. Tesoriero AA, Wong EM, Jenkins MA, Hopper JL, Brown MA, Chen-ivix-Trench G, Spurdle AB, Southey MC, kConFab (2005) Molecular characterization and cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 splice site variants identified in multiple-case breast cancer families. *Hum Mutat* 26: 495
41. Orban TI, Olah E (2001) Expression profiles of BRCA1 splice variants in asynchronous and in G1/S synchronized tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 32-38
42. Aretz S, Uhlhaas S, Sun Y, Pagenstecher C, Mangold E, Caspari R, Moslein G, Schulmann K, Propping P, Friedl W (2004) Familial adenomatous polyposis: aberrant splicing due to missense or silent mutations in the APC gene. *Hum Mutat* 24: 370-380
43. Gonçalves V, Theisen P, Antunes O, Medeira A, Ramos JS, Jordan P, Isidro G (2009) A missense mutation in the APC tumor suppressor gene disrupts an ASF/SF2 splicing enhancer motif and causes pathogenic skipping of exon 14. *Mutat Res* 662: 33-36
44. Baehring J, Sutter C, Kadmon M, Doeberitz MV, Gebert J (2006) A 'nonsense' mutation leads to aberrant splicing of hMLH1 in a German hereditary non-polyposis colorectal cancer family. *Fam Cancer* 5: 195-199
45. Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR (2007) The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol* 14: 185-193
46. Piekietko-Witkowska A, Master A, Wojcicka A, Boguslawska J, Brozda I, Tanski Z, Nauman A (2009) Disturbed expression of type 1 iodothyronine deiodinase splice variants in human renal cancer. *Thyroid* 19: 1105-1113

47. Piekietko-Witkowska A, Wiszomirska H, Wojcicka A, Poplawski P, Boguslawska J, Tanski Z, Nauman A (2010) Disturbed expression of splicing factors in renal cancer results in impaired alternative splicing of apoptosis regulators, oncogenes and tumor suppressors. *PLoS One*, w druku
48. Mole S, McFarlane M, Chuen-Im T, Milligan SG, Millan D, Graham SV (2009) RNA splicing factors regulated by HPV16 during cervical tumour progression. *J Pathol* 219: 383-391
49. Ghigna C, Moroni M, Porta C, Riva S, Biamonti G (1998) Altered expression of heterogenous nuclear ribonucleoproteins and SR factors in human colon adenocarcinomas. *Cancer Res* 58: 5818-5824
50. Stickeler E, Kittrell F, Medina D, Berget SM (1999) Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis. *Oncogene* 18: 3574-3582
51. Zerbe LK, Pino I, Pio R, Cosper PF, Dwyer-Nield LD, Meyer AM, Port JD, Montuenga LM, Malkinson AM (2004) Relative amounts of antagonistic splicing factors, hnRNP A1 and ASF/SF2, change during neoplastic lung growth: implications for pre-mRNA processing. *Mol Carcinog* 41: 187-196
52. He X, Ee PL, Coon JS, Beck WT (2004) Alternative splicing of the multi-drug resistance protein 1/ATP binding cassette transporter subfamily gene in ovarian cancer creates functional splice variants and is associated with increased expression of the splicing factors PTB and SRp20. *Clin Cancer Res* 10: 4652-4660
53. Relógio A, Ben-Dov C, Baum M, Ruggiu M, Gemund C, Benes V, Darnell RB, Valcárcel J (2005) Alternative splicing microarrays reveal functional expression of neuron-specific regulators in Hodgkin lymphoma cells. *J Biol Chem* 280: 4779-4784
54. Milani L, Fredriksson M, Syvänen AC (2006) Detection of alternatively spliced transcripts in leukemia cell lines by minisequencing on microarrays. *Clin Chem* 52: 202-211
55. Li C, Kato M, Shiue L, Shively JE, Ares M Jr, Lin RJ (2006) Cell type and culture condition-dependent alternative splicing in human breast cancer cells revealed by splicing-sensitive microarrays. *Cancer Res* 66: 1990-1999
56. Garrdina PJ, Clark TA, Shimada B, Staples MK, Yang Q, Veitch J, Schweitzer A, Awad T, Sugnet C, Dee S, Davies C, Williams A, Turpaz Y (2006) Alternative splicing and differential gene expression in colon cancer detected by a whole genome exon array. *BMC Genomics* 7: 325
57. French PJ, Peeters J, Horsman S, Duijm E, Siccama I, van den Bent MJ, Luidert TM, Kros JM, van der Spek P, Sillevius Smitt PA (2007) Identification of differentially regulated splice variants and novel exons in glial brain tumors using exon expression arrays. *Cancer Res* 67: 5635-5642
58. Xi L, Feber A, Gupta V, Wu M, Bergemann AD, Landreneau RJ, Litle VR, Pennathur A, Luketich JD, Godfrey TE (2008) Whole genome exon arrays identify differential expression of alternatively spliced, cancer-related genes in lung cancer. *Nucleic Acids Res* 36: 6535-6547
59. Klinck R, Bramard A, Inkel L, Dufresne-Martin G, Gervais-Bird J, Madden R, Paquet ER, Koh C, Venables JP, Prinos P, Jilaveanu-Pelms M, Wellinger R, Rancourt C, Chabot B, Abou Elela S (2008) Multiple alternative splicing markers for ovarian cancer. *Cancer Res* 68: 657-663
60. Venables JP, Klinck R, Bramard A, Inkel L, Dufresne-Martin G, Koh C, Gervais-Bird J, Lapointe E, Froehlich U, Durand M, Gendron D, Brosseau JP, Thibault P, Lucier JF, Tremblay K, Prinos P, Wellinger RJ, Chabot B, Rancourt C, Elela SA (2008) Identification of alternative splicing markers for breast cancer. *Cancer Res* 68: 9525-9531
61. Mercatante DR, Mohler JL, Kole R (2002) Cellular response to an antisense-mediated shift of Bcl-x pre-mRNA splicing and antineoplastic agents. *J Biol Chem* 277: 49374-49382
62. Zhu N, Gu L, Findley HW, Li F, Zhou M (2004) An alternatively spliced survivin variant is positively regulated by p53 and sensitizes leukemia cells to chemotherapy. *Oncogene* 23: 7545-7551
63. Patry C, Bouchard L, Labrecque P, Gendron D, Lemieux B, Toutant J, Lapointe E, Wellinger R, Chabot B (2003) Small interfering RNA-mediated reduction in heterogeneous nuclear ribonucleoparticule A1/A2 proteins induces apoptosis in human cancer cells but not in normal mortal cell lines. *Cancer Res* 63: 7679-7688
64. Gaur S, Shively JE, Gaur RK (2008) Altered splicing of CEACAM1 in breast cancer: identification of regulatory sequences that control splicing of CEACAM1 into long or short cytoplasmic domain isoforms. *Mol Cancer* 7: 46
65. Turbide C, Kunath T, Daniels E, Beauchemin N (1997) Optimal ratios of biliary glycoprotein isoforms required for inhibition of colonic tumor cell growth. *Cancer Res* 57: 2781-2788
66. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD (1999) Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res* 59: 6097-6102
67. Hirata T, Fukuse T, Naiki H, Hitomi S, Wada H (1998) Expression of CD44 variant exon 6 in stage I non-small cell lung carcinoma as a prognostic factor. *Cancer Res* 58: 1108-1110
68. Aaltomaa S, Lipponen P, Ala-Opas M, Kosma VM (2001) Expression and prognostic value of CD44 standard and variant v3 and v6 isoforms in prostate cancer. *Eur Urol* 39: 138-144
69. Xin Y, Grace A, Gallagher MM, Curran BT, Leader MB, Kay EW (2001) CD44V6 in gastric carcinoma: a marker of tumor progression. *App Immunohistochem Mol Morphol* 9: 138-142
70. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ (2002) VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 62: 4123-4131

## Disturbances of alternative splicing in cancer

Hanna Wiszomirska, Agnieszka Piekietko-Witkowska, Alicja Nauman<sup>✉</sup>

Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Medical Centre of Postgraduate Education, 99/103 Marymoncka St., 01-813 Warsaw, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: anauman@cmkp.edu.pl

**Key words:** apoptosis, carcinogenesis, oncogene, alternative splicing, tumor suppressor

### ABSTRACT

Splicing of pre-mRNA is one of the post-transcriptional modifications in which introns are removed from primary transcript and exons are joined. pre-mRNA splicing reactions are catalyzed by dynamic complex called spliceosome. Exons can be joined on different manners in a process known as alternative splicing, that provide production of multiple mRNA and protein isoforms from relatively low number of genes. Alternative splicing is regulated by *cis* elements localized within exons or introns and *trans*-acting factors including spliceosome components and members of the SR and hnRNP protein family that exert antagonistic effects on splicing. Aberrant pre-mRNA splicing may be caused by mutations in *cis* elements and altered expression of splicing factors. This review describes disturbances in splicing of genes controlling proliferation and metastasis that can lead to tumoral transformation. Also, potential applications of abnormally spliced transcripts that may potentially serve as diagnostic biomarkers of cancer or targets in anticancer therapy are discussed.

# Budowa krypt komórkowych i ich rola w funkcjonowaniu komórki oraz w oporności wielolekowej nowotworów

Witold Szaflarski✉

Michał Nowicki

Maciej Zabel

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań

✉Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. H. Świątcickiego 6, 60-781 Poznań; tel.: (61) 854 64 39, e-mail: witold.szaflarski@gmail.com

Artykuł otrzymano 4 października 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 9 grudnia 2010 r.

**Słowa kluczowe:** krypty komórkowe, MVP/LRP, TEP1, vPARP, oporność wielolekowa, nowotwory

**Stosowane skróty:** kDa – kilodaltonów; LRP (ang. *Lung Resistance-related Protein*) – białko oporności raka płuc; MDR (ang. *Multidrug Resistance*) – oporność wielolekowa (nowotworów); MVP (ang. *Major Vault Protein*) – główne białko krypt; TEP1 (ang. *Telomerase-associated Protein 1*) – białko 1 związane z telomerazą; vPARP (ang. *poly(ADP)-ribose polymerase*) – polimeraza poli(ADP)-rybozy; vRNA (ang. *vault RNA*) – RNA krypt

**Podziękowania:** Przedstawiona praca została sfinansowana z projektu badawczego nr 0172/B/P01/2009/36 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

## STRESZCZENIE

Krypty komórkowe będące kompleksami rybonukleoproteinowymi złożonymi z trzech białek (MVP, TEP1, vPARP) oraz kilku łańcuchów vRNA odkryto w 1986 roku. Badania biochemiczne i strukturalne wykazały ich obecność w cytoplazmie wielu komórek organizmów eukariotycznych oraz beczułkowatą strukturę wskazującą na ich funkcję transportową. Ponadto, wysoka homologia białka MVP do białka LRP zaangażowanego w mechanizm lekooporności nowotworów otworzyła trwającą do dziś dyskusję o funkcji krypt w komórce zdrowej oraz zmienionej nowotworowo. Prace z zakresu histopatologii wykazały wzrost poziomu białka MVP/LRP w wielu nowotworach, a także wskazały na możliwość przemieszczania się krypt komórkowych z cytoplazmy do otoczki jądrowej, co może być ważnym czynnikiem chroniącym jądro komórkowe przed bezpośrednim działaniem cytostatyków.

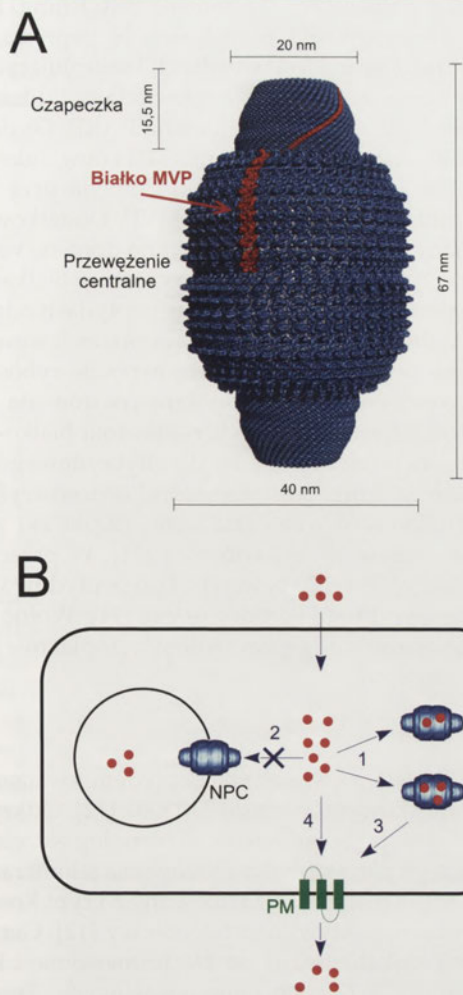
## WPROWADZENIE

W 1986 roku po raz pierwszy opisano nowy rodzaj struktur komórkowych nazwanych kryptami [1] (tłumaczenie na język polski zaczerpnięto z [2]). Zaskakująco późne odkrycie krypt komórkowych wynikało z niedoskonałości technik mikroskopii elektronowej oraz podobieństwa tych struktur do pęcherzyków cytoplazmatycznych. Dopiero szczegółowa analiza izolowanych frakcji pęcherzyków, przeprowadzona przez pierwszych odkrywców, ujawniła obecność krypt komórkowych w badanych przez nich hepatocytach szczura. Scharakteryzowano je jako struktury o długości 65 i szerokości 35 nanometrów (nm) o zawsze jednolitym beczułkowatym kształcie. Przeprowadzone później analizy krystalograficzne zweryfikowały nieznacznie ich wielkość w komórkach szczura (odpowiednio 67 nm i 40 nm, Ryc. 1A). Badania biochemiczne opisane w pierwszej publikacji o kryptach ujawniły obecność w tych strukturach polipeptydów o różnej długości (54 kDa, 104 kDa, 192 kDa, 210 kDa) oraz kilku łańcuchów RNA o długości ok. 90–140 nukleotydów [1].

Krypty komórkowe występują powszechnie w komórkach eukariotycznych. Od czasu ich odkrycia zostały opisane w wielu odległych filogenetycznie organizmach. Przykładami są ameba *Dictyostelium discoideum* [3], jeżowce *Lytechinus pictus* [4] i *Strongylocentrotus purpuratus* [5], drętwa pstra *Torpedo marmorata* [6] oraz różne gatunki płazów, ptaków i ssaków (np. żaba rycząca *Rana catesbeiana* i żaba szponiasta *Xenopus laevis*, kura domowa *Gallus gallus*, szczur *Rattus norvegicus*) [3,5]. Oczywiście potwierdzono też występowanie krypt w komórkach człowieka [7], przede wszystkim zaś w wielu wyprowadzonych liniach komórek nowotworowych [8]. Co jednak ciekawe, brak jest doniesień o obecności krypt komórkowych w tak dobrze przebadanych organizmach jak drożdże piekarnicze *Saccharomyces cerevisiae*, nicienie *Caenorhabditis elegans*, muszka owocowa *Drosophila melanogaster*, czy rzodkiewnik pospolity *Arabidopsis thaliana*. Krypty opisane w różnych organizmach różnią się tylko nieznacznie swoją budową. Struktury wyizolowane z komórek ameby mają wielkość ok. 35 x 60 nm, a zatem są tylko nieco mniejsze niż ich odpowiedniki izolowane z kręgowców (ok. 35 x 65 nm) [3]. Odkrycie zatem nowych struktur, o tak dużych rozmiarach, otworzyło toczącą się do dziś dyskusję nad ich rolą w komórce. Ponadto, obecność krypt w wielu odległych ewolucyjnie organizmach, a przy tym wysoki stopień ich zachowania w ewolucji potwierdza, że rola ta jest na pewno podstawowa i niebagatelna.

W 1995 wykazano, że jedno z białek tworzących krypty komórkowe - białko MVP (ang. *Major Vault Protein*) jest ortologiem białka LRP (ang. *Lung Resistant-related Protein*), któremu już wcześniej przypisano znaczącą rolę w mechanizmie oporności komórek nowotworowych na cytostatyki [9]. Stało się jasne, że białko MVP jak i całe krypty komórkowe mogą być w ten proces również zaangażowane. W niniejszym przeglądzie literatury pragniemy przedstawić czytelnikowi obecny stan wiedzy na temat budowy krypt komórkowych, ich lokalizacji w





**Rycina 1.** A. Model strukturalny krypty komórkowej uzyskany metodą krystalograficzną. Kolorem czerwonym zaznaczono pojedynczy łańcuch białka MVP (na podstawie struktur 2ZUO, 2ZV4 oraz 2ZV5 zdeponowanych w bazie *Protein Data Bank*) [16]. B. Szlaki eliminacji cytostatyków za pomocą krypt komórkowych oraz białek transbłonowych [55]. (1) Przechowywanie cytostatyków we wnętrzu krypty; (2) przeciwdziałanie przemieszczaniu się cytostatyków do wnętrza jądra komórkowego przez zamknięcie cząsteczką krypty światła porów jądrowych (NPC); (3) eliminacja cytostatyków przez ich transport we wnętrzu krypty w stronę błony komórkowej; (4) usuwanie leków przez pompy transbłonowe (PM), które wchodzi w skład mechanizmów MDR.

komórce oraz ich roli w rozwoju oporności na leki cytostacyjne przez komórki nowotworowe.

## BUDOWA KRYPT KOMÓRKOWYCH

### KRYPTY JAKO KOMPLEKSY BIAŁKOWO-NUKLEINOWE

Krypty komórkowe zbudowane są z trzech białek i zazwyczaj kilku łańcuchów vRNA (ang. *vault RNA*). Podstawowym białkiem strukturalnym jest MVP o masie 99 kDa (*Swiss-Prot* nr Q14764), które może samo spontanicznie formować cząsteczki podobne do krypt komórkowych [10]. Białko vPARP (ang. *vault poly(ADP-ribose) polymerase*) o masie 193 kDa (*Swiss-Prot* nr Q9UKK3) to enzym prawdopodobnie odpowiadający za rybozylację substratu (m.in. krypt komórkowych) resztami adenozyndifosorybozy [11]. Największe białko krypt – TEP1 (ang. *telomerase-associated protein 1*) o masie 290 kDa (*Swiss-Prot* nr Q99973) odpowiada za stabilizację vRNA [12,13]. Łańcuchy vRNA, wchodzące w skład krypt, wyizolowane z hepatocytów szczura posiadały

długość 141 par zasad i zawierały sekwencję o charakterze niekodującym [14]. Wstępne badania biochemiczne wykazały obecność w kryptach 96 białek MVP, 8 vPARP i 2 TEP1 oraz przynajmniej 6 kopii vRNA [15]. Po uzyskaniu jednak struktury krystalicznej cząsteczki krypty komórkowej jej skład został zmodyfikowany. Wykazano, że pojedyncza krypta zawiera wyłącznie 78 kopii białka MVP, a zatem pozostawiona jest pozostałych składników białkowych i nukleinowych [16].

Krypty komórkowe posiadają kształt beczułki zbudowanej z dwóch symetrycznych połówek, które łączą się ze sobą w przewężeniu centralnym (Ryc. 1A). Każda z połówek jest zbudowana z 39 białek MVP tworzących wspólnie symetrię 39-krotną. Pojedyncza cząsteczka krypty posiada wysokość ok. 67 nm i szerokość mierzona pośrodkowo ok. 40 nm. Struktura beczułki zwęża się do biegunów, gdzie zlokalizowane są tzw. czapczki (ang. *cap*) o wysokości ok. 15,5 nm i średnicy ok. 20 nm. Ściana beczułki o grubości zaledwie 2 nm ogranicza wewnętrzną przestrzeń o długości ok. 62 nm i średnicy ok. 35 nm, a zatem jest wystarczająco duża, aby pomieścić większość obiektów występujących w cytoplazmie komórki (np. kilku rybosomów).

Struktura krystaliczna krypty komórkowej wykazuje obecność wyłącznie białka MVP [16], co było zaskoczeniem, ponieważ wcześniejsze badania biochemiczne i strukturalne opisywały w krypcie także białka TEP1 oraz vPARP [17]. Wysłunięto jednak podejrzenie, że wyższa gęstość elektronowa obserwowana w rejonach obu czapczek krypty może odpowiadać lokalizacji białka TEP1 [16]. Ponadto opisany wcześniej stosunek białka MVP do pozostałych składników krypt (tj. TEP1, vPARP i vRNA) wynoszący około 1:8 [15] wyklucza możliwość utworzenia przez te wszystkie składniki cząsteczki o symetrii 39-krotnej ujawnionej w strukturze krystalicznej krypty [16]. Wskazuje to, że białka TEP1 oraz vPARP wiążą się tylko z pewną frakcją krypt komórkowych.

Cechą charakterystyczną krypt jest ich zdolność do dysocjacji na dwie połówki, a ich podział ma miejsce na linii przewężenia centralnego (Ryc. 1A). Proces ten zachodzi w niskim pH, poniżej wartości 4,0 [18]. Znaczenie fizjologiczne tego procesu nie jest do końca jasne, ale wiąże się go z funkcją transportową krypt, zwłaszcza pomiędzy macierzą cytoplazmatyczną a lizosomami [19]. W odróżnieniu od krypt, lizosomy są stabilne w niskim pH, co może wskazywać, że „załadunek” bądź „rozładunek” krypt zachodzi wewnątrz lizosomów. Mechanizm dysocjacji krypt potwierdzony został przez szczegółową analizę dwóch map gęstości elektronowej, które uzyskane zostały niezależnie przez zespoły badawcze z Hiszpanii [20] i z Japonii [16].

### BIAŁKO MVP

Białko MVP jest podstawowym składnikiem krypt i stanowi ono przynajmniej 75% masy całej krypty, co potwierdzono badaniami biochemicznymi [1,21]. Gen MVP człowieka znajduje się na krótszym ramieniu 16 chromosomu [22] i posiada, podobnie jak jego odpowiednik u myszy, 15 eksonów [23]. Porównanie sekwencji reszt aminokwasowych białek MVP uzyskanych z komórek człowieka, szczu-

ra i myszy ujawniło wysoki stopień zachowania w ewolucji tego białka, utrzymującego się na poziomie ponad 90% homologii [23].

Białko MVP nie wykazuje endogennej aktywności enzymatycznej. Ulega ono natomiast rybozylacji przez białko vPARP [11], które również związane jest z kryptami, oraz fosforylacji przez różne kinazy białkowe [24, 25]. W ekstraktach cytoplazmatycznych białko MVP może też ulegać fosforylacji na resztach tyrozyny indukowanej hormonem wzrostu naskórka (EGF, ang. *epidermal growth factor*) [26]. Fosfataza tyrozynowa SHP-2 (ang. *Src homology phosphatase 2*) będąca fragmentem czynnościowym domeny SH2 (ang. *Src homology 2*) jest zdolna wiązać w warunkach *in vitro* uprzednio defosforylowany MVP [26]. Białko MVP może ulegać inaktywacji na drodze ubikwitylacji za pomocą tzw. białek SUMO (ang. *Small Ubiquitin-like Modifier*), którą wykazano w komórkach jeżowca [5]. Duża ilość modyfikacji odzwierciedla wysoką kontrolę aktywności białka MVP i może również wskazywać na istotny udział całych krypt komórkowych w rozwoju embrionalnym lub w innych procesach fizjologicznych.

Białko MVP potrafi spontanicznie, bez udziału innych czynników, tworzyć struktury podobne do krypt. Stymulowana synteza szczerzego białka MVP w linii komórkowej Sf9, która pochodzi z komórek jajników ćmy z gatunku rolnicy gwoździówki (łac. *Spodoptera frugiperda*) i charakteryzuje się wrodzonym brakiem krypt, doprowadziła do formowania się organelli o cechach morfologicznych i biochemicznych podobnych do naturalnie występujących krypt w komórkach wątroby szczura [10]. To zjawisko potwierdza podstawową rolę MVP w formowaniu strukturalnym krypt. Ponadto, białka MVP nie występują z reguły jako wolne monomery, ale ulegają one szybkiemu wbudowywaniu do powstających krypt komórkowych [27].

Białko MVP posiada strukturę domenową i zbudowane jest z 861 reszt aminokwasowych [16]. Szczegółowa analiza danych krystalograficznych ujawniła, że białko MVP ulega pofałdowaniu w 12 domen, tj. 9 powtarzających się takich samych domen tworzących wybrzuszenie centralne w części krypty, pojedynczą domenę centralną (ang. *shoulder domain*), domenę czapeczki o strukturze helisy (ang. *cap-helix domain*) oraz domenę pierścienia zamykającego czapeczkę (ang. *cap-ring domain*) [16] (Ryc. 1A). Struktura domenowa białka MVP została potwierdzona przez inną grupę badaczy, choć zauważono pewne różnice we wzajemnym ułożeniu przestrzennym domen strukturalnych R1 i R2 w rejonie N-końcowym białka MVP [20].

#### BIAŁKO vPARP

Białko vPARP (inaczej określane jako PARP4) posiada homologię do domeny katalitycznej rodziny białek PARP (ang. *poly(ADP-ribose) polymerase*) cechujące się aktywnością polimerazy poli(ADP)-rybozy [11]. Najlepiej poznano białko jądrowe PARP-1, które przyczynia się do utrzymania stabilności genetycznej i jest aktywowane uszkodzeniem DNA. Gen vPARP człowieka znajduje się na chromosomie 13 i składa się z 34 eksonów kodujących białko o długości 1724 reszt aminokwasowych [11]. W białku vPARP wy-

rózniono kilka domen [11]: (1) domena BRCT (ang. *BRCA1 C-terminus*) zlokalizowana przy końcu N peptydu, która przeważnie znajdowana jest w białkach kontrolujących cykl komórkowy i prawdopodobnie odpowiada za oddziaływanie typu białko-białko [28], (2) domena PARP, (3) domena wykazująca 30% homologię do białka ITIH (ang. *inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain* [29]), (4) domena przy końcu C peptydu oddziałująca z białkiem MVP. Dodatkowo wewnątrz domeny ITIH scharakteryzowano domenę von Willebrandta typu A (VWA), występującą często w białkach macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym w peptydach odpowiadających za adhezję komórek oraz w peptydach wewnątrzkomórkowych uczestniczących w transporcie rybosomów oraz błon biologicznych [30]. Podobnie jak domena BRCT, domena VWA odpowiada za oddziaływanie białko-białko [30]. Ponadto, za pomocą systemu dwuhybrydowego w komórkach drożdży (ang. *yeast two-hybrid system*) wykazano brak autooddziaływań wewnątrz samej cząsteczki vPARP pomiędzy jej częścią N- i C-końcową [31]. W przeciwieństwie do białek MVP, tylko pewna frakcja peptydów vPARP jest związana z kryptami komórkowymi [11]. Wolne białka vPARP mogą znajdować się zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze komórkowym.

#### BIAŁKO TEP1

Białko TEP1 jest największym peptydem związanym z kryptami komórkowymi o masie 240 kDa [12]. Odkryto, że białko TEP1 występujące u ssaków to homolog wcześniej zidentyfikowanej u pierwotniaka *Tetrahymena* telomerazy p80 [12]. Jednak samo białko TEP1 izolowane z krypt komórkowych nie wykazuje aktywności telomerazy [12]. Gen *TEP1* człowieka jest zlokalizowany na 14 chromosomie i koduje białko o długości 2627 reszt aminokwasowych. Trzy rejony obejmujące jedną trzecią tego peptydu od strony końca N wykazują podobieństwo do telomerazy p80. Fragment C końcowy zawiera natomiast przynajmniej 16 powtórzeń sekwencji WD40 (WD40 to motyw białkowy zbudowany z ok. 40 reszt aminokwasowych często zakończony sekwencją Trp-Asp, tj. WD [32]) [33]. W białku TEP1 wyróżniono również motyw TROVE (ang. *Telomerase, Ro and Vaults motif*) charakterystyczny dla wielu rybonukleinoprotein [34], domenę vWA (domena czynnika A von Willebrandta) [34], opisywaną już wcześniej dla białka vPARP oraz domenę NACHT (nazwa domeny od nazw białek NAIP, CIITA, HET-E i TP1, które zaliczane są do tzw. białek związanych z apoptozą [35]). W białku TEP1 rejon o wysokiej homologii do białka p80 odpowiada za oddziaływanie z vRNA [36].

Jak wyżej wspomniano, opis struktury krystalograficznej wskazuje na obecność w kryptach komórkowych szczura wyłącznie białka MVP [16]. Niemniej autorzy podejrzewają obecność białka TEP1 w rejonie czapeczki, ponieważ znajduje się tam obszar o podwyższonej gęstości elektronowej, który pod względem masy molowej odpowiada właśnie temu białku. Potwierdzają to wcześniejsze badania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej mroźniowej (ang. *cryo-EM*). Wykazano, że mutanty myszy z wyłączonym białkiem TEP1 posiadały krypty o znacznie mniejszej gęstości elektronowej w obrębie czapeczki w porównaniu z typem dzikim [13,17], niemniej myszy z wyłączonym białkiem TEP1 nie wykazywały żadnych zaburzeń rozwojo-

wych [13,37]. Wyniki te wskazują, że białko TEP1 wiąże się z białkami MVP lub innymi składnikami krypt w pewnych warunkach fizjologicznych i odpowiada za wykonanie nieokreślonej jeszcze funkcji bądź też aktywuje przemieszczenie się cząsteczki krypty w określone miejsce w komórce.

## RNA KRYPT

Krypty, występujące we wszystkich opisanych gatunkach, zawsze posiadają kilka łańcuchów RNA (vRNA, ang. *vault RNA*), które znajdują się w obszarze czapeczki [19]. Ilość łańcuchów vRNA przypadających na pojedynczą cząsteczkę krypty jak również sekwencje RNA są zmienne i charakterystyczne dla poszczególnych gatunków. Dla przykładu, u szczurów wykazano obecność pojedynczego łańcucha vRNA o długości 141 par zasad, podczas gdy u żab (*R. catesbeiana*) występują 2 łańcuchy vRNA o długościach odpowiednio 89 i 94 pary zasad [14]. Komórki człowieka posiadają krypty z trzema łańcuchami vRNA (88–98 pary zasad) ulegającymi ekspresji z trzech różnych genów (*HVG 1-3*) [38]. Geny te znajdują się na chromosomie 5p wewnątrz rejonu o długości 16 kb, co wskazuje na ich ewolucyjną duplikację. Ponadto genom człowieka zawiera czwarty gen kodujący vRNA (*HVG4*) na chromosomie X, jednak prawdopodobnie nie ulega on ekspresji [38]. Ciekawe jest to, że pomimo różnic gatunkowych w sekwencji genów *HVG* struktura przestrzenna vRNA wydaje się być u wszystkich opisanych organizmów zachowana w ewolucji [14,38].

Łańcuch vRNA może występować w cytoplazmie w stanie wolnym lub związanym z kryptami komórkowymi. Wykazano, że tylko 20% vRNA obecnych w cytoplazmie wiąże się z kryptami [39]. Natomiast sucha masa krypty zawiera tylko około 5% vRNA [40]. Zauważono, że liczba cząsteczek vRNA wzrasta w liniach komórek nowotworowych opornych na cytostatyki. Przykładem może być linia CLC4/adr z komórkami opornymi na adriamycynę, gdzie poziom vRNA wzrósł dziesięciokrotnie w porównaniu do komórek wrażliwych [39]. Nie wykazano jednak, aby ekspresja określonego typu vRNA (*HVG1-3*) w komórce nowotworowej wiązała się bezpośrednio z jej opornością na cytostatyki. Wykazano, że ekspresja typu *HVG3* vRNA była znacznie wyższa w porównaniu do ekspresji innych, jednak ten typ vRNA nie wiązał się z kryptami i nie powodował zwiększenia oporności komórki na cytostatyki [38].

## LOKALIZACJA KRYPT W KOMÓRCIE

Obecność krypt komórkowych zaobserwowano w wielu rodzajach tkanek. Oszacowano ich liczbę na mniej więcej  $10^4$ – $10^5$  w pojedynczej komórce, choć są to dane wyłącznie szacunkowe, a liczba ta może się zmieniać w zależności od miejsca występowania danej komórki [39]. Najbardziej bogate w krypty są makrofagi oraz komórki nabłonkowe, zwłaszcza te spełniające funkcje wydzielnicze [7]. Uogólniając, krypty występują w komórkach długotrwale poddawanych działaniu ksenobiotyków. Przykładami są komórki nabłonka dróg oddechowych oraz nabłonka pokrywającego ścianę przewodu pokarmowego [8]. Lokalizacja krypt w tkankach okrywających nasuwa przypuszczenie o ich funkcji ochronnej dla całego organizmu.

Krypty w komórce występują w znakomitej większości w cytoplazmie, ale spotyka się je również w otoczce jądrowej. W cytoplazmie oddziałują z elementami cytoszkieletu, takimi jak filamenty aktynowe [41] oraz mikrotubule [42,43]. Ponadto, krypty ulegają dynamicznym zmianom położenia w cytoplazmie w zależności od fazy cyklu komórkowego [41]. Ponadto, zmieniają one swoją lokalizację w komórce w trakcie ontogenezy. U jeżowca podczas rozwoju płodowego białka MVP znajdowały się w cytoplazmie komórek embrionów, natomiast u osobników dorosłych ulegały one translokacji do jąder komórkowych [4,5]. W obrębie samego jądra komórkowego były one zlokalizowane w rejonie jąderka lub w otoczce jądrowej [4]. W oocytach świńskich oraz embrionach nie zauważono zależności pomiędzy lokalizacją białka MVP w jądrze komórkowym a etapem rozwoju zwierzęcia, ale było ono czasami związane z otoczką jądrową i ciałkami prekursorowymi jąderka [44]. Szczegółowa analiza frakcji subkomórkowych wykazała, że około 5% cząsteczek krypt może być związana z jądrem komórkowym [45].

## ROLA KRYPT W KOMÓRCIE

Krypta komórkowa jest największą poznaną strukturą rybonukleinową. Cechuje się olbrzymią wewnętrzną przestrzenią, w której mogą pomieścić się struktury o długości do 35 nm i średnicy do 33 nm [16]. Zatem każda krypta posiada potencjalną zdolność transportu setek białek. Krypty wyizolowane z komórek jeżowca zawierały dodatkowo nieokreślone białko o masie ok. 14–55 kDa, które potencjalnie stanowiło przenoszony ładunek [5]. Ponadto zdjęcia krypt wyizolowanych z komórek wątroby szczura wykonane techniką elektronowej mikroskopii mroźniowej często zawierały „zaciemnioną” wewnętrzną przestrzeń krypty, co wskazuje na jej wypełnienie przez przenoszone białka bądź inne cząsteczki [19].

Wczesne badania wykazały, że niewielki procent krypt w komórkach szczurzych jest związany z otoczką jądrową, prawdopodobnie z jądrowym kompleksem porowym (NPC, ang. *Nuclear Pore Complex*) [46]. Skłoniło to badaczy do stworzenia hipotezy, że krypty mogą działać jako transportery pomiędzy jądrem a cytoplazmą. Pośrednim potwierdzeniem tej hipotezy może być porównanie masy, średnicy i kształtu cząsteczki krypty i wewnętrznego kanału NPC. Są one bardzo podobne. Uwzględniając, że przez kanał wewnętrzny NPC są transportowane cząstki o średnicy do 39 nm [47] wydaje się, że cząsteczka krypty może precyzyjnie się przez kanał NPC lub ulec zakotwiczeniu w jego wnętrzu. Ta ostatnia możliwość wydaje bardziej prawdopodobna, ponieważ kilkakrotnie przedstawiono lokalizację białek MVP nie w samym jądrze komórkowym, ale w otoczce jądrowej [48,49]. Ponadto stosując technikę FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) oraz mikroskopię sił jądrowych (ang. *Atomic Force Microscopy*) wykazano obecność cząsteczek krypt wewnątrz kompleksu NPC [50].

Jedną z niewielu potwierdzonych funkcji krypt jest ich udział w powstawaniu *de novo* kompleksu NPC w otoczce jądrowej [51]. Proces ten wymaga obecności m.in. wielu białek związanych z błoną jądrową (nukleoporyn), które

oddziałując ze sobą układają się w określone miejsca kompleksu NPC. Niespodziewanie okazało się, że krypty komórkowe są niezbędnym ogniwem tego procesu, a funkcjonują jako fizyczne rusztowanie dla nukleoporyn w trakcie biogenezy kompleksu NPC. To wyjaśnia obecność krypt komórkowych w otoczce jądrowej, lecz jednocześnie nie wyklucza ich funkcji transportowej pomiędzy cytoplazmą a jądrem komórkowym.

Pośrednim dowodem wskazującym na funkcję transportową krypt jest opis oddziaływania białka MVP budującego krypty z różnego rodzaju cząsteczkami, które intensywnie przemieszczają się w komórce. Przykładem są podjednostki rybosomów ulegające składaniu w jąderkach i będące dalej transportowane do cytoplazmy [52]. Okazało się, że krypty komórkowe oddziałują z rybosomami [4]. Ponadto, ci sami autorzy wykazali obecność białka MVP w jąderkach coelomocytów. Czy zatem jedną z funkcji krypt komórkowych jest transport podjednostek rybosomów z jądra komórkowego do cytoplazmy? Tej hipotezy nie udało się ostatecznie potwierdzić. Obok rybosomów, wykazano również, że składniki krypt – białko MVP oraz vRNA tworzą kompleksy z receptorem estrogenowym [53]. Białko MVP wiązało się z fragmentem receptora, który obejmował sygnał lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localization signal*). Z tym samym fragmentem oddziaływało również białko opiekuńcze Hsp90, a jego związanie powodowało inaktywację całego receptora. W przeprowadzonym doświadczeniu podanie estradiolu do komórek wywołało wzrost liczby kompleksów krypta-receptor estrogenowy. Jednak równoczesne dodanie molibdenianu sodu, który zatrzymuje dysocjację Hsp90 od receptora zapobiegło w ogóle utworzeniu się tych kompleksów. Zatem krypty mogą aktywować receptor estrogenowy lub nawet odpowiadać za jego transport do jądra komórkowego.

#### UDZIAŁ KRYPT W POWSTANIU MECHANIZMU LEKOOPORNOŚCI NOWOTWORÓW

Przełomem w badaniach nad kryptami komórkowymi, o którym już wspomniano we wstępie, było odkrycie, że białko MVP jest ortologiem białka LRP [9]. Temu białku już wcześniej przypisywano istotny udział w rozwoju lekooporności komórek nowotworowych. Odkrycie to zapoczątkowało dyskusję o roli białka MVP i całych krypt komórkowych w mechanizmie oporności wielolekowej nowotworów [54-56]. Ich naturalne występowanie w tkance nabłonkowej doskonale pasuje do ich potencjalnej roli jako czynników chroniących przed cytostatykami. Jak wcześniej wspomniano są to m.in. tkanki nabłonkowe wyścielające drogi oddechowe oraz nabłonek przewodu pokarmowego oraz makrofagi i komórki dendrytyczne, a więc miejsca narażone na działanie ksenobiotyków [7,8,57]. Zatem krypty komórkowe w podobny sposób jak chronią zdrową komórkę, będą również uczestniczy w ochronie komórki nowotworowej. Obecnie nie ulega wątpliwości, że krypty komórkowe uczestniczą w nabywaniu przez komórki nowotworowe oporności na leki cytostatyczne. Nie ma jednak jednoznacznego i wiarygodnego opisu w jaki sposób zachodzi ten mechanizm. Temat ten w literaturze omawiany jest wielokrotnie, a prowadzone badania bazują zarówno na materiale pozyskiwanym od pacjentów jak i na doświadczeniach *in vitro* na wprowadzonych liniach komórek no-

wotworowych, zarówno wrażliwych jak i opornych na leki cytostatyczne.

Wstępne badania przesiewowe przeprowadzone na 61 liniach komórkowych wyprowadzonych z różnych typów nowotworów człowieka wykazały, że MVP/LRP ulegało syntezie w 78% linii komórkowych, a wzrost poziomu syntezy tego białka zwykle wiązał się ze wzrostem oporności komórek na różnorodne leki przeciwnowotworowe [58]. Dane te zostały potwierdzone w dalszych badaniach 8 linii komórkowych, które wykazywały związek pomiędzy ekspresją mRNA dla MVP/LRP a ich chemioopornością na szereg cytostatyków [59]. Podwyższony poziom MVP zaobserwowano w linii komórek glejaka gwieździstego, który wykazywał oporność na różne klasy leków cytostatycznych, tj. doksorubicynę, metotreksat, etopozyd, winkrystynę, cytarabinę i cisplatynę [60]. Aktywność krypt komórkowych wydaje się być zależna od tkanki, z której rozwinął się nowotwór oraz wykazywać specyficzność substratową. W komórkach raka niedrobnokomórkowego płuc wzrost poziomu syntezy białka MVP korelował z pojawieniem się oporności tylko na cisplatynę, ale nie zaobserwowano jednoczesnego wzrostu oporności na inne leki, takie jak daunorubicyna, doksorubicyna, etopozyd, winblastyna i bleomycyna [61].

W komórkach zdrowego mózgu poziom syntezy białka MVP pozostaje na granicy wykrywalności za pomocą metod immunohistochemicznych, z wyjątkiem naczyń krwionośnych, gdzie jest on stosunkowo wysoki [60]. Przebadano pod kątem syntezy białka MVP próbki zwojakoglejaków uzyskanych od 30 różnych pacjentów i okazało się, że jest on tam znacznie wyższy w porównaniu do zdrowych tkanek grupy kontrolnej [62]. Wzrost poziomu białka MVP został potwierdzony również dla innych nowotworów mózgu, zarówno w materiale operacyjnym jak i w pierwotnych hodowlach komórkowych wyprowadzonych z tkanek pochodzenia neuroektodermalnego [60]. Nie wszystkie jednak nowotwory mózgu wykazują wyższy poziom syntezy białka MVP. Był on niewielki w komórkach pochodzących z nerwiaka niedojrzałego oraz z rdzeniaka [60]. Jednak tam gdzie zaobserwowano wzrost poziomu białka MVP wzrastała również oporność na antracykliny, cisplatynę i etopozyd.

Udział krypt komórkowych jest również istotny w leczeniu epilepsji, ponieważ wysoki poziom białka MVP obniża skuteczność terapii [63]. Efekt ten został potwierdzony na modelu szczurzym. Zaobserwowano, że stymulowany atak epilepsji powodował wyższą syntezę MVP zarówno w zakręcie zębatym jak i w korze pola przyhipokampowego [64].

Dla nowotworu gruczołu piersiowego trzy zespoły badawcze opisały podwyższony poziom białka MVP w tkance patologicznej, jednak żaden z zespołów nie wykazał związku samego białka MVP z opornością na zastosowaną chemioterapię ani z prognozą rozwoju choroby [65-67]. W innym zespole wykazano jednak, że wysoki poziom syntezy białka MVP u pacjentów z zaawansowanym nowotworem piersi, którzy otrzymali wcześniej chemioterapię, miała związek ze znacząco krótszym przeżyciem [68]. Należy zaznaczyć, że w przypadku zastosowania chemioterapii opartej na 5-fluorouracylu, doksorubicyny/epirubicyny i

cuklofosfamidu poziom białka MVP wzrastał w komórkach guza [68].

Niestety białko MVP nie może być rozpatrywane jako uniwersalny marker rozwoju choroby nowotworowej ani tym bardziej jako czynnik decydujący o wyborze konkretnego typu chemioterapii. Niekiedy zdarza się, że poziom syntezy białka MVP w ogóle nie koreluje ze wzrostem oporności komórek na leki cytotatyczne [69]. Należy pamiętać, że głównymi czynnikami odpowiadającymi za wzrost lekooporności są białka rodziny ABC (ang. *ATP-binding cassette proteins*), przede wszystkim glikoproteiny P, a krypty komórkowe raczej spełniają rolę pomocniczą w tym procesie [70].

## LOKALIZACJA JĄDROWA MVP I/LUB KRYPT KOMÓRKOWYCH W NOWOTWORACH

W pewnych warunkach pomocnicza rola krypt komórkowych może okazać się jednak krytyczna dla rozwoju lekooporności. Podczas długotrwałego leczenia cytotatykami zaobserwowano dodatkową lokalizację białek transbłonowych związanych z mechanizmem MDR (ang. *Multidrug Resistance*). Przykładem może być obecność glikoproteiny P w otoczce jądrowej komórek nowotworu piersi człowieka opornych na doksorubicynę (MCF-7/DX) [71]. Inkubacja z doksorubicyną komórek wrażliwych powodowała przejście leku do jądra komórkowego, natomiast w komórkach opornych lek ten pozostawał wyłącznie w cytoplazmie. Identyczne rezultaty otrzymano pracując na komórkach raka pęcherza i wprowadzając epirubicynę do cytoplazmy za pomocą mikrokrojenki [72]. W obu typach komórek opornych na działanie cytotatyków jądra komórkowe były pozbawione leku.

Podobnie do glikoproteiny P również krypty komórkowe mogą ulegać translokacji do jądra komórkowego. Nie wiadomo jednak, w jaki sposób mogą one eliminować leki z jądra. W przeciwieństwie do glikoproteiny P żaden z ich składników nie jest pompą transbłonową. Zaobserwowano jednak, że w komórkach opornych ilość białka MVP związanego z otoczką jądrową wzrasta [49].

W celu zweryfikowania wpływu białka MVP na proces eliminacji leku z jądra komórkowego zaprojektowano rybozym, który specyficznie blokował ekspresję MVP [73,74]. Linie komórkową raka okrężnicy (SW620) poddano działaniu maślanu sodu (ang. *sodium butyrate*), co doprowadziło do syntezy białek MVP i w konsekwencji spowodowało nabycie przez komórki SW620 oporności na działanie doksorubicyny, etopozytu, winkrystyny, paklitakselu oraz gramicydyny. Wykazano, że doksorubicyna ulegała akumulacji w jądrach komórek wrażliwych (nie traktowanych maślanem sodu), natomiast nie była obecna w jądrach komórek opornych (traktowanych maślanem sodu). Następnie, produkcja każdego z dwóch rodzajów rybozymów specyficznych dla MVP spowodowała cofnięcie się zaobserwowanego wcześniej fenotypu oporności w komórkach traktowanych maślanem sodu. Wynik ten wskazuje na czynne zaangażowanie krypt komórkowych w jądrowym eksporcie leku, co prowadzi do rozwoju oporności wielolekowej.

Badania przeprowadzone na innych komórkach również ujawniły różnice w wewnątrzkomórkowej dystrybucji do-

ksorubiny. Indukowana działaniem benzo[a]pirenu (ang. *benzo[a]pyrene*) synteza MVP w komórkach epidermalnych powodowała eliminację doksorubicyny z ich jąder [75]. Ponadto, obserwacje w mikroskopie konfokalnym komórek A549 (rak niedrobnokomórkowy płuc) wykazały lokalizację MVP i doksorubicyny w pęcherzykach cytoplazmatycznych, co wskazuje na rolę tego białka w separacji leku w obrębie komórki [76].

## PODSUMOWANIE

Krypty komórkowe zostały odkryte prawie 25 lat temu [1]. Od tego czasu udało się zidentyfikować strukturę przestrzenną tych organelli [16]. Analizy biochemiczne mające na celu opis ich funkcji zostały przeprowadzone w wielu laboratoriach i jak dotąd nie przyniosły oczekiwanych wyników. Do dzisiaj nie wiadomo jaka jest podstawowa rola krypt komórkowych. Przypuszcza się, że mogą one wykonywać funkcje transportowe oraz uczestniczyć w mechanizmach ochronnych komórki, zwłaszcza przed działaniem naturalnych ksenobiotyków (Ryc. 1B). Ponadto, interesujące są doniesienia o oddziaływaniach krypt komórkowych z porami jądrowymi i ich zaangażowaniu w formowanie się porów jądrowych [51]. Niemniej, jedną z ważniejszych cech krypt jest ich udział w rozwoju lekooporności nowotworów, negatywnego zjawiska powodującego znaczne obniżenie efektywności leczenia pacjentów z rozpoznaną chorobą nowotworową. Wydaje się, że prace prowadzone w następnych latach skierowane będą właśnie na szczegółowe poznanie mechanizmów działania krypt komórkowych w aspekcie lekooporności.

## PIŚMIENNICTWO

1. Kedersha NL, Rome LH (1986) Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA. *J Cell Biol* 103: 699-709
2. Jamrozik K, Balcerczak E, Robak T (2002) Znaczenie białka związanego z opornością w płucach (LRP) w nowotworach układu krwiotwórczego. *Acta Haematol Pol* 33: 41-53
3. Kedersha NL, Miquel MC, Bittner D, Rome LH (1990) Vaults. II. Ribonucleoprotein structures are highly conserved among higher and lower eukaryotes. *J Cell Biol* 110: 895-901
4. Hamill DR, Suprenant KA (1997) Characterization of the sea urchin major vault protein: a possible role for vault ribonucleoprotein particles in nucleocytoplasmic transport. *Dev Biol* 190: 117-128
5. Stewart PL, Makabi M, Lang J, Dickey-Sims C, Robertson AJ, Coffman JA, Suprenant KA (2005) Sea urchin vault structure, composition, and differential localization during development. *BMC Dev Biol* 5: 3
6. Herrmann C, Volkandt W, Wittich B, Kellner R, Zimmermann H (1996) The major vault protein (MVP100) is contained in cholinergic nerve terminals of electric ray electric organ. *J Biol Chem* 271: 13908-13915
7. Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Giaccone G, Broxterman HJ, Meijer CJ, van der Valk P, Scheper RJ (1996) Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol* 148: 877-887
8. Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, Kaaijk P, Dalton WS, van Heijningen TH, van Kalken CK, Slovak ML, de Vries EG, van der Valk P, et al. (1993) Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res* 53: 1475-1479
9. Scheffer GL, Wijngaard PL, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, Meijer CJ, Clevers HC, Scheper RJ (1995) The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med* 1: 578-582

10. Stephen AG, Raval-Fernandes S, Huynh T, Torres M, Kickhoefer VA, Rome LH (2001) Assembly of vault-like particles in insect cells expressing only the major vault protein. *J Biol Chem* 276: 23217-23220
11. Kickhoefer VA, Siva AC, Kedersha NL, Inman EM, Ruland C, Streuli M, Rome LH (1999) The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol* 146: 917-928
12. Kickhoefer VA, Stephen AG, Harrington L, Robinson MO, Rome LH (1999) Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1. *J Biol Chem* 274: 32712-32717
13. Kickhoefer VA, Liu Y, Kong LB, Snow BE, Stewart PL, Harrington L, Rome LH (2001) The Telomerase/vault-associated protein TEP1 is required for vault RNA stability and its association with the vault particle. *J Cell Biol* 152: 157-164
14. Kickhoefer VA, Searles RP, Kedersha NL, Garber ME, Johnson DL, Rome LH (1993) Vault ribonucleoprotein particles from rat and bullfrog contain a related small RNA that is transcribed by RNA polymerase III. *J Biol Chem* 268: 7868-7873
15. Kong LB, Siva AC, Kickhoefer VA, Rome LH, Stewart PL (2000) RNA location and modeling of a WD40 repeat domain within the vault. *RNA* 6: 890-900
16. Tanaka H, Kato K, Yamashita E, Sumizawa T, Zhou Y, Yao M, Iwasaki K, Yoshimura M, Tsukihara T (2009) The structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution. *Science* 323: 384-388
17. Mikyas Y, Makabi M, Raval-Fernandes S, Harrington L, Kickhoefer VA, Rome LH, Stewart PL (2004) Cryoelectron microscopy imaging of recombinant and tissue derived vaults: localization of the MVP N termini and VPARP. *J Mol Biol* 344: 91-105
18. Goldsmith LE, Yu M, Rome LH, Monbouquette HG (2007) Vault nanocapsule dissociation into halves triggered at low pH. *Biochemistry* 46: 2865-2875
19. Kong LB, Siva AC, Rome LH, Stewart PL (1999) Structure of the vault, a ubiquitous cellular component. *Structure* 7: 371-379
20. Querol-Audi J, Casanas A, Uson I, Luque D, Caston JR, Fita I, Verdaguier N (2009) The mechanism of vault opening from the high resolution structure of the N-terminal repeats of MVP. *Embo J* 28: 3450-3457
21. Kedersha NL, Heuser JE, Chugani DC, Rome LH (1991) Vaults. III. Vault ribonucleoprotein particles open into flower-like structures with octagonal symmetry. *J Cell Biol* 112: 225-235
22. Slovak ML, Ho JP, Cole SP, Deeley RG, Greenberger L, de Vries EG, Broxterman HJ, Scheffer GL, Scheper RJ (1995) The LRP gene encoding a major vault protein associated with drug resistance maps proximal to MRP on chromosome 16: evidence that chromosome breakage plays a key role in MRP or LRP gene amplification. *Cancer Res* 55: 4214-4219
23. Mossink M, van Zon A, Franzel-Luiten E, Schoester M, Scheffer GL, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EA (2002) The genomic sequence of the murine major vault protein and its promoter. *Gene* 294: 225-232
24. Herrmann C, Kellner R, Volkandt W (1998) Major vault protein of electric ray is a phosphoprotein. *Neurochem Res* 23: 39-46
25. Ehrnsperger C, Volkandt W (2001) Major vault protein is a substrate of endogenous protein kinases in CHO and PC12 cells. *Biol Chem* 382: 1463-1471
26. Kolli S, Zito CI, Mossink MH, Wiemer EA, Bennett AM (2004) The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling. *J Biol Chem* 279: 29374-29385
27. Zheng CL, Sumizawa T, Che XF, Tsuyama S, Furukawa T, Haraguchi M, Gao H, Gotanda T, Jueng HC, Murata F, Akiyama S (2005) Characterization of MVP and VPARP assembly into vault ribonucleoprotein complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 100-107
28. Callebaut I, Mornon JP (1997) From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett* 400: 25-30
29. Zhuo L, Kimata K (2008) Structure and function of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chains. *Connect Tissue Res* 49: 311-320
30. Whittaker CA, Hynes RO (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell* 13: 3369-3387
31. van Zon A, Mossink MH, Schoester M, Scheffer GL, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EA (2002) Structural domains of vault proteins: a role for the coiled coil domain in vault assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 535-541
32. Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371: 297-300
33. Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, Arruda J, Robinson MO (1997) A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275: 973-977
34. Bateman A, Kickhoefer V (2003) The TROVE module: a common element in Telomerase, Ro and Vault ribonucleoproteins. *BMC Bioinformatics* 4: 49
35. Koonin EV, Aravind L (2000) The NACHT family – a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci* 25: 223-224
36. Poderycki MJ, Rome LH, Harrington L, Kickhoefer VA (2005) The p80 homology region of TEP1 is sufficient for its association with the telomerase and vault RNAs, and the vault particle. *Nucleic Acids Res* 33: 893-902
37. Liu Y, Snow BE, Kickhoefer VA, Erdmann N, Zhou W, Wakeham A, Gomez M, Rome LH, Harrington L (2004) Vault poly(ADP-ribose) polymerase is associated with mammalian telomerase and is dispensable for telomerase function and vault structure *in vivo*. *Mol Cell Biol* 24: 5314-5323
38. van Zon A, Mossink MH, Schoester M, Scheffer GL, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EA (2001) Multiple human vault RNAs. Expression and association with the vault complex. *J Biol Chem* 276: 37715-37721
39. Kickhoefer VA, Rajavel KS, Scheffer GL, Dalton WS, Scheper RJ, Rome LH (1998) Vaults are up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines. *J Biol Chem* 273: 8971-8974
40. Kickhoefer VA, Poderycki MJ, Chan EK, Rome LH (2002) The La RNA-binding protein interacts with the vault RNA and is a vault-associated protein. *J Biol Chem* 277: 41282-41286
41. Kedersha NL, Rome LH (1990) Vaults: large cytoplasmic RNP's that associate with cytoskeletal elements. *Mol Biol Rep* 14: 121-122
42. Herrmann C, Golkaramnay E, Inman E, Rome L, Volkandt W (1999) Recombinant major vault protein is targeted to neuritic tips of PC12 cells. *J Cell Biol* 144: 1163-1172
43. Eichenmuller B, Kedersha N, Solovyeva E, Everley P, Lang J, Himes RH, Suprenant KA (2003) Vaults bind directly to microtubules via their caps and not their barrels. *Cell Motil Cytoskeleton* 56: 225-236
44. Sutovsky P, Manandhar G, Laurincik J, Letko J, Caamano JN, Day BN, Lai L, Prather RS, Sharpe-Timms KL, Zimmer R, Sutovsky M (2005) Expression and proteasomal degradation of the major vault protein (MVP) in mammalian oocytes and zygotes. *Reproduction* 129: 269-282
45. Slesina M, Inman EM, Rome LH, Volkandt W (2005) Nuclear localization of the major vault protein in U373 cells. *Cell Tissue Res* 321: 97-104
46. Chugani DC, Rome LH, Kedersha NL (1993) Evidence that vault ribonucleoprotein particles localize to the nuclear pore complex. *J Cell Sci* 106 ( Pt 1): 23-29
47. Pante N, Kann M (2002) Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* 13: 425-434
48. Slesina M, Inman EM, Moore AE, Goldhaber JI, Rome LH, Volkandt W (2006) Movement of vault particles visualized by GFP-tagged major vault protein. *Cell Tissue Res* 324: 403-410
49. van Zon A, Mossink MH, Houtsmuller AB, Schoester M, Scheffer GL, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EA (2006) Vault mobility depends in part on microtubules and vaults can be recruited to the nuclear envelope. *Exp Cell Res* 312: 245-255
50. Dickenson NE, Moore D, Suprenant KA, Dunn RC (2007) Vault ribonucleoprotein particles and the central mass of the nuclear pore complex. *Photochem Photobiol* 83: 686-691
51. Vollmar F, Hacker C, Zahedi RP, Sickmann A, Ewald A, Scheer U, Dabauvalle MC (2009) Assembly of nuclear pore complexes mediated by major vault protein. *J Cell Sci* 122: 780-786

52. Zemp I, Kutay U (2007) Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS Lett* 581: 2783-2793
53. Abbondanza C, Rossi V, Roscigno A, Gallo L, Belsito A, Piluso G, Medici N, Nigro V, Molinari AM, Moncharmont B, Puca GA (1998) Interaction of vault particles with estrogen receptor in the MCF-7 breast cancer cell. *J Cell Biol* 141: 1301-1310
54. Steiner E, Holzmann K, Elbling L, Micksche M, Berger W (2006) Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance. *Curr Drug Targets* 7: 923-934
55. Mossink MH, van Zon A, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EA (2003) Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? *Oncogene* 22: 7458-7467
56. Berger W, Steiner E, Grusch M, Elbling L, Micksche M (2009) Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. *Cell Mol Life Sci* 66: 43-61
57. Bouhamyia L, Chantot-Bastaraud S, Zaidi S, Roynard P, Prengel C, Bernaudin JF, Fleury-Feith J (2007) Immunolocalization and cell expression of lung resistance-related protein (LRP) in normal and tumoral human respiratory cells. *J Histochem Cytochem* 55: 773-782
58. Izquierdo MA, Shoemaker RH, Flens MJ, Scheffer GL, Wu L, Prather TR, Scheper RJ (1996) Overlapping phenotypes of multidrug resistance among panels of human cancer-cell lines. *Int J Cancer* 65: 230-237
59. Laurencot CM, Scheffer GL, Scheper RJ, Shoemaker RH (1997) Increased LRP mRNA expression is associated with the MDR phenotype in intrinsically resistant human cancer cell lines. *Int J Cancer* 72: 1021-1026
60. Berger W, Spiegl-Kreinecker S, Buchroithner J, Elbling L, Pirker C, Fischer J, Micksche M (2001) Overexpression of the human major vault protein in astrocytic brain tumor cells. *Int J Cancer* 94: 377-382
61. Berger W, Elbling L, Micksche M (2000) Expression of the major vault protein LRP in human non-small-cell lung cancer cells: activation by short-term exposure to antineoplastic drugs. *Int J Cancer* 88: 293-300
62. Aronica E, Gorter JA, van Vliet EA, Spliet WG, van Veelen CW, van Rijen PC, Leenstra S, Ramkema MD, Scheffer GL, Scheper RJ, Sisodiya SM, Troost D (2003) Overexpression of the human major vault protein in gangliogliomas. *Epilepsia* 44: 1166-1175
63. Sisodiya SM, Martinian L, Scheffer GL, van der Valk P, Cross JH, Scheper RJ, Harding BN, Thom M (2003) Major vault protein, a marker of drug resistance, is upregulated in refractory epilepsy. *Epilepsia* 44: 1388-1396
64. van Vliet EA, Aronica E, Redeker S, Gorter JA (2004) Expression and cellular distribution of major vault protein: a putative marker for pharmacoresistance in a rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 45: 1506-1516
65. Linn SC, Pinedo HM, van Ark-Otte J, van der Valk P, Hoekman K, Honkoop AH, Vermorken JB, Giaccone G (1997) Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy. *Int J Cancer* 71: 787-795
66. Pohl G, Filipits M, Suchomel RW, Stranzl T, Depisch D, Pirker R (1999) Expression of the lung resistance protein (LRP) in primary breast cancer. *Anticancer Res* 19: 5051-5055
67. Schneider J, Gonzalez-Roces S, Pollan M, Lucas R, Tejerina A, Martin M, Alba A (2001) Expression of LRP and MDR1 in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy. *Breast Cancer Res* 3: 183-191
68. Burger H, Foekens JA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Wiemer EA, Stoter G, Nooter K (2003) RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res* 9: 827-836
69. Ikuta K, Takemura K, Sasaki K, Kihara M, Nishimura M, Ueda N, Naito S, Lee E, Shimizu E, Yamauchi A (2005) Expression of multidrug resistance proteins and accumulation of cisplatin in human non-small cell lung cancer cells. *Biol Pharm Bull* 28: 707-712
70. Jasinski M, Figlerowicz M (2006) Roslinne ABC transportery - rodzina z tradycjami. *Postepy Biochem* 52: 296-302
71. Calcabrini A, Meschini S, Stringaro A, Cianfriglia M, Arancia G, Molinari A (2000) Detection of P-glycoprotein in the nuclear envelope of multidrug resistant cells. *Histochem J* 32: 599-606
72. Featherstone JM, Speers AG, Lwaleed BA, Hayes MC, Cooper AJ, Birch BR (2005) The nuclear membrane in multidrug resistance: microinjection of epirubicin into bladder cancer cell lines. *BJU Int* 95: 1091-1098
73. Kitazono M, Sumizawa T, Takebayashi Y, Chen ZS, Furukawa T, Nagayama S, Tani A, Takao S, Aikou T, Akiyama S (1999) Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *J Natl Cancer Inst* 91: 1647-1653
74. Kitazono M, Okumura H, Ikeda R, Sumizawa T, Furukawa T, Nagayama S, Seto K, Aikou T, Akiyama S (2001) Reversal of LRP-associated drug resistance in colon carcinoma SW-620 cells. *Int J Cancer* 91: 126-131
75. Cheng SH, Lam W, Lee AS, Fung KP, Wu RS, Fong WF (2000) Low-level doxorubicin resistance in benzo[a]pyrene-treated KB-3-1 cells is associated with increased LRP expression and altered subcellular drug distribution. *Toxicol Appl Pharmacol* 164: 134-142
76. Meschini S, Marra M, Calcabrini A, Monti E, Gariboldi M, Dolfini E, Arancia G (2002) Role of the lung resistance-related protein (LRP) in the drug sensitivity of cultured tumor cells. *Toxicol In Vitro* 16: 389-398

## The structure of cellular vaults, their role in the normal cell and in the multidrug resistance of cancer

Witold Szaflarski<sup>✉</sup>, Michał Nowicki, Maciej Zabel

Department of Histology and Embryology, Poznan University of Medical Sciences, 6 H. Świącickiego St., 60-781 Poznan, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: witold.szaflarski@gmail.com

**Key words:** cellular vaults, MVP/LRP, TEPI, vPARP, multidrug resistance, cancer

### ABSTRACT

The cellular vaults have been described for the first time in 1986 as ribonucleoprotein complexes composed of three proteins, MVP, TEPI and vPARP and several vRNA strains. Biochemical and structural studies revealed their ubiquitous existence in the cytoplasm of many eukaryotic cells and their barrel-like structure indicating their engagement in the intracellular transport. Furthermore, the high homology between MVP and LRP which was already known to be involved in multidrug resistance mechanism opened a discussion about the role of vaults in both normal and cancer cells. The histopathology research demonstrated an increased amount of MVP/LRP proteins in the cancer as well as showed translocation possibility between cytoplasm and nuclear envelope, which can be of crucial point in the prevention of nucleus against anticancer drugs.

# System kontroli jakości białek w cytoplazmie – rola białek opiekuńczych w biologii chorób neurodegeneracyjnych

Izabela Guenther

Sabina Kędzierska-  
Mieszkowska

Katedra Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, Gdańsk

Katedra Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; tel.: (58) 523 63 09, e-mail: kedzie@biotech.ug.gda.pl

Artykuł otrzymano 16 września 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 1 grudnia 2010 r.

**Słowa kluczowe:** ATPazy Clp, autofagia, białka opiekuńcze, BAG1, CHIP, fałdowanie białek, proteazy

**Wykaz skrótów:** ALS (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*) – stwardnienie zanikowe boczne; APP (ang. *amyloid beta A4 precursor protein*) – białko prekursorowe amyloidu  $\beta$ ; białka AAA (ang. *ATPase associated with various activities*) – ATPazy związane z różnymi procesami komórkowymi; CFTR (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) – białko błonowe tworzące kanał chlorkowy, którego brak/zaburzenie funkcji wywołuje mukowiscydozę; CMA (ang. *chaperone-mediated autophagy*) – autofagia zależna od białek opiekuńczych; DRPLA (ang. *dentatorubral-pallidoluyasian atrophy*) – zanik jąder zębanych, gałek błędnych i ciał podwzgórzowych; Hsps (ang. *heat shock proteins*) – białka szoku cieplnego; ER (łac. *reticulum endoplasmaticum*) – siateczka śródplazmatyczna; sHsps (ang. *small heat shock proteins*) – białka szoku cieplnego o niskiej masie cząsteczkowej; SBMA (ang. *spinal and bulbar muscular atrophy*) – opuszkowo-rdzeniowy zanik mięśni; SCA (ang. *spinocerebellar ataxia*) – ataksje rdzeniowo-mózdkowe; TBP (ang. *TATA-binding protein*) – białko wiążące się z sekwencją TATA-box, wchodzące w skład transkrypcyjnego kompleksu preinicjacyjnego; TPR (ang. *chaperone-interacting tetratricopeptide*) – motyw strukturalny spotykany w białkach, pośredniczący w oddziaływaniach białko-białko

**Podziękowanie:** Praca powstała w trakcie realizacji grantu UG BW/130-5-0410-0.

## STRESZCZENIE

W artykule opisano rolę białek opiekuńczych i proteaz komórkowych w cytoplazmatycznym systemie kontroli jakości białek. System ten kontroluje i reguluje stan fałdowania białek oraz ich prawidłowe funkcjonowanie w komórkach organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. W wyniku współdziałania białek opiekuńczych i proteaz w cytoplazmie zostaje ograniczona akumulacja nieprawidłowo zwiniętych białek. W artykule szczególną uwagę zwrócono na powiązania białek opiekuńczych z procesami degradacji białek oraz na ich rolę w biologii chorób neurodegeneracyjnych.

## WPROWADZENIE

Prawidłowe funkcjonowanie komórek, ich przeżywalność zależą w dużej mierze od procesu fałdowania białek. W procesie tym zgodna z zapisem genetycznym, liniowa, ściśle określona struktura pierwszorzędowa białka, zostaje przeobrażona w odpowiednią strukturę przestrzenną. Proces fałdowania białek jest bardzo istotny w komórce z uwagi na kluczową rolę białek we wszystkich procesach biologicznych. Przestrzenne ułożenie łańcucha polipeptydowego i jego konformacja decydują o specyficznej funkcji biologicznej białka w komórce. Jedynie białka prawidłowo zwinięte, posiadające stabilną konformację są w pełni funkcjonalne. Rozciągnięty lub ułożony przypadkowo łańcuch polipeptydowy jest pozbawiony aktywności biologicznej. Stan fałdowania białek oraz ich prawidłowe funkcjonowanie w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych kontroluje i reguluje tzw. potranslacyjny system kontroli jakości białek. System ten tworzą białka opiekuńcze oraz proteazy komórkowe. Białka opiekuńcze w warunkach fizjologicznych chronią nowo syntetyzowane polipeptydy przed agregacją i pośredniczą w ich poprawnym zwijaniu nie wchodząc w skład ich ostatecznej struktury [1,2]. Natomiast w warunkach stresu chronią one inne białka komórkowe przed inaktywacją i denaturacją, uczestniczą w reaktywacji zagregowanych białek lub też kierują je do degradacji, jeśli ich naprawa jest niemożliwa [3-8]. Z kolei główne zadanie proteaz sprowadza się do wyeliminowania z komórki nieodwracalnie uszkodzonych białek, których obecność ze względu na ich tendencję do tworzenia agregatów, mogłaby niekorzystnie wpływać na funkcjonowanie innych białek komórkowych [9,10]. W wyniku wspólnego działania białek opiekuńczych i proteaz zostaje ograniczona w cytoplazmie komórek akumulacja nieprawidłowo zwiniętych białek [11].

## ROLA BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH I PROTEAZ W SYSTEMIE KONTROLI JAKOŚCI BIAŁEK

Wiele białek opiekuńczych znanych jest jako białka szoku cieplnego (Hsp), których poziom syntezy znacznie wzrasta w komórkach w warunkach stresu cieplnego. Zadaniem tej grupy białek jest przede wszystkim ochrona komórki przed zgubnymi skutkami zmian czynników zewnątrznych. Nagłe zmiany czynników środowiskowych często zaburzają proces fałdowania nowo powstających polipeptydów oraz naruszają prawidłową konformację białek, co sprzyja ich agregacji. Dzięki białkom opiekuńczym każdy żywy organizm może kontrolować proces agregacji polipeptydów i przeciwstawiać się temu, m.in. poprzez zapobieganie niepożądanym oddziaływaniom międzycząsteczkowym. Stosując kryterium masy cząsteczkowej można wyróżnić 6 głównych rodzin białek opiekuńczych (Tab. 1). Jedną z nich jest rodzina białek Hsp100, do której należą m.in. bakteryjne białka ClpA, ClpB, ClpX, ClpY (HslU), drożdżowe białka Hsp104 (cytosol) i Hsp78 (mitochondria), będące homologami bakteryjnego białka ClpB oraz roślinne białko Hsp101. Białka należące do rodziny Hsp100 są ATPazami o strukturze przypominającej heksameryczny pierścień, zaliczanymi do tzw. ATPaz AAA+. W centrum tego pierścienia znajduje się kanał, przez który przeciągany jest substrat białkowy [12-14]. Większość ATPaz Hsp100, z wyjątkiem ClpB/Hsp104, tworzy kompleksy proteolityczne współpracujące z podjednostkami peptydazowymi (ClpP lub ClpQ (HslV)), odpowiedzialne w



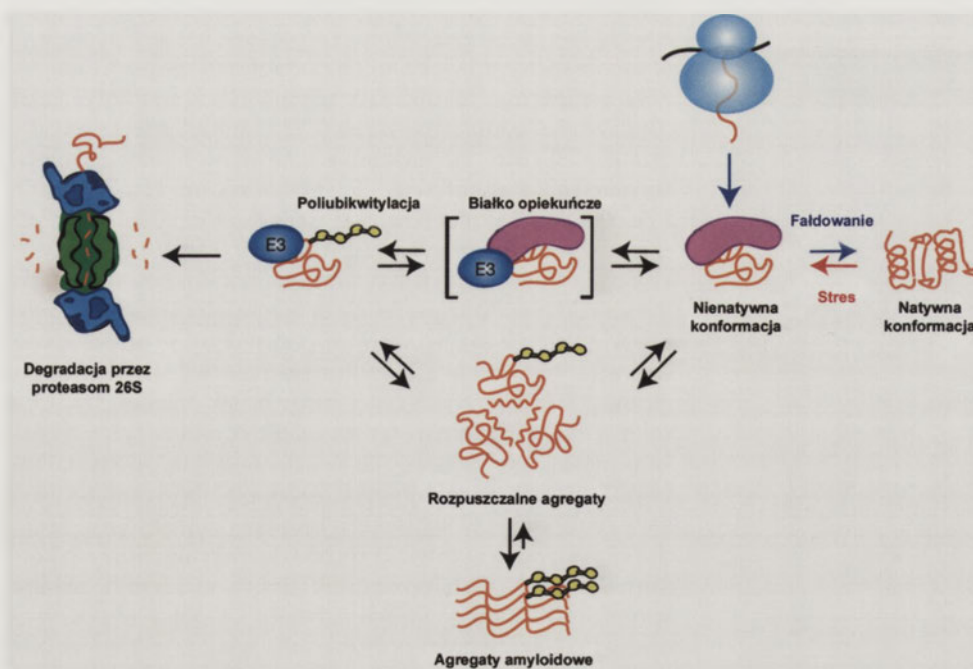
**Tabela 1.** Główne rodziny białek opiekuńczych i ich przedstawiciele [27,73-75].

Hsps zależne od ATP
Podjednostki kompleksów proteolitycznych oraz dezagregazy współpracujące z Hsp70/Hsp40
<b>Hsp100/Clp</b>
<i>E. coli</i> : ClpA, ClpX, ClpY (HslU), ClpB (cytosol)
<i>S. cerevisiae</i> : Hsp104 (cytosol), Hsp78 (mitochondria)
<i>Arabidopsis thaliana</i> : AtHsp101/ClpB1 (cytosol)
Foldazy
<b>Hsp90</b>
<i>E. coli</i> : HtpG (cytosol)
<i>S. cerevisiae</i> : Hsp83 (cytosol/jądro komórkowe)
Ssaki: Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$ (cytosol/jądro komórkowe)
Grp94 (ER)
<b>Hsp70</b>
<i>E. coli</i> : DnaK (cytosol)
<i>S. cerevisiae</i> : Ssa 1-4 i Ssb 1,2 (cytosol)
Kar2 (ER), Ssc1 (mitochondria)
Ssaki: Hsp70 (Hsp72) (cytosol/jądro komórkowe)
Hsc70 (Hsp73) (cytosol/jądro komórkowe)
Hsp75 (Grp75/mtHsp70) (mitochondria)
BiP (Grp78/Hsp78) (ER)
<b>Hsp60</b>
<i>E. coli</i> : GroEL (cytosol)
<i>S. cerevisiae</i> : Hsp60 (mitochondria)
Rośliny: Cpn60 (chloroplasty)
Ssaki: Hsp60 (mitochondria/cytosol)
<b>Hsp40 (partnerzy Hsp70)</b>
<i>E. coli</i> : DnaJ (cytosol)
<i>S. cerevisiae</i> : Ydj1 (cytosol/jądro komórkowe)
Ssaki: Hsp40 (cytosol/mitochondria), Hsp47 (ER)
<b>Hsp10 (partnerzy Hsp60)</b>
<i>E. coli</i> : GroES (cytosol)
Rośliny: Cpn10 (chloroplasty)
Ssaki: Hsp10 (mitochondria/cytosol)
Hsps niezależne do ATP (sHsps)
Holdazy
<i>E. coli</i> : IbpA i IbpB
<i>S. cerevisiae</i> : Hsp27 (cytosol)
Ssaki: $\alpha$ A- i $\alpha$ B-krystaliny (cytosol)
Hsp25/Hsp27 (cytosol/jądro komórkowe)

komórce bakteryjnej za degradację nieprawidłowo zwiniętych polipeptydów [15,16]. ClpB/Hsp104, w przeciwieństwie do innych przedstawicieli ATPazy Clp, nie jest zaangażowane w degradację białek, lecz wraz z systemem DnaK/DnaJ (Hsp70/Hsp40) bierze udział w dysocjacji agregatów białkowych i reaktywacji białek [17-20]. Aktywność tego dwuskładnikowego systemu białek opiekuńczych jest krytyczna dla przeżywalności bakterii, drożdży i roślin w warunkach stresu. Do tej pory nie zidentyfikowano homologów białek ClpB/Hsp104 w cytosolu wyższych organizmów eukariotycznych. Przypuszcza się, że ich funkcję w komórkach ssaków przejęły inne ATPazy AAA+, np. białko VCP (ang. *valosin-containing protein*) znane także jako p97, którego zaburzenia funkcji prowadzą m.in. do akumulacji nierozpuszczalnych i ubikwitylowanych białek [21]. Rola ATPazy Clp w procesach degradacji i dysocjacji agregatów białkowych/reaktywacji białek została szczegółowo opisana w pracach przeglądowych [14,21-26]. Kolejnymi rodzinami białek opiekuńczych są Hsp90, Hsp70 współpracujące m.in. z Hsp40 oraz Hsp60 tworzące kompleks z Hsp10.

Przedstawiciele tych rodzin występują we wszystkich organizmach; są obecne zarówno w komórkach bakteryjnych, jak i w komórkach człowieka, a ich docelowym miejscem jest nie tylko cytoplazma, ale także różne organella komórkowe, takie jak siateczka śródplazmatyczna (ER), chloroplasty i mitochondria [26-28] (Tab. 1). Niektóre z omawianych białek syntetyzowane są konstytutywnie, inne takie jak np. Hsp70(Hsp72) i Hsp90 $\alpha$ , są indukowane pod wpływem działania różnych czynników stresogennych. Hsp90, Hsp70/Hsp40 oraz Hsp60/Hsp10 działają przede wszystkim jako tzw. foldazy (ang. *folder chaperones*) ponieważ pośredniczą one w fałdowaniu i w reaktywacji białek inaktywowanych pod wpływem stresu, przywracając im właściwą konformację oraz właściwości biologiczne [11,26,29]. Działanie tej grupy białek opiekuńczych jest zależne od ATP. Innym typem białek opiekuńczych są białka o masie cząsteczkowej 12-43 kDa, takie jak  $\alpha$  $\beta$ -krystaliny, Hsp25/Hsp27 lub bakteryjne białka IbpA, IbpB (Tab. 1). Białka te funkcjonują w komórkach jako tzw. holdazy (ang. *holder chaperones*), ponieważ wiążą się one do nieprawidłowych konformacji białek (niezależnie od ATP) i tworzą z nimi stabilne kompleksy, zapobiegając ich agregacji [30-33]. Nie posiadają one jednak aktywności przywracania właściwej konformacji. Białka opiekuńcze w obrębie poszczególnych rodzin charakteryzują się stabilnością w ewolucji zarówno strukturalną, jak i funkcjonalną, co potwierdza ich niezastąpioną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórek [34]. Białka te nie tylko chronią inne białka komórkowe przed utratą ich prawidłowej konformacji, ale także biorą one udział w transporcie polipeptydów przez błony komórkowe, w apoptozie komórek lub w prezentacji antygenów na ich powierzchni [27].

Białka opiekuńcze stanowią pierwszą linię obrony komórki w walce z nieprawidłowo zwiniętymi i нефunkcjonalnymi białkami. To przede wszystkim od tej grupy białek zależy utrzymanie krytycznej dla przeżywalności komórek równowagi pomiędzy procesami fałdowania i degradacji nieprawidłowo zwiniętych białek (Ryc. 1). Białka opiekuńcze rozpoznają nienaturalne konformacje białek i wiążąc się z nimi promują ich fałdowanie w sposób zależny od ATP oraz zapobiegają hydrofobowym oddziaływaniom białek, które mogą doprowadzić do ich agregacji. Dopiero białka trwale uszkodzone pod wpływem stresu lub mutacji, czyli takie, którym białka opiekuńcze nie są w stanie przywrócić właściwej im konformacji są degradowane przez komórkowe proteazy, stanowiące drugi kluczowy element systemu kontroli jakości białek. W degradacji białek biorą udział proteazy zlokalizowane w różnych przedziałach komórkowych. W komórkach eukariotycznych głównym miejscem odpowiedzialnym za degradację cytoplazmatycznych białek jest proteasom 26S (Ryc. 2), multikatalityczna proteaza, która degraduje wyłącznie białka naznaczone wcześniej przez ubikwitynę, małe globularne białko składające się z 76 reszt aminokwasowych [35-37]. Ten sposób degradacji białek jest wysoce selektywny. Oznacza to, że degradowane są tylko wybrane białka. Ubikwityna jest przyłączana do białka przeznaczonego do degradacji w wyniku kaskady reakcji enzymatycznych z udziałem 3 enzymów: enzymu aktywującego ubikwitynę (E1), enzymów koniugujących (E2) i ligazy ubikwitylowych (E3), które decydują o specyficzności substratowej reakcji ubikwitylacji [35,38]. Ligazy ubikwitylowe są ważnym elementem systemu kontroli jakości białek.



Rycina 1. Rola białek opiekuńczych w utrzymaniu równowagi pomiędzy procesami fałdowania i degradacji źle zwiniętych białek [54]. Białka opiekuńcze pośredniczą w fałdowaniu nowo syntetyzowanych białek. Mogą one także wiązać się do nienaturnych konformacji białek, powstających podczas denaturacji (np. w warunkach stresu) i promować ich fałdowanie w sposób zależny od ATP. Białka opiekuńcze zapobiegają także hydrofobowym oddziaływaniom białek, które mogą sprzyjać tworzeniu agregatów białkowych. Dopiero białka trwale uszkodzone, którym białka opiekuńcze nie są w stanie przywrócić natywnej konformacji, zostają usunięte z komórki na drodze proteolizy. W komórkach eukariotycznych proces ten zazwyczaj wiąże się z ubikwitylacją białek z udziałem ligaz ubikwitylowych (E3) i aktywnością proteasomu 26S. W niektórych przypadkach, ubikwitylacja substratów związanych z białkami opiekuńczymi jest możliwa dzięki specyficznym oddziaływaniom niektórych Hsps (Hsp70 czy Hsp90) z enzymami E3 (takimi jak CHIP) zawierającymi motywy TPR (warunkujące ich oddziaływanie z Hsps). Stres, mutacje czy proces starzenia się zaburzają prawidłowe funkcjonowanie systemu kontroli jakości białek. Pojawia się wówczas zwiększona ilość nieprawidłowo zwiniętych białek, które często mają tendencję do tworzenia agregatów. Obecność nierozpuszczalnych agregatów może doprowadzić do zaburzenia funkcji komórkowych i rozwoju choroby neurodegeneracyjnej.

Drugim fundamentalnym mechanizmem odpowiedzialnym w komórkach organizmów eukariotycznych za degradację białek i utrzymanie homeostazy jest autofagia. Jest ona mniej selektywnym mechanizmem w porównaniu z proteolizą białek zależną od ubikwityny. W procesie autofagii przede wszystkim białka o długim okresie półtrwania oraz nieprawidłowo funkcjonujące organella komórkowe są kierowane do lizosomów, gdzie ulegają degradacji. Wyróżnia się 3 główne typy autofagii: makrofagię, mikrofagię i autofagię zależną od białek opiekuńczych (CMA, ang. *chaperone-mediated autophagy*). Makroautofagia polega na usuwaniu z komórki zbędnych białek lub całych organelli komórkowych, poprzez formowanie autofagosomu, który w dalszej kolejności ulega fuzji z lizosomem lub wakuolą, gdzie jego zawartość zostaje zdegradowana przez hydrolazy. Z kolei mikroautofagia to proces, który prowadzi do wyeliminowania mniejszych elementów komórki przez inwaginację błony lizosomalnej. Natomiast w CMA substraty białkowe, zawierające motyw KFERQ, są rozpoznawane przez kompleks cytoplazmatycznych białek opiekuńczych i dostarczane do powierzchni błony lizosomalnej, gdzie zostają związane przez białko receptorowe LAMP-2A (ang. *lysosome-associated membrane protein type 2A*) biorące udział zarówno w ich prawidłowym rozpoznaniu, jak i w translokacji do wnętrza lizosomu. Translokacja cytoplazmatycznych białek przez błonę lizosomalną wymaga ich całkowitego rozwinięcia, dlatego też w procesie tym niezbędne są białka

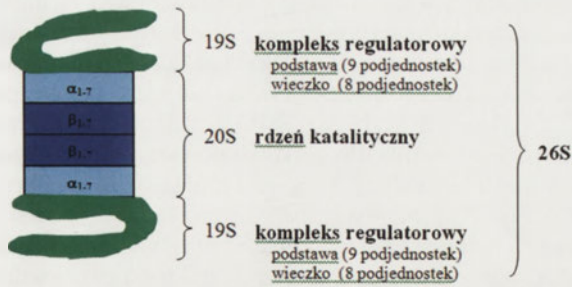
opiekuńcze. Zatem CMA jest to proces, który zachodzi wyłącznie w obecności białek opiekuńczych i polega na selektywnej proteolizie pojedynczych białek cytoplazmatycznych, które ulegają rozfałdowaniu, a nie białek tworzących oligomeryczne czy multimeryczne kompleksy, takie jak agregaty. Z tego powodu całe organella komórkowe nie są degradowane na drodze autofagii zależnej od białek opiekuńczych. CMA została do tej pory opisana wyłącznie u ssaków. Makrofagia i CMA są aktywowane w warunkach stresu i głodu, które prowadzą do uszkodzenia struktury białek. Bardzo często makrofagia i CMA działają synchronicznie lub w określonej kolejności. Z dotychczas zebranych danych literaturowych wynika, że autofagia może być alternatywnym, kompensującym mechanizmem degradacji białek, który jest aktywowany w przypadku zahamowania aktywności proteasomu, co może świadczyć o „komunikowaniu się” głównych szlaków degradacji białek [39-44].

W komórkach prokariotycznych, które są pozbawione ubikwityny ważną rolę w degradacji

niefunkcyjnych, cytoplazmatycznych białek odgrywają ATP-zależne proteazy, zaliczane do czterech klas, tj. wspomniane wcześniej kompleksy proteolityczne ClpAP/ClpXP i ClpYQ (HslVU) oraz proteazy Lon i FtsH [45]. Bakteryjne kompleksy proteolityczne, z ATPazą Clp funkcjonującą jako podjednostka regulatorowa proteazy, przypominają pod względem strukturalnym i mechanizmu działania eukariotyczny proteasom 26S [12,46,47]. Na przykład w kompleksie ClpAP można wyróżnić część proteolityczną, ClpP, będącą odpowiednikiem proteasomu 20S i kompleks 19S zawierający ATPazę Clp. ClpP (białko szoku cieplnego) tworzy multimer złożony z 14 podjednostek uporządkowanych w dwa siedmioczłonowe pierścienie, które przylegają do siebie. Heksameryczne pierścienie ClpA wiążą się do jednego lub obu końców proteolitycznej beczułki ClpP. ATPaza Clp w takim kompleksie funkcjonuje jako podjednostka regulatorowa proteazy.

#### POWIĄZANIA BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH Z PROCESEM DEGRADACJI BIAŁEK

Istnieje szereg obserwacji świadczących o komunikowaniu się systemów białek opiekuńczych i proteaz zarówno w komórkach organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych [11,48-50]. Udział białek opiekuńczych w degradacji niewłaściwie zwiniętych białek nie jest w pełni poznany. Przypuszcza się, że ich udział w proteolizie polega na stabi-



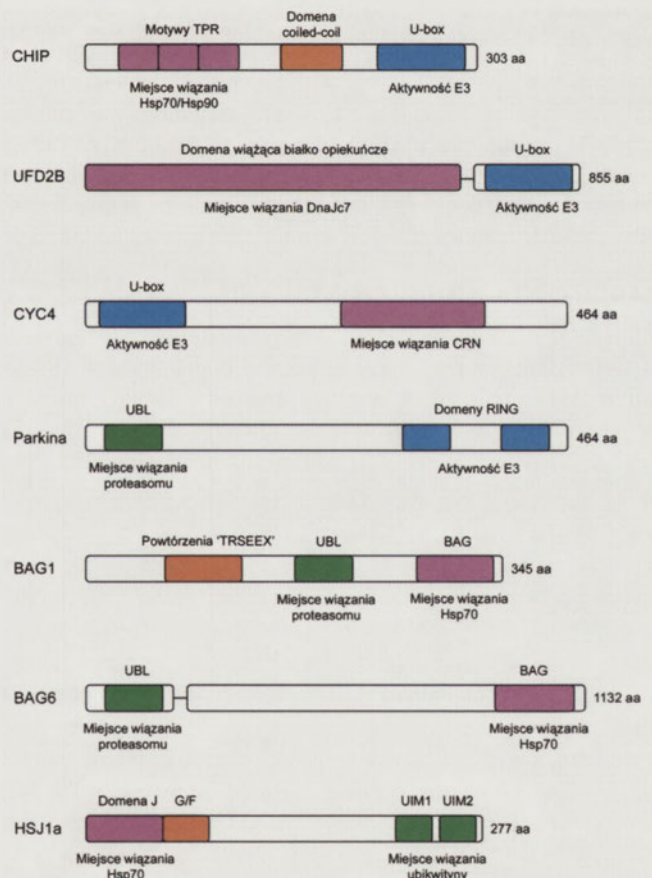
**Rycina 2.** Struktura proteasomu 26S. Proteasom jest multikatalityczną proteazą, która degraduje poliubikwitylowane białka do krótkich peptydów. Składa się on z dwóch zasocjowanych ze sobą subkompleksów białkowych: katalitycznego 20S i kompleksu regulatorowego 19S. Kompleks 20S (rdzenia katalitycznego 20S i kompleksu regulatorowego 19S) ma kształt zamkniętej beczki złożonej z czterech współosiowych pierścieni, dwóch zewnętrznych  $\alpha$  i dwóch wewnętrznych  $\beta$ . Każdy z pierścieni składa się z siedmiu różnych podjednostek tworzących ogólną strukturę kompleksu 20S:  $\alpha 1-7\beta 1-7\beta 1-7\alpha 1-7$ . Miejsca aktywne proteazy zlokalizowane są na końcach aminowych podjednostek  $\beta$ , które zawierają reszty Thr lub Ser. Taka struktura kompleksu 20S pozwala na izolację miejsca aktywnego proteazy od potencjalnych substratów, dopóki nie zostaną one skierowane do wnętrza katalitycznej beczki. Substraty są stopniowo degradowane bez uwalniania pośrednich produktów degradacji, do momentu aż substrat zostanie rozłożony do peptydów o długości 7-9 reszt aminokwasowych. Dostęp do wnętrza katalitycznej komory jest kontrolowany przez kompleks 19S, zbudowany z 17 podjednostek, 9 z nich znajduje się w tzw. podstawie kompleksu, zaś 8 tworzy wieczko kompleksu. Jedną z najważniejszych funkcji kompleksu 19S jest rozpoznawanie i wiązanie ubikwitylowanych białek. Ponadto kompleks 19S otwiera substratowi wejście do komory katalitycznej znajdujące się w pierścieniu  $\alpha$  i umożliwia jemu przedostanie się do wnętrza kompleksu. Jeżeli substrat jest większy niż otwór kanału prowadzącego do katalitycznego rdzenia to kompleks 19S bierze udział również w rozwijaniu substratu białkowego. Otwieranie kanału, czyli indukcja zmian konformacyjnych proteasomu 20S oraz rozwijanie substratu wymaga nakładu energii. Pochodzi ona z hydrolizy ATP. Dlatego też kluczowym składnikiem kompleksu 19S, jego podstawy, jest 6 różnych ATPaz należących do białek AAA+. Podjednostka 19S zawiera także izopeptydazę, która odcina nienaruszone cząsteczki ubikwityny. Zatem proteasom nie powoduje degradacji ubikwityny, lecz umożliwia ponowne jej wykorzystanie. Ubikwitylacja i aktywność proteasomu współgrają ze sobą w degradacji niepożądanych białek. Uwolniona ubikwityna zostaje ponownie wykorzystana, a peptydy powstające w wyniku działania proteasomu 26S zostają rozłożone do pojedynczych aminokwasów przez inne proteazy komórkowe.

lizacji populacji rozpuszczalnych, niewłaściwie sfałdowanych polipeptydów, poprzez wiązanie się z nimi [29]. Obserwacja, że niektóre z eukariotycznych białek opiekuńczych specyficznie oddziałują z ligazami ubikwitylowymi E3 nasuwa przypuszczenie, że przynajmniej w niektórych przypadkach białka opiekuńcze rozpoznają niewłaściwie sfałdowane polipeptydy i pośredniczą w ich poliubikwitylacji poprzez werbowanie enzymów E3 i oddziaływanie z nimi [51-53]. Zatem udział białek opiekuńczych w proteolizie mógłby polegać na utrzymywaniu w formie rozpuszczalnej nieprawidłowo sfałdowanych polipeptydów i udostępnianiu ich systemowi ubikwitylacji, który następnie kieruje białka do proteasomu 26S (Ryc. 1). Białka opiekuńcze mogą również uczestniczyć w selekcji białek przeznaczonych do degradacji [54]. Rola białek opiekuńczych w degradacji białek w lizosomach także sprowadza się do ich udziału w prawidłowym rozpoznaniu substratu białkowego, rozwinięciu jego struktury i wytworzeniu konformacji optymalnej dla translokacji oraz dostarczeniu go do błony lizosomalnej. Ponadto białka opiekuńcze zaangażowane w CMA regulują dynamikę składania i rozkładania kompleksu translokacyjnego oraz stabilizują jego multimeryczną strukturę [41]. Ze względu na udział białek opiekuńczych zarówno w proteasomalnej, jak i lizosomalnej degradacji białek

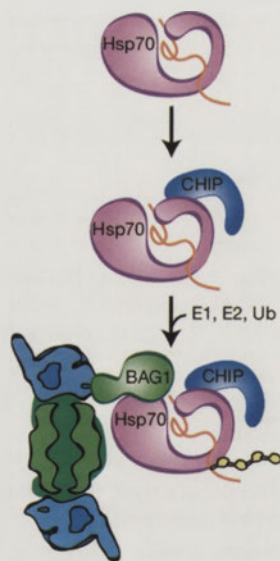
przypisuje się im rolę mediatorów, cząsteczek (ang. *sensing or cross-communication molecules*), które pośredniczą w wymianie informacji między dwoma głównymi szlakami degradacji niefunkcyjnych białek.

## ROLA BIAŁEK CHIP I BAG1 W SYSTEMIE JAKOŚCI BIAŁEK

Pewne rodziny białek mogą uczestniczyć w procesie łączenia białek opiekuńczych z systemem ubikwitylacji oraz z aktywnością proteasomu [54,55]. Białka te posiadają charakterystyczną strukturę domenową (Ryc. 3). Pierwszymi zidentyfikowanymi tego typu białkami były CHIP i BAG1. Białko CHIP zawiera na N-końcu trzy motywy TPR oddziałujące z Hsp70/Hsp90 oraz tzw. domenę U-box charakterystyczną dla enzymów E3 czyli ligaz ubikwitylowych. Drugie z białek, BAG1, jest przedstawicielem dużej rodziny białek zawierających domenę BAG wiążącą Hsp70 i domenę UBL (ubikwitynopodobną), odpowiedzialną za oddziaływanie z proteasomem 26S. Białka BAG działają jako czynniki wymieniające nukleotyd w zależnym od ATP cyklu Hsp70. Białka CHIP i BAG1 jednocześnie mogą oddziaływać z Hsp70. BAG1 oddziałuje z N-końcową domeną ATPazową Hsp70, podczas gdy CHIP z domeną C-końcową. Według jednego z modeli białka CHIP i BAG1 mogą wpływać na substrat białkowy związany z Hsp70/



**Rycina 3.** Organizacja domenowa wybranych białek integrujących działanie białek opiekuńczych i proteasomu 26S [54]. CRN (ang. *crooked neck*) – białko zawierające nietypowy motyw TPR; U-box i RING – domeny charakterystyczne dla ligaz ubikwitylowych (E3); UBL – domena ubikwitynopodobna odpowiedzialna za oddziaływanie z proteasomem; UIM (ang. *ubiquitin-interacting motif*) – motyw wiążący ubikwitynę; domeny odpowiedzialne za oddziaływanie z białkami opiekuńczymi zaznaczono kolorem różowym.



Proteasom 26S

Rycina 4. Oddziaływanie białek CHIP i BAG1 na substrat białkowy związany przez Hsp70 [54]. W wyniku współdziałania CHIP i BAG1 dochodzi do indukcji procesu degradacji białek z udziałem Hsp70 i proteasomu 26S. E1 – enzym aktywujący ubikwitynę; E2 – enzym koniugujący i przenoszący ubikwitynę; Ub – ubikwityna.

Hsp90 w następujący sposób (Ryc. 4). Przyłączenie się białka CHIP do Hsp70 (najprawdopodobniej po nieudanej próbie fałdowania substratu przez Hsp70) uruchamia w obecności enzymów E1, E2, ATP i ubikwityny poliubikwitylację substratu związanego z Hsp70, następnie białko BAG1 zasocjowane z Hsp70 i proteasomem 26S pośredniczy w przekazaniu substratu białkowego do proteasomu, w którym zostaje on zdegradowany [54]. W wyniku współdziałania BAG1 i CHIP dochodzi do indukcji procesu degradacji białek z udziałem Hsp70 i proteasomu 26S. Oba białka regulują aktywność ATPazową Hsp70. W związku z tym, mogą one nie tylko fizycznie łączyć system białek opiekuńczych z aktywnością proteasomu, ale również mogą modulować

przebieg między procesami fałdowania i degradacji nieprawidłowo zwiniętych białek. Z dotychczasowych doświadczeń wynika, że CHIP jest kluczowym regulatorem procesów fałdowania i degradacji białek w komórkach człowieka [51,52].

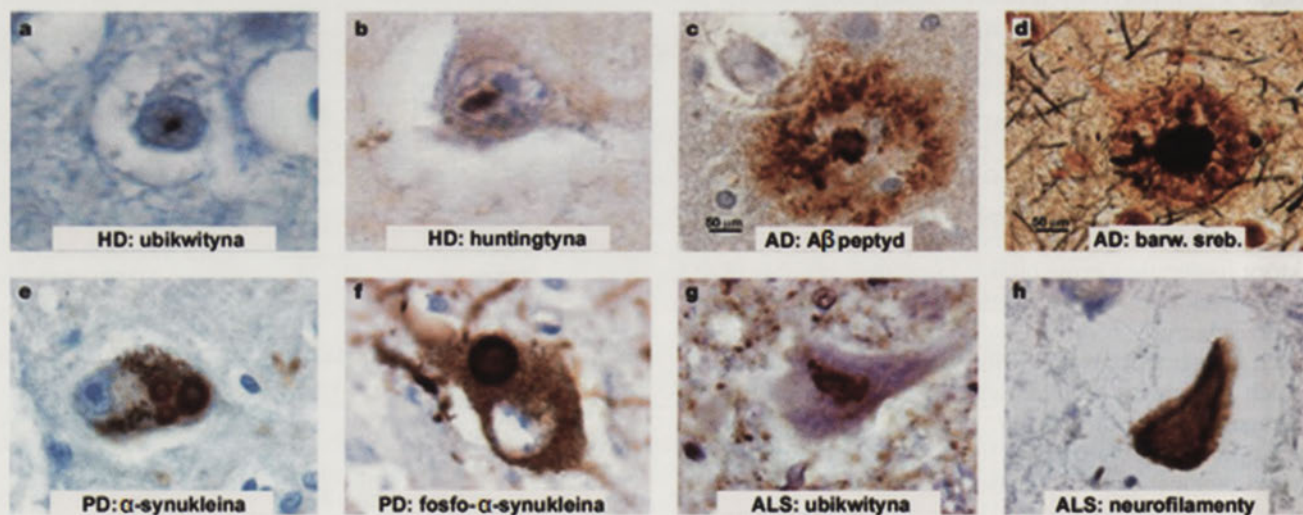
### ZABURZENIA W FUNKCJONOWANIU SYSTEMU JAKOŚCI BIAŁEK

Omawiany system kontroli jakości białek nie jest doskonałym systemem. Stres cieplny, stres oksydacyjny, mutacje

genetyczne i proces starzenia się organizmu zaburzają jego sprawne działanie (Ryc. 1). W takich przypadkach pojawia się w komórkach zwiększona liczba nieprawidłowo zwiniętych białek. Białka takie mają często tendencję do tworzenia agregatów. Zaczynający się proces agregacji zakłóca działanie systemu kontroli jakości białek. System ten nie jest w stanie „przebrobić” zwiększonej liczby agregatów białkowych, dochodzi do jego przeładowania. Początkowo powstają oligomeryczne (globularne) intermediały, które następnie tworzą profibrylarne struktury. Asocjacja tych struktur prowadzi do powstania nierozpuszczalnych włókien amyloidowych, które odkładane są jako agregaty i inkluduje widoczne w mikroskopie świetlnym [56]. Istnieje hipoteza, że intermediały agregacji są bardziej toksyczne niż białko prekursorowe czy inkluzje. Wobec tego zahamowanie wczesnych etapów agregacji byłoby korzystne dla komórki, ponieważ zapobiegałoby tworzeniu toksycznych oligomerów i interemediatów. Natomiast hamowanie późniejszych etapów mogłoby spowodować akumulację toksycznych agregatów.

### CHOROBY NEURODEGENERACYJNE ZWIĄZANE Z AGREGACJĄ NIEPRAWIDŁOWO SFAŁDOWANYCH BIAŁEK

Niewłaściwe fałdowanie białek, któremu towarzyszy utrata ich funkcji biologicznej jest przyczyną szeregu chorób człowieka, w tym tzw. chorób agregacyjnych (konformacyjnych). Zdecydowaną większość tych chorób stanowią choroby neurodegeneracyjne takie jak choroba Alzheimera, Parkinsona, stwardnienie zanikowe boczne (ALS), choroba Huntingtona (płasawica), opuszkowo-rdzeniowy zanik mięśni (SBMA) lub ataksje rdzeniowo-mózdzkowe (SCA) (Tab. 2). Ostatnie z wymienionych chorób, tzw. choroby poliglutaminowe (polyQ), powodowane są przez mutację, która polega na zwiększeniu liczby powtórzeń tripletu CAG w kodujących regionach genów kodujących huntingtynę (*HD/IT-15*), receptor androgenów (*AR*), ataksynę-1 (*SCA1*), ataksynę-2 (*SCA2*), ataksynę-3 (*MJD/SCA3*), ataksynę-7 (*SCA7*), atropinę-1 (*ATN1*), podjednostki  $\alpha_{1A}$  kanału wapniowego (*CACNA1A*) oraz czynnik transkrypcyjny TBP (*TBP*) [57] (Tab. 2). Produktami zmie-



Rycina 5. Rodzaje agregatów nieprawidłowo sfałdowanych białek towarzyszące chorobom neurodegeneracyjnym [56]. a, b – wewnątrzjądrowe agregaty charakterystyczne dla choroby Huntingtona; c, d – płytki starcze charakterystyczne dla choroby Alzheimera; e, f – ciała Lewy’ego tworzące się na terenie cytoplazmy neuronów u chorych z zespołem Parkinsona; g, h – cytoplazmatyczne sploty neurofibrylarne wykrywane w stwardnieniu zanikowym bocznym (ALS). W detekcji większości agregujących białek wykorzystano odpowiednie przeciwciała, wyjątek stanowią płytki starcze (panel d), które wybarwiono metodą srebrzenia (metoda Hirano).

Tabela 2. Choroby neurodegeneracyjne, których patogeniza jest związana z agregacją nieprawidłowo zwiniętych białek [44,45,49,57,72].

Schorzenie	Patogenne białko tworzące agregaty	Rodzaj/struktura agregatu białkowego
choroba Alzheimera	amyloid $\beta$ ( $A\beta$ peptyd) powstający z APP, hiperfosforylowane białko tau	płytki starcze (zewnątrzkomórkowe agregaty), sploty neurofibrylarne (wewnątrzkomórkowe agregaty)
choroba Parkinsona	$\alpha$ -synukleina	ciała Lewy'ego wykrywane w cytoplazmie neuronów, często blisko jądra
stwardnienie zanikowe boczne (ALS)	cytoplazmatyczna dysmutaza nadadtlenkowa (CuZn SOD)	neurofibryle (tzw. agresomy) ciała Buniny (neurofilamenty), ciała szkliste, agregaty typu SLI (ang. <i>skein-like inclusions</i> )
choroby poliglutaminowe (polyQ):		
choroba Huntingtona	huntingtyna	inkluzyje wewnątrzjądrowe i cytoplazmatyczne
opuszkowo-rdzeniowy zanik mięśni (SBMA)	receptor androgenowy	inkluzyje wewnątrzjądrowe oraz cytoplazmatyczne wykrywane w neuronach
ataksje rdzeniowo-mózdzkowe (SCA)	ataksyny-1-3 (SCA1,2,3), ataksyna-7 (SCA7), podjednostka $\alpha_{1A}$ kanału wapniowego (SCA6), białko TBP (SCA17)	inkluzyje wewnątrzjądrowe
zanik jąder zębatych, gałek białych i ciało podwzgórzowych (DRPLA)	atrofina-1	inkluzyje wewnątrzjądrowe
choroby prionowe:		
pasażowalne encefalopatie gąbczaste: kuru, warianty choroby Creutzfeldta-Jakoba (CJD), choroba Gerstmana-Sträusslera-Scheinkera (GSS), śmiertelna rodzinna bezsenność (FFI, ang. <i>fatal familial insomnia</i> )	białko prionowe PrP (ang. <i>prion protein</i> )	agregaty zarówno zewnątrzkomórkowe, jak i wewnątrzkomórkowe; agregaty mające cechy amyloidu lub inne

nionych genów są białka zawierające wielokrotne powtórzenia reszt glutaminowych, w liczbie 36 lub więcej. Do chorób neurodegeneracyjnych należą także choroby prionowe, zwane pasażowalnymi encefalopatiami gąbczastymi (Tab. 2). Specyficzną i wspólną cechą chorób neurodegeneracyjnych jest występowanie w komórkach nerwowych nierozpuszczalnych agregatów białkowych lub ciał inkluzyjnych [56,58] (Ryc. 5). W zależności od jednostki chorobowej są one zlokalizowane w cytoplazmie lub w jądrze bądź też występują w obydwu przedziałach komórkowych. Agregaty tworzące się w chorobach neurodegeneracyjnych zazwyczaj składają się z włókien zawierających nieprawidłowo zwinięte, czyli patogenne białko o charakterystycznej strukturze  $\beta$  [44]. Konformacje  $\beta$  są wykrywane w białkach polyQ, w amyloidzie  $\beta$ , który jest głównym składnikiem tzw. płytek starczych tworzących się w chorobie Alzheimera. Wymienione choroby neurodegeneracyjne to choroby nieuleczalne, prowadzące do drastycznego pogorszenia się jakości życia pacjentów a często do śmierci. Dokładne poznanie przyczyn neurodegeneracji na poziomie komórki, a także mechanizmów rządzących agregacją i toksycznością zagregowanych białek, występujących w różnych zespołach chorobowych jest niezwykle ważne, ponieważ od ich poznania uzależnione jest leczenie tych chorób.

#### ROLA BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH W HAMOWANIU NEURODEGENERACJI I AGREGACJI PATOGENNYCH BIAŁEK

W hamowaniu neurodegeneracji i agregacji nieprawidłowych białek ważną rolę przypisuje się białkom opiekuńczym, co czyni z nich potencjalny obiekt badań terapeutycznych

[54,59]. O roli białek Hsps w hamowaniu neurodegeneracji może świadczyć ich lokalizacja, m.in. w płytkach starczych, splotach neurofibrylarnych czy agregatach złożonych z białek polyQ. W agregatach tych przede wszystkim zidentyfikowano członków dwóch rodzin białek opiekuńczych Hsp40 i Hsp70. Białka te współpracują ze sobą w komórce. Ponadto u chorych obserwuje się podwyższony poziom syntezy Hsp70. Stwierdzono, że nadprodukcja Hsp70 hamuje neurotoksyczność m.in. amyloidu  $\beta$  i białka tau związanych z chorobą Alzheimera,  $\alpha$ -synukleiny (głównego składnika ciał Lewy'ego), cytoplazmatycznej dysmutazy nadadtlenkowej (CuZn SOD), głównego enzymu antyoksydacyjnego agregującego w ALS oraz tzw. białek polyQ, które łączy się z chorobami Huntingtona, opuszkowo-rdzeniowym zanikiem mięśni oraz ataksjami rdzeniowo-mózdzkowymi [60]. Przypuszcza się, że białka opiekuńcze nie tyle zapobiegają powstawaniu agregatów, ile raczej zmieniają strukturę patogennych białek z nierozpuszczalnej w detergentach na rozpuszczalną, co wiąże się ze spadkiem ich toksyczności. Stwierdzono bowiem, że Hsp70 wraz z Hsp40 indukuje przebudowę konformacji zmutowanego białka huntingtyny, czego efektem jest akumulacja specyficznych rozpuszczalnych fibryli polyQ [60,61]. Białka opiekuńcze mogą tłumić neurotoksyczne działanie białek polyQ czy amyloidu  $\beta$ . Z wiekiem jednak dochodzi do zmniejszenia się liczby funkcjonalnych białek opiekuńczych, co ostatecznie prowadzi do wystąpienia objawów chorobowych. Najnowsze badania dowodzą także, że system Hsp70/40 odgrywa ważną rolę w blokowaniu przyjmowania przez białka polyQ konformacji umożliwiających ich oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi. Możliwe, że ta grupa białek chroni same czynniki transkrypcyjne, zapobiegając zmianie ich

struktury w wyniku bezpośredniego kontaktu ze zmutowanymi białkami powodującymi schorzenia poliglutaminowe [62]. Nadprodukcja Hsp70 i Hsp40 zwiększa również zależną od ubikwityny degradację patogennych białek, takich jak  $\alpha$ -synukleina czy białek polyQ [60].

Na stopień agregacji patogennych białek może wpływać także białko opiekuńcze Hsp104 z rodziny Hsp100. Hsp104 wraz z systemem Hsp70/Hsp40 posiada zdolność odwracania już zaistniałej agregacji białek. Wykazano, że nadprodukcja tego białka w komórkach drożdżowych zmniejsza agregację białek z ekspansją reszt glutaminowych [58]. Omawiane wcześniej białko CHIP (funkcjonujące przede wszystkim jako ligaza ubikwitylowa współpracująca z Hsp70/Hsp90) również może zmniejszać agregację i toksyczność patogennych białek. Stwierdzono bowiem, że białko to w układach modelowych (transfekowane linie komórkowe) zmniejsza agregację zmutowanych białek polyQ oraz zwiększa ich rozpuszczalność [49]. W procesie tym wymagana jest obecność N-końcowej domeny TPR, odpowiedzialnej za oddziaływanie z Hsp70. Przypuszcza się, że zmniejszona agregacja białek polyQ jest wynikiem wzmocnionego refaldowania białek przez Hsp70 a nie ich proteasomalnej degradacji. Uważa się, że białko CHIP jest kluczowym mediatorem systemu kontroli jakości białek w komórkach nerwowych. Dlatego też białko to jest brane pod uwagę jako potencjalny cel terapeutyczny w przypadku chorób neurodegeneracyjnych, wywołanych akumulacją białek z ekspansją reszt glutaminowych. Znany jest także udział CHIP w procesach ubikwitylacji i degradacji białek CFTR czy p53 [63,64]. CHIP może stymulować zarówno refaldowanie, jak i ubikwitylację oraz degradację białek. Co więcej, istnieją doniesienia, które sugerują, że białko CHIP może również pełnić rolę „przełącznika molekularnego” pomiędzy proteasomalnym i lizosomalnym szlakiem degradacji białek [65]. Zatem jego rola w systemie jakości białek zależy przede wszystkim od substratu białkowego.

Ostatnie lata przyniosły znaczne poszerzenie wiedzy na temat molekularnych podstaw rozwoju chorób neurodegeneracyjnych oraz udziału w ich patogenezie procesu agregacji białek. Z dotychczasowych badań przeprowadzonych z wykorzystaniem przede wszystkim zwierzęcych modeli, linii komórkowych i doświadczeń *in vitro* wynika, że agregacja białek jest wieloetapowym procesem kompleksowym, który odzwierciedla zmienność struktury, wielkość i wewnątrzkomórkową lokalizację agregatu białkowego i jest tym, co łączy choroby neurodegeneracyjne. Jednakże opinie dotyczące toksyczności agregatów białkowych, które towarzyszą chorobom neurodegeneracyjnym są kontrowersyjne. Istnieją trzy alternatywne hipotezy opisujące rolę agregacji białek w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych [43,66]. Pierwsza z nich zakłada, że inkluzje białkowe, które powstają w chorobach neurodegeneracyjnych są pośrednio lub bezpośrednio toksyczne dla komórek nerwowych. Według drugiej hipotezy nierozpuszczalne agregaty białkowe powstają w wyniku procesu detoksykacji i pełnią raczej funkcję neuroprotektyną. Zatem odizolowanie patogennego białka w postaci agregatu znosi jego toksyczność. Z kolei ostatnia z hipotez głosi, że inkluzje białkowe mogą korelować z chorobą, ale mają niewielki wpływ na jej rozwój. Biorąc pod uwagę czas ujawnienia się choroby, jej kom-

pleksowość, możliwa jest kombinacja trzech wymienionych hipotez. Pomimo dyskusyjnej roli agregacji białek w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych istnieje silny argument, który potwierdza, że eliminacja zakumulowanych i zagregowanych białek może być skutecznym środkiem w walce z neurodegeneracją [43,66]. Stąd duże zainteresowanie wielu laboratoriów wewnątrzkomórkową degradacją agregatów białkowych i udziałem w niej systemu ubikwityna/proteasom, a przede wszystkim ligaz ubikwitylowych oraz makrofagii, której przypisuje się coraz większą rolę w selektywnym usuwaniu nieprawidłowych neurobiałek, które mogą wywoływać symptomy neurodegeneracji [40,44,67-71]. Duże nadzieje w walce z zaburzeniami neurodegeneracyjnymi wiąże się także z autofagią zależną od białek opiekuńczych. Istnieje hipoteza, że ten rodzaj autofagii może być odpowiedzialny za usuwanie patogennych białek jeszcze przed ich agregacją, oraz że zmniejszająca się aktywność CMA z wiekiem może być jednym z czynników, które sprzyjają rozwojowi neurodegeneracji [41]. Zatem stymulacja, usprawnienie tego procesu może przyczynić się do spowolnienia rozwoju przynajmniej niektórych chorób neurodegeneracyjnych.

## PODSUMOWANIE

Utrzymanie właściwej równowagi pomiędzy procesami faldowania a degradacji nieprawidłowo zwiniętych białek jest krytyczne dla przeżycia komórek. Kluczową rolę w tych procesach odgrywa system kontroli jakości białek, na który składają się białka opiekuńcze i proteazy. Białka opiekuńcze sprawują pieczę nad prawidłowym faldowaniem nowo powstających polipeptydów oraz uczestniczą w przywracaniu prawidłowej struktury zdenaturowanych i zagregowanych białek, przywracając im odpowiednią konformację przestrzenną. Z kolei proteazy są odpowiedzialne za usuwanie trwale uszkodzonych i niefunkcyjnych białek. Zatem sprawny przebieg procesu kontroli jakości białek jest efektem skoordynowanego działania białek opiekuńczych i proteaz komórkowych. Mechanizm molekularny, który decyduje o faldowaniu lub przekazaniu białka do proteolizy jest mało poznany. W przypadku organizmów eukariotycznych rolę integrującą działanie systemów białek opiekuńczych i proteaz (proteasomu 26S) przypisuje się białkom modularnym, jak CHIP czy BAG1. Zachwianie naturalnej homeostazy spowodowane przez mutacje genetyczne, stres czy starzenie się organizmu stanowi dla każdej komórki poważne zagrożenie. Akumulacja źle zwiniętych białek oraz ich agregacja może prowadzić do poważnych schorzeń i chorób neurodegeneracyjnych, takich jak: choroby Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona, stwardnienie zanikowe boczne czy choroby prionowe. Ze względu na istotną rolę białek opiekuńczych w hamowaniu neurodegeneracji i agregacji nieprawidłowych białek, stanowią one ważny obiekt badań terapeutycznych. Wspomniane wcześniej białka modularne, jak CHIP, które mogą pełnić rolę „przełączników molekularnych” w procesach faldowania i degradacji białek także są niezwykle ważne z punktu widzenia medycyny ze względu na możliwość zastosowania ich w terapii chorób neurodegeneracyjnych. Manipulacja mechanizmami degradacji białek, zwłaszcza makrofagią i CMA, również brana jest pod uwagę w strategiach terapeutycznych chorób neurodegeneracyjnych. Być może wkrótce wpływając na aktywność autofagii przy użyciu od-

powiednich modulatorów farmakologicznych będzie można korzystnie wpływać na homeostazę komórek nerwowych i przeciwstawić się nieuleczalnym do tej pory chorobom.

## PIŚMIENNICTWO

- Hartl U (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-580
- Bukau B, Deuerling E, Pfund C, Craig EA (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101: 119-122
- Schröder H, Langer T, Hartl FU, Bukau B (1993) DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J* 12: 4137-4144
- Ziemienowicz A, Skowrya D, Zeilstra-Ryalls J, Fayet O, Georgopoulos C, Żylicz M (1993) Both the *Escherichia coli* chaperones systems, GroEL/GroES and DnaK/DnaJ/GrpE, can reactivate heat-treated RNA polymerase. *J Biol Chem* 268: 25425-25431
- Kędzierska S, Jezierski G, Taylor A (2001) DnaK/DnaJ chaperone system reactivates endogenous *E. coli* thermostable FBP aldolase *in vivo* and *in vitro*; the effect is enhanced by GroE heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 6: 29-37
- Kuczyńska-Wiśnik D, Kędzierska S, Matuszewska E, Lund P, Taylor A, Lipińska B, Laskowska E (2003) The *Escherichia coli* small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured *in vivo* during extreme heat shock. *Microbiology* 148: 1757-1765
- Mogk A, Schlieker C, Friedrich KL, Schönfeld HJ, Vierling E, Bukau B (2003) Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J Biol Chem* 278: 31033-31042
- Mogk A, Deuerling E, Vorderwülbecke S, Vierling E, Bukau B (2003) Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol Microbiol* 50: 585-595
- Laskowska E, Taylor A (1996) Rola proteaz szoku termicznego w usuwaniu zdenaturowanych białek z komórek *E. coli*. *Postepy Biochem* 44: 334-344
- Laskowska E, Kuczyńska-Wiśnik D, Skórko-Glonek J, Taylor A (1996) Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated *in vivo* by heat shock; HtrA protease action *in vivo* and *in vitro*. *Mol Microbiol* 22: 555-571
- Tomoyasu T, Mogk A, Langen H, Goloubinoff P, Bukau B (2001) Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol Microbiol* 40: 397-413
- Horwich AL, Weber-Ban EU, Finley D (1999) Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11033-11040
- Reid BG, Fenton WA, Horwich AL, Weber-Ban EU (2001) ClpA mediates directional translocation of substrate proteins into the ClpP protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3768-3772
- Zolkiewski M (2006) A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases. *Mol Microbiol* 61: 1094-1100
- Lee S, Tsai FTF (2005) Molecular chaperones in protein quality control. *J Biochem Mol Biol* 38: 259-265
- Weibezahn J, Bukau B, Mogk A (2004) Unscrambling an egg: protein disaggregation by AAA<sup>+</sup> proteins. *Microbial Cell Factories* 3: 1-12
- Zolkiewski M (1999) ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. *J Biol Chem* 274: 28083-28086
- Glover JR, Lindquist S (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94: 73-82
- Goloubinoff P, Mogk A, Zvi AP, Tomoyasu T, Bukau B (1999) Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13732-13737
- Schlee S, Beinker P, Akhrymuk A, Reinstejn J (2004) A chaperone network for the resolubilization of protein aggregates: direct interaction of ClpB and DnaK. *J Mol Biol* 336: 275-285
- Tyedmers J, Mogk A, Bukau B (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 777-788
- Kędzierska S (2006) Struktura, funkcja oraz mechanizmy działania ATPaz z rodziny AAA. *Postepy Biochem* 52: 330-338
- Mogk A, Haslberger T, Tessarz P, Bukau B (2008) Common and specific mechanisms of AAA<sup>+</sup> proteins involved in protein quality control. *Biochem Soc Trans* 36: 120-125
- Liberek K, Lewandowska A, Ziętkiewicz S (2008) Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J* 27: 328-335
- Barends TRM, Werbeck ND, Reinstejn J (2010) Disaggregases in 4 dimensions. *Curr Opin Struct Biol* 20: 46-53
- Richter K, Haslbeck M, Buchner J (2010) The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell* 40: 253-266
- 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
- Stetler RA, Gan Y, Zhang W, Liou AK, Gao Y, Cao G, Chen J (2010) Heat shock proteins: cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 92: 184-211
- Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286: 1888-1893
- Ehrnsperger M, Gräber S, Gaestel M, Buchner J (1997) Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J* 16: 221-229
- Veinger L, Diamant S, Buchner J, Goloubinoff P (1998) The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *J Biol Chem* 273: 11032-11037
- Matuszewska E, Kwiatkowska J, Ratajczak E, Kuczyńska-Wiśnik D, Laskowska E (2009) Role of *Escherichia coli* heat shock proteins IbpA and IbpB in protection of alcohol dehydrogenase AdhE against heat inactivation in the presence of oxygen. *Acta Biochim Polon* 56: 55-61
- Laskowska E, Matuszewska E, Kuczyńska-Wiśnik D (2010) Small heat shock proteins and protein-misfolding diseases. *Curr Pharm Biotechnol* 11: 146-157
- Jordan IK, Rogozin IB, Wolf YI, Koonin EV (2002) Essential genes are more evolutionarily conserved than are nonessential genes in bacteria. *Genome Res* 12: 962-968
- Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 258: 8206-8214
- Thower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19: 94-102
- Wolf DH, Hilt W (2004) The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* 1695: 19-31
- Ciechanover A (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6: 79-87
- Rajawat YS, Hilioti Z, Bossis I (2009) Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system. *Ageing Res Rev* 8: 199-213
- Kraft C, Peter M, Hoffman K (2010) Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol* 12: 836-841
- Orestejn SJ, Cuervo AM (2010) Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol* 21: 719-726
- Koga H, Cuervo AM (2010) Chaperone-mediated autophagy dysfunction in the pathogenesis of neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, doi: 10.1016/j.nbd.2010.07.006
- Yamamoto A, Simonsen A (2010) The elimination of accumulated and aggregated proteins: a role for autophagy in neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, doi: 10.1016/j.nbd.2010.08.015
- Yang Z, Klionsky (2010) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 12: 814-822
- Wong P, Houry WA (2003) Chaperone networks in bacteria: analysis of protein homeostasis in minimal cells. *J Struct Biol* 146: 79-89

46. Kessel M, Maurizi MR, Kim B, Kocsis E, Trus BL, Singh SK, Steven AC (1995) Homology in structural organization between *E. coli* ClpAP protease and the eukaryotic 26S proteasome. *J Mol Biol* 250: 587-594
47. Kessel M, Wu W, Gottesman S, Kocsis E, Steven AC, Maurizi MR (1996) Six-fold rotational symmetry of ClpQ, the *E. coli* homolog of the 20S proteasome, and its ATP-dependent activator, ClpY. *FEBS Lett* 398: 274-278
48. Arndt V, Daniel C, Nastainczyk W, Alberti S, Höhfeld J (2005) BAG-2 acts as an inhibitor of the chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP. *Mol Biol Cell* 16: 5891-5900
49. Miller VM, Nelson RF, Gouvion CM, Williams A, Rodriguez-Lebron E, Harper SQ, Davidson BL, Rebagliati MR, Paulson HL (2005) CHIP suppress polyglutamine aggregation and toxicity *in vitro* and *in vivo*. *J Neurosci* 25: 9152-9161
50. Pratt WB, Morishima Y, Peng H-M, Osawa Y (2010) Proposal for a role of the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery in making triage decisions when proteins undergo oxidative and toxic damage. *Exp Biol Med* 235: 278-289
51. McDonough H, Patterson C (2003) CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones* 8: 303-308
52. Dikshit P, Jana NR (2007) The co-chaperone CHIP is induced in various stresses and confers protection to cells. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 761-765
53. Rosser MFN, Washburn E, Muchowski PJ, Patterson C, Cyr DM (2007) Chaperone functions of the E3 ubiquitin ligase CHIP. *J Biol Chem* 282: 22267-22277
54. McClellan AJ, Tam S, Kaganovich D, Frydman J (2005) Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nature Cell Biol* 7: 736-741
55. Esser C, Alberti S, Hohfeld L (2004) Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim Biophys Acta* 1695: 171-188
56. Ross CA, Poirier M (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine* 10 Suppl: S10-S17
57. Takahashi T, Katada S, Onodera O (2010) Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? Where are we going? *J Mol Cell Biol* 2: 180-191
58. Krobitch S, Lindquist S (2000) Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1589-1594
59. Söti C, Nagy E, Giricz Z, Vigh L, Csérmely P, Ferdinandy P (2005) Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 146: 769-780
60. Muchowski PJ, Wacker JL (2005) Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nature Rev Neurosci* 6: 11-22
61. Wacker JL, Zareie MH, Fong H, Sarikaya M, Muchowski PJ (2004) Hsp70 and Hsp40 attenuate formation of spherical and annular polyglutamine oligomers by partitioning monomer. *Nature Struct Mol Biol* 11: 1215-1222
62. Leźnicki P (2005) Agregacja a toksyczność białek z powtórzeniami polylg. *Postępy Biochem* 51: 215-222
63. Meacham GC, Patterson C, Zhang W, Younger JM, Cyr DM (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nature Cell Biol* 3: 100-105
64. Esser C, Scheffer M, Höhfeld J (2005) The chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP is able to target p53 for proteasomal degradation. *J Biol Chem* 280: 27443-27448
65. Shin Y, Klucken J, Patterson C, Hyman BT, McLean PJ (2005) The co-chaperone carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) mediates  $\alpha$ -synuclein degradation decisions between proteasomal and lysosomal pathways. *J Biol Chem* 280: 23727-23734
66. Dohm CP, Kermer P, Bähr (2008) Aggregopathy in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic implication. *Neurodegener Dis* 5: 321-338
67. Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC (2002) Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 11: 1107-1117
68. Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC (2003)  $\alpha$ -synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem* 278: 25009-25013
69. Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Naslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA (2005) Macroautophagy - a novel  $\beta$ -amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171: 87-98
70. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata I, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441: 880-884
71. Hara T, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441: 885-889
72. Bąk D, Milewski M (2005) Choroby związane z agregacją białek. *Postępy Biochem* 51: 297-307
73. Noble EG, Milne KJ, Melling CWJ (2008) Heat shock proteins and exercise: a primer. *Appl Physiol Nutr Metab* 33: 1050-1065
74. Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra RK, Chowdhuri DK (2010) Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sci* 86: 377-384
75. Tensor SJ, Scott C, Boumaza I, Liss TR, Brodsky JL, Vierling E (2008) Heat shock protein 101 effects in *A. thaliana*: genetic variation, fitness and pleiotropy in controlled temperature conditions. *Mol Ecol* 17: 1614-1626

## Cytosolic protein quality control system – the role of molecular chaperones in the biology of neurodegenerative diseases

Izabela Guenther, Sabina Kędzierska-Mieszkowska<sup>✉</sup>

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

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

**Key words:** autophagy, BAG1, CHIP, Clp ATPases, molecular chaperones, protein folding, proteases

### ABSTRACT

In this article we describe the role of molecular chaperones and cellular proteases in the cytosolic protein quality control system that controls and regulates in all living organisms folding status of proteins and their proper function. Thanks to cooperative action of molecular chaperones and proteases the accumulation of misfolded proteins in the cytosol is limited. In particular, the links between chaperones to protein degradation and the role of molecular chaperones in the biology of neurodegenerative diseases are discussed.



# Patogeneza molekularna choroby Charcot-Marie-Tooth 2

## STRESZCZENIE

Choroba Charcot-Marie-Tooth 2 (CMT2) jest dziedziczną neuropatią aksonalną ruchowo-czuciową. Jest niezwykle heterogenna pod względem klinicznym oraz genetycznym. Do tej pory wyodrębniono 15 podtypów tej choroby, znanych jest 14 loci i 13 genów odpowiedzialnych za rozwój CMT2. Poznanie mechanizmów patogenezy molekularnej jest kluczowe dla opracowania terapii osób chorych, jednak różnorodność zaangażowanych w rozwój choroby białek znacznie to utrudnia. W patogenezę molekularną CMT2 zaangażowane są między innymi białka zewnętrznej błony mitochondrialnej o przeciwstawnych funkcjach (mitofuzyna 2 i GDA1) odpowiedzialne za fuzję i podział sieci mitochondrialnej. Ważną rolę w patogenezie CMT2 odgrywają mutacje w genach, kodujących syntetazy tRNA, białko cytoskieletu komórki nerwowej, białka tworzącego kanał jonowy oraz białka opiekuńcze. Praca jest podsumowaniem dotychczasowej wiedzy na temat choroby CMT2 w kontekście patogenezy molekularnej.

## WPROWADZENIE

Pomimo znacznego rozwoju badań nad podłożem molekularnym wielu chorób genetycznie uwarunkowanych, jaki obserwujemy w ostatnich latach, w większości z nich nie można mówić o przełomie terapeutycznym. Nadzieję na rozpoczęcie terapii eksperymentalnych w wielu chorobach dziedzicznych stwarzają badania nad ich patogenezą molekularną. Dziedziczne neuropatie ruchowo-czuciowe (HMSN) wydają się być dobrym przykładem zaawansowanych badań nad patogenezą molekularną, w grupie chorób, w których jak dotąd nie opracowano żadnego modelu terapii eksperymentalnej. Istotą dziedzicznych neuropatii ruchowo-czuciowych, nazywanych również zwyczajowo chorobami kręgu Charcot-Marie-Tooth (CMT), jest powoli postępujący zanik mięśni odśiebnych<sup>1</sup> kończyn dolnych i górnych. W niektórych formach CMT zanik mięśni nie ogranicza się do mięśni odśiebnych, lecz rozszerza się na mięśnie dosiebne, czego skutkiem jest unieruchomienie chorych na wózku inwalidzkim. Zanikowi mięśni obserwowanemu w HMSN towarzyszą dodatkowo zaburzenia czucia, które w skrajnych przypadkach prowadzą do masywnych, niepodatnych na żadne leczenie, owrzodzeń zlokalizowanych głównie w kończynach dolnych, kończących się zwykle amputacją części kończyny [1]. W niektórych przypadkach HMSN, oprócz zaniku mięśni i zaburzeń czucia, występują objawy dodatkowe, takie jak chrypka (porażenie nerwu krtaniowego wstecznego), skrzywienie boczne kręgosłupa (zanik mięśni przykręgosłupowych), niedosłuch (uszkodzenie nerwu słuchowego) i zaburzenia wegetatywne (uszkodzenie autonomicznego układu nerwowego) [2]. Od wielu lat wiadomo, że neuropatie dziedziczne mogą rozpoczynać się od uszkodzenia osłonki mielinowej (CMT1 – typ demielinizacyjny) albo od uszkodzenia aksonu (CMT2 – typ aksonalny o dziedziczeniu autosomalnym dominującym i CMT4C – typ aksonalny o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym). W ostatnich latach dokonano bardzo znaczących odkryć w badaniach nad biologią neuropatii dziedzicznych. W pracy prezentujemy obecny stan wiedzy na temat podłoża molekularnego choroby Charcot-Marie-Tooth typu 2 oraz typu 4C, uwzględniając dotychczas zidentyfikowane geny (Ryc. 1).

## FORMY AKSONALNE CHORÓB KRĘGU CHARCOT-MARIE-TOOTH O DZIEDZICZENIU AUTOSOMALNYM DOMINUJĄCYM

### CHOROBA CMT2A

Większość przypadków choroby CMT2A rozpoczyna się w pierwszej dekadzie życia. Przebieg choroby może być postępujący bądź stacjonarny. W niektórych przypadkach zanik mięśni jest tak duży, że prowadzi do unieruchomienia chorych na wózku inwalidzkim. U niektórych chorych z CMT2A obserwuje się

<sup>1</sup>Mięśnie dystalne – termin oznacza mięśnie podudzi, przedramion, drobne mięśnie dłoni i stóp.

Katarzyna Kotruchow<sup>1,✉</sup>

Dagmara Kabzińska<sup>1</sup>

Kamila Karpińska<sup>1</sup>

Andrzej Kochoński<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zespół chorób nerwowo-mięśniowych Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, Warszawa  
<sup>2</sup>Wydział Biologii i Nauk o Środowisku Uniwersytetu Kardynała Stefana Wyszyńskiego, Warszawa

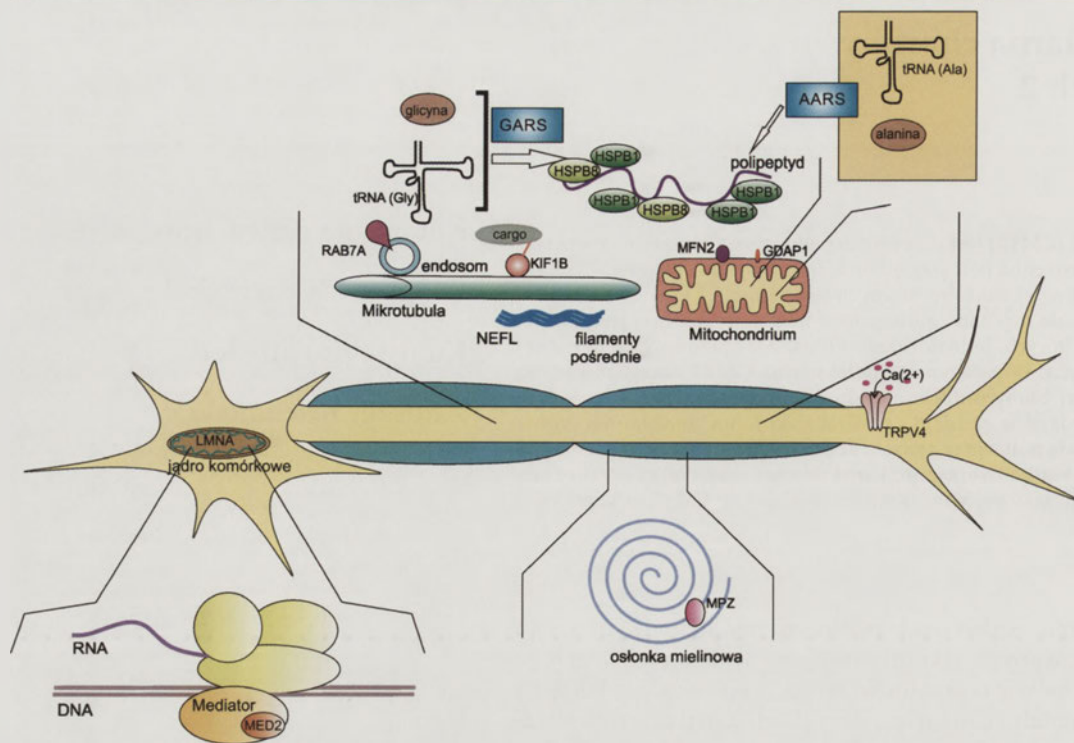
<sup>✉</sup>Zespół chorób nerwowo-mięśniowych Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa; e-mail: k.kotruchow@gmail.com

Artykuł otrzymano 6 grudnia 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 27 stycznia 2011 r.

**Słowa kluczowe:** dziedziczna neuropatia aksonalna, patogeneza molekularna, mutacja

**Wykaz skrotów:** CMT2 – Choroba Charcot-Marie-Tooth typu 2; dHMN – ang. *distal hereditary motor neuropathy*; HMSN – ang. *hereditary motor and sensory neuropathy*; MFN2 – mitofuzyna 2

**Podziękowania:** Pracę tę dedykujemy chorym i ich rodzinom, jednocześnie dziękując za wieloletnią współpracę. Serdecznie dziękujemy Pani Profesor Ewie Bartnik za cenne uwagi w trakcie pracy nad manuskryptem.



Rycina 1. Schemat przedstawiający lokalizację i funkcję białek, których mutacje są zaangażowane w mechanizmy patogenezы molekularnej choroby Charcot-Marie-Tooth 2. GARS – tRNA syntetaza glicyny; AARS – tRNA syntetaza alaniny; HSPB1 i HSPB8 – białka szoku cieplnego; RAB7A – ang. *Ras-related protein Rab-7a*; KIF1B – kinezyzna; NEFL – lekki łańcuch filamentów pośrednich; MFN2 – mitofuzyna 2; GDAP1 – ang. *ganglioside-induced differentiation-associated protein 1*; TRPV4 – kanał kationowy; LMNA – lamina; MPZ – ang. *myelin protein P0*; MED25 – białko zaangażowane w transkrypcję, połączone z kompleksem polimerazy RNA II.

również zanik nerwu wzrokowego (HMSN VI) [3] oraz neuropatię z objawami piramidowymi (HMSN V) [4] Czasami dochodzi także do utraty słuchu [5] oraz zmian w istocie białej mózgu [6].

Choroba CMT2A stanowi 20% przypadków CMT2 [7]. CMT2A zmapowano w *locus* 1p36.2 [8]. Wczesniejsze doniesienia mówią o mutacji w genie *KIF1B*, jako o odpowiadającej za chorobę [9]. Produkt tego genu należy do rodziny białek motorycznych – kinezyn, odpowiadających za transport aksonalny wzdłuż mikrotubul w aksonie komórki nerwowej (Ryc. 1). Mimo że gen *KIF1B* jest dobrym kandydatem, którego uszkodzenia mogłyby powodować neuropatię i *locus* w chromosomie odpowiada zidentyfikowanemu dla postaci choroby CMT2A, to znaleziono tylko jedną mutację u chorych na CMT2A w jednej rodzinie japońskiej [9]. Do dzisiaj nie udostępniono materiału DNA w celu wykluczenia istnienia innych mutacji u opisywanych pacjentów. W pozostałych rodzinach poddawanych badaniom genetycznym nie zidentyfikowano mutacji w tym genie, jednak analizy sprzężeń wskazywały na to samo *locus* w chromosomie 1 [8].

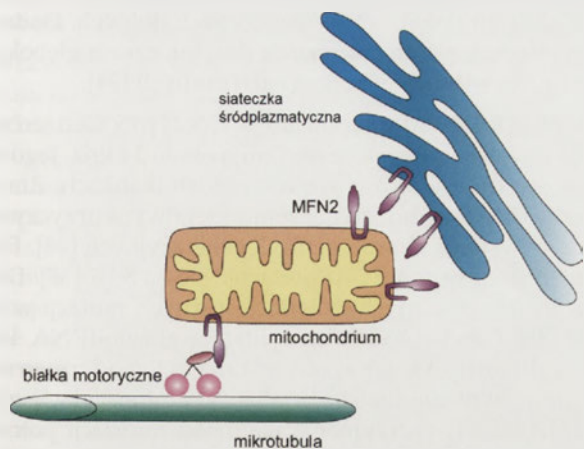
Grupa Züchnera do swoich badań wykorzystała próbki DNA siedmiu rodzin o różnym pochodzeniu etnicznym z klinicznie rozpoznaną chorobą CMT2 i przeprowadziła analizę sprzężeń genetycznych. Badanie genetyczne wskazało znane już *locus* kojarzone z CMT2A, w którym znajduje się gen *KIF1B*. Sekwencjonowanie obu izoform  $\alpha$  i  $\beta$  nie przyniosło rezultatów w postaci mutacji, jedynie niepatogen-

nych polimorfizmów. W związku z tym Züchner przebadał 14 innych genów, znajdujących się w regionie 1p36.2 i wykluczył występowanie w nich mutacji wśród badanych pacjentów. Natomiast wszyscy chorzy z grupy badanej posiadali mutacje zmiany sensu w genie, kodującym mitofuzynę 2 (MFN2). Badania te zajęły wiele lat i doprowadziły do identyfikacji genu, w którym mutacje są odpowiedzialne za najczęściej występującą formę CMT2 [8].

Białko MFN2 zlokalizowane jest w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i odpowiada za łączenie się mitochondriów, czyli tworzenie tzw. sieci mitochondrialnej w komórce (Ryc. 1) [10]. Kluczową dla tego procesu jest domena N-końcowa o aktywności GTPazy, ponieważ to

hydroliza GTP jest niezbędna do łączenia się organelli. W tym regionie zidentyfikowano największą liczbę mutacji patogennych. Dodatkowo hydrofobowa domena C-końcowa (HR2) również odgrywa ważną rolę w fuzji mitochondriów, łącząc się z domeną HR mitofuzyny 1 lub 2 drugiego organellum. Dwie domeny transbłonowe (TM, ang. *transmembrane*) zakotwiczą białko w zewnętrznej błonie mitochondrialnej [10]. Dodatkowo mitofuzyna 2 oprócz regulowania morfologii mitochondriów, reguluje także morfologię siateczki śródplazmatycznej (ER). Przy braku mitofuzyny 2 stwierdzono pęcznienie i agregację siateczki. Białko MFN2 stanowi swoisty łącznik między mitochondrium i ER. W miejscach kontaktu tych organelli zaobserwowano zwiększony poziom białka MFN2 w ich błonach. Zmiany w genie *MFN2* zaburzają kontakt między mitochondrium a siateczką śródplazmatyczną, a tym samym zaburzają pobieranie jonów wapnia przez mitochondrium. Wpływa to negatywnie na ścieżkę przekazywania sygnału przy pomocy  $Ca^{2+}$  [11]. Mitofuzyna 2 jest również konieczna do transportu mitochondriów wzdłuż aksonów, dzięki połączeniom mitofuzyny 2 zakotwiczonej w zewnętrznej błonie mitochondrium z białkami motorycznymi (Ryc. 2) [12].

Gen *MFN2* ulega ekspresji we wszystkich tkankach, jednak w sercu, mięśniach szkieletowych i mózgu wykryto najwyższy poziom mRNA dla mitofuzyny 2 [13]. Do tej pory zidentyfikowano 59 różnych mutacji patogennych, wśród osób chorych na CMT2A, z których przeważająca część przypadków jest o dziedziczeniu autosomalnym dominują-



**Rycina 2.** Rola białka mitofuzyny 2 (MFN2) w komórce nerwowej – transport aksonalny mitochondriów dzięki połączeniu MFN2 z białkami motorycznymi i transportowi wzdłuż mikrotubul, utrzymanie morfologii mitochondrium i siateczki śródplazmatycznej oraz ich kontaktu.

cym [10]. Stwierdzono, że dynamika sieci mitochondrialnej może być istotna dla proliferacji komórek, procesu apoptozy, przekazywania sygnałów i regulacji procesów metabolicznych związanych strukturalnie z błoną mitochondriów. Zaburzona dynamika sieci mitochondrialnej może powodować nieprawidłową dystrybucję mitochondriów w aksonach, co prowadzi do nieefektywnego metabolizmu energetycznego. Postuluje się, że w następstwie wymienianych zjawisk może dochodzić do degeneracji aksonów, która jest bezpośrednią przyczyną neuropatii aksonalnych [14].

#### CHOROBA CMT2B

Choroba Charcot-Marie-Tooth typu 2B rozpoczyna się najczęściej w drugiej dekadzie życia i charakteryzuje się autosomalnym dominującym sposobem dziedziczenia. Pierwszym objawem u chorych są trudności w poruszaniu się. Dochodzi do osłabienia i zaniku odsiebnych mięśni kończyn dolnych. Przebieg choroby może być zarówno lekki, jak i ciężki z utratą czucia, prowadzącą do owrzodzeń, nawracających zakażeń i amputacji kończyn [15]. Stwierdzono, że za rozwój neuropatii CMT2B są odpowiedzialne mutacje w genie kodującym białko Rab7A, szczególnie w zachowanych w ewolucji domenach wiążących i hydrolizujących GTP [15-17]. Do tej pory zidentyfikowano 4 mutacje zmiany sensu w genie *RAB7A* (3q13-q22) [15,18,19].

Białko Rab7A pełni ważną rolę w kontroli transportu struktur obłonionych w komórce (Ryc. 1). Dzięki cyklicznej wymianie GTP na GDP oraz zaangażowaniu białek motorycznych, białka Rab pośredniczą w transporcie pęcherzykowym wzdłuż cytoszkieletu oraz w wiązaniu i zakotwiczeniu pęcherzyków w docelowych błonach w komórce [20]. Białko Rab7A zlokalizowane jest w błonach późnych endosomów oraz w błonach lizosomalnych i fagosomach. Do rekrutacji białek motorycznych, kompleksu dyneina-dynaktyna, do białka Rab7A, konieczne jest białko efektorowe RILP (ang. *Rab7-interacting lysosomal protein*). Białko RILP wiąże się z rejonem C-końcowym białka Rab7A związanego z GTP. Cały kompleks umożliwia transport pęcherzyków w kierunku końca (-) mikrotubul [20-22].

W komórkach nerwowych centralnego układu nerwowego białko Rab7A jest zaangażowane we wsteczny transport aksonalny receptorów neurotrofin [23]. Dodatkowo cząstka efektorowa RILP jest konieczna do uformowania ciałek wielopęcherzykowych zaangażowanych w degradację receptorów neurotrofin [24]. Zależność ta potwierdza hipotezę, że choroba CMT2B może być powodowana przez zaburzenia w transporcie receptorów dla neurotrofin, jako konsekwencji mutacji w genie *RAB7A* [17]. Mutacje w genie, kodującym białko Rab7A, dotyczą przede wszystkim domen uczestniczących w formowaniu miejsca wiążącego nukleotydy. Zmiany te powodują zaburzenia w dysocjacji i hydrolizie GTP, akumulację białka ze związanym GTP w komórce oraz obniżenie powinowactwa do GDP [17]. Zaburzenia w funkcjonowaniu białka Rab7A, a zatem i transportu endosomów, mogą powodować zahamowanie wzrostu neuronu lub wpływać na promocję apoptozy [25].

W chorobie CMT2B uszkodzeniu ulegają, oprócz neuronów ruchowych, również neurony czuciowe. Neurony czuciowe mają wyjątkowo długie aksony, a zachodząca tylko na ich wierzchołku endocytoza wymusza transport cząsteczek sygnałowych oraz pęcherzyków endocytarnych na dość długie odległości, do ciała komórki nerwowej. Subtelne zaburzenia w takim transporcie są szkodliwe dla neuronu czuciowego, ale mogą być niezauważalne w innych typach komórek. Jest to między innymi powód, dla którego mutacje w genie ulegającym ekspresji w różnych tkankach, wywołują tak poważne zaburzenia w obwodowych komórkach nerwowych, gdzie transport pęcherzykowy musi być ściśle kontrolowany, a w innych komórkach efekt ich jest niezauważalny [17,25].

#### CHOROBA CMT2C

Choroba Charcot-Marie-Tooth typu 2C, będąca dziedziczną neuropatią ruchowo-czuciową (HMSN IIC, ang. *hereditary motor and sensory neuropathy type IIC*) jest rzadko występującą formą tego schorzenia. Pierwsze objawy zazwyczaj pojawiają się w drugiej dekadzie życia, jednak znane są przypadki zachorowań od pierwszej do trzeciej dekady. Choroba CMT2C dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący i mutacje powodujące tę formę charakteryzuje wysoka penetracja. Do tej pory opisano 7 rodzin dotkniętych chorobą CMT2C [26-30]. Niektórymi objawami CMT2C jest postępujące słabnięcie mięśni odsiebnych kończyn, mięśni przepony i krtani, zaburzenia czucia oraz zanik odruchów głębokich.

Analiza sprzężeń genetycznych przeprowadzona przez grupę Landouré w 2010 roku wykazała, że gen odpowiadający za powstawanie choroby zlokalizowany jest w locus 12q24.1. W rejonie tym poznano sekwencje wszystkich występujących tam genów i zidentyfikowano gen *TRPV4* odpowiedzialny za chorobę CMT2C [30]. Białko TRPV4 (ang. *transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4*) należy do nadrodziny białek TRP kanałów kationowych (Ryc. 1). Gen *TRPV4* ulega ekspresji na niskim poziomie w komórkach nerwowych. Białko TRPV4 jest nie-selektywnym kanałem kationowym indukowanym przez bodźce środowiskowe, jak temperatura, środowisko hipoto-

niczne komórki i związki chemiczne, np. pochodne forbolu i kwasu arachidonowego. Stwierdzono, za pomocą badań w oocytach *Xenopus*, że w komórkach ze zmutowanymi białkami, po poddaniu ich działaniu czynników środowiskowych, aktywność kanałów była wyższa w porównaniu do białek niezmiennych. Taki efekt okazał się być toksyczny dla komórki z powodu podwyższonego napływu jonów wapnia do cytoplazmy [30]. Wapń odgrywa dużą rolę, jako cząsteczka sygnałowa w neuronach, reguluje ich wzrost, synaptogenezę, plastyczność i przekazywanie synaptyczne, dlatego zbyt duże stężenia  $Ca^{2+}$  były już wcześniej kojarzone z neurodegeneracją [31].

Struktura białka TRPV4 jest domenowa, składa się z 6 domen transbłonowych, tworzących por jonowy między piątą, a szóstą domeną transbłonową oraz z wewnątrzkomórkowych domen N-końcowej, zawierającej 6 powtórzeń ankirynowych i C-końcowej. Powtórzenia ankirynowe biorą udział w oligomeryzacji, włączaniu do błony cytoplazmatycznej i w oddziaływaniach z innymi białkami. Mutacje w kodonie Arg269 nie występują w regionie, który bezpośrednio uczestniczy w interakcjach z białkami, jednak łańcuch boczny argininy jest eksponowany w miejscu łączenia się z innymi peptydami, stąd postulat, że może być kluczowy dla prawidłowego funkcjonowania kanału, jednak nie narusza jego struktury i fałdowania [32].

#### CHOROBA CMT2D

Choroba Charcot-Marie-Tooth typu 2D jest neuropatią aksonalną ruchowo-czuciową typu drugiego, która dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący. Powodowana jest przez mutacje w genie *GARS*, który koduje syntetazę glicylo-tRNA [33]. Po raz pierwszy została opisana w 1996 roku przez Ionasescu i wsp., w dużej rodzinie z Ameryki Północnej, której członkowie chorowali na neuropatię obwodową kończyn górnych [34]. Mutacje w genie *GARS* mogą powodować także dziedziczne neuropatie ruchowe typu 5 (dHMN, HMN5a) oraz dSMA [35].

Istnienie formy dHMN/dSMA/CMT2D nie sprowadza się wyłącznie do różnorodności nazewnictwa wynikającej z nomenklatury wypracowanej przez różne „szkoły”. W niektórych rodzinach (dHMN/dSMA) opisuje się wyłącznie deficyt neurologiczny wynikający z uszkodzenia włókien ruchowych nerwów obwodowych. W innych rodzinach oprócz przeważającego znacznie uszkodzenia włókien ruchowych nerwów obserwuje się dyskretne zaburzenia neurologiczne wynikające z uszkodzenia włókien czuciowych. W tym przypadku uprawnione staje się używanie nazwy CMT2D. Wreszcie opisano w literaturze fachowej rodziny, w których u części chorych występuje forma dHMN, podczas gdy inni chorzy członkowie tej samej rodziny mają dodatkowo zaburzenia czucia (CMT2D). W takich rodzinach uprawnione jest używanie skrótu dHMN/dSMA/CMT2D, gdzie dSMA oznacza dystalną formę rdzeniowego zaniku mięśni [36].

Początek choroby CMT2D przejawia się osłabieniem mięśni dłoni, pojawiającym się pomiędzy 16 a 30 rokiem życia [34,37]. Poza tym dochodzi do zaniku odsiebnych mięśni rąk oraz niewielkiego osłabienia mięśni nóg. CMT2D

cechuje zanik głębokich odruchów ścięgniętych w kończynach górnych i obniżenie w kończynach dolnych. Dodatkowo występują zaburzenia czucia dotyku, czucia głębokiego oraz czucia wibracji w kończynach górnych [34].

Gen *GARS* został zmapowany w *locus* 7p15. Gen ten składa się z 17 eksonów, które obejmują około 14 kpz. Jego ekspresja jest obserwowana we wszystkich tkankach. Zmiany w genie *GARS* w mózgu i rdzeniu kręgowym przyczyniają się do powstania chorób neurodegeneracyjnych [34]. Penetrację mutacji w genie *GARS* szacuje się na 80% [37]. Do tej pory zostało opisanych jedenaście różnych mutacji w tym genie [35]. Gen *GARS* koduje syntetazę glicylo-tRNA, która należy do drugiej klasy syntetaz. Enzym ten odgrywa ważną rolę w syntezie białka, katalizując aminoacylację glicylo-tRNA [38]. Do utrzymania wierności translacji potrzeba odpowiedniego rozpoznania przez enzym zarówno rodzaju tRNA jak i danego aminokwasu [37]. Funkcjonalny holoenzym występuje jako homodimer. Białko składa się z trzech domen: katalicznego rdzenia odpowiedzialnego za ligację aminokwasu z odpowiednim tRNA, C-terminalnej domeny rozpoznającej antykodon oraz z domeny WHEP-TRS, która odpowiedzialna jest za połączenie z innymi syntetazami aminoacylo-tRNA w kompleksach enzymatycznych [34,39].

Badania nad innymi rodzajami syntetaz tRNA (syntetaza tryptofanylo-tRNA oraz syntetaza glutaminylo-tRNA) wykazały, że aktywność cytoplazmatycznych syntetaz tRNA jest niezbędna w rozwoju aksonów, natomiast aktywność mitochondrialnych syntetaz tRNA odgrywa większą rolę w funkcjonowaniu dojrzałych dendrytów [40]. Syntetaza glicylo-tRNA jest transportowana w powstających aksonach i związana jest z ich normalnym wzrostem. Natomiast mutacje, skutkujące powstawaniem uszkodzonych białek powodują ich wadliwe rozmieszczenie. Defekt ten może być związany ze zmianą w powierzchniach oddziaływania podjednostek dimeru [41].

Mechanizm, według którego mutacje w genie powszechnie ulegającym ekspresji prowadzą do wysoce specyficznego fenotypu, wymaga dodatkowych badań. Obecnie przyjmuje się kilka hipotez. Dwie z nich sugerują, że molekularny mechanizm patogenetyczny wynika ze zmniejszonej aktywności enzymu. Zakłada się powstawanie fenotypu wskutek zmniejszonej wydajności translacji, z uwagi na zaburzenia włączania reszty glicyny do nowo powstającego polipeptydu. W większości komórek defekt ten może nie mieć negatywnych skutków. Jednak komórki nerwowe z długimi aksonami mogą być szczególnie wrażliwe na redukcję prawidłowych produktów białkowych, docierających do końca aksonu. [34]. Pomimo iż aminoacylacja jest jedyną znaną funkcją *GARS*, wykazano bardzo wiele, nie związanych bezpośrednio z aminoacylacją funkcji, takich jak zaangażowanie w splicing, apoptozę, transkrypcję i związanie białek dla innych syntetaz aminoacylo-tRNA. Dlatego możliwe jest, że choroba nie powstaje w wyniku defektów translacji, ale jest skutkiem zaburzeń w innych, nieznanych funkcjach *GARS* [38,42]. Badania prowadzone przez Achilli i wsp. wykazały, że większość opisanych u ludzi mutacji w genie *GARS*, wpływa na połączenia dimerów glicylo-tRNA syntetazy, czasem poprzez słabe oddziaływania, co skutkuje wzrostem lub spadkiem intensywności procesu dimery-

zacji [42]. Jednakże nadal niewyjaśnione pozostaje, jaki ma to związek z patogenezą choroby.

Wszystkie opisane dotychczas mutacje w GARS są dominujące, co sugeruje, że fenotyp powstaje albo z dominujących mutacji uzyskania funkcji albo z niewystarczającej ilości produktu białkowego spowodowanej obecnością tylko jednej funkcjonalnej kopii genu (ang. *haploinsufficiency*). Badania przeprowadzane na myszach i muszce owocowej wykazały, że obie hipotezy są prawdopodobne [40,41]. Dodatkowo sugeruje się, że fenotyp CMT2D powstaje przez mutacje utraty funkcji, takie jak utrata aktywności enzymu. Może to bezpośrednio wpływać na translację, która jest istotna dla funkcjonowania aksonów, plastyczności synaptycznej, migracji i polarności komórek oraz innych funkcji związanych z funkcjonowaniem układu nerwowego [42].

## CHOROBA CMT2E

W 2000 roku po raz pierwszy zidentyfikowano i opisano postać choroby CMT2E. Zmapowano *locus* tej choroby w regionie 8p21, a następnie zidentyfikowano gen, odpowiedzialny za tę chorobę. Początek choroby CMT2E następuje między drugą a trzecią dekadą życia, jednak występowały także przypadki zachorowań już w pierwszych dziesięciu latach życia. Pierwsze objawy CMT2E to trudności w chodzeniu, osłabienie i zanik mięśni kończyn dolnych, deformacje stóp. Dodatkowo u niektórych pojawiają się zaniki mięśni kończyn górnych, skutkujące powstaniem tzw. szponiastych rąk, zaburzenia czucia, zaburzenia zmysłu równowagi, obniżenie poziomu odruchów, opadanie powiek, zmiany dermatologiczne [43-45].

We wszystkich opisanych rodzinach z CMT2E stwierdzono mutacje w genie *NEFL*. Zmiany w *NEFL* są także odpowiedzialne za demielinizacyjną formę choroby Charcot-Marie-Tooth (CMT1F) oraz postać mieszaną aksonalno-demielinizacyjną. Gen *NEFL* koduje łańcuch lekki neurofilamentu i jest jednym z kluczowych składników cytoszkieletu komórki nerwowej (Ryc. 1). Neurofilamenty są filamentami pośrednimi, których średnica wynosi 10-12 nm czyli jest mniejsza od średnicy mikrotubul (około 25 nm), a większa od średnicy mikrofilamentów (7-10 nm). Neurofilamenty składają się z trzech białek, z łańcucha lekkiego (NF-L) o masie 68 kDa, łańcucha o średniej masie (NF-M) 145 kDa oraz łańcucha ciężkiego (NF-H) o masie 200 kDa. Każdy z nich ma trójdziałną budowę. Wyróżnia się  $\alpha$ -helikalną domenę centralną, liczącą około 300 reszt aminokwasowych, zachowaną w ewolucji domenę N-końcową, tzw. *head domain* oraz domenę C-końcową, tzw. *tail domain*. Podjednostki neurofilamentu syntetyzowane są w perikarionie i stamtąd transportowane w aksonach, wzdłuż mikrotubul, przez białka motoryczne, kinezy i dyneiny [46]. Tworzenie sieci filamentów w neuronach jest ściśle związane ze wzrostem średnicy aksonu podczas mielinizacji, a więc determinuje szybkość przewodzenia w nerwach obwodowych [47]. Stwierdzono, że białka neurofilamentów są fosforylowane w domenach N-końcowych i prawdopodobnie jest to mechanizm regulujący łączenie się podjednostek filamentów pośrednich. Fosforylacja domen N-końcowych przez kinazy białkowe A, C i N zachodzi w kilku odosobnionych miejscach w NFL i NFM, zapobiegając łączeniu się w neu-

rofilamenty lub rozdzielając je [48]. Natomiast domena centralna typu coiled-coil jest odpowiedzialna za formowanie dimerów, co jest jednym z kroków doprowadzających do utworzenia się filamentów [49].

Przeprowadzono szereg badań w hodowlach komórkowych z wykorzystaniem białek NF-L z niektórymi mutacjami uznanymi za przyczyniające się do rozwoju choroby CMT2E. Stwierdzono, że mutacje w genie *NEFL* powodują zaburzenia w łączeniu się poszczególnych łańcuchów w neurofilamenty, w ich transporcie, jak również w transporcie mitochondriów i innych organelli i białek podlegających transportowi aksonalnemu, zarówno w kierunku synapsy, jak i transportu wstecznego, powodują także agregację NF-L, co zaburza powstawanie całej sieci neurofilamentów. Opisane zjawiska są prawdopodobnie mechanizmem powodującym powstawanie choroby CMT2E [48,50]. Przypuszcza się, że niektóre zmiany w genie *NEFL* mogą być modyfikatorami fenotypu CMT2E. Badania funkcjonalne mutacji Ile214Met wykazały, że komórki z mutacją Ile214Met w genie *NEFL* wykazywały tendencję do tworzenia zbitych struktur filamentów [51]. Przykładem mutacji zbadanych szczegółowo są mutacje Pro22 (Pro22Ser i Pro22Thr). Mutacje te powodują, że zależna od cykliny kinaza 5 (Cdk5) i kinaza regulowana zewnętrznym sygnałem (ERK2) nie fosforylują reszty treoniny 21, co hamuje łączenie filamentów. Wyniki sugerują, że mutacje reszty Pro22, powodujące CMT indukują powstawanie nieprawidłowych agregatów filamentów, poprzez zaburzenie powstawania prawidłowych oligomerów. Powstawanie agregatów jest utrudnione dzięki fosforylacji przez białkową kinazę A (PKA), która staje się dobrym kandydatem dla celów terapeutycznych [49].

## CHOROBA CMT2F

U 6-pokoleniowej rodziny z Rosji stwierdzono chorobę Charcot-Marie-Tooth typu 2 o dziedziczeniu autosomalnym dominującym. Na podstawie analizy genetycznej wyłoniono nową postać choroby – neuropatię ruchową CMT2F, zmapowaną w *locus* 7q11-q21. Zbadano 14 pacjentów. Wszyscy mieli podobny fenotyp kliniczny. Objawy ujawniały się między 15. a 25. rokiem życia. Chorzy wykazywali symetryczne osłabienie w mięśniach kończyn dolnych, zanik odsiebnych mięśni nóg, opadanie stóp i charakterystyczny chód. Zanik drobnych mięśni dłoni doprowadza do powstawania po upływie kilku lat zniekształceń, tzw. szponiastych rąk. We wczesnym stadium choroby obserwowano obniżone odruchy głębokie, a nawet ich zanik. U wszystkich pacjentów stwierdzono zaburzenia czucia bólu i temperatury zarówno w dłoniach, jak i stopach. U starszych pacjentów obserwowano drżenie rąk i nóg. Zmiany troficzne<sup>2</sup> są stałym elementem obrazu klinicznego w tych przypadkach. Postęp choroby jest bardzo powolny, brak sprawności następuje po 15-20 latach [52].

Dodatkowo zbadano *locus* 7q11-q21 za pomocą markerów molekularnych i odnaleziono mutację zmiany sensu c.404C>T (Ser135Phe), segregującą z chorobą, w genie *HSPB1*, kodującym białko szoku cieplnego (HSPB1). Zmianę Ser135Phe znaleziono także w innych rodzinach, w któ-

<sup>2</sup>Zmiany o charakterze owrzodzeń zlokalizowanych w dystalnej części kończyn.

rych stwierdzono chorobę Charcot-Marie-Tooth 2. Zidentyfikowano także cztery inne mutacje zmiany sensu w genie *HSPB1* [53]. Cztery z pięciu zidentyfikowanych zmian w sekwencji, znajdują się w domenie Hsp20- $\alpha$ -krystaliny, która jest domeną niezmienną ewolucyjnie wśród wszystkich białek szoku cieplnego człowieka. Są to Arg127Trp, Ser135Phe, Arg136Trp i Thr151Ile. Piąta zmiana Pro182Leu znajduje się w zmiennym ogonie C-końcowym białka HSPB1. Mutacje w genie *HSPB1* dziedziczą się w sposób autosomalny dominujący.

Białko HSPB1 należy do rodziny białek szoku cieplnego (Ryc. 1). Składa się z domeny WDPF w rejonie N-końcowym, domeny  $\alpha$ -krystaliny oraz części C-końcowej. Ekspresja genu *HSPB1* jest indukowana w odpowiedzi na czynniki stresowe środowiska. Białko HSPB1 jest białkiem opiekuńczym, odpowiada zatem za ochronę komórki przed stresem, blokadę sygnałów proapoptotycznych, za ruchliwość komórki oraz stabilizację cytoszkieletu [54-57]. Bierze także udział w fałdowaniu białek, zależnym od ATP lub kierowaniu nieprawidłowo sfałdowanych białek do degradacji w proteasomach. Dowiedziono, że HSPB1 oddziałuje z bardzo wieloma partnerami białkowymi w środowisku komórkowym, między innymi z podjednostkami mikrofilamentów, filamentów pośrednich i mikrotubul. Zmiany w poziomie ekspresji genu *HSPB1* mają bezpośredni wpływ na organizację cytoszkieletu, polimeryzację i depolimeryzację aktyny, stabilizację mikrotubul oraz filamentów pośrednich. Stwierdzono, że białko HSPB1 oddziałuje z białkami NFL i HSPB8. Mutacje w genach, kodujących te białka powodują odpowiednio, wspomnianą już, CMT2E oraz CMT2L. Wykazano, że mutacje w genach *NEFL* i *HSPB8* mają bardzo podobny wpływ na sieć neurofilamentów. Prowadzą do agregacji łańcucha lekkiego neurofilamentów oraz postępującej degeneracji neuronów ruchowych. Mutacja Ser135Phe dziedziczy się w sposób dominujący i powoduje agregację białka NFL. Koprodukcja dzikiego białka HSPB8 i zmutowanego NFL w hodowli komórkowej znosi toksyczne efekty mutantu [50]. Okazało się, że białko HSPB1 ma wpływ na żywotność neuronów ruchowych i czuciowych [58], co w przypadku nieprawidłowości w genie *HSPB1*, skutkuje rozwojem CMT2.

#### CHOROBA CMT2G

Tę postać choroby CMT2 wyodrębniono na podstawie genetycznego badania sprzężeń w hiszpańskiej rodzinie, w której wykluczono inne znane *loci*. Analiza wskazała na *locus* w chromosomie 12q13.13. Wykluczono także geny, których mutacje mogłyby odpowiadać za rozwój choroby CMT2G – *AVIL*, *CENTG1*, *RAB5B* oraz *DHH*. U większości pacjentów objawy uwidoczniły się w drugiej dekadzie życia, chociaż wiek zachorowania wahał się między 9. a 76. rokiem życia. Na obraz kliniczny składały się deformacje stóp, utrudnienia w chodzeniu, brak lub obniżenie odruchów skokowych. Postęp choroby był powolny i skutkował umiarkowaną niepełnosprawnością [59].

#### CHOROBA CMT2I

Tę postać choroby wyodrębniono na podstawie analizy genetycznej i wyłonienia nowego *locus*, w którym

zmiany odpowiadają za zachorowanie. Zidentyfikowano 10 mutacji w genie *MPZ* (ang. *myelin protein zero*), powodujących chorobę Charcot-Marie-Tooth, którą uznaje się za aksonalną. Jednak mutacje w tym genie powodują przede wszystkim demielinizacyjną formę choroby CMT (CMT1B), a oprócz tego także odpowiadają za rozwinięcie syndromu Dejerine-Sottas (DSS). Jednoznaczne określenie pierwotnych zmian, demielinizacyjnych bądź aksonalnych, jest jednak bardzo trudne. Uważa się bowiem, że prawdopodobnie to demielinizacja jest zmianą pierwotną i powodującą określone fenotypy. W takich przypadkach choroba wykazuje cechy zarówno neuropatii demielinizacyjnej jak i aksonalnej [60]. Dokonano podziału aksonalnej formy choroby, powodowanej przez mutacje w genie *MPZ* na chorobę CMT2I oraz CMT2J [61]. Stwierdzono, że pacjenci z postacią choroby CMT2I wyróżniają się nieco zwolnionym przewodzeniem nerwowym [62], natomiast pacjenci z chorobą CMT2J chorują na neuropatię aksonalną z objawami dodatkowymi, takimi jak głęboki niedosłuch, objaw Agryll Robertsona<sup>3</sup> [63].

Opisano wiele rodzin, w których odnaleziono mutacje w genie, kodującym białko MPZ u osób dotkniętych chorobą CMT. Część z nich zidentyfikowano, jako CMT2 na podstawie badań klinicznych i elektrofizjologicznych w 16 rodzinach oraz u dwóch izolowanych pacjentów [64-66]. Najczęstszą mutacją identyfikowaną w genie *MPZ* u chorych na CMT2 jest substytucja Thr124Met w białku MPZ. Osoby z tą zmianą charakteryzowały się pewnymi cechami wspólnymi, objawy pojawiały się między 4. a 5. dekadą życia, przebieg choroby był szybki, prowadzący do znacznego osłabienia kończyn dolnych, co skutkowało unieruchomieniem na wózku inwalidzkim. Wiele osób skarżyło się na przeszywające bóle w nogach [64].

Białko MPZ (P0) jest zachowanym w ewolucji białkiem transbłonowym, występującym jedynie w komórkach Schwanna (Ryc. 1). Jest głównym składnikiem mieliny (strukturalna część obwodowego układu nerwowego) i lokalizuje się w osłonkach mieliniowych. P0 składa się z zewnątrzkomórkowej domeny immunoglobulino-podobnej, pojedynczej domeny transbłonowej, oraz wewnątrzkomórkowej domeny C-końcowej. Monomery P0 łączą się w tetramer, tworząc strukturę podobną do kanału. Najprawdopodobniej pełni funkcje jako element pozwalający na adhezję otoczki mieliniowej, co zapewniałoby zachowanie organizacji osłonek mieliniowych komórek. Substytucja Asp61Gly znajduje się w domenie wewnątrzkomórkowej, którą uważa się za odpowiedzialną za oligomeryzację. Proces ten polega na oddziaływaniach między łańcuchami bocznymi aminokwasów, dlatego brak reszty kwasu asparaginowego, a obecność reszty glicyny, skutkuje brakiem łańcucha kwasowego, a tym samym zaburzeniami w tworzeniu się tetramerów. Substytucja Tyr119Cys, w domenie zewnątrzkomórkowej, wprowadza dodatkową grupę tiolową, pomiędzy resztami cysteiny w pozycjach 50 i 127, które w normalnych warunkach tworzą mostki disiarczkowe. Może to powodować agregację z prawidłowymi partnerami białkowymi, opartą na wiązaniach disiarczkowych.

<sup>3</sup>Objaw Agryll Robertsona cechują wąskie nieraz nieokrągłe źrenice, niereagujące obustronnie na światło, natomiast reagujące na zbieżność.

Efektem kolejnej mutacji jest substytucja Thr124Met (najczęściej spotykana). Jest zlokalizowana w środku  $\beta$ -harmonijki domeny transbłonowej. Następuje w tym przypadku zmiana aminokwasu hydrofilowego na hydrofobowy, czego skutkiem są prawdopodobnie nieprawidłowości w fałdowaniu białka lub braku stabilności takiego białka. Podejrzewa się, że kodon 124 jest wyjątkowo podatny na mutacje. Obecność mutacji Thr124Met udokumentowano u wielu pacjentów. Może tak być ze względu na efekt założyciela, ale także ze względu na istnienie tzw. *hotspot* w kodonie 124. Zmianie ulega kodon ACG na ATG, a uważa się, że dinukleotydy CpG są wyjątkowo podatne na mutacje [67].

Mechanizm patogenezy aksonalnej formy CMT, powodowanej przez mutacje w genie *MPZ* nie jest dobrze poznany. Wiadomo, że te zmiany sekwencji nie powodują znaczących zmian w budowie białka, jednak mogą naruszać jego funkcję. Przypuszcza się, że mutacje te zaburzają oddziaływanie między komórkami Schwanna a aksonem, które powodują drobne nieprawidłowości w aksonie, ale przede wszystkim degenerację aksonów. Skutkiem jest rozwinięcie łagodnej formy CMT2 o późnym początku [68].

#### CHOROBA CMT2K

Podtyp choroby Charcot-Marie-Tooth 2K jest powodowany przez dominujące mutacje w genie *GDAP1* (ang. *ganglioside-induced differentiation associated protein-1*). Jednak najczęściej spotykany jest recesywny sposób dziedziczenia mutacji w genie *GDAP1* (choroba CMT4C4). Poza tym mutacje w tym genie mogą powodować formy demielinizacyjne choroby CMT (CMT4A) oraz formy mieszane. Neuropatia aksonalna z objawami piramidowymi, zmapowana została do *locus* 8q21.3, które charakteryzuje chorobę CMT4A [69]. Autorzy zaklasyfikowali tę postać choroby o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym jako CMT4C2, natomiast Baird wyróżnił ją, jako CMT2H.

Białko *GDAP1* jest zakotwiczone w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i jego podwyższony poziom (w stosunku do innych tkanek) obserwuje się w obwodowym układzie nerwowym (Ryc. 1) [70]. W przeciwieństwie do mitofuzyny 2, białko *GDAP1* odpowiada za rozpad sieci mitochondrialnej, promuje zjawisko określane w piśmiennictwie jako „*fission*”. Jest zaangażowane w prawidłowy kształt, strukturę i podział sieci mitochondrialnej. *GDAP1* posiada dwie N-końcowe domeny GST oraz dwie C-końcowe domeny transbłonowe. Mimo strukturalnego podobieństwa do S-transferaz glutationu, w badaniach na komórkach *E. coli* nie stwierdzono ich funkcji enzymatycznej w białku *GDAP1* [71].

Zmutowane formy białka dziedziczone w sposób autosomalny dominujący prowadziły do obniżonej zdolności łączenia się mitochondriów, a więc do ich uszkodzenia poprzez częściową utratę potencjału błonowego, wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) oraz wzmoczoną podatność na sygnały proapoptotyczne. Mutacje dziedziczone w sposób autosomalny recesywny powodowały obniżoną zdolność do podziału sieci mitochondrialnej

w porównaniu do organelli z niezmienionym białkiem *GDAP1*. Dodatkowo stwierdzono, że takie zróżnicowanie ze względu na sposób dziedziczenia ma odzwierciedlenie w fenotypie wśród pacjentów z CMT2. Pacjenci z mutacjami recesywnymi zapadali na chorobę CMT już we wczesnym dzieciństwie, natomiast objawy u pacjentów z mutacjami dominującymi pojawiały się późno w wieku dorosłym [72].

#### CHOROBA CMT2L

Za tę postać choroby Charcot-Marie-Tooth odpowiedzialne są mutacje w genie *HSPB8*, kodującym białko szoku cieplnego HSPB8 (Ryc. 1). Mutacje w tym genie powodują także neuropatie ruchowe, bez komponenty czuciowej. Mechanizm molekularnej patogenezy CMT2L nie jest dobrze poznany. Prawdopodobnie zaburzenia w białku HSPB8 prowadzą do powstawania agregatów, które mogą blokować transport aksonalny. Wykazano, że białko HSPB8 oddziałuje z opisanym już białkiem HSPB1. Sugeruje to, że oba białka przechodzą tę samą ścieżkę w komórce. Białko HSPB8 może występować w formie monomerycznej lub jako homodimer. Białko HSPB8 może także tworzyć kompleksy z innymi białkami szoku cieplnego, HSPB1,  $\alpha$ B-kryształiną. Stwierdzono, że poszczególne mutanty białka HSPB8 wykazują nieprawidłowości w oddziaływaniach z innymi białkami oraz w tworzeniu kompleksów zarówno homo- jak i heteromerycznych. Przykładem może być wzmoczona tendencja do tworzenia agregatów przez białka zmienione [73]. Taka wiedza daje nadzieje na opracowanie terapii oraz na kompensację skutków uszkodzeń białek w obwodowym układzie nerwowym.

#### CHOROBA CMT2N

Nowa postać choroby Charcot-Marie-Tooth typu 2 o dziedziczeniu autosomalnym dominującym została opisana przez grupę francuską. Chorzy to 17 osób, wykazujących objawy kliniczne, oraz dwie osoby bezobjawowe, w wieku 30 i 50 lat, u których występowało ryzyko zachorowania. Średni wiek, w którym następowało rozwinięcie choroby wynosił 28 lat. U wszystkich pacjentów, na podstawie badania elektromiograficznego, stwierdzono zaniki nerwów ruchowych i czuciowych. Przy pomocy badania genetycznego stwierdzono, że u wszystkich osób chorych występuje mutacja zmiany sensu (c.986G>A, p.Arg329His) w ósmym eksonie genu *AARS*, kodującego cytoplazmatyczną syntetazę alanylo-tRNA (*AlaRS*). Tę samą zmianę znaleziono w innej francuskiej rodzinie, jednak wykluczono efekt założyciela analizą sekwencji mikrosatelitarnych [74].

Syntetazy aminoacylo-tRNA są enzymami odpowiedzialnymi za wierność translacji, dzięki łączeniu odpowiednich aminokwasów z właściwymi tRNA (Ryc. 1). W ramieniu akceptorowym tRNA<sup>Ala</sup> pojedyncza para nukleotydów odpowiada za łączenie tRNA z alaniną poprzez aminoacylację w miejscu katalitycznym syntetazy alanylo-tRNA. Jest to szczególny enzym, ponieważ rozpoznaje tRNA nie poprzez sekwencję antykodonu, jak większość syntetaz tRNA, ale poprzez ramię akceptorowe [75]. Biał-

ko to ma budowę modułową, w której wyróżnia się domenę aminoacylacji (AD), środkową domenę helikalną (HD) i domenę edycji (ED). Sekwencja aminokwasowa białka AlaRS jest w dużym stopniu zachowana w ewolucji. AlaRS człowieka jest monomerem lub homodimerem [76]. Gen AARS zawiera 21 eksonów i koduje białko zbudowane z 968 reszt aminokwasowych. Zidentyfikowana mutacja w kodonie 329, zamieniająca resztę argininy na resztę histydyny, znajduje się w środkowej domenie helikalnej białka. Wiadomo, że łańcuch boczny argininy jest bardziej elastyczny od łańcucha bocznego histydyny. Dodatkowo arginina jest akceptorem protonów, podczas gdy histydyna zawiera zmiennie uprotonowany pierścień imidazolowy. Podejrzewa się, że dinukleotyd CG w kodonie 329 może być, tzw. „gorącym miejscem” mutacji, ponieważ zidentyfikowano tam zmiany w dwóch niespokrewnionych rodzinach.

Przeprowadzono mutagenezę w bakteriiach *E.coli*, której wynikiem było ustalenie dwóch głównych determinantów dla wiązania i efektywnej aminoacylacji tRNA<sup>Ala</sup> – reszta kwasu asparaginowego w pozycji 285 oraz reszta argininy w pozycji 314. Substytucje w tych pozycjach powodowały obniżenie poziomu aminoacylacji w wyniku zmniejszonej efektywności wiązania tRNA. Dodatkowo mutanty nie komplementowały szczepu pozbawionego AlaRS, jednak mutant Arg314Lys częściowo pozwalał na przeżycie komórek. Utworzono także model myszy, w którym uszkodzenie obu alleli w AARS powodowało defekt w funkcji edytującej AlaRS, co skutkowało włączeniu tRNA<sup>Ala</sup> z seryną lub glicyną zamiast alaniny. Takie zmiany prowadziły do nieprawidłowości w fałdowaniu białek oraz neurodegeneracji. Z tych doświadczeń wywnioskowano, że zaburzenia w wierności działania syntetazy alanylo-tRNA są wystarczające dla procesu neurodegeneracji. Zidentyfikowano także mutacje w aminoacylo-tRNA syntetazach glicyny i tyrozyny, które powodowały inne podtypy choroby CMT, odpowiednio CMT2D oraz neuropatię mieszaną. Dlatego ta klasa białek jest dobrym celem do badań i być może identyfikacji kolejnych postaci tej choroby [74,75].

**Tabela 1.** Zestawienie podtypów chorób, loci, nazw genów, liczby mutacji, odpowiadających za poszczególne choroby. AD – dziedziczenie autosomalne dominujące; AR – dziedziczenie autosomalne recesywne. Na podstawie bazy danych <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations> oraz bazy PubMed (stan na 15.11.2010 r.)

Nazwa choroby	Locus	Symbol genu	Liczba mutacji	Sposób dziedziczenia
CMT2A1	1p36.2	KIF1B	1	AD
CMT2A2	1p36.2	MFN2	59	AD/AR
CMT2B	3q21	RAB7	4	AD
CMT2C	12q24.1	TRPV4	4	AD
CMT2D	7p15	GARS	11	AD
CMT2E	8p21	NEFL	4	AD
CMT2F	7q11.2	HSPB1	4	AD
CMT2G	12q12-q13.3	nieznany		
CMT2I/J/P0	1q22	MPZ	22	AD
CMT2K/CMT4C4	8q21.11	GDAP1	14	AD/AR
CMT2L	12q24	HSPB8	6	AD
CMT2N	16q22	AARS	1	AD
CMT4C1	1q21.2	LMNA	4	AR
CMT4C3	17q13.3	MED25	1	AR

## FORMY AKSONALNE CHOROÓB KRĘGU CHARCOT-MARIE-TOOTH O DZIEDZICZENIU AUTOSOMALNYM RECESYWNYM

Dodatkowo za polineuropatie aksonalne odpowiadają też mutacje o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym. Wyróżniono cztery podtypy choroby: CMT4C1, CMT4C2, CMT4C3 i CMT4C4. Podłoże molekularne choroby CMT4C2 nie jest znane. Za postać CMT4C4 odpowiadają mutacje w opisywanym już genie *GDAP1* dziedziczone w sposób autosomalny recesywny. Podtyp CMT4C1 powodowany jest przez mutacje w genie *LMNA* [77], kodującym laminę A/C natomiast podtyp CMT4C3 powodują mutacje w genie *MED25* (Ryc. 1) [78]. Mutacje w obu genach dziedziczą się w sposób autosomalny recesywny. Białko lamina A/C należy do rodziny białek filamentów pośrednich i lokalizuje się w jądrze komórkowym w wewnętrznej otoczce jądrowej. Postuluje się, że stabilizuje strukturę jądra komórkowego i wchodzi w skład cytoszkieletu tego organelum. Utrzymuje również strukturę chromatyny oraz jest zaangażowana w ekspresję genów. Podczas podziałów mitotycznych białka laminy są rozdzielane w odwrotnym procesie fosforylacji. Produktami genu laminy są cztery transkrypty (lamina A, AD10, C i C2), powstające na drodze różnicowego cięcia i składania [79,80]. Jedna ze zidentyfikowanych mutacji (Arg298Cys) znajduje się w rejonie genu, kodującym domenę ROD białka, co wpływa na powstawanie wszystkich czterech zmutowanych transkryptów. Motyw, w którym znajduje się reszta argininy 298 jest zachowany w ewolucji i bierze udział w oddziaływaniu z innymi białkami, więc substytucja na inną resztę aminokwasową zaburza funkcje komórkowe peptydu [77]. Myszy model mutacji genu *Lmna* potwierdzał związek mutacji z chorobą neurodegeneracyjną. U tych zwierząt stwierdzono aksonopatię, oprócz objawów klinicznych stwierdzono brak pełnej długości transkryptów *Lmna* oraz silne zmniejszenie zagęszczenia aksonów, wzrost ich średnicy i obecność aksonów pozbawionych mieliny, co silnie koreluje z obrazem histologicznym u pacjentów z CMT2 [77,81].

Produkt genu *MED25* wchodzi w skład kompleksu koaktywatora transkrypcyjnego zwanego kompleksem Mediatora. Kompleks ten jest wymagany do procesu transkrypcji większości genów transkrybowanych przez polimerazę RNA II. Białko *MED25* bierze udział w modyfikacjach chromatyny oraz inicjacji tworzenia się całego kompleksu mediatora [78].

### PODSUMOWANIE

Badanie podłoża molekularnego choroby Charcot-Marie-Tooth typu 2, aksonalnej neuropatii czuciowo-ruchowej, stanowi ogromne wyzwanie stawiane przed lekarzami, genetykami oraz biologami. CMT2 charakteryzuje ogromna różnorodność objawów oraz heterogenność genetyczna. Do tej pory zidentyfikowano 13 genów, w których mutacje powodują poszczególne



formy CMT2 (Tab. 1). Mutacje w opisywanych genach powodują szereg uszkodzeń komórki nerwowej, które prowadzą do degeneracji aksonu (Ryc. 1) poprzez zaburzenia transportu aksonalnego, dynamiki sieci mitochondrialnej, nieprawidłowości translacji, związania białek.

W archiwum Zespołu Chorób Nerwowo-Mięśniowych IMDiK PAN znajduje się ponad 500 rodowodów rodzin CMT. Szacuje się, że w Polsce choruje około 16 tysięcy osób. Polineuropatie aksonalne stanowią niewielki procent w tej grupie. Diagnostyka molekularna chorych z CMT dotyczy choroby CMT1A oraz neuropatii z nadwrażliwością na ucisk (HNPP) i jest to analiza duplikacji/delekcji w genie *PMP22*. CMT2 jest chorobą, w której nie wykonuje się rutynowych testów molekularnych ani nie opracowano jeszcze żadnej terapii. Rozważa się próby zastosowania metod biologii molekularnej w leczeniu pacjentów, stosując mechanizmy oparte na wyciszeniu nieprawidłowych alleli genu oraz poszukiwaniu substancji np. degradujących agregaty białkowe. W chwili obecnej stan naszej wiedzy nie pozwala jednak na skuteczne stosowanie rozległych możliwości biologii molekularnej (Tab. 1).

## PIŚMIENNICTWO

- Züchner S, Vance JM (2005) Emerging pathways for hereditary axonopathies. *J Mol Med* 83: 935-943
- Züchner S, Vance JM (2006) Mechanisms of Disease: a molecular genetic update on hereditary axonal neuropathies. *Nat Rev Neurol* 2: 45-53
- Züchner S, De Jonghe P, Jordanova A, Claeys KG, Guergueltcheva V, Cherninkova S, Hamilton SR, Van Stavern G, Krajewski KM, Stajich J, Tournev I, Verhoeven K, Langerhorst CT, de Visser M, Baas F, Bird T, Timmerman V, Shy M, Vance JM (2006) Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann Neurol* 59: 276-281
- Zhu D, Kennerson ML, Walizada G, Züchner S, Vance JM, Nicholson GA (2005) Charcot-Marie-Tooth with pyramidal signs is genetically heterogeneous: families with and without MFN2 mutations. *Neurology* 65: 496-497
- Lawson VH, Graham BV, Flanigan KM (2005) Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. *Neurology* 65: 197-204
- Chung KW, Kim SB, Park KD, Choi KG, Lee JH, Eun HW, Suh JS, Hwang JH, Kim WK, Seo BC, Kim SH, Son IH, Kim SM, Sunwoo IN, Choi BO (2006) Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations. *Brain* 129: 2103-2118
- Verhoeven K, Claeys KG, Züchner S, Schröder JM, Weis J, Ceuterick C, Jordanova A, Nelis E, De Vriendt E, Van Hul M et al (2006) MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain* 129: 2093-2102
- Züchner S, Mersyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J et al (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36: 449-451
- Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, Yang HW, Terada S, Nakata T, Takei Y, Saito M, Tsuji S, Hayashi Y, Hirokawa N (2001) Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 105: 587-597
- Cartoni R, Martinou JC (2009) Role of mitofusin 2 mutations in the pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp Neurol* 218: 268-273
- de Brito OM, Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456: 605-610
- Misko A, Jiang S, Wegorzewska I, Milbrandt J, Baloh RH (2010) Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci* 30: 4232-4240
- Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT (2003) Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 116: 2763-2774
- Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E (2008) Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 9: 505-518
- Verhoeven K, De Jonghe P, Coen K, Verpoorten N, Auer-Grumbach M, Kwon JM, FitzPatrick D, Schmedding E, De Vriendt E, Jacobs A, Van Gerwen V, Wagner K, Hartung HP, Timmerman V (2003) Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am J Hum Genet* 72: 722-727
- Auer-Grumbach M, De Jonghe P, Wagner K, Verhoeven K, Hartung HP, Timmerman V (2000) Phenotype-genotype correlations in a CMT2B family with refined 3q13-q22 locus. *Neurology* 55: 1552-1557
- Spinosa MR, Progida C, De Luca A, Colucci AM, Alifano P, Bucci C (2008) Functional characterization of Rab7 mutant proteins associated with Charcot-Marie-Tooth type 2B disease. *J Neurosci* 28: 1640-1648
- Houlden H, King RH, Muddle JR, Warner TT, Reilly MM, Orrell RW, Ginsberg L (2004) A novel RAB7 mutation associated with ulcero-mutilating neuropathy. *Ann Neurol* 56: 586-590
- Meggough F, Bienfait HM, Weterman MA, de Visser M, Baas F (2006) Charcot-Marie-Tooth disease due to a de novo mutation of the RAB7 gene. *Neurology* 67: 1476-8
- Jordens I, Marsman M, Kuijl C, Neeffjes J (2005) Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* 6: 1070-1077
- Jordens I, Fernandez-Borja M, Marsman M, Dusseljee S, Janssen L, Calafat J, Janssen H, Wubbolts R, Neeffjes J (2001) The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol* 11: 1680-1685
- Cantalupo G, Alifano P, Roberti V, Bruni CB, Bucci C (2001) Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *EMBO J* 20: 683-693
- Deinhardt K, Salinas S, Verastegui C, Watson R, Worth D, Hanrahan S, Bucci C, Schiavo G (2006) Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron* 52: 293-305
- Progida C, Malerød L, Staffers S, Brech A, Bucci C, Stenmark H (2007) RILP is required for the proper morphology and function of late endosomes. *J Cell Sci* 120: 3729-3737
- Zhang M, Chen L, Wang S, Wang T (2009) Rab7: roles in membrane trafficking and disease. *Biosci Rep* 29: 193-209
- Dyck PJ, Litchy WJ, Minnerath S, Bird TD, Chance PF, Schaid DJ, Aronson AE (1994) Hereditary motor and sensory neuropathy with diaphragm and vocal cord paresis. *Ann Neurol* 35: 608-615
- Donaghy M, Kennett R (1999) Varying occurrence of vocal cord paralysis in a family with autosomal dominant hereditary motor and sensory neuropathy. *J Neurol* 246: 552-555
- Santoro L, Manganelli F, Di Maio L, Barbieri F, Carella M, D'Adamo P, Casari G (2002) Charcot-Marie-Tooth disease type 2C: a distinct genetic entity. Clinical and molecular characterization of the first European family. *Neuromuscul Disord* 12: 399-404
- McEntagart ME, Reid SL, Irrthum A, Douglas JB, Eyre KE, Donaghy MJ, Anderson NE, Rahman N (2005) Confirmation of a hereditary motor and sensory neuropathy IIC locus at chromosome 12q23-q24. *Ann Neurol* 57: 293-297
- Landouré G, Zdebek AA, Martinez TL, Burnett BG, Stanescu HC, Inada H, Shi Y, Taye AA, Kong L, Munns CH, Choo SS, Phelps CB, Paudel R, Houlden H, Ludlow CL, Caterina MJ, Gaudet R, Kleta R, Fischbeck KH, Sumner CJ (2010) Mutations in TRPV4 cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C. *Nat Genet* 42: 170-174
- Mattson MP (2007) Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* 6: 337-350
- Zimoň M, Baets J, Auer-Grumbach M, Berciano J, Garcia A, Lopez-Laso E, Merlini L, Hilton-Jones D, McEntagart M, Crosby AH et al (2010) Dominant mutations in the cation channel gene transient receptor potential vanilloid 4 cause an unusual spectrum of neuropathies. *Brain* 133: 1798-1809

33. Antonellis A, Ellsworth RE, Sambuughin N, Puls I, Abel A, Lee-Lin SQ, Jordanova A, Kremensky J, Christodoulou K, Middleton LT, Sivakumar K, Ionasescu V, Funalot B, Vance JM, Goldfarb LG, Fischbeck KH, Green ED (2003) Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am J Hum Genet* 72: 1293-1299
34. Ionasescu V, Searby C, Sheffield VC, Roklina T, Nishimura D, Ionasescu R (1996) Autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth axonal neuropathy mapped on chromosome 7p (CMT2D). *Hum Mol Genet* 5: 1373-1375
35. Rohkamm B, Reilly MM, Lochmüller H, Schlotter-Weigel B, Barisic N, Schöls L, Nicholson G, Pareyson D, Laurà M, Janecke AR, Miltenberger-Miltenyi G, John E, Fischer C, Grill F, Wakeling W, Davis M, Pieber TR, Auer-Grumbach M (2007) Further evidence for genetic heterogeneity of distal HMN type V, CMT2 with predominant hand involvement and Silver syndrome. *J Neurol Sci* 263: 100-106
36. Kochański A (2007) Choroba Charcot-Marie-Tooth typu 2D. Dziezyczna neuropatia ruchowa typu V, charakterystyka kliniczno-genetyczna. *Neurologia Dziecięca* 16: 45-47.
37. Goldfarb LG, Sivakumar K (1993-2006.11.08, zaktualizowano 2010.06.17) Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2D/Distal Spinal Muscular Atrophy V. GeneReviews (Internet) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=cmt2d> (stan na 14.10.2010)
38. Park SG, Schimmel P, Kim S (2008) Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 11043-11049
39. Freist W, Logan DT, Gauss DH (1996) Glycyl-tRNA synthetase. *Biol Chem Hoppe Seyler* 377: 343-356
40. Chihara T, Luginbuhl D, Luo L (2007) Cytoplasmic and mitochondrial protein translation in axonal and dendritic terminal arborization. *Nat Neurosci* 10: 828-837
41. Nangle LA, Zhang W, Xie W, Yang XL, Schimmel P (2007) Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant tRNA synthetases linked to altered dimer interface and neurite distribution defect. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 11239-11244
42. Achilli F, Bros-Facer V, Williams HP, Banks GT, AlQatari M, Chia R, Tucci V, Groves M, Nickols CD, Seburn KL et al (2009) An ENU-induced mutation in mouse glycyl-tRNA synthetase (GARS) causes peripheral sensory and motor phenotypes creating a model of Charcot-Marie-Tooth type 2D peripheral neuropathy. *Dis Model Mech* 2: 359-373
43. Mersiyanova IV, Perepelov AV, Polyakov AV, Sitnikov VF, Dadali EL, Oparin RB, Petrin AN, Evgrafov OV (2000) A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *Am J Hum Genet* 67: 37-46
44. Georgiou DM, Zidar J, Korosec M, Middleton LT, Kyriakides T, Christodoulou K (2002) A novel NF-L mutation Pro22Ser is associated with CMT2 in a large Slovenian family. *Neurogenetics* 4: 93-96
45. Züchner S, Vorgerd M, Sindern E, Schröder JM (2004) The novel neurofilament light (NEFL) mutation Glu397Lys is associated with a clinically and morphologically heterogeneous type of Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Neuromuscul Disord* 14: 147-157
46. Cairns NJ, Lee VM, Trojanowski JQ (2004) The cytoskeleton in neurodegenerative diseases. *J Pathol* 204: 438-449
47. Lee MK, Cleveland DW (1996) Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* 19: 187-217
48. Al-Chalabi A, Miller CC (2003) Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays* 25: 346-355
49. Sasaki T, Gotow T, Shiozaki M, Sakaue F, Saito T, Julien JP, Uchiyama Y, Hisanaga S (2006) Aggregate formation and phosphorylation of neurofilament-L Pro22 Charcot-Marie-Tooth disease mutants. *Hum Mol Genet* 15: 943-952
50. Zhai J, Lin H, Julien JP, Schlaepfer WW (2007) Disruption of neurofilament network with aggregation of light neurofilament protein: a common pathway leading to motor neuron degeneration due to Charcot-Marie-Tooth disease-linked mutations in NFL and HSPB1. *Hum Mol Genet* 16: 3103-3116
51. Kabzińska D, Perez-Olle R, Goryunov D, Drac H, Ryniewicz B, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kochański A, Liem RK (2006) Is a novel I214M substitution in the NEFL gene a cause of Charcot-Marie-Tooth disease? Functional analysis using cell culture models. *J Peripher Nerv Syst* 11: 225-231
52. Ismailov SM, Fedotov VP, Dadali EL, Polyakov AV, Van Broeckhoven C, Ivanov VI, De Jonghe P, Timmerman V, Evgrafov OV (2001) A new locus for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2F) maps to chromosome 7q11-q21. *Eur J Hum Genet* 9: 646-650
53. Evgrafov OV, Mersiyanova I, Irobi J, Van Den Bosch L, Dierick I, Leung CL, Schagina O, Verpoorten N, Van Impe K, Fedotov V et al (2004) Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat Genet* 36: 602-606
54. Wagstaff MJ, Collaço-Moraes Y, Smith J, de Belleruche JS, Coffin RS, Latchman DS (1999) Protection of neuronal cells from apoptosis by Hsp27 delivered with a herpes simplex virus-based vector. *J Biol Chem* 274: 5061-5069
55. Hirano S, Shelden EA, Gilmont RR (2004) HSP27 regulates fibroblast adhesion, motility, and matrix contraction. *Cell Stress Chaperones* 9: 29-37
56. Williams KL, Rahimtula M, Mearow KM (2006) Heat shock protein 27 is involved in neurite extension and branching of dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Neurosci Res* 84: 716-723
57. Arrigo AP, Simon S, Gibert B, Kretz-Remy C, Nivon M, Czekalla A, Guillet D, Moulin M, Diaz-Latoud C, Vicart P (2007) Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett* 581: 3665-3674
58. Benn SC, Perrelet D, Kato AC, Scholz J, Decosterd I, Mannion RJ, Bakowska JC, Woolf CJ (2002) Hsp27 upregulation and phosphorylation is required for injured sensory and motor neuron survival. *Neuron* 36: 45-56
59. Nelis E, Berciano J, Verpoorten N, Coen K, Dierick I, Van Gerwen V, Combarros O, De Jonghe P, Timmerman V (2004) Autosomal dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2G) maps to chromosome 12q12-q13.3. *J Med Genet* 41: 193-197
60. Hanemann CO, Gabreëls-Festen AA, De Jonghe P (2001) Axon damage in CMT due to mutation in myelin protein P0. *Neuromuscul Disord* 11: 753-756
61. Bird TD (1993-1998, zaktualizowane 27.05.2010) Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2. W: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K (red.), GeneReviews (Internet), Seattle, University of Washington
62. Li J, Bai Y, Ianakova E, Grandis M, Uchwat F, Trostinskaia A, Krajewski KM, Garbern J, Kupsky WJ, Shy ME (2006) Major myelin protein gene (P0) mutation causes a novel form of axonal degeneration. *J Comp Neurol* 498: 252-265
63. Chapon F, Latour P, Diraison P, Schaeffer S, Vandenberghe A (1999) Axonal phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease associated with a mutation in the myelin protein zero gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66: 779-782
64. De Jonghe P, Timmerman V, Ceuterick C, Nelis E, De Vriendt E, Löfgren A, Vercauysen A, Verellen C, Van Maldergem L, Martin JJ, Van Broeckhoven C (1999) The Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype. *Brain* 122: 281-290
65. Santoro L, Manganeli F, Di Maria E, Bordo D, Cassandrini D, Ajmar F, Mandich P, Bellone E (2004) novel mutation of myelin protein zero associated with an axonal form of Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 262-265
66. Kabzińska D, Korwin-Piotrowska T, Drechsler H, Drac H, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kochański A (2007) Late-onset Charcot-Marie-Tooth type 2 disease with hearing impairment associated with a novel Pro105Thr mutation in the MPZ gene. *Am J Med Genet A* 143A: 2196-2199
67. Senderek J, Hermanns B, Lehmann U, Bergmann C, Marx G, Kabus C, Timmerman V, Stoltenburg-Didinger G, Schröder JM (2000) Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2 and P0 point mutations: two novel

- amino acid substitutions (Asp61Gly; Tyr119Cys) and a possible „hot-spot“ on Thr124Met. *Brain Pathol* 10: 235-248
68. Shy ME (2006) Peripheral neuropathies caused by mutations in the myelin protein zero. *J Neurol Sci* 242: 55-66
  69. Barhoumi C, Amouri R, Ben Hamida C, Ben Hamida M, Machghoul S, Gueddiche M, Hentati F (2001) Linkage of a new locus for autosomal recessive axonal form of Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q21.3. *Neuromuscul Disord* 11: 27-34
  70. Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U (2005) Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* 170: 1067-1078
  71. Pedrola L, Espert A, Wu X, Claramunt R, Shy ME, Palau F (2005) GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum Mol Genet* 14: 1087-1094
  72. Niemann A, Wagner KM, Ruegg M, Suter U (2009) GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol Dis* 36: 509-520
  73. Fontaine JM, Sun X, Hoppe AD, Simon S, Vicart P, Welsh MJ, Bendorf R (2006) Abnormal small heat shock protein interactions involving neuropathy-associated HSP22 (HSPB8) mutants. *FASEB J* 20: 2168-2170
  74. Latour P, Thauvin-Robinet C, Baudalet-Méry C, Soichot P, Cusin V, Faivre L, Locatelli MC, Mayençon M, Sarcey A, Brousolle E, Camu W, David A, Rousson R (2010) A major determinant for binding and aminoacylation of tRNA(Ala) in cytoplasmic Alanyl-tRNA synthetase is mutated in dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet* 86: 77-82
  75. Giegé R, Sissler M, Florentz C (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res* 26: 5017-5035
  76. Antonellis A, Green ED (2008) The role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9: 87-107
  77. De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, Vallat JM, Tazir M, Kassouri N, Szepietowski P, Hammadouché T, Vandenberghe A, Stewart CL, Grid D, Lévy N (2002) Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet* 70: 726-736
  78. Leal A, Huehne K, Bauer F, Sticht H, Berger P, Suter U, Morera B, Del Valle G, Lupski JR, Ekici A et al (2009) Identification of the variant Ala335Val of MED25 as responsible for CMT2B2: molecular data, functional studies of the SH3 recognition motif and correlation between wild-type MED25 and PMP22 RNA levels in CMT1A animal models. *Neurogenetics* 10: 275-287
  79. Machiels BM, Zorenc AH, Endert JM, Kuijpers HJ, van Eys GJ, Ramaekers FC, Broers JL (1996) An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J Biol Chem* 271: 9249-9253
  80. Furukawa K, Inagaki H, Hotta Y (1994) Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Exp Cell Res* 212: 426-430
  81. Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, Anver M, Bhat N, Nagashima K, Stewart CL, Burke B (1999) Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol* 147: 913-920

## Molecular pathogenesis of hereditary motor and sensory neuropathy

Katarzyna Kotruchow<sup>1,✉</sup>, Dagmara Kabzińska<sup>1</sup>, Kamila Karpińska<sup>1</sup>, Andrzej Kochoński<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Neuromuscular Unit, Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 5 Pawinskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

<sup>2</sup>Faculty of Biology and Environmental Sciences, Cardinal Stefan Wyszyński University, 1/3 Wóycickiego St., 01-938 Warsaw, Poland

✉e-mail: k.kotruchow@gmail.com

**Key words:** hereditary axonal neuropathy, molecular pathogenesis, mutation

### ABSTRACT

Charcot-Marie-Tooth disease 2 is an inherited axonal motor and sensory neuropathy. It is very heterogenous, both clinically and genetically. Till present, 15 types of CMT2, 14 loci and 13 genes are known to be causative of CMT2. Studying mechanisms of molecular pathogenesis is very important for finding a therapy for patients but the diversity of proteins involved in pathogenesis makes this very difficult. Proteins involved in molecular pathogenesis are e.g. proteins of the mitochondrial outer membrane with opposite functions (mitofusin 2 and GDAP1) responsible for fusion and fission of the mitochondrial network. Mutations also occur in genes encoding tRNA-synthetases, neuronal cytoskeletal protein, cation channel protein and molecular chaperones. This review presents knowledge of CMT2 and possible pathogenetic mechanisms responsible for the disease.

# Rola enzymów metabolizujących ektonukleotydy w sygnalizacji z udziałem puryn

Dorota Porowińska

Joanna Czarnecka

Michał Komoszyński

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

✉ Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; tel.: (56) 611 45 20, e-mail: michkom@chem.uni.torun.pl

Artykuł otrzymano 11 października 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 14 stycznia 2011 r.

**Słowa kluczowe:** ektonukleotydy, ektonukleotydu, NTPDazy, NPPazy

**Wykaz skrótów:** ACR – ang. *apyrase conserved regions*; ADP – adenozylo difosforan nukleotydu; AMP – adenozylo monofosforan nukleotydu; ATP – adenozylo trifosforan nukleotydu; EDTA – kwas etylenodiaminoczworowartościowy; NPPazy (ang. *ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase*) – pirofosfatazy/fosfodiesterazy nukleotydu; NTPDazy (ang. *nucleotide triphosphate diphosphohydrolase*) – fosfohydrolazy di- i trifosfonukleotydu

## STRESZCZENIE

Sygnalizacja z udziałem puryn odgrywa kluczową rolę w regulacji wielu procesów fizjologicznych. Ektonukleotydy aktywując receptory typu P wpływają na szereg procesów metabolicznych i fizjologię wielu narządów. Stężenie tych związków w przestrzeni pozakomórkowej jest kontrolowane przez enzymy należące do kilku rodzin nukleotydu. Degradując nukleotydy uczestniczą one w terminacji transmisji sygnału z udziałem nukleotydu i receptorów P2 oraz produkują inne cząsteczki sygnałowe takie, jak ADP i adenozyne. NPPazy i NTPDazy stanowią przykład ewolucji konwergencyjnej białek. Białka te nie są filogenetycznie spokrewnione, a mimo to katalizują ten sam typ reakcji. Celem ich działania jest degradacja tri- i difosfonukleotydu do monofosfonukleotydu oraz ortofosforanu lub pirofosforanu. Większość dotychczas opisanych NTPDaz i NPPaz zwierzęcych to ektoenzymy błonowe lub ich rozpuszczalne formy występujące w płynach tkankowych. Celem tej pracy jest zebranie informacji dotyczących lokalizacji, budowy, właściwości i funkcji NTPDaz i NPPaz w regulacji stężenia nukleotydu poza komórką, a tym samym transmisji sygnału z udziałem puryn i pirymidyn.

## WPROWADZENIE

Nukleotydy są cząsteczkami o kluczowym znaczeniu dla funkcjonowania komórek. Transportują energię niezbędną w procesach metabolicznych, są elementem struktury kwasów nukleinowych, uczestniczą w katalizie enzymatycznej jako koenzymy, kofaktory i substraty, a ich cykliczne pochodne pełnią funkcję wtórnych cząsteczek sygnalizacyjnych. Wielokierunkowy zakres działania nukleotydu przenosi się również do macierzy pozakomórkowej [1,2].

Ektonukleotydy to również cząsteczki sygnałowe, które regulują przebieg wielu procesów fizjologicznych. ATP jest sygnałem bólowym, a w układzie krwionośnym reguluje ciśnienie krwi. ATP znajdujący się poza komórką w wysokich (mM) stężeniach, przy jednoczesnym braku jonów dwuwartościowych, staje się cytotoksyczny [3]. W naczyniach krwionośnych uwolniony z uszkodzonych komórek ADP aktywuje agregację płytek, co inicjuje proces hemostazy [3]. Ektonukleotydy regulują mineralizację tkanki kostnej, przez co wpływają na prawidłowy rozwój szkieletu [3-7]. Związki te biorą również udział w transmisji synaptycznej, percepcji dotyku i reakcji naczyniowo-ruchowej. Na poziomie komórkowym ektonukleotydy kontrolują proliferację, uczestniczą w mitogenezie, apoptozie oraz transporcie jonów i wody [3,8].

Ektonukleotydy aktywują receptory P2 [1,9-11]. Obecność receptorów P2 stwierdzono we wszystkich zbadanych dotąd narządach i tkankach. Wyróżniamy dwa podtypy receptorów P2: I/ receptory P2Y (metabotropowe) – zbudowane z siedmiu hydrofobowych domen transbłonowych i współdziałając z białkami G oraz II/ receptory P2X (jonotropowe) – kanały jonowe, których podjednostki mają 2 domeny transbłonowe połączone dużą zewnątrzkomórkową pętlą [1,8-11]. Mimo, że komórkowe stężenie nukleotydu jest na poziomie 1-2 mM [12], do aktywacji sygnału nukleotyduowego na zewnątrz komórki wystarczą już stężenia mikromolowe, a nawet nanomolowe. Powinowactwo receptorów względem agonistów jest różne dla różnych ich podtypów. Receptory P2X aktywowane są przez 1-10  $\mu$ M stężenia ATP (dla P2X7 EC<sub>50</sub> od 300  $\mu$ M do 1 mM), natomiast receptory P2Y wrażliwe są na stężenia ATP w zakresie 0,01-30  $\mu$ M [13-17]. Źródłem nukleotydu poza komórką są uszkodzone i rozpadające się komórki, egzocytoza, transport z udziałem transporterów błonowych (białka ABC). W przestrzeni pozakomórkowej ATP jest degradowany do ADP i AMP, a ADP jest hydrolizowany do AMP lub wykorzystywany do resyntezy ATP [1,6,8,18].

Tabela 1. Enzymy zaangażowane w regulację stężenia ektonukleotydów.

Ektonukleotydy		Enzymy	
		Katalizowane reakcje*	
1	NTPDazy	NTP	NMP + 2Pi
		NTP	NDP + Pi
		NDP	NMP + Pi
2	NPPazy	NTP	NMP + PPi
3	5' nukleotydaza	NMP	Nukleozyd + Pi
4	Fosfatazy	X-P**	X + Pi
Kinazy		Katalizowane reakcje*	
5	Kinaza adenylanowa	2NDP	NTP + NMP

\*specyficzność substratowa omawianych enzymów została przedstawiona w tekście w rozdziale „Właściwości fizykochemiczne NTPDaz”;  
\*\*X-P- ester fosforanowy związku organicznego lub nieorganicznego

### ENZYMY KONTROLUJĄCE STĘŻENIE EKTOPURYN

Stężenie nukleotydów i nukleozydów w przestrzeni pozakomórkowej jest kontrolowane przez enzymy należące do kilku rodzin z klasy hydrolaz oraz przez kinazy. Ich obecność stwierdzono we wszystkich przebadanych dotąd organizmach i tkankach. Są to ektonukleotydazy i ektokinazy (Tab. 1) [8-11,18]. W wyniku działania ektonukleotydaż powstają nukleotydy i nukleozydy. Ektonukleotydazy to enzymy zaliczane do klasy hydrolaz, które metabolizują nukleotydy w przestrzeni pozacytoplazmatycznej oraz w płynach fizjologicznych. Z uwagi na pochodzenia oraz na różnice w mechanizmie katalizowanych reakcji wyróżniamy cztery rodziny ektonukleotydaż: E-NPPazy (EC 3.1.4) (ekto-pirofosfatazy/fosfodiesterazy nukleotydów, ang. *ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase*), E-NTPDazy (EC 3.6.1.5) (ekto-fosfohydrolazy di- i trifosfonukleozydów, ang. *ecto-nucleotide triphosphate diphosphohydrolase*) nazywane wcześniej ekto-apirazami lub E-ATPazami oraz alkaliczne fosfatazy (EC 3.1.3.1) i ekto-5'-nukleotydazy (EC 3.1.3.6) (ang. *ecto-5'-nucleotidase*) [8-11,18].

Drugą grupą ektoenzymów regulujących stężenie nukleotydów są kinazy nukleotydydowe (ang. *nucleotide kinase*) oraz kinaza adenylanowa (miokinaza, ang. *miokinase*) (EC 2.7.4.3) [11], które katalizują transfer grupy fosforanowej

między nukleotydami. Enzymy różnych klas i rodzin mogą współwystępować [15].

ATP znajdujące się w przestrzeni pozakomórkowej jest hydrolizowane do ADP i/lub AMP oraz piro- lub ortofosforanu. AMP, z kolei, jest substratem 5'-nukleotydaży hydrolizującej ten nukleotyd do adenozyne, agonisty receptorów adenozynowych (P1). Aktywacja receptorów adenozynowych w wielu przypadkach, inicjuje efekty przeciwstawne do skutków aktywacji receptorów nukleotydydowych [13,19-21]. Tak więc jedną z funkcji ektonukleotydaż jest utrzymywanie w przestrzeni pozakomórkowej równowagi między ligandami receptorów P1 i P2 [20,21], (Ryc. 1). Wiele dowodów wskazuje, że ektonukleotydazy degradując nukleotydy uczestniczą w zakończeniu procesu przekazywania sygnału z udziałem nukleotydów i receptorów P2 [19,22,23]. Jednocześnie produkty działania ektonukleotydaż i ektokinaz (ATP, ADP i adenozyne) powstające poza komórką, są także cząsteczkami sygnalizacyjnymi (Ryc. 1).

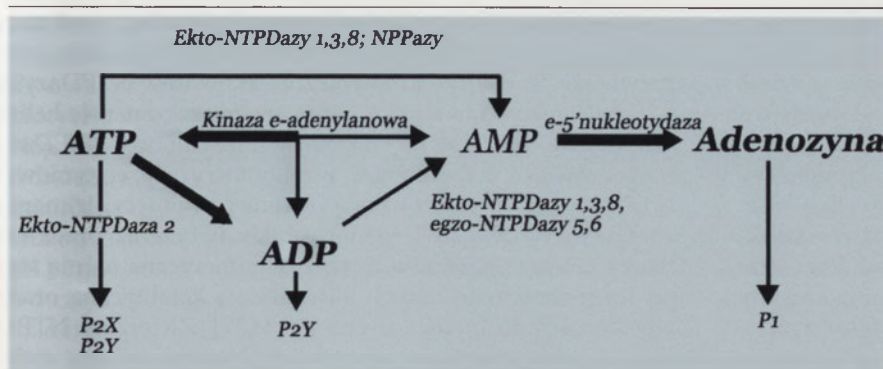
Ostatnie lata badań nad sygnalizacją z udziałem nukleotydów i nukleozydów wskazują na ogromny wpływ tych związków na szereg procesów metabolicznych i fizjologię wielu narządów. Celem tej pracy jest przedstawienie rezultatów dotychczasowych badań dotyczących lokalizacji, budowy, właściwości i funkcji dwóch rodzin nukleotydaż – NTPDaz i NPPaz. Szczególne zainteresowanie tymi rodzinami enzymów wynika z faktu, że to one głównie metabolizują nukleotydy poza komórką i w ten sposób uczestniczą w przekazywaniu sygnału z udziałem puryn i pirymidyn.

### RODZINA NTPDaz

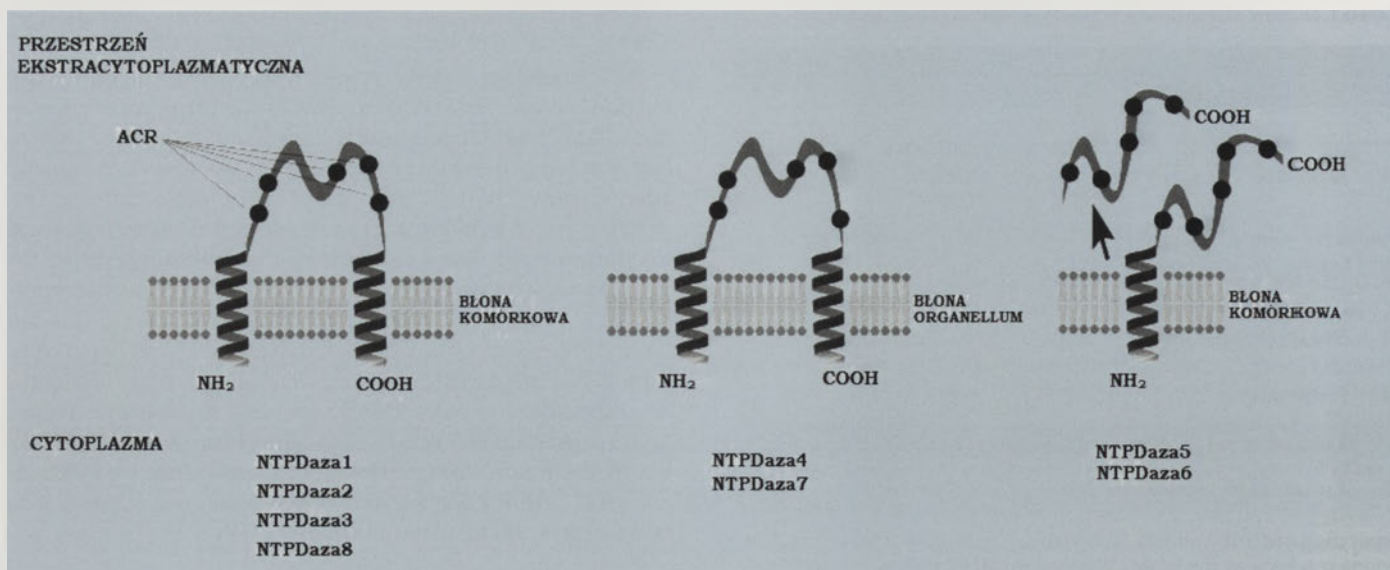
NTPDazy (ang. *ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase*) są strukturalnie i katalitycznie jednorodną grupą enzymów, rozpowszechnioną we wszystkich przebadanych dotąd narządach i tkankach zwierząt i roślin [24-28]. Wszyscy przedstawiciele tej rodziny enzymów mają zdolność hydrolizy nukleozydów 5'-tri- lub difosforanowych do monofosforanów nukleozydów oraz nieorganicznego fosforanu zgodnie ze schematami reakcji zamieszczonymi w tabeli 1 [24,25,29].

W skład rodziny NTPDaz zwierząt wchodzi osiem enzymów kodowanych przez osiem różnych genów, które zostały ponumerowane zgodnie z kolejnością ich odkrycia [21,30,31]. Ze względu na topografię, budowę i lokalizację

funkcjonalnego białka, NTPDazy możemy podzielić na trzy grupy (Ryc. 2) [4,5,21,31]. Do pierwszej należą NTPDazy 1, 2, 3, 8 posiadające dwie domeny transbłonowe znajdujące się na N i C końcach łańcucha polipeptydowego. Są to białka błonowe zlokalizowane na powierzchni komórki z miejscem katalitycznym skierowanym do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Ryc. 2). NTPDazy 4 i 7, wykazują również obecność dwóch domen transbłonowych, ale zlokalizowane są w błonach aparatu Golgiego (GA), siateczki śródplazmatycznej lub lizosomów. Miejsce katalityczne tych enzymów położo-



Rycina 1. Zintegrowany łańcuch przemian ektonukleotydów adeninowych. Szlaki przemian nukleotydydów prowadzące do powstania cząsteczek sygnalizacyjnych zostały pogrubione.



Rycina 2. Schemat budowy enzymów należących do rodziny NTPDaz.

ne jest w świetle w/w struktur (Ryc. 2). Do grupy trzeciej zaliczane są NTPDaza 5 i 6. Białka te są również związane z błonami komórkowymi. Posiadają jednak tylko jedną domenę transbłonową znajdującą się na N-końcu łańcucha polipeptydowego, która może być odcięta z udziałem protez. Powstająca rozpuszczalna forma NTPDazy metabolizuje nukleotydy we krwi lub w płynach śródtkankowych (Ryc. 2) [26, 31-36].

#### BUDOWA NTPDaz

Masa cząsteczkowa znanych NTPDaz waha się w granicach 50–189 kDa. Wszystkie NTPDazy posiadają pięć zachowanych w ewolucji regionów tzw. "apyrase conserved regions" (ACR 1-5) (Ryc. 2) [31,34,37-39]. Badania tych regionów wskazują, że pełnią one prawdopodobnie kluczową rolę w procesie katalizy [34,37-39]. Większość mutacji punktowych w obrębie regionów ACR wywołuje inaktywację, zmniejszoną aktywność enzymatyczną i/lub niższym poziomem syntezy białka. Niektóre mutacje (np. substytucje) powodują zmianę stosunku hydrolizy ATP:ADP, zwiększając aktywność ATPazową lub ADPazową NTPDaz.

NTPDazy należą do nadrodziny aktyn/hsp70/heksokinaz. Wszystkie białka tej grupy posiadają dwie ważne domeny (N- i C-końcowa) o charakterystycznej powtarzającej się strukturze drugorzędowej ( $\beta 1\beta 2\beta 3\alpha 1\beta 4\alpha 2\beta 5\alpha 3$ ), które powstały najprawdopodobniej w wyniku duplikacji genu. Między tymi domenami znajduje się kieszeń, na dnie której wiążą się substraty [21]. W oparciu o podobieństwo znanych sekwencji NTPDaz do sekwencji białek należących do nadrodziny aktyn zaproponowano komputerowy model trzeciorzędowej struktury NTPDazy3 człowieka. Zgodnie z tym modelem ACR1 i ACR4 tworzą dwie struktury  $\beta$  zlokalizowane po obu stronach domeny zewnątrzkomórkowej. W rejonie tych ACR (1 i 4) znalezione zostały motywy wiążące  $\beta$ - i  $\gamma$ -fosforan (DXG), charakterystyczne dla białek należących do nadrodziny aktyn/hsp70/heksokinaz [28,31,37]. ACR3 i ACR5 to  $\alpha$ -helisy, zlokalizowane między N- i C-końcową domeną [37]. Struktura trzeciorzędowa

zbudowana w oparciu o pomiary kryształu domeny zewnątrzkomórkowej NTPDazy2 szczura charakteryzuje się podobnym planem budowy. Zawiera ona dwie domeny, między którymi zostało zidentyfikowane miejsce aktywne [40]. Dodatkowo niektóre z enzymów tej rodziny zwierają w swojej strukturze niezbędne dla aktywności katalitycznej mostki disiarczkowe [35,36].

Na granicy domeny zewnątrzkomórkowej i błony komórkowej (między N-końcową domeną transbłonową (TM) i ACR1 oraz C-końcową TM i ACR5) zlokalizowane są dwie zachowane w ewolucji reszty proliny ułatwiające przyjęcie prawidłowej konformacji i usztywnienie struktury domeny zewnątrzkomórkowej. Taka budowa umożliwia NTPDazom (i innym białkom należącym do nadrodziny aktyn) rotacyjny ruchów domen zewnątrzkomórkowych względem siebie powodując ich zbliżanie i odsuwanie. Ruchy te nazywane „butterfly-like” umożliwiają zbliżenie rejonu ACR1 i ACR4 do substratu, a następnie katalizę oraz uwolnienie produktu. Wydaje się więc, że te skoordynowane ruchy związane z resztami proliny są niezbędne do przeprowadzenia katalizy [37]. Ruchy domen zewnątrzkomórkowych dotyczą jednak tylko NTPDaz związanych z błoną komórkową (1-3 i 8) i są funkcjonalnie i strukturalnie związane z ruchem domen transbłonowych. Domeny transbłonowe NTPDaz (1-3 i 8) w rejonach zlokalizowanych po stronie ekstracytoplazmatycznej silnie ze sobą oddziałują, podczas gdy po stronie cytoplazmatycznej ich współdziałanie jest niewielkie. Stwierdzono również, że aktywność NTPDazy1 jest uwarunkowana możliwością przemieszczania się helisy TM względem siebie [37]. Domeny transbłonowe NTPDaz mogą również uczestniczyć w oligomeryzacji enzymów. NTPDazy łatwo tworzą homooligomery (dimery, trimery i tetramery). Nie stwierdzono jednak tworzenia przez te białka heterooligomerów. Formy oligomeryczne różnią się od form monomerycznych aktywnością katalityczną oraz właściwościami biologicznymi [30,34,37]. Zwierzące NTPDazy są modyfikowane po translacji. Najważniejszą z nich jest glikozylacja [4,24,37], która jest niezbędna dla ich prawidłowej lokalizacji w błonie komórkowej [21].

## WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNE NTPDaz

NTPDazy wykazują specyficzność substratową względem wszystkich nukleotydów, a ich aktywność wymaga obecności jonów dwuwartościowych [27-32,41]. Wykazują alkaliczne optimum pH (7,5-8,5) [4,24,28,34]. NTPDazy różnią się wrażliwością na jony, preferencjami substratowymi, oraz produktami katalizy [21]. NTPDazy 1-3 i 8 hydrolizują wszystkie nukleotydy, ale ich reakcja przebiega najefektywniej dla nukleotydów adeninowych. NTPDaza 1 hydrolizuje ATP i ADP ze zbliżoną szybkością, podczas gdy NTPDazy 3 i 8 mają wyższe powinowactwo do ATP niż ADP. Z kolei NTPDaza 2, nazywana czasami ektoATPazą, wykorzystuje jako substraty głównie trifosforany nukleotydów [4,5,21,26,39]. W przeciwieństwie do zwierzęcych, NTPDazy 1 i 2, które są najsilniej aktywowane w obecności jonów  $Mg^{2+}$ , NTPDazy 3 i 8 ulegają silnej aktywacji w obecności jonów  $Ca^{2+}$  [21]. NTPDaza 4 najefektywniej hydrolizuje UDP i nukleozydy 5'-di- oraz 5'-trifosforanowe z wyjątkiem ATP i ADP [4,5,26]. NTPDaza 7 katalizuje przede wszystkim reakcję hydrolizy trifosfonukleotydów (UTP, GTP, CTP) [21]. NTPDaza 5 i 6 hydrolizują głównie nukleozydy 5'-difosforanowe (GDP, UDP i IDP) [4,5,26,32,33]. NTPDaza 1 hydrolizuje ATP i ADP do AMP, jeśli jednak substratem jest UTP, to głównym produktem tego enzymu jest UDP, a nie UMP. W przeciwieństwie do NTPDazy 1, NTPDaza 2 hydrolizuje ATP do ADP, które z udziałem innych NTPDaz może być defosforylowane do AMP. Z kolei NTPDaza 3 i 8 hydrolizują ATP do produktu przejściowego jakim jest ADP, który przez te same enzymy degradowany jest do monofosforanu adenozyiny [21].

Mechanizm katalizy NTPDaz nie został w pełni poznany. W oparciu o komputerowe modele i analizy rentgenograficzne postuluje się, że specyficzność substratowa NTPDaz względem tri- i difosforanów nukleotydów jest wynikiem plastyczności centrum aktywnego i zarówno NTP jak i NDP konkurują o to samo miejsce hydrolityczne. Hydroliza rozpoczyna się od aktywacji cząsteczki wody przez grupę karbonylową glutaminianu 165. Następnie powstający po deprotonacji wody jon akoholanowy atakuje wiązanie pirofosforanowe  $\gamma$  i  $\beta$  i uwolnione zostają reszty fosforanowe. Jony dwuwartościowe uczestniczą tak w aktywacji wody, jak i stabilizują substrat w centrum katalitycznym.

## INHIBITORY NTPDaz

Aktywność NTPDaz może być regulowana za pomocą różnych związków. Znanymi inhibitorami NTPDaz są: analogi nukleotydów, związki chelatujące jony metali dwuwartościowe, suramina, azydki i w przypadku niektórych typów NTPDaz  $HgCl_2$  i polioksometales [34,42,43]. Najsilniejszym inhibitorem aktywności NTPDaz, który jednocześnie nie wpływa na przekazywanie sygnału z udziałem receptorów nukleotydowych jest strukturalny analog ATP (6-N,N-dietylo-D- $\beta$ - $\gamma$ -dibromometyleno-ATP) [21]. Innymi proponowanymi inhibitorami tych enzymów o dużej specyficzności są również: 5'-trifosforan 8-tiobutyloadenozyiny (8BuS-ATP) i kwas 1-naftol-3,6-disulfonowy (BGO136) [21]. Wykazano również, że jony gadolinu hamują NTPDazy z organu elektrycznego węgorza elektrycznego (*Torpedo marmorata*) oraz apirazę z ziemniaka

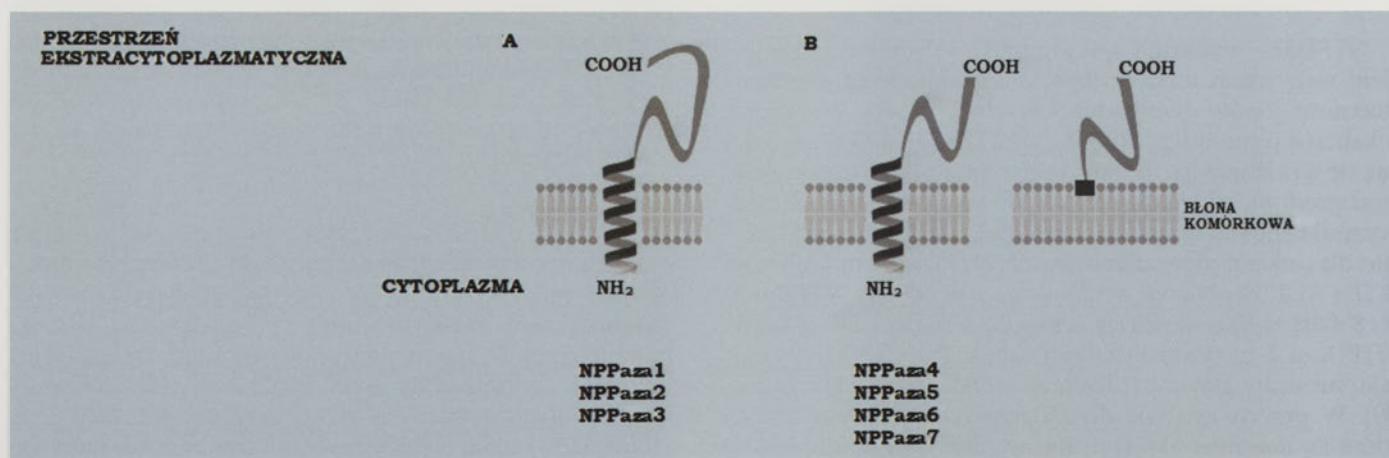
[21,42]. Większość prezentowanych wyżej inhibitorów charakteryzuje się jednak niską specyficznością, bowiem poza NTPDazami hamują również aktywność innych nukleotydaz, jak i receptorów P2. Enzymy rodziny NTPDaz są niewrażliwe na specyficzne inhibitory ATPaz typu P, F i V [27-29,34,43].

## FUNKCJE NTPDaz

Podstawową funkcją metaboliczną NTPDaz jest kontrola stężenia nukleotydów w komórce i w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Wewnątrz komórki degradacja tri-, di- oraz monofosfonukleotydów zmienia jej ładunek energetyczny, potencjał fosforylacyjny oraz stężenie jonów fosforanowych. Ponadto enzymy te mogą uczestniczyć również w glikozylacji białek, metabolizmie cukrów oraz utrzymaniu integralności błon komórkowych [24,29,44].

Poza komórką NTPDazy hydrolizują nukleotydy do monofosforanów nukleotydów, które są następnie degradowane przez inne enzymy metabolizujące puryny do adeniny, rybozy i ortofosforanu. Powyższa aktywność nie tylko uwalnia receptory od ich nukleotydowych agonistów, ale powstające produkty degradacji nukleotydów mogą być z udziałem odpowiednich kanałów (ortofosforan) i transporterów białkowych (adenozyna) transportowane do komórki i ponownie wykorzystane w resyntezie nukleotydów. NTPDazy mogą również w bezpośredni sposób wpływać na regulację wielu ważnych procesów fizjologicznych. NTPDazy degradując nukleotydy obecne we krwi i ścianie naczyń regulują hemostazę, ciśnienie krwi oraz odpowiedź immunologiczną (hamują procesy prozapalne) co może w istotny sposób wpływać nie tylko na metabolizm układu krwionośnego ale również na inne narządy i tkanki.

W układzie nerwowym NTPDazy degradując nukleotydy nie tylko kończą sygnał purynowy, ale powstające w wyniku hydrolizy produkty mogą modyfikować procesy fizjologiczne [41], takie jak percepcja bólu i neurotransmisja [29,34,36,44]. W szczelinie synaptycznej i na płycie nerwowo-mięśniowej znajdują się NTPDaza 1 i 2. Oba enzymy degradują ATP natomiast NTPDaza 1 również ADP. Wiele dowodów wskazuje, że powyższe enzymy kończą sygnał nukleotydowy przekazywany z udziałem receptorów P2 [34, 45-49]. Jednak analizy kinetyczne wykazały, że różnią się one wartością  $K_M$  względem ATP.  $K_M$  NTPDazy 1 jest o rząd wielkości mniejsze od  $K_M$  NTPDazy 2 i zbliżone do stężenia ATP wystarczającego do aktywacji receptorów P2. Milimolarne stężenia ATP wymagają szybkiego usunięcia z synapsy. NTPDaza 2, której  $K_M$  względem ATP jest wyższe niż NTPDazy 1, może działać wydajniej w warunkach wysokiego, cytotoksycznego stężenia ATP, np. towarzyszącego drgawkom epileptycznym, niedotlenieniu lub niedokrwieniu [34]. Powyższe wyniki wskazują, że zakończenie sygnału nukleotydowego odpowiedzialna jest NTPDaza 1 podczas, gdy NTPDaza 2 uczestniczy w obniżaniu wysokich, toksycznych stężeń ATP w szczelinie synaptycznej i/lub produkcji ADP, kolejnej cząsteczki sygnalizacyjnej [34,46,48-52]. NTPDaza 2, hydrolizując ATP do ADP, produkuje również agonistę receptorów P2Y<sub>1</sub>. W wielu komórkach stwierdzono kolokalizację receptorów P2Y<sub>1</sub> i aktywowanych przez ATP receptorów P2Y<sub>2</sub>. Aktywa-



Rycina 3. Schemat budowy enzymów należących do rodziny NPPaz. A) budowa NPPazy 1, 2 i 3; B) dwie przypuszczalne struktury NPPazy 4-7.

cja tych ostatnich może hamować uwalnianie z neuronów neurotransmitterów stymulujących.

### RODZINA NPPAZ

NPPazy są enzymami posiadającymi aktywność alkalicznej fosfodiesterazy i pirofosfatazy nukleotydowej [4,7]. Enzymy te odpowiedzialne są za hydrolizę wiązań pirofosforanowych nukleotydów oraz wiązań fosfodiesterowych kwasów nukleinowych [6,8,9]. Katalizują reakcję hydrolizy 3', 5'-cAMP do AMP, ATP do AMP i P<sub>i</sub>, ADP do AMP i P<sub>i</sub> lub NAD<sup>+</sup> do AMP i mononukleotydu nikotynoamidowego (Tab. 1) [4,5,9]. Białka homologiczne do NPPaz zwierzęcych zidentyfikowano w komórkach roślin, bakterii, drożdży oraz w genomie wirusa z rodzaju *Avipoxvirus* (*Fowlpox virus*) [4-6].

Błonowe formy NPPaz zlokalizowane zostały w większości analizowanych tkanek zwierzęcych. Ich obecność stwierdzono w mózgu, sercu, nerkach, trzustce, łożysku, wątrobie, jelicie cienkim, jajnikach, gruczole krokowym, jądrach, komórkach kości, komórkach chrząstki i w macicy [3-7,53-55]. Poszczególne enzymy związane są z regułą ze specyficznymi typami komórek lub strukturami subkomórkowymi. Mogą również współwystępować w jednej tkance [4-6,56]. Rozpuszczalne formy NPPaz zlokalizowane zostały przede wszystkim w surowicy krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym i żółci [53] kręgowców oraz jądze węży (np. u *Crotalus adamanteus*) [4-7,53]. W skład rodziny NPPaz wchodzi siedem białek oznaczonych numerami 1-7 zgodnie z kolejnością ich odkrycia. Ze względu na różnice w sekwencji reszt aminokwasowych budujących białka rodziny NPPaz możemy wyróżnić dwie oddzielne grupy tych białek (Ryc. 3). Pierwszą z nich stanowią NPPazy 1-3 (Ryc. 3A). W skład drugiej grupy wchodzi natomiast NPPazy 4-7 (Ryc. 3B) [54]. Cechą wspólną białek należących do obu grup jest budowa centrum katalitycznego, które jest najbardziej zachowanym w ewolucji miejscem cząsteczki (podobieństwo w składzie reszt aminokwasowych między poszczególnymi NPPazami u ludzi wynosi 24-60%). Zachowanie w ewolucji dotyczy reszty treoniny oraz otaczających ją reszty aminokwasowych centrum aktywnego [3,6,7,57-59]. Ponadto wszystkie NPPazy (NPPazy 1-7) posiadają od 4 do 10 potencjalnych miejsc N-glikozylacji (Asn-X-Ser/

Thr). Ich funkcja właściwie nie została jeszcze wyjaśniona, ale uważa się, że mogą one uczestniczyć w transporcie tych enzymów na powierzchnię błony komórkowej [3,6,7].

#### NPPaza 1-3

Enzymy należące do tej grupy wykazują duże zróżnicowanie. Geny kodujące NPPazę 1 i NPPazę 3 zlokalizowano na chromosomie 6 (6q22-q23) co sugeruje, że powstały one przez duplikację jednego genu [3,6,7]. Podobieństwo sekwencji reszt aminokwasowych między tymi dwoma enzymami wynosi około 50% [6]. Gen NPPazy 2, z kolei, zlokalizowany został na chromosomie 8 (8q24.1) i jego sekwencja jest tylko w 39-41% homologiczna do NPPaz 1 i 3 [3,6,7]. NPPazy 1 i 3 zbudowane są z dwóch identycznych podjednostek o masie ok. 110 kDa każda, połączonych mostkami dwusiarczkowymi. NPPaza 2 natomiast jest monomeroem [3,7,59]. Ta grupa NPPaz zaliczana jest do glikoprotein transbłonowych typu II [54,55,57-62]. NPPaza 1, 2 i 3 mogą występować również w formie rozpuszczalnej [53,58,59,61].

Błonowe formy NPPaz 1-3 zbudowane są z trzech domen: 1, zewnątrzkomórkowej zawierającej motywy podobne do somatomedyny B (SMB), motyw o właściwościach nukleazy, domenę katalityczną oraz motyw dłoni EF; 2, pojedynczej domeny transbłonowej i 3, krótkiej N-końcowej domeny wewnątrzkomórkowej (Ryc. 3A) [54,55,60,61].

W obrębie centrum katalitycznego tych enzymów znajduje się zachowana w ewolucji reszta treoniny oraz sześć zachowanych w ewolucji reszt aminokwasowych wiążących metale [6,57]. Dodatkowo w domenie katalitycznej NPPazy 1 i 3 występuje zachowana w ewolucji sekwencja Gly-X-Gly-X-X-Gly [7,60], a w NPPazie 2 Phe-X-Gly-X-X-Gly (X oznacza dowolną resztę aminokwasową) [60]. Ten bogaty w reszty glicyny motyw jest niezbędny dla katalizy, ponieważ przedostatnia reszta aminokwasowa jest jednym z sześciu zachowanych w ewolucji reszt aminokwasowych biorących udział w wiązaniu jonów metali [60].

#### NPPAZY 4-7

Enzymy te są bardzo blisko ze sobą spokrewnione. Podobieństwo między NPPazą 4 i NPPazą 5 wynosi ponad 51%.



NPPazy 4–7 są z reguły znacznie krótsze od białek należących do pierwszej grupy (u ludzi NPP 4 zbudowana jest z 453, a NPP 5 z 477 reszt aminokwasowych). Geny kodujące te białka posiadają tylko dwa introny homologiczne do intronów 13 i 15 występujących w genach kodujących NPPazy 1–3, co wskazuje na wspólne pochodzenie obu grup enzymów [57].

Struktura NPPaz 4–7 nie została jeszcze poznana. W literaturze pojawiają się dwa różne modele strukturalne tych cząsteczek. Pierwszy z nich zakłada, że enzymy te należą do I typu białek transbłonowych posiadających krótką C-kończącą domenę wewnątrzkomórkową, która nie jest zachowana w ewolucji, domenę transbłonową i krótszą w porównaniu z NPPazami 1–3 domenę zewnątrzkomórkową zawierającą jedynie motyw fosfodiesterazy (Ryc. 3B) [3,6,7,58,62].

Inny model zakłada, że NPPazy 4 i 5 mają budowę zbliżoną dla fosfataz. Enzymy te nie miałyby wówczas N-końcowej domeny cytoplazmatycznej, ani regionu transbłonowego (Ryc. 3B). W zakotwiczonej w błonie domenie zewnątrzkomórkowej brak motywów podobnych do somatomedyny B, w wyniku czego domena ta jest o 250 reszt aminokwasowych krótsza od domeny zewnątrzkomórkowej występującej w NPPazach 1–3 [57]. Nie znana jest struktura oligomeryczna tych enzymów [3,6,7,58,62]. Większość znanych NPPaz jest białkami transbłonowymi. Jednak niektórzy autorzy sądzą, że istnieją również formy pozbawione domeny transbłonowej a zakotwiczone w błonie kotwicą glikofosfatydyloinozytolową. Ta forma enzymu miałyby być wynikiem różnicowego cięcia i składowania mRNA NPPaz 1–7 lub modyfikacji potranslacyjnej tych białek [6].

#### ROZPUSZCZALNE FORMY NPPaz

NPPazy 1, 2, 3, 6 i 7 występują również w formie rozpuszczalnej [58,62]. Większość z tych białek może powstać w wyniku różnicowego cięcia i składowania mRNA kodującego błonową formę enzymu [3] lub podobnie jak w przypadku niektórych NTPDaz jest efektem proteolitycznego odszczepienia domeny zewnątrzkomórkowej tuż przy błonie komórkowej [3,4,6,7]. Enzymy te mają takie same właściwości oraz takie same miejsca glikozylacji jak białka związane z błoną komórkową.

Rozpuszczalna NPPaza 1 człowieka jest wynikiem proteolitycznego rozszczepienia formy błonowej między resztami proliny 152 i alaniny 153. Przypuszcza się, że proteoliza przebiega w aparacie Golgiego. Enzym ten o masie około 100 kDa ma budowę analogiczną do zewnątrzkomórkowej domeny NPPaz błonowych. Nie zawiera on jednak domeny podobnej do somatomedyny B uczestniczącej w tworzeniu mostków dwusiarczkowych [7]. Inną rozpuszczalną formą NPPaz ssaków jest NPPaza 2 (autotaksyna), glikoproteina o masie 125 kDa wydzielana między innymi przez komórki czerniaka. Białko to powstaje jako pre-pro-enzym, który po odcięciu proteolitycznym domeny zewnątrzkomórkowej przyjmuje formę rozpuszczalną [58,59]. Enzym ten ma identyczną strukturę jak domena zewnątrzkomórkowa błonowych form NPPaz [63,64].

#### AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA NPPaz

Enzymy należące do tej rodziny wykazują niewielką specyficzność substratową. Katalizują reakcję hydrolizy wiązań pirofosforanowych i wiązań fosfodiesterowych w wielu różnych związkach zawierających tego typu wiązania [55,57,58,60]. Enzymy te są również zdolne do hydrolizy wiązań siarkowo-fosforanowych w cząsteczkach 3'-fosfoadenozyno 5'-fosfosiarczanu [3,6]. NPPazy 1–3 posiadają wysoką specyficzność w stosunku do nukleotydów jako substratów. NPPaza 2 dodatkowo posiada aktywność lizofosfolipazy D. Podstawowym substratem dla tego enzymu jest lizofosfatydylocholina, która jest hydrolizowana do kwasu lizofosfatydowego (ang. *lysophosphatidic acid*) będącego cząsteczką sygnałową. Natomiast NPPaza 6 i 7 hydrolizują tylko wiązania fosfodiesterowe lizofosfolipidów oraz innych estrów fosforanowych cholinyl [56,58,59,62].

#### MECHANIZM REAKCJI KATALIZOWANEJ PRZEZ NPPazy

Na podstawie strukturalnego podobieństwa NPPaz do fosfataz zaproponowano dwuetapowy mechanizm hydrolizy substratu. Proces ten zależny jest od obecności dwóch jonów metali dwuwartościowych. Jony te są koordynacyjnie związane przez aminokwasy centrum katalitycznego [6,7,57]. W pierwszym etapie reakcji jeden atom metalu (Me<sub>2</sub>) aktywuje, obecną w centrum katalitycznym, grupę hydroksylową reszty treoniny. Z jej udziałem prowadzony jest atak nukleofilowy na atom fosforu  $\alpha$  substratu i tworzy się wiązanie kowalencyjne. Prowadzi to do uwolnienia z cząsteczki substratu grupy alkoholowej i powstania kowalencyjnego związku pośredniego – kompleksu enzym-substrat [53]. W drugim etapie reakcji nukleofilem jest cząsteczka wody związana z jodem Me<sub>1</sub>, która przeprowadza nukleofilowy atak na centralny atom fosforu związku pośredniego, utworzony zostaje kompleks enzym-monofosforan nukleozydu, w którym NMP jest niekowalencyjnie związany z enzymem. Następnie kompleks ten ulega dysocjacji do wolnego enzymu i 5'-monofosforanu nukleozydu [6,7,57].

#### WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNE NPPaz

Wszystkie NPPazy posiadają alkaliczne optimum pH (8,5–9,5) [55,56,59,62] (8,9–9,3 dla NPPazy 1). Umożliwia ono prawidłowy przebieg katalizy, ponieważ kwaśne pH powoduje zahamowanie drugiego etapu reakcji. Do pełnej aktywności tych enzymów wymagana jest obecność dwuwartościowych jonów metali [4,6,7,56,65] takich, jak Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> lub Zn<sup>2+</sup>. Wykazano, że kationy Ca<sup>2+</sup> stabilizują cząsteczki PC-1 (NPPaza 1 człowieka) [4,5,65] oraz chronią je przed termiczną denaturacją i proteolizą [7,65]. Wartości  $K_m$  tej grupy enzymów zależą od rodzaju substratu oraz typu NPPazy uczestniczącej w reakcji.

#### INHIBITORY NPPaz

NPPazy są kompetycyjnie hamowane przez produkty katalizowanych reakcji, jak również przez glikoamino-glikany, takie jak heparyna i siarczan heparanu [3,7]. Dodatkowo działanie enzymów może być blokowane przez EDTA oraz inne związki chelatujące jony metali, które są

niezbędne do przeprowadzenia katalizy [3,57]. Niekompetywnym inhibitorem drugiego etapu reakcji jest imidazol. Związek ten wiąże się do kompleksu enzym-substrat powstającego w pierwszym etapie reakcji. Innym związkiem hamującym działanie NPPaz poprzez wiązanie jonów metali jest dietylopirokarbonian przeprowadzający acylację reszty histydyliny [57]. Hydroliza polifosforanów diadenozyny jest hamowana w obecności błękitu cybakronowego (ang. *Cibacron Blue*), niespecyficznego inhibitora receptora P2 [55], PPADS [4,66] oraz suraminy [66]. Pierwszy z nich jest inhibitorem dla wszystkich NPPaz, drugi wykazuje silniejszy wpływ na NPPazę 1 i NPPazę 3, trzeci natomiast hamuje jedynie NPPazę 1 i NPPazę 2 [66]. Inhibitorami tych enzymów występujących w formie dimerów są związki redukujące takie, jak 2-merkaptoetanol i ditioneitol [3,7], które niszczą mostki dwusiarczkowe łączące podjednostki.

#### FUNKCJE NPPaz

Funkcje NPPaz 1-3 zostały dobrze poznane i scharakteryzowane jednak fizjologiczna rola NPPaz 4-7 wciąż nie jest do końca wyjaśniona [55]. Zmiany w działaniu pierwszej grupy enzymów towarzyszą wielu schorzeniom. Nie wiadomo jednak, czy pojawienie się stanów patologicznych jest skutkiem dysfunkcji tych enzymów, czy też następstwem choroby [3]. NPPazy wraz z innym ektoenzymami regulując stężenie zewnątrzkomórkowych nukleotydów, które współdziałają z receptorami P2, wpływają na wiele procesów biologicznych, takich jak skurcz mięśni gładkich, agregacja płytek krwi, wydzielanie hormonów, odpowiedź immunologiczna oraz proliferacja, różnicowanie i apoptoza komórek [3,7]. Hydroliza ATP przez NPPazy może również chronić komórki przed zależną od ATP apoptozą indukowaną w wyniku aktywacji receptora P2X<sub>7</sub>. Inhibitory NPPazy 1, 6-azofenylofosforan pirodoksalu i kwas 4'-disulfonowy hamują tworzenie adenozyliny i inicjację apoptozy za pośrednictwem receptora A3 w komórkach nerwiaka niedojrzałego linii N1E-115 myszy [3].

NPPazy, podobnie jak NTPDazy, degradując ektonukleotydy biorą również udział w wychwycie zwrotnym uwolnionych z nich nukleozydów i ortofosforanu [3,6,7]. Ponadto enzymy te utrzymując równowagę między stężeniem pirofosforanu (PP<sub>i</sub>) i ortofosforanu (P<sub>i</sub>) uczestniczą w regulacji procesu mineralizacji kości [3,7]. NPPaza 2, dzięki aktywności lizofosfolipazy D, stymuluje ruchliwość komórek [60,61,64,67]. Dodatkowo istnieją liczne dowody przemawiające za udziałem NPPazy 1 w oporności na insulinę. Nie jest jednak znane molekularne podłoże tego procesu, a w literaturze pojawia się wiele sprzecznych danych dotyczących tych procesów.

NPPazę 2 zlokalizowano w komórkach wielu typów nowotworów włączając raka wątroby, nerwiaka niedojrzałego, raka prostaty oraz raka płuc. Wykazano, że enzym ten zwiększa możliwości inwazyjne i przerzutowe komórek rakowych oraz komórek zawierających onkogen *ras* [7,60,61,67]. Dodatkowo NPPaza 2 uczestniczy w indukcji angiogenezy, co może być wynikiem działania adenozyliny, końcowego produktu enzymatycznej degradacji ATP zapoczątkowanego przez NPPazę.

#### NUKLEOTYDAZY ROZPUSZCZALNE

Kolejna rodzina rozpuszczalnych enzymów, które hydrolizują ektonukleotydy zidentyfikowana została w gruczołach ślinowych stawonogów żywiących się krwią (*Cimex lectularius*, *Phlebotomus papatasi* i *Lutzomyia longipalpis*). Enzymy te hydrolizując ADP, które inicjuje agregację płytek, hamują krzepnięcie krwi żywicieli w/w owadów. Sekwencje genów homologiczne do tych, które znaleziono u wymienionych owadów zlokalizowane zostały również w układzie krwionośnym i nerwowym człowieka oraz w genomie muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), nicieni (*Caenorhabditis elegans*) i pierwotniaka (*Cryptosporidium parvum*) [70-74]. Enzymy te są białkami o masie cząsteczkowej ok. 35-37 kDa i należą do grupy nukleotydaz filogenetycznie spokrewnionych z 5' nukleotydazą [73,74]. Ich aktywność jest ściśle zależna od jonów wapnia. U pluskwy *Cimex lectularius* w wiązaniu jonów Ca<sup>2+</sup> uczestniczą przypuszczalnie reszty Asp znajdujące się w motywie DDRTG zlokalizowanym w krótkiej pętli między dwoma strukturami β. Optimum pH dla tej grupy enzymów u człowieka zawiera się w zakresie 6,2-7,2, podczas gdy u owadów wynosi ono 8,5. Enzymy te ulegają licznym modyfikacjom posttranslacyjnym: glikozylacji, fosforylacji, N-mirystylacji [70-72].

Ta grupa rozpuszczalnych białek znacznie różni się od dotychczas omawianych NPPaz i NTPDaz tak pod względem pochodzenia, budowy, jak i właściwości. Enzymy te kodowane są przez inne geny niż omawiane wcześniej rodziny enzymów. Sekwencja reszt aminokwasowych tych białek wykazuje brak homologii do wcześniej opisanych rodzin nukleotydaz. Niewielkie podobieństwa dotyczą przede wszystkim obszarów miejsca katalitycznego. Ma to najprawdopodobniej związek z katalizowaniem hydrolizy identycznych nukleotydów. Jednak aktywność katalityczna enzymów pochodzących z gruczołów ślinowych owadów jest ściśle zależna od jonów wapnia, podczas, gdy NTPDazy i NPPazy mogą wiązać różne jony metali dwuwartościowych.

#### NTPDazy I NPPazy REGULUJĄ STĘŻENIE NUKLEOTYDÓW

Podsumowując NPPazy i NTPDazy nie są filogenetycznie spokrewnione lecz pełnią w tkankach zwierząt i roślin podobną funkcję. Stanowią więc przykład ewolucji konwergencyjnej białek. NPPazy należą do nadrodziny enzymów fosforosiarkowych wiążących metale i wykazują duże podobieństwo do fosfataz. NTPDazy natomiast posiadają najprawdopodobniej wspólnego przodka z kinazami cukrów (ang. *actin-hsp 70 sugar kinases*), ponieważ zawierają motyw heksokinazy (ang. *hexokinase actin-hsp70*) wiążący β i γ fosforan [4,5]. Analiza sekwencji aminokwasowych kodujących enzymy należące do obu rodzin wykazuje brak podobieństwa między tymi grupami białek. Wyjątek stanowią te regiony łańcuchów białkowych, które uczestniczą w katalizie. W ich obrębie można zauważyć niewielką homologię. Ma to prawdopodobnie związek z rodzajem katalizowanej reakcji.

W procesach degradacji nukleotydów uczestniczy wiele rodzin enzymów. Oznacza to, że prawidłowe ich stężenie i przemiany tych związków w komórce i poza nią są bardzo

ważne dla metabolizmu komórek i tkanek. Każda z omawianych w tym przeglądzie rodzin enzymów degraduje ATP i inne nukleotydy do NDP lub NMP. Ich funkcja w komórce i poza nią z pozoru wydaje się odmienna. Obniżenie stężenia ATP poza komórką skutkuje zahamowaniem procesów prozapalnych, hamuje cytotoksyczne działanie tej cząsteczki, kontroluje agregację płytek krwi oraz procesy transmisji sygnału z udziałem nukleotydów.

Rzeczą charakterystyczną jest to, że większość dotychczas opisanych NTPDaz i NPPaz zwierzęcych to ektoenzymy związane z błonami, a ich rozpuszczalne formy znajdziemy we krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym i innych płynach tkankowych. Hydroliza trifosforanów nukleozydów przez NPPazy prowadzi do uwolnienia AMP i  $PP_i$ . Związki te są identyczne do produktów NTPDaz (AMP), lecz różnią się drugim z produktów reakcji  $PP_i$ . Enzymy te posiadają dodatkowo aktywność fosfatazy i kinazy.

U zwierząt skutkiem obniżenia stężenia tri- i difosfonukleozydów poza komórkami powoduje uwolnienie receptorów P2 od ich agonistów i przerwanie sygnału purynowego. Powstający w wyniku tej reakcji NMP i jest degradowany do stosownego nukleozydu i ortofosforanu. Tylko w takiej formie produkty degradacji di- i trifosfonukleozydów mogą być transportowane z udziałem specyficznych transporterów białkowych i kanałów z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do komórki i uzupełniać w niej pulę związków niezbędnych do syntezy nukleotydów.

## PODSUMOWANIE

W utrzymaniu homeostazy puryn i pirymidyn w przestrzeni pozakomórkowej uczestniczy wiele różnych enzymów należących do kilku rodzin nukleotydz (w tym 6 NTPDaz i 7 NPPaz) oraz deaminaza i kinaza adenylanowa. Enzymy te zwykle współwystępują w narządach i tkankach. Ektoenzymy uczestniczące w metabolizmie ektonukleotydów formują w przestrzeni pozakomórkowej łańcuch przemian, którego substratem jest ATP, a końcowym produktem adenozyne. Enzymy uczestniczące w tym szlaku metabolicznym są nie tylko odpowiedzialne za uwalnianie receptorów od ich agonistów, ale również produkują inne cząsteczki sygnałowe, takie jak ADP i adenozyne. Egzocytoza ATP powoduje w końcowym etapie przemian produkcję ekwimolarnych ilości adenozyne, związku, który pełni funkcje neuroprotektoryjne [75-79]. Krótkotrwałe incydenty niedotlenienia aktywują w neuronach i komórkach endotelium syntezę 5'-nukleotydu i zwiększają efektywność kaskady enzymów degradujących nukleotydy poza komórką [13,49,50,80]. W efekcie w warunkach stresowych zwiększa się stężenie ektoadenozyne [50]. Powstająca poza komórką adenozyne jest czynnikiem cytoprotekcyjnym i za pośrednictwem receptorów P1 obniża metabolizm komórek nerwowych i zmniejsza uwalnianie z komórki przekaźników pobudzających [75-79,81-83]. Ektopuryny uczestniczące w procesie sygnalizacji oraz metabolizujące je enzymy tworzą więc unikalny, samokontrolujący się mechanizm regulacji metabolizmu komórek, który jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu.

## PIŚMIENNICTWO

- Illes P, Klotz KN, Lohse MJ (2000) Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362: 295-298
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1999) Podstawy biologii komórki, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- Godinga JW, Grobden B, Slegers H (2003) Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 1638: 1-19
- Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362: 299-309
- Zimmermann H (1999) Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Physiol Sci* 20: 231-236
- Bollen M, Gijsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Stefan C (2000) Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase on the move. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35: 393-432
- Wójcik M, Szmalenberg B, Koziolkiewicz M (2003) Budowa, mechanizm działania i funkcje biologiczne enzymów z rodziny pirofosfataz/fosfodiesteraz ektonukleotydów (E-NPP). *Postepy Biochem* 49: 202-212
- Novak I (2003) ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News Physiol Sci* 18: 12-17
- Gendaszewska-Darmach E, Maszewski M, Zaklos M, Koziolkiewicz M (2003) Degradation of extracellular nucleotides and their analogs in HeLa and HUVEC cell cultures. *Acta Biochim Polon* 50: 973-984
- Vlajkovic SM, Thorne PR, Seevigny J, Robson SC, Housley GD (2002) Distribution of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases 1 and 2 in rat cochlea. *Hearing Res* 170: 127-138
- Lazarowski ER, Boucher RC, Kendall Harden T (2003) Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* 64: 785-795
- Gergs U, Boknik P, Schmitz W, Simm A, Silber R, Neumann J (2008) A positive inotropic effect of ATP in the human cardiac atrium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 8: 1-31
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Am J Pharmacol Exp Ther* 50: 413-492
- Burnstock G (1996) Development and perspectives of the purinoceptors concept. *J Auton Pharmacol* 16: 295-302
- Lauranell H, Burch PM (2006) E-NTPDases in human airways: Regulation and relevance for chronic lung diseases. *Purinergic Signal* 2: 399-408
- Burnstock G, Knight GE (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240: 31-304
- Harden TK, Lazarowski ER, Boucher R C (1997) Release, metabolism and interconversion of adenine and uridine nucleotides: Implications for G protein-coupled P2 receptor agonist selectivity. *Trends Pharmacol Sci* 18: 43-46
- Yegutkin GG, Henttinen T, Jalkanen S (2001) Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions. *FASEB J* 15: 251-260
- Zimmermann H (1996) Extracellular purine metabolism. *Drug Dev Res* 39: 337-352
- Ninomiya H, Otani H, Lu K, Uchiyama T, Kido M, Imamura H (2002) Complementary role of extracellular ATP and adenosine in ischemic preconditioning in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1810-1820
- Robson SC, Seevigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2: 409-430
- Koziak K (2002) CD39 (NTPDaza 1) – charakterystyka enzymu oraz jego rola w regulacji krzepnięcia i procesów zapalnych. *Post Biol Kom* 29: 15-25
- Zimmermann H, Braun N, Heine P, Kohring K, Marxen M, Seevigny J, Robson SC (2000) The molecular and functional properties of E-NT-

- PDase1, E-NTPDase2 and ecto-5'-nucleotidase in nervous tissue. W: VanDuffel L, Lemmens R (red) Ecto-ATPases and related ectonucleotidases. Shaker Publishing BV, Maastricht str. 9-20
24. Komoszyński M, Wojtczak A (1996) Apyrase (ATP diphosphohydrolase, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochem Biophys Acta* 1310: 233-241
  25. Osés JP, Cardoso CM, Albuquerque Germano R, Barreto Kirst J, Rucker B, Ribas Furstenau C, Wink MR, Bonan CD, Battastini AMO, Freitas Sarkis JJ (2004) Soluble NTPDase: an additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci* 74: 3275-3284
  26. Braun N, Fengler S, Ebeling C, Servos J, Zimmermann H (2000) Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *Biochem J* 351: 639-647
  27. Steinebrunner I, Jeter C, Song Ch, Roux SJ (2000) Molecular and biochemical comparison of two different apyrases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 38: 913-922
  28. Kegel B, Braun N, Heine P, Maliszewski CR, Zimmermann H (1997) An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neurpharm* 36: 1189-1200
  29. Nourizad N, Ehn M, Gharizadeh B, Hober S, Nyren P (2003) Methylophilic yeast *Pichia pastoris* as a host for production of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Prot Expr Purifi* 27: 229-23
  30. Atkinson B, Dwyer K, Enyaji K, Robson SC (2006) Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis* 36: 217-222
  31. Javed R, Yarimizu K, Pelletier N, Li Ch, Knowles AF (2007) Mutagenesis of lysine 62, asparagine 64, and conserved region 1 reduces the activity of human ecto-ATPase (NTPDase 2). *Biochemistry* 46: 6617-6627
  32. Ivanenkov VV, Murphy-Piedmonte DM, Kirley TL (2003) Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD39L2) nucleotidase; implications for structure and function. *Biochem* 42: 11726-11735
  33. Hicks Berger CA, Chadwick BP, Frischauf AM, Kirley TL (2000) Expression and characterization of soluble and membrane bound human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (CD39L2). *J Biol Chem* 275: 34041-34045
  34. Kukulski F, Komoszyński M (2002) E-NTPDazy – enzymy uczestniczące w procesach sygnalizacji w centralnym układzie nerwowym. *Post Biol Kom* 29: 449-463
  35. Murphy-Piedmonte DM, Crawford PA, Kirley TL (2005) Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase5 (CD39L4) ecto-nucleotidase. *Biochem Biophys Acta* 174: 251-259
  36. Murphy DM, Ivanenkov VV, Kirley TL (2002) Identification of cysteine residues responsible for oxidative cross-linking and chemical inhibition of human nucleoside-triphosphate diphosphohydrolase. *J Biol Chem* 277: 6121-6129
  37. Kirley TL, Crawford PA, Smith TM (2006) The structure of the nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) as revealed by mutagenic and computational modeling analyses. *Purin Sign* 2: 379-389
  38. Drosopoulos JHF (2002) Roles of Asp54 and Asp213 in Ca<sup>2+</sup> utilization by soluble human CD39/ecto-nucleotidase. *Arch Biochem Biophys* 406: 85-95
  39. Yang F, Hicks-Berger CA, Smith TM, Kirley TL (2001) Site-directed mutagenesis of human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3: the importance of residues in the apyrase conserved regions. *Biochem* 40: 3943-3950
  40. Zebisch M, Strater N (uzupełnić) (2008) Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 6882-6887
  41. Vlajkovic SM, Thorne PR, Seevigny J, Robson SC, Housley GD (2002) Distribution of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases 1 and 2 in rat cochlea. *Hear Res* 170: 127-138
  42. Escalada A, Navarro P, Ros E, Aleu J, Solsona C, Martín-Satué M (2004) Gadolinium Inhibition of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity in *Torpedo* Electric Organ. *Neuro Res* 29: 1711-1714
  43. Muller Ch E, Iqbal J, Baqi Y, Zimmermann H, Rollich A, Stephan H (2006) Polyoxometalates – a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors. *Bioorg Med Chem Let* 16: 5943-594
  44. Komoszyński MA (1996) Comparative studies on animals and plants (ATP diphosphohydrolase EC 3.6.1.5) with application of immunological techniques and various ATPase inhibitors. *Comp Biochem Physiol* 113B: 581-591
  45. Schmidt AP, Böhmer AE, Leke R, Schallenger C, Antunes C, Pereira MS, Wofchuk ST, Elisabetsky E, Souza DO (2008) Antinociceptive effects of intracerebroventricular administration of guanine-based purines in mice: evidences for the mechanism of action. *Brain Res* 1234: 50-58
  46. Kukulski F, Komoszyński M (2003) Purification and characterization of NTPDase1 (ecto-apyrase) and NTPDase2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes. *Eur J Biochem* 270: 3447-3454
  47. Alvarado-Castillo C, Harden TK, Boyer JL (2005) Regulation of P2Y1 receptor-mediated signaling by the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase isozymes NTPDase1 and NTPDase2. *Mol Pharmacol* 67: 114-122
  48. Ricatti MJ, Alfie LD, Lavoie EG, Sévigny J, Schwarzbach PJ, Faillace MP (2009) Immunocytochemical localization of NTPDases1 and 2 in the neural retina of mouse and zebrafish. *Synapse* 63: 291-307
  49. Vlajkovic SM, Thorne PR, Seévigny J (2002) NTPDase1 and NTPDase2 immunolocalization in mouse cochlea: Implications for regulation of P2 receptor signaling. *J Histochem Cytochem* 50: 1435-1441
  50. Schetinger MRC, Bonan CD, Schierholt R (1998) Nucleotide hydrolysis in rats submitted to global cerebral ischemia: A possible link between preconditioning and adenosine production. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 7: 281-286
  51. Belcher SM, Zsarnovszky A, Crawford PA, Hemani H, Spurling L, Kirley TL (2006) Immunolocalization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in rat brain: implications for modulation of multiple homeostatic systems including feeding and sleep-wake behaviors. *Neuroscience* 137: 1331-1346
  52. Vlajkovic SM, Housley GD, Munoz DJB (2004) Noise exposure induces up-regulation of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases 1 and 2 in rat cochlea. *Neuroscience* 126: 763-773
  53. Yano Y, Hayashi Y, Sano K, Shinmaru H, Kuroda Y, Yokozaki H, Yoon S, Kasuga M (2003) Expression and localization of ecto-nucleoside pyrophosphatase/phosphodiesterase I-3 (E-NPP3/CD203c/PD-1 $\beta$ /B10/gp<sup>130RB13-6</sup>) in human colon carcinoma. *Int J Mol Med* 12: 763-766
  54. Canani LH, Daniel PKN, Smiles A, Rogus JJ, Warram JH, Krolewski AS (2002) Polymorphism in ecto-nucleoside pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 gene (*ENPP1/PC-1*) and early development of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes* 51: 1188-1193
  55. Sakagami H, Aoki J, Natori Y, Nishikawa K, Kakehi Y, Natori Y, Arai H (2005) Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleoside pyrophosphatase/phosphodiesterase (NPP) family. *J Biol Chem* 280: 1-30
  56. Rucker B, Almeida ME, Libermann TA, Zerbini LF, Wink MR, Freitas Sarkis JJ (2007) Biochemical characterization of ecto-nucleoside pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP, E.C. 3.1.4.1) from rat heart left ventricle. *Mol Cell Biochem* 306: 247-254
  57. Gijsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M (2001) Structural and catalytic similarities between nucleoside pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 276: 1361-1368
  58. Stefan C, Jansen S, Bollen M (2005) NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci* 30: 542-550
  59. Terkeltaub R (2006) Physiologic and pathologic functions of the NPP nucleoside pyrophosphatase/phosphodiesterase family focusing on NPP1 in calcification. *Purinergic Signalling* 2: 371-377

60. Cimpean A, Stefan C, Gijsbers R, Stalmans W, Bollen M (2004) Substrate-specifying determinants of the nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases NPP1 and NPP2. *Biochem J* 381: 71-77
61. Gijsbers R, Ceulemans H, Bollen M (2003) Functional characterization of the non-catalytic ectodomains of the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase NPP1. *Biochem J* 371: 321-330
62. Stefan C, Jansen S, Bollen M (2006) Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purin Signal* 2: 361-370
63. Clair T, Lee HY, Lance LA, Stracke ML (1997) Autotaxin is an exoenzyme possessing 5'-nucleotide phosphodiesterase/ATP pyrophosphatase and ATPase activities. *J Biol Chem* 272: 996-1001
64. Umezū-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, Yamori T, Mills GB, Inoue K, Aoki J, Arai H (2002) Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* 158: 227-233
65. Lee J, Jung ID, Nam SW, Clair T, Jeong EM, Hong SY, Han JW, Lee HW, Stracke ML, Lee HY (2001) Enzymatic activation of autotaxin by divalent cations without EF-hand loop region involvement. *Biochem Pharma* 62: 219-224
66. Vollmayer P, Clair T, Goding JW, Sano K, Servos J, Zimmermann H (2003) Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. *Eur J Biochem* 270: 2971-2978
67. Gijsbers R, Aokib J, Araib H, Bollen M (2003) The hydrolysis of lysophospholipids and nucleotides by autotaxin (NPP2) involves a single catalytic site. *FEBS Lett* 538: 60-64
68. Komoszyński MA (1994) Apirazy – enzymy kontrolujące stężenie wolnych nukleotydów w komórkach i tkankach. *Postepy Biochem* 40: 174-181
69. Subburaj K (2003) E-NTPase/E-NTPDase: a potential regulatory role in E-kinase/PKA-mediated CD36 activation. *Cell Biol Int* 27: 153-163
70. Valenzuela JG, Charlab R, Galperin MY, Ribeiro JMC (1998) Purification, Cloning, and Expression of an Apyrase from the Bed Bug *Cimex lectularius*. *J Biol Chem* 273: 30583-30590
71. Valenzuela JG, Belkaid Y, Rowton E, Ribeiro JMC (2001) The Salivary Apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel *Cinex* family of apyrases. *J Exp Biol* 204: 229-237
72. Smith TM, Hicks-Berger CA, Kim S, Kirley TL (2002) Cloning, expression, and characterization of a soluble calcium-activated nucleotidase, a human enzyme belonging to a new family of extracellular nucleotidases. *Arch Biochem Biophys* 406: 105-115
73. Sun D, McNicol A, James AA, Peng Z (2006) Expression of functional recombinant mosquito salivary apyrase: a potential therapeutic platelet aggregation inhibitor. *Platelets* 17: 178-184
74. Yang M, Kirley TL (2008) Engineered human soluble calcium-activated nucleotidase inhibits coagulation *in vitro* and thrombosis *in vivo*. *Thromb Res* 122: 541-548
75. Latini S, Pedata F (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79: 463-484
76. Dixon KA, Gubituz AK, Sirinathsinghji DJS, Richardson PJ, Freeman TC (1996) Tissue distribution of adenosine receptor messenger-RNAs in the rat; *B J Pharmacol* 118: 1461-1468
77. Björklund O, Shang M, Tonazzini I, Daré E, Fredholm BB (2008) Adenosine A1 and A3 receptors protect astrocytes from hypoxic damage. *Eur J Pharmacol* 596: 6-13
78. Jacobson KA, Hoffmann C, Cattabeni F, Abbracchio MP (1999) Adenosine-induced cell death: evidence for receptor-mediated signaling. *Apoptosis* 4: 197-211
79. Schubert P, Ogata T, Marchini C, Ferroni S, Rudolph K (1999) Protective mechanisms of adenosine in neurons and glial cells. *Ann N Y Acad Sci* 825: 1-10
80. Barsotti C, Ipata PL (2004) Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2214-2225
81. Brundege J, Dunwiddie T (1997) Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central Nervous System. *Adv Pharmacol* 59: 353-383
82. Wardas J (2002) Neuroprotective role of adenosine in CSN. *Pol J Pharmacol* 54: 313-326
83. Zalewska-Kasubaska J (2002) Rola adenozyiny w procesach neurodegeneracyjnych. *Neurol Neurochir Pol* 26: 399-336

## The role of ectonucleotides metabolizing enzymes in purinergic signaling

Dorota Porowska, Joanna Czarnecka, Michał Komoszyński✉

Department of Biochemistry, Institute of General and Molecular Biology, Faculty of Biology and Earth Sciences, Nicolaus Copernicus University, 9 Gagarina St., 87-100 Torun, Poland

✉e-mail: michkom@chem.uni.torun.pl

**Key words:** NPPase, NTPDase, ectonucleotidase, ectonucleotide

### ABSTRACT

Purinergic signaling plays an important role in the regulation of many physiological processes. The concentration of nucleotides in extracellular space is controlled by at least two families of nucleotidases: NPPases and NTPDases. These families are examples of convergent evolution of proteins. Above enzymes are not phylogenetically related, but they catalyze the same type of reaction. They hydrolyzed tri- and diphosphonucleosides to monophosphonucleosides and orthophosphate or pyrophosphate. This degradation terminates the nucleotide signaling process and also produces other signaling molecules like ADP, and with 5'-nucleotidase, adenosine. Most of known animal NPPases and NTPDases were found as membranous ectoenzymes or soluble proteins localized in tissue fluids. The aim of this work is to provide information about localization, structure, properties and function of NPPases and NTPDases in the regulation of extracellular concentration of nucleotides and purinergic signaling.

# Kompleks dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej i wielopłaszczyznowa regulacja aktywności kompleksu

Adam Tylicki<sup>1,✉</sup>

Victoria I. Bunik<sup>2</sup>

Sławomir Strumiło<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Cytobiochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, Białystok;

<sup>2</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow Lomonosov State University, 119992 Moscow, Russian Federation

✉Zakład Cytobiochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, ul. Świerkowa 20B, 15-950 Białystok; e-mail: atyl@uwb.edu.pl

Artykuł otrzymano 14 czerwca 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 29 września 2010 r.

**Słowa kluczowe:** ATP, cykl kwasów trójkarboksylowych, pirofosforan tiaminy, FAD, jony metali dwuwartościowych, kompleks wieloenzymowy, kwas liponowy, NADH

**Wykaz skrótów:** E1 – dehydrogenaza 2-oksoglutaranowa (pierwszy enzym kompleksu); E2 – transferaza sukcyndioliponianowa (drugi enzym kompleksu); E3 – dehydrogenaza dihydroliponianowa (trzeci enzym kompleksu); OGDHC – kompleks dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej (ang. *2-oxoglutarate dehydrogenase complex*); Pi – fosforan nieorganiczny;  $S_{0.5}$  – stężenie substratu warunkujące osiągnięcie połowy prędkości maksymalnej reakcji katalizowanej przez enzym; TPP – pirofosforan tiaminy (ang. *thiamine pyrophosphate*)

## STRESZCZENIE

Enzymy są odpowiedzialne za szybki i skoordynowany przebieg reakcji biochemicznych, wśród których szczególnie istotną rolę odgrywają te związane z zaspokojeniem potrzeb energetycznych komórki. Do takich właśnie biokatalizatorów należy kompleks dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej (OGDHC) będący kluczowym ogniwem cyklu Krebsa, który integruje podstawowe szlaki przemian węglowodanów, kwasów tłuszczowych oraz aminokwasów zarówno w kierunku katabolicznym, jak też anabolicznym. Ze względu na ważną pozycję aktywność OGDHC jest wielostronnie kontrolowana. Służy temu przede wszystkim mechanizm regulacji allosterycznej z udziałem efektorów dodatnich, takich jak ADP, Pi,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  silnie zwiększających powinowactwo pierwszego enzymu kompleksu do 2-oksoglutaranu, oraz inhibitorów: ATP, NADH, sukcynto-CoA wpływających na wszystkie trzy enzymy kompleksu. Oprócz szybkiej regulacji izosterycznej i allosterycznej aktywność OGDHC zależy od tempa biosyntezy jego poszczególnych składników związanego z ekspresją odpowiednich genów, a także od potranslacyjnych modyfikacji składników kompleksu. Wszystkie te procesy utrzymują odpowiedni stan dynamicznej równowagi procesu katalizowanego przez OGDHC, co w niektórych sytuacjach metabolicznych chroni go przed negatywnymi skutkami nadmiernej aktywności.

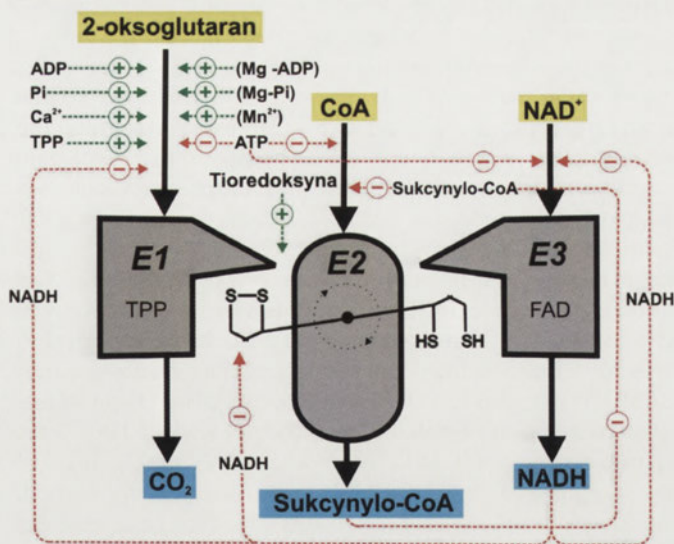
## WPROWADZENIE

Przemiany enzymatyczne związane z kluczowymi metabolitami usytuowanymi na skrzyżowaniu podstawowych szlaków metabolicznych podlegają swojej i wielopłaszczyznowej kontroli. Jednym z takich metabolitów jest 2-oksoglutaran, ważny substrat przy generowaniu NADH w cyklu Krebsa. Proces ten pośrednio przyczynia się do przepływu elektronów oraz powstawania siły protonomotorycznej w mitochondriach, czego wynikiem jest synteza ATP [1-4]. OGDHC dzięki katalizowaniu jednej z głównych, nieodwracalnych reakcji utleniania w cyklu Krebsa, w której 2-oksoglutaran zostaje przekształcony w sukcynto-CoA, ma swoje znaczenie w ogólnej kontroli metabolizmu. Reakcja ta należy bowiem do zachowanych w ewolucji podstawowych przemian, odgrywających ważną rolę w adaptacjach organizmów żywych. Badając rolę OGDHC w różnych rodzajach komórek można dostrzec, że prócz regulacji przemian cyklu Krebsa kompleks ten przyczynia się do tak ważnych dla funkcjonowania komórki procesów jak: produkcja wolnych rodników, przemiany azotowe, synteza hemu, zapobieganie niekorzystnemu działaniu glutaminianu na neurony, odpowiedź na zranienia u roślin [5]. Mutacje prowadzące do syntezy nieaktywnego OGDHC są letalne już w okresie embrionalnym [6], a te, które znacznie obniżają jego aktywności powodują głębokie zmiany homeostazy komórek [7], zwłaszcza neuronów, wywołując schorzeniach neurodegeneracyjne jak choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona, syndrom Wernickiego-Korsakoffa i inne [8,9]. Utrzymywanie należytej aktywności tego kompleksu jest więc szczególnie istotne w ochronie neuronów podczas działania różnego rodzaju czynników neurotoksycznych [8,10,11]. Tempo utleniania 2-oksoglutaranu przez OGDHC ma więc kluczowe znaczenie dla metabolizmu wszystkich komórek, a szczególnie dla procesów zachodzących w układzie nerwowym, co ma bezpośredni wpływ na kondycję organizmu. Dlatego OGDHC staje się obecnie ważnym obiektem w kontekście rozwiązywania niektórych problemów medycznych. W celu pełnego wykorzystania możliwości katalityczno-regulacyjnych OGDHC należy głębiej poznać i zrozumieć mechanizmy jego funkcjonowania w komórkach.

Poszczególne rozdziały niniejszego artykułu przedstawiają aktualną wiedzę z zakresu enzymologii, akcentując mechanizmy regulacji OGDHC, które pozwalają komórce modulować jego aktywność zgodnie z bieżącymi potrzebami (Ryc. 1). Z wiedzy tej wyłaniają się potencjalne możliwości sterowania aktywnością kompleksu w warunkach doświadczalnych. Możliwości te już w niedalekiej perspektywie mogą zostać wykorzystane w praktyce klinicznej podczas terapii chorób neurodegeneracyjnych, nowotworowych i innych.

## PODSTAWY STRUKTURY I FUNKCJONOWANIA OGDHC

OGDHC należy do rodziny wieloenzymowych kompleksów dehydrogenaz 2-oksokwasów i jest obecny zarówno u organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych. Mimo subtelnych różnic w budowie katalizuje on ten sam proces u wszystkich organizmów żywych (Tab. 1). Sferyczną strukturę kompleksu tworzą powtarzalne kopie dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej (E1, EC 1.2.4.2), transferazy sukcylnodihydroliponianowej (E2, EC 2.3.1.61) i dehydrogenazy dihydroliponianowej (E3, EC 1.8.1.4). Budowa przestrzenna OGDHC nie jest jednak absolutnie uniwersalna i często wykazuje różnice specyficzne tkankowo i gatunkowo. U bakterii rdzeń kompleksu zbudowany jest z 24 cząsteczek enzymu E2 tworzących oktaedr, natomiast ilościowy udział enzymów E1 i E3 może być różny w zależności od źródła i sposobu izolacji. U ssaków kompleks składa się najczęściej z sześciu homodimerów E1 i sześciu homodimerów E3 [12]. W związku z tym sposób ostatecznej konstrukcji OGDHC może mieć znaczenie regulacyjne, gdzie ważną rolę odgrywa liczba powierzchniowych cząsteczek E1 i E3 otaczających rdzeń kompleksu [13]. Przykładowo, nowo opisana forma molekularna OGDHC z mózgu ma odmienny stosunek poszczególnych enzymów składowych od formy wyizolowanej z serca [13]. Funkcjonowanie kompleksu wymaga zaangażowania aż pięciu kofaktorów: TPP, kwasu liponowego, CoA, FAD i NAD<sup>+</sup>. Produkty procesu katalizowanego przez ten kompleks powstają w wyniku sekwencyjnych reakcji, w których kolejno działają poszczególne jego enzymy. OGDHC przekształca 2-oksoglutaran do sukcylny-CoA z wykorzystaniem koenzymu A oraz NAD<sup>+</sup> po stronie substratów i wytworzeniem NADH+H<sup>+</sup> i CO<sub>2</sub> po stronie produktów (Ryc. 2). W procesie katalizy jako koenzymy, uczestniczą: TPP połączony z enzymem E1 kompleksu, grupa liponianowa wbudowana w strukturę enzymu E2 i FAD związany z enzymem E3. Należy podkreślić, że reakcja katalizowana przez OGDHC jest jednym z dwóch, obok dehydrogenazy izocytrynianowej, najistotniejszych ogniw regulacji cyklu Krebsa [12]. Uświadamiając sobie kluczową rolę cyklu Krebsa w metabolizmie komórki, zrozumiały stają się sens mnogości i wielopoziomowości mechanizmów regulacji OGDHC (Ryc. 1).



Rycina 1. Czynniki istotne w regulacji kompleksu dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej u kręgowców. E1 – dehydrogenaza 2-oksoglutaranowa (pierwszy enzym kompleksu); E2 – transferaza sukcylnodihydroliponianowa (drugi enzym kompleksu); E3 – dehydrogenaza dihydroliponianowa (trzeci enzym kompleksu); żółte tło – substraty; niebieskie tło – produkty funkcjonowania kompleksu; zielone strzałki ze znakiem „+” – działanie aktywujące wiązanie substratów i katalizowane reakcje; czerwone strzałki ze znakiem „-” – działanie hamujące wiązanie substratów i katalizowane reakcje.

## REGULACJA BIOSYNTETYZU KOMPONENTÓW OGDHC

U organizmów prokariotycznych geny kodujące enzymy E1 i E2 kompleksu wchodzi w skład jednego operonu, w związku z czym ich ekspresja jest kontrolowana wspólnie [14-15]. Gen enzymu E3 może wchodzić w skład tego samego operonu lub niezwiązanej z nim sekwencji DNA [14]. Transkrypcja genów poszczególnych enzymów OGDHC u drożdży podlega wspólnym mechanizmom regulacji [16]. Białka regulatorowe HAP2 i HAP3 są aktywatorami transkrypcji genów wszystkich enzymów kompleksu. U eukariotów geny kodujące poszczególne enzymy OGDHC są zlokalizowane w genomie jądrowym i mogą być rozmieszczone na różnych chromosomach. Procesy regulacji ekspresji tych genów jak dotąd są poznane w małym stopniu. W przypadku dobrze zbadanego enzymu E1 OGDHC z serca człowieka, kodowanego przez gen zlokalizowany na 7 chromosomie wiadomo,

Tabela 1. Porównanie niektórych właściwości kompleksu dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej u bakterii i organizmów eukariotycznych.

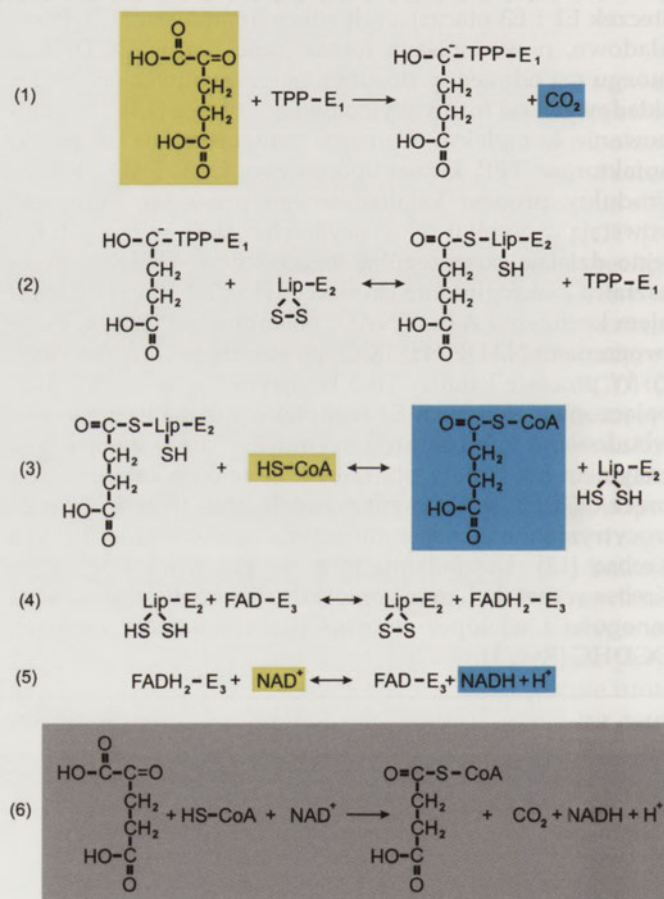
Cecha	Bakterie	Organizmy eukariotyczne	Piśmiennictwo
struktura rdzenia	24 podjednostki E2	24 podjednostki E2	[12,30]
właściwości kinetyczne E1	hamowanie przy wysokich stężeniach 2-oksoglutaranu	niewrażliwy na wysokie stężenia 2-oksoglutaranu (ssaki)	[24,59]
właściwości regulacyjne E1	aktywowany przez AMP	aktywowany przez ADP	[30,63]
lokalizacja genów	geny kodujące E1 i E2 ułożone w tym samym operonie, E3 może być w innym operonie	wszystkie geny w genomie jądrowym, u człowieka E1 i E3 na chromosomie 7, E2 na chromosomie 14	[14,15,17,18]
wiązanie TPP	nietrwałe, podczas izolacji kompleks traci TPP	podczas izolacji z roślin kompleks traci TPP, zwierzęcy OGDHC utraykuje koenzym	[24]
aktywacja liponianu przed wbudowaniem	przez ATP	przez GTP (u ssaków)	[46,47]
wbudowywanie liponianu	wymaga aktywności jednego enzymu: Lp1A	wymaga współdziałania dwóch enzymów: LAE i transferazy liponianowej	[46,47]
wpływ Ca <sup>2+</sup>	brak aktywacji	u ssaków aktywacja, u owadów i roślin brak aktywacji	[62,63,68]

że glutaminian, którego stężenie w komórce jest związane z dostępnością 2-oksoglutaranu, jest aktywatorem transkrypcji tego genu. Kluczowy koenzym kompleksu, TPP oraz wolna tiamina i jej analogi, jak również cAMP, deksametazon, mleczan i metabolity cyklu Krebsa z wyjątkiem 2-oksoglutaranu, nie wykazują istotnego wpływu na poziom transkrypcji genu kodującego enzym E1 kompleksu [17]. Ekspresja zlokalizowanego na 14 chromosomie genu kodującego enzym E2 OGDHC człowieka jest regulowana przez efekторы reagujące na glukokortykoidy, cAMP i czynnik transkrypcyjny Sp1 [18]. Gen kodujący enzym E3 OGDHC człowieka jest zlokalizowany na chromosomie 7. Promotor tego genu posiada sekwencje odpowiadające budowę miejscom reagującym na białka związane z cAMP. Wykazano również możliwość regulacji ekspresji tego genu niezwiązaną z białkami reagującymi z cAMP [19]. Zostały ustalone warunki, w których ekspresja genów kodujących poszczególne enzymy OGDHC ulega zasadniczym zmianom. W przypadku *E. coli* zaobserwowano 5-krotne obniżenie ekspresji genu kodującego enzym E3 w warunkach beztlenowych. Proces ten przebiega pod kontrolą białkowych regulatorów transkrypcji (FNR, ang. *ferric nitrite reductase* i ArcAB, ang. *aerobic respiratory control 2-component system*) odpowiedzialnych za przełączanie metabolizmu tlenowego i beztlenowego. U mutantów *E. coli* pozbawionych FNR i ArcAB odnotowano istotny wzrost ekspresji genu kodującego enzym E3 nawet w warunkach beztlenowych [20]. W mitochondriach wątroby szczurów poddawanych działaniu etanolu ekspresja genu kodującego enzym E1 wzrastała trzykrotnie [21]. Zawartość enzymu E2 była dwukrotnie większa w sercach szczurów poddawanych treningowi fizycznemu [22], natomiast chroniczny brak potasu w diecie powodował dwukrotny wzrost ekspresji genu kodującego enzym E3 w mięśniach szkieletowych [23]. W rozważaniach nad regulacją aktywności OGDHC należy brać pod uwagę występowanie podobnego enzymu E3 we wszystkich kompleksach dehydrogenaz 2-oksokwasów. Aby ocenić znaczenie ekspresji genu kodującego enzym E3 w aktywności konkretnych kompleksów, należy brać pod uwagę różne powinowactwo enzymu E3 do tych kompleksów. W badaniach nad organizmami prokariotycznymi wykazano, że bakteryjny OGDHC wiąże enzym E3 z około 30 razy mniejszym powinowactwem w porównaniu z kompleksem dehydrogenazy pirogronianowej [24]. Wynika z tego, że ograniczenie ekspresji genu kodującego enzym E3 może być bardzo wydajną metodą obniżenia aktywności OGDHC na zasadzie konkurencji w wiązaniu dostępnych cząsteczek enzymu E3 przez wszystkie trzy kompleksy dehydrogenaz 2-oksokwasów.

#### REGULACJA AKTYWNOŚCI OGDHC POPRZEZ WIĄZANIE KOFAKTORÓW

Jednym z głównych koenzymów OGDHC jest pirofosforan tiaminy (TPP). Kompleks wyizolowany z bakterii i roślin zazwyczaj traci związany TPP podczas procedury izolacji i oczyszczenia, podczas gdy kompleks pochodzący z tkanek zwierzęcych utrzymuje związany TPP [24]. Kompletny OGDHC stabilniej wiąże TPP w porównaniu z wyizolowanym enzymem E1. Oczyszczony enzym E1 zachowuje TPP w około połowie centrów aktywnych. Przykładowo, w wyizolowanym E1 z serca świni [25] zawartość TPP wynosiła 0,5-0,6 mola/mol enzymu, a wzbogacenie mieszaniny reakcyjnej egzogennym TPP powodowało dwukrotny wzrost aktywności enzymu E1. Wyniki uzyskiwane przez różnych autorów

wskazują na różne powinowactwo centrów aktywnych dimerycznego E1 do TPP [26-28]. Oprócz bezpośredniego wpływu na aktywność kompleksu jako koenzymu w centrach aktywnych enzymu E1, TPP zmienia również kształt krzywej kinetycznej wysycania kompleksu przez 2-oksoglutaran. Badania przeprowadzone na OGDHC z serca żubra wykazały, że uzupełnienie mieszaniny reakcyjnej TPP w odpowiednim stężeniu znacząco przyspiesza początkową prędkość reakcji przy niskich stężeniach 2-oksoglutaranu (wartość  $S_{0.5}$  dla 2-oksoglutaranu obniżała się trzykrotnie w obecności egzogennego TPP przy jednoczesnym braku różnic w wartości  $V_{max}$  [29]). Wpływ TPP na funkcjonowanie OGDHC jest skorelowany z dostępnością ADP. Wzbogacenie mieszaniny reakcyjnej w ADP powoduje zniesienie efektu TPP. Wyniki te wskazują, że TPP i ADP mogą wpływać na wiązanie 2-oksoglutaranu w centrum aktywnym E1 poprzez wbudowanie się do sąsiadujących lub częściowo wspólnych centrów allosterycznych kompleksu. Centra te mogą się znajdować w cząsteczce enzymu E1 OGDHC [29]. Obecność centrum allosterycznego specyficznego dla nukleotydów adenylowych w cząsteczce E1 została



Rycina 2. Sekwencja reakcji katalizowanych przez poszczególne enzymy kompleksu dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej. Reakcje 1 i 2 są katalizowane przez dehydrogenazę 2-oksoglutaranową (E1). Reakcja 3 jest katalizowana przez transferazę sukcynylodihydroliponianową (E2). Reakcje 4 i 5 są katalizowane przez dehydrogenazę dihydroliponianową (E3). Reakcja 6 przedstawia sumaryczny bilans przemian zachodzących podczas aktu katalitycznego kompleksu. Żółtym tłem zaznaczono substraty; niebieskim – końcowe produkty. 1 – reakcja oksydacyjnej dekarboksylacji 2-oksoglutaranu z udziałem pirofosforanu tiaminy (TPP). 2 – reakcja przeniesienia grupy sukcynylowej na liponian. 3 – przeniesienie grupy sukcynylowej z liponianu na CoA z wytworzeniem sukcynyl-CoA i dihydroliponianu. 4 – odtworzenie utlenionej formy liponianu przy udziale FAD jako akceptora elektronów. 5 – reakcja redukcji  $\text{NAD}^+$  przy udziale elektronów z FAD z wytworzeniem NADH i utlenionej formy FAD.



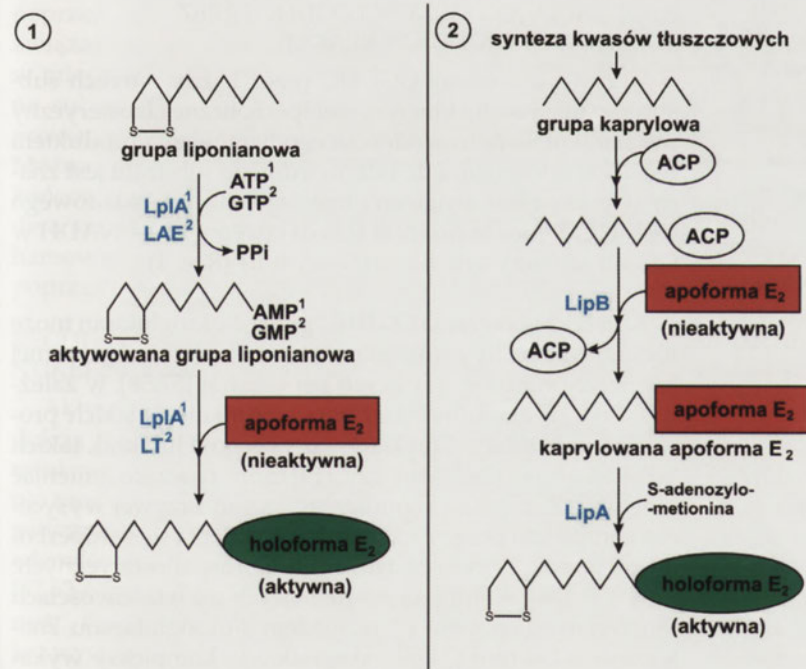
ostatnio potwierdzona doświadczalnie w badaniach strukturalnych tego enzymu [30]. Oprócz danych kinetycznych, za występowaniem w cząsteczce E1 centrum allosterycznego specyficznego dla TPP, przemawiają dane uzyskane w badaniach z zastosowaniem dichroizmu kołowego [31]. Przytoczone wyniki wskazują, że TPP oprócz dobrze znanej funkcji jako koenzymu odgrywa również rolę efektora allosterycznego enzymu E1 OGDHC. Najnowsze odkrycia sugerują, że oprócz TPP inna pochodna tiaminy, adenylowany pirofosforan tiaminy (niedawno zidentyfikowany związek powstający z połączenia TPP z adeniną [32]) może, oprócz przypisywanych mu właściwości cząsteczki sygnałowej, pełnić także rolę regulatora allosterycznego OGDHC [32].

Badania oddziaływań TPP i jego strukturalnych analogów z OGDHC są bardzo istotne w aspekcie poznawczym, ale mogą mieć również praktyczne znaczenie w medycynie. Według danych niektórych autorów od 30% do 80% alkoholików jest dotkniętych niedoborem tiaminy [33]. Badania nad enzymami zależnymi od tiaminy z mózgu alkoholików wskazują na obniżenie aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej i transketolazy, efektu takiego nie stwierdzono zaś w przypadku OGDHC [34]. Inna sytuacja ma miejsce w doświadczeniach, w których u zwierząt wywoływano stany niedoboru tiaminy przez podawanie im analogów tej witaminy. Wiązanie analogu przez enzym powinno być wprost proporcjonalne do powinowactwa tego enzymu do TPP. Wysokie powinowactwo

enzymu E1 do TPP powinno czynić OGDHC wrażliwym na hamowanie przez analogi tiaminy mogące zastępować TPP w centrach aktywnych E1. W warunkach podawania zwierzętom analogów tiaminy OGDHC często reaguje jako pierwszy z enzymów zależnych od tiaminy [35,36]. Preferencyjne hamowanie OGDHC w tkankach zwierzęcych może być uzależnione od sposobu podawania analogów tiaminy. Podczas gdy pojedyncza wysoka dawka oksytiaminy prowadzi do zahamowania aktywności OGDHC, to długotrwałe podawanie oksytiaminy zwierzętom w małych dawkach powoduje hamowanie transketolazy i kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej przy braku reakcji ze strony OGDHC [37]. Różnice w reakcji na analogi tiaminy mogą wynikać z różnic w mechanizmach hamowania enzymów zależnych od TPP. Działanie analogów tiaminy w znacznej mierze zależy od zdolności organizmu do ich fosforylacji i późniejszego wbudowania w centra aktywne enzymów. Natomiast niedobór tiaminy powoduje braki w zaopatrzeniu komórki w koenzym w postaci TPP. W przeciwieństwie do braku tiaminy, podawanie jej analogów powoduje konkurencję pomiędzy TPP a analogami w trakcie włączania do centrów aktywnych apoformy enzymów. Oksytiamina jako antymetabolit tiaminy może być łatwo fosforylowana w warunkach *in vivo*, pirytyamina była uważana za związek, który hamuje aktywność pirofosfokinazy tiaminy. Jednak ostatnio stwierdzono, że pirytyamina może być również fosforylowana *in vivo* [38]. Oba wspomniane analogi tiaminy

mogą być więc przekształcane w nieaktywny biologicznie koenzym i po włączeniu w strukturę enzymu hamować jego aktywność, szczególnie w przypadkach, gdy duża pula enzymu w komórkach występuje w postaci apoformy. Biorąc również pod uwagę także inne funkcje TPP należy przypuszczać, że ufosforylowane analogi tiaminy mogą oddziaływać z centrum allosterycznym enzymu E1, wpływając także w ten sposób na funkcjonowanie OGDHC. W odróżnieniu od faktycznego niedoboru tiaminy w diecie, efekt uzyskiwany doświadczalnie przez podawanie *in vivo* jej analogów może sprzyjać występowaniu zjawiska preferencyjnego hamowania aktywności OGDHC wynikającego z wysokiego powinowactwa E1 do koenzymu. Nie jest to zazwyczaj brane pod uwagę podczas interpretacji wyników badań aktywności OGDHC u alkoholików z syndromem Wernicke-Korsakoff'a [39], jak też przy modelowaniu hipowitaminozy B<sub>1</sub> u szczurów poprzez podawanie pirytyminy [35] i innych antymetabolitów tiaminy [40-42].

Grupa liponianowa jest kowalencyjnie związana poprzez grupę aminową ε reszty lizyny z drugim enzymem (E2) OGDHC. Komórkowy system kontroli włączania grupy liponianowej w łańcuchy białkowe E2 ma znaczenie regulatorowe dla OGDHC. Obecność genów o podobnych sekwencjach nukleotydów [43], wznowienie syntezy kwasu liponowego u mutantów *LipA E. coli*, pozbawionych możliwości jego syntezy, przez implantację genu *LIP1* myszy [44], jak też dane dotyczące funkcjonowania transferaz liponianowych [45,46] wskazują na podobieństwa w sposobie wbudowywania liponianu



**Rycina 3.** Wbudowywanie grupy liponianowej w strukturę enzymu E2 kompleksu dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej. Kolorem niebieskim oznaczono enzymy biorące udział w procesie. 1 – proces wbudowywania grupy liponianowej w strukturę E2 przy obfitości liponianu w komórce. W przypadku organizmów prokariotycznych (1) obie reakcje procesu katalizuje ten sam enzym LpIA (ang. *lipoyl-protein ligase*), a liponian jest wstępnie aktywowany przez ATP. W przypadku organizmów eukariotycznych (2) każdy etap jest katalizowany przez inny enzym. Aktywacja grupy liponianowej przez GTP jest katalizowana przez enzym LAE (ang. *lipoyl-activating enzyme*) natomiast przeniesienie liponianu na apoformę E2 katalizuje transferaza liponianowa (LT). 2 – proces wbudowania grupy liponianowej w strukturę E2 przy ograniczonym dostępie liponianu w komórce. Grupa liponianowa jest syntetyzowana z wykorzystaniem łańcucha węglowodorowego kaprylanu dostarczanego do apoformy E2 przez przenośnik ACP (ang. *lipoyl-acyl carrier protein*) z udziałem enzymu LipB (ang. *lipoyl-octanoyl-ACP-protein lipotransferase*), następnie enzym LipA (syntetaza liponianowa) wprowadza atomy siarki do łańcucha węglowodorowego wykorzystując S-adenosylometioninę.

w strukturę cząsteczki E2 u ssaków i bakterii. Wszystko to świadczy o ewolucyjnej zachowawczości tego procesu. Istnieją dwie możliwości włączenia liponianu do OGDHC (Ryc. 3). Pierwsza z nich polega na wbudowaniu liponianu w cząsteczkę E2. U *E. coli* reakcja ta jest katalizowana przez jeden enzym kodowany przez gen *Lp1A*, podczas gdy u ssaków wymaga współdziałania dwóch różnych enzymów [46]. Wstępnie grupa liponianowa jest aktywowana przez ATP u bakterii [47] lub GTP u ssaków [46]. Następnie grupa liponianowa ze związku „liponian-AMP” lub „liponian-GMP” o wysokiej energii swobodnej jest włączana w strukturę E2. Druga możliwość jest realizowana w warunkach ograniczonej dostępności liponianu. Wtedy koenzym ten powstaje z przenoszonej na E2 za pomocą transportera białkowego ACP (ang. *lipoyl-acyl carrier protein*) reszty kwasu tłuszczowego, kaprylanu. Następnie, wykorzystując S-adenozylometioninę syntaza liponianowa zawierająca grupę Fe-S (enzym kodowany przez *LipA* u *E. coli* lub *LIP1* u myszy), wprowadza siarkę do ośmiowęglowej domeny. Ta druga droga wprowadzania kofaktora do enzymu E2 OGDHC jest szczególnie wrażliwa na uszkodzenia wywołane oksydantami [47]. Proces wprowadzania liponianu do OGDHC może być niezwykle istotny w powstawaniu stanów patologicznych, u podłoża których leży ograniczanie aktywności OGDHC. Usuwanie liponianu z podjednostek E2 OGDHC jest katalizowane przez lipoamidazę. Jednak enzym ten wyizolowany z tkanek ssaków nie był aktywny wobec liponianu związanego z białkiem, lecz hydrolizował *in vitro* połączenie liponianu z lizyną [48]. Wyniki te wskazują, że w przypadku ssaków kwestia uwalniania liponianu z OGDHC pozostaje otwarta. Zakładając jednak zgrane działanie lipoamidaz i układów enzymatycznych wprowadzających liponian do OGDHC, można dostrzec potencjalną zdolność komórki do naprawy cząsteczek E2 uszkodzonych przez czynniki utleniające. Jeżeli uszkodzone grupy liponianowe będą usuwane z kompleksu i zamieniane na grupy prawidłowe, może to być skuteczny mechanizm reparacyjny nie wymagający proteolitycznej degradacji całych podjednostek E2, w których oksydacyjne uszkodzenia dotyczyły tylko grup liponianowych. Oprócz regulacji aktywności OGDHC poprzez wbudowywanie grup liponianowych do E2, regulacyjna rola liponianu ujawnia się również w udziale kompleksu w reakcjach związanych z wytwarzaniem i eliminacją wolnych rodników [49].

Wolne rodniki cieszą się wznrastającym zainteresowaniem z powodu ich udziału w przekazywaniu sygnałów w komórce, różnicowaniu, apoptozie i starzeniu komórek [50,51]. Jednym z generatorów wolnych rodników w komórce może być OGDHC [49,50,52]. Wytwarzanie anionorodników ponadtlenkowych z wykorzystaniem NADH przez izolowany enzym E3 jest procesem znanym od dawna [49]. Reakcja ta jest regulowana przez dostępność jonów  $Zn^{2+}$ , których homeostaza jest zaburzona w przypadkach chorób neurodegeneracyjnych. OGDHC jest w stanie generować anionorodniki ponadtlenkowe podczas reakcji oksydacyjnej dekarboksylacji 2-oksoglutaranu. Reakcja zachodzi przy braku  $NAD^+$ , co prowadzi do redukcji liponianu związanego z OGDHC. Produkt tej reakcji, rodnik siarczkowy dihydroliponianu może być wykorzystany przez odpowiednią dysmutazę zwaną tioredoksyną [53,54]. Takie właściwości katalityczne pozwalają tioredoksynie zapobiegać inaktywacji OGDHC przez rodniki tiolowe pochodzące z liponianu [49]. W związku z tym zależna od tioredoksyny

reakcja pozwala OGDHC zachować aktywność przy niedoborach  $NAD^+$  [54]. Może to mieć istotne znaczenie podczas dostarczania sukcyńlo-CoA do biosyntezy hemu i substratowej fosforylacji nukleotydów adenylowych i guanydylowych przy ograniczonej produkcji NADH. Odwracalne oddziaływanie grup liponianowych kompleksu z biologicznie aktywnymi związkami tiolowymi, takimi jak glutation, wykazują działanie ochronne w stosunku do formowania rodników tiolowych z grup liponianowych i innych niekorzystnych modyfikacji tych grup [55]. Glutationylacja liponianu związanego z OGDHC zachodzi podczas traktowania nadtlenkiem wodoru mitochondriów z tkanek szczura. Reakcja taka może chronić kompleks przed utratą aktywności spowodowaną wolnorodnikowymi uszkodzeniami koenzymów, a także powodować częściowe odzyskanie utraconej aktywności [55].

Innym kofaktorem uczestniczącym w procesie katalizowanym przez OGDHC jest FAD wbudowany niekowalencyjnie do enzymu E3. Wiązanie to jest jednak trwałe, ponieważ wyizolowany kompleks nie wymaga wprowadzenia egzogenego FAD do mieszaniny reakcyjnej, aby osiągnąć  $V_{max}$ . Wbudowanie FAD w podjednostki E3 jest kluczowym etapem formowania dimeru, który jest aktywną formą enzymu E3 [56]. FAD można usunąć z E3 poprzez denaturację chlorkiem guanidyny. Po uwolnieniu koenzymu dimer ulega rozpadowi na monomery, które po wprowadzeniu FAD do mieszaniny reakcyjnej ponownie formują aktywne dimery.

#### REGULACJA AKTYWNOŚCI OGDHC PRZEZ SUBSTRATY I PRODUKTY REAKCJI

Krzywe wysycania OGDHC przez każdy z trzech substratów mają cechy kinetyki niehiperbolicznej. Izosteryczny mechanizm współzawodniczącego hamowania produktem reakcji w odniesieniu do odpowiedniego substratu jest znany w przypadku drugiego i trzeciego enzymu składowego OGDHC. Ponadto produkt reakcji enzymu E3 – NADH w sposób allosteryczny hamuje enzym E1 (Ryc. 1).

Kinetyka wysycania OGDHC przez 2-oksoglutaran może wykazywać cechy zarówno pozytywnej, jak też negatywnej kooperacji centrów wiążących ten substrat [57,58], w zależności od źródła kompleksu oraz warunków w jakich prowadzono pomiary. Przykładowo, obecność lub brak takich kofaktorów jak  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  czy TPP może znacząco zmieniać kinetykę. Zazwyczaj sigmoidalny kształt krzywej wysycenia kompleksu przez 2-oksoglutaran zmienia się w hiperboliczny pod wpływem dodatnich efektorów allosterycznych: ADP i  $P_i$  [58]. Kompleksy o różniących się właściwościach kinetycznych enzymu E1 względem 2-oksoglutaranu znaleziono u bakterii [24,59]. Wszystkie te kompleksy wykazywały hamowanie aktywności przy wysokich (0,5–5 mM) stężeniach tego substratu. Podobnego efektu nie stwierdzano w przypadku OGDHC pochodzącego z tkanek zwierzęcych. Wielce prawdopodobne jest więc występowanie różnych izoform E1 wykazujących odmienną kinetykę w stosunku do 2-oksoglutaranu. Odpowiedni skład kompleksu pod względem izoform enzymu E1 oraz uwarunkowane tym właściwości kinetyczne kompleksu w odniesieniu do 2-oksoglutaranu mogą być ważnym elementem regulacji jego aktywności. Występowanie różnych izoform enzymu E1 o różnym powinowactwie do substratu ma zapewne

istotne znaczenie w dystrybucji 2-oksoglutaranu do procesów bioenergetycznych i syntezy neurotransmiterów w mózgu [13], co ściśle wiąże funkcjonowanie kompleksu z patologiami układu nerwowego.

OGDHC pochodzenia zwierzęcego wykazuje pozytywną kooperację centrów wiążących CoA [60]. Produkt reakcji E2, sukcylnylo-CoA, hamuje aktywność kompleksu (Ryc. 1). Reakcja ta jest współzawodnicząca względem CoA i dotyczy przemian zachodzących w centrum aktywnym E2. OGDHC uzyskany z mięśnia piersiowego gołębia [61] charakteryzuje się stosunkiem  $K_{i \text{ sukcylnylo-CoA}} / K_{m \text{ CoA}}$  około 1,4. Wskaźnik ten sugeruje, że hamowanie E2 przez sukcylnylo-CoA jest ważnym mechanizmem regulacyjnym OGDHC w warunkach *in vivo*.

OGDHC z mięśnia piersiowego gołębia charakteryzuje się pozytywną kooperacją centrów wiążących  $\text{NAD}^+$ , natomiast w obecności ADP kształt krzywej wysycenia kompleksu przez ten substrat przybiera hiperboliczny przebieg [57]. Natomiast NADH hamuje aktywność enzymów E1 i E3 kompleksu [57]. Działanie  $\text{NAD}^+$  i NADH na enzym E3 zachodzi na poziomie centrum aktywnego, podczas gdy ich efekt w stosunku do enzymu E1 ma charakter allosteryczny. Hamowanie E1 przez NADH jest niwelowane przez  $\text{NAD}^+$ . NADH zwiększa wartość  $S_{0,5}$  dla 2-oksoglutaranu i nieznacznie obniża  $V_{max}$  reakcji katalizowanej przez OGDHC [57], wpływa też na kooperację centrów wiążących 2-oksoglutaran. Preinkubacja kompleksu z NADH zakłóca wiązanie 2-oksoglutaranu w centrum aktywnym E1 poprzez zależną od NADH redukcję grup liponianowych związanych z enzymem E2 kompleksu [28]. Nawet jeżeli w mieszaninie reakcyjnej są ciągle dostępne inne niezbędne substraty, dłuższa preinkubacja kompleksu z NADH prowadzi do nieodwracalnej inaktywacji enzymu E1 [52]. Można przyjąć, że kontrola funkcjonowania OGDHC przez końcowy produkt reakcji, jakim jest NADH, realizuje się na dwa sposoby: krótkie ujemne sprzężenie zwrotne poprzez hamowanie enzymu E3 i długie ujemne sprzężenie zwrotne poprzez allosteryczne hamowanie enzymu E1 (Ryc. 1).

#### REGULACJA OGDHC PRZEZ NUKLEOTYDY ADENYLOWE I $\text{P}_i$

Aktywność OGDHC jest nierozdzielnie związana z produkcją ATP w mitochondriach. W związku z tym kompleks musi reagować na status energetyczny komórki odpowiednio modulując swoją aktywność. Wskaźnikiem statusu energetycznego komórki jest stan ufosforylowania nukleotydów adenylowych. Badania kinetyczne OGDHC z różnych źródeł [57,62-64] wskazują, że kompleks silnie reaguje na ten parametr. Przykładowo, kompleks wyizolowany z bakterii [30] jest wydatnie aktywowany przez AMP, który posiada swoiste centrum allosteryczne w enzymie E1. Kompleks pochodzenia zwierzęcego (serce szczura) jest bardzo wrażliwy na ADP, który silnie obniża wskaźnik  $S_{0,5}$  dla 2-oksoglutaranu bez znaczących zmian w prędkości maksymalnej katalizowanej reakcji [63]. Wpływ ADP na kinetykę kompleksu wzmacniają jony  $\text{Mg}^{2+}$ , co według niektórych autorów świadczy o tym, że właściwym jego aktywatorem może być związek „ADP-Mg” [43]. Wykazano, że stężenie ADP zapewniające osiągnięcie połowy maksymalnej aktywności kompleksu wynosi około  $115 \mu\text{M}$ , podczas gdy dla związku „ADP-Mg” tylko  $6,9 \mu\text{M}$ . OGDHC do osiągnięcia swojej maksymalnej aktywności wy-

maga jonów magnezu, są więc podstawy by uważać że  $\text{Mg}^{2+}$  włączony do centrum aktywnego E1 znacznie nasila pozytywne działanie ADP. Może to świadczyć o strukturalnym i funkcjonalnym zintegrowaniu miejsc wiążących oba te regulatory w cząsteczce E1 kompleksu. Badania kinetyczne prowadzone w warunkach niskich stężeń 2-oksoglutaranu wykazały, że krzywa zależności aktywności kompleksu od stężenia ADP ma kształt sigmoidalny, wskazując na pozytywną kooperację centrów wiązania tego efektora [12]. Ta właściwość OGDHC może mieć istotne znaczenie regulacyjne, gdyż stężenie ADP w tkankach zwierzęcych jest zmienne w szerokim zakresie, od 10 do nawet  $200 \mu\text{M}$  [65] w zależności od statusu energetycznego komórek. W odróżnieniu od ADP wysokie stężenie ATP świadczy o wysokim potencjale energetycznym i hamuje aktywność OGDHC, przez co wpływa na ograniczenie produkcji ATP (Ryc. 4). Hamujące działanie ATP może wynikać z jego powinowactwa do miejsc wiążących  $\text{NAD}^+$  i CoA w kompleksie oraz konkurencyjnego ich blokowania w warunkach wysokiego stężenia ATP. Badania kinetyczne prowadzone w obecności niewysycających stężeń 2-oksoglutaranu wykazały, że ATP działa antagonistycznie w stosunku do ADP na poziomie enzymu E1 [12].

Podobnie do ADP,  $\text{P}_i$  jest pozytywnym efektem OGDHC [58,62]. Fosforan nieorganiczny obniża wartość  $S_{0,5}$  dla 2-oksoglutaranu bez wpływu na prędkość maksymalną kompleksu przy wysycających stężeniach tego substratu. Przykładowo, w obecności  $\text{P}_i$  wartość  $S_{0,5}$  dla 2-oksoglutaranu OGDHC z serca żubra była 12-krotnie niższa niż przy braku  $\text{P}_i$  w mieszaninie reakcyjnej [60]. Stężenia  $\text{P}_i$  i ADP w odniesieniu do stężenia ATP są wyznacznikami stanu energetycznego komórki. Wysokie stężenia ADP i  $\text{P}_i$  na tle niskiego stężenia ATP wskazują na obniżony potencjał energetyczny komórki oraz wysokie zapotrzebowanie na ATP. OGDHC jako ogniwo cyklu Krebsa generujące NADH (niezbędny do syntezy ATP) jest aktywowany przez ADP i  $\text{P}_i$  (Ryc. 4) w wyniku zwiększenia powinowactwa kompleksu do 2-oksoglutaranu. Natomiast ATP wywiera na kompleks efekt przeciwny do ADP. Biorąc pod uwagę niewrażliwość OGDHC pochodzenia zwierzęcego na AMP, jak też jego regulację przez stosunek  $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$  [ $\text{P}_i$ ] można przyjąć, że potencjał fosforylacyjny, a nie tzw. ładunek energetyczny zależny od AMP, jest pierwszorzędowym czynnikiem kontrolującym aktywność OGDHC w mitochondriach komórek zwierzęcych. W porównaniu z nukleotydami adenylowymi nukleotydy guanydylowe wywierają o wiele mniejszy wpływ na aktywność i kinetykę OGDHC, chociaż produkt reakcji katalizowanej przez kompleks, czyli sukcylnylo-CoA, ulega fosforylacji substratowej z wytworzeniem GDP w cyklu Krebsa. W świetle przytoczonych wyników badań należy podkreślić, że OGDHC jest bardzo istotnym punktem regulacji cyklu Krebsa wrażliwym na nukleotydy adenylowe, szczególnie ADP, jak też stężenie  $\text{P}_i$  (Ryc. 4). Oznacza to, że kompleks ten jest jednym z trzech kluczowych, obok zależnej od  $\text{NAD}^+$  dehydrogenazy izocytrynianowej i kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej, ogniw regulacji procesu pozyskiwania ATP [12].

#### JONY METALI DWUWARTOŚCIOWYCH W REGULACJI AKTYWNOŚCI OGDHC

Jony  $\text{Mg}^{2+}$  pełnią funkcję pomocniczą podczas wiązania grupy pirofosforanowej TPP w centrum aktywnym enzymu

E1 [30]. W związku z ich uczestnictwem w składaniu holoenzymu, dodatek  $Mg^{2+}$  może zwiększać efekt aktywacji enzymu E1 powodowany przez TPP w przypadkach, gdy E1 stracił koenzym w toku izolacji i oczyszczania. W niektórych pracach wykazano, że jony magnezu również nasilają pozytywne, allosteryczne działanie ADP i Pi [43] w odniesieniu do OGDHC.

Śród enzymów mitochondrialnych powiązanych z cyklem Krebsa takich jak zależna od  $NAD^+$  dehydrogenaza izocytrynianowa i kompleks dehydrogenazy pirogronianowej, OGDHC jest regulowany przez stężenie jonów wapnia [66]. Wapń odgrywa dobrze znaną rolę wtórnego przekaźnika w metabolizmie i funkcjonowaniu komórek [67]. Zmiany wewnętrzmitochondrialnego stężenia  $Ca^{2+}$  są bardzo istotne dla odpowiedniej aktywności mitochondriów. Jony wapnia są silnym aktywatorem OGDHC u kręgowców [62,63], ale nie wpływają istotnie na jego aktywność u owadów, roślin (ziemniak) lub bakterii (*E. coli*) [68]. Jony wapnia powodują wielokrotne zwiększenie powinowactwa enzymu E1 do 2-oksoglutaranu (obniżenie wartości  $K_m$ ), bez wpływu na prędkość maksymalną katalizowanej reakcji. Stosując niewysokie, fizjologiczne stężenia  $Ca^{2+}$  *in vitro* udało się 5-krotnie zwiększyć aktywność kompleksu wyizolowanego z serca świni przy 0,1 mM stężeniu 2-oksoglutaranu. Podobny efekt dawały jony  $Sr^{2+}$ , które są raczej nietypowe dla organizmów żywych. W przypadku kompleksu z nadnerczy wołu wskaźnik  $S_{0,5}$  dla 2-oksoglutaranu obniżał się z 25 mM do 0,23 mM po zwiększeniu stężenia  $Ca^{2+}$  z 1 nM do 10  $\mu$ M. Spowodowane przez wapń podwyższenie powinowactwa OGDHC do 2-oksoglutaranu może być wzmacniane przez oddziaływanie z dodatnimi efektorami allosterycznymi, takimi jak ADP lub fosforan nieorganiczny [62]. Ponadto jony wapnia znacząco redukują ha-

mowanie aktywności OGDHC wywołane przez NADH. Wiedząc, że nadmierne stężenie wapnia indukuje procesy związane ze śmiercią komórki, można sądzić, że kompleks OGDHC odgrywa rolę w zależnym od wapnia uszkodzeniu neuronów. Przykładowo, neurotoksyczność glutaminianu związana z podwyższonym stężeniem wapnia w mitochondriach została ograniczona przez zastosowanie specyficznych inhibitorów OGDHC [5,10,11].

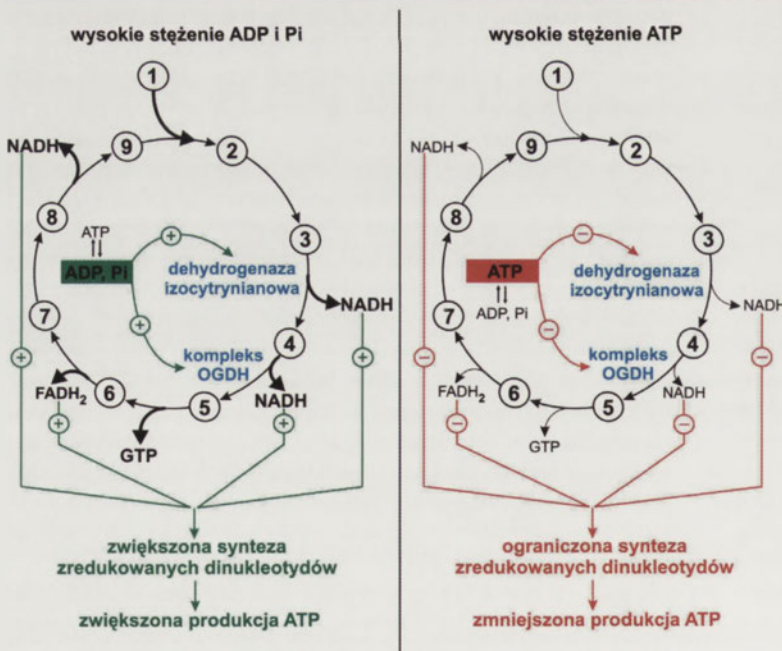
Na szczególną uwagę w aspekcie regulacji OGDHC zasługuje mangan. We wcześniejszych pracach dotyczących kompleksu z serca świni nie wykazano wpływu jonów manganu na aktywności OGDHC. Późniejsze badania z wykorzystaniem kompleksu z serca żubra wykazały, że mangan działa na OGDHC podobnie jak wapń wywołując 50-krotne obniżenie wartości  $S_{0,5}$  dla 2-oksoglutaranu przy niezmięnionej wartości  $V_{max}$  [69]. Różne wyniki dotyczące wpływu manganu na OGDHC mogą zależeć od gatunkowo specyficznych właściwości kompleksu, jednak efektywność manganu w świetle niektórych danych jest wysoka i zasługuje na uwagę w kontekście ewentualnego wykorzystania do regulacji aktywności OGDHC w praktyce klinicznej [70]. Przykładowo, podawanie  $Mn^{2+}$  szczurom, które wcześniej przeszły wywołany doświadczalnie zawał serca, może redukować efekt obniżenia aktywności OGDHC w pozawałowym mięśniu sercowym [71].

#### MODYFIKACJE STRUKTURY OGDHC I ICH REGULACYJNE ZNACZENIE

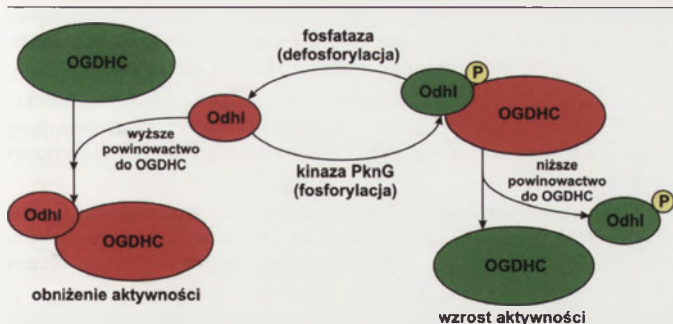
Oprócz kowalencyjnego włączenia liponianu w strukturę enzymu E2 kompleksu również inne rodzaje modyfikacji potranslacyjnych mogą wpływać na jego funkcjonowanie.

W odróżnieniu od kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej i dehydrogenazy 2-oksokwasów o rozgałęzionych łańcuchach, aktywność OGDHC nie zależy od fosforylacji enzymu E1. Jednak wyniki ostatnich badań wskazują, że oksydacyjna dekarboksylacja 2-oksoglutaranu może być także regulowana przez fosforylację, lecz poprzez odmienny mechanizm [72-74]. U sinic serynowo/treoninowa kinaza białkowa G (PknG) jest zaangażowana w regulację aktywności OGDHC poprzez inhibitorowe białko OdhI [72]. Gdy białko inhibitorowe pozostaje nieufosforylowane wywołuje silne hamowanie OGDHC ( $K_i=2.4nM$ ). Fosforylacja OdhI następuje na N-końcu białka w reszcie Thr14 zachowanego w ewolucji motywu ETTS, osłabiając oddziaływanie OdhI z kompleksem, co skutkuje wzrostem jego aktywności (Ryc. 5).

OGDHC jest bardzo wrażliwy na stres oksydacyjny. Reakcje uruchamiane w takich warunkach mogą być odpowiedzialne za modyfikacje struktury kompleksu prowadzące do jego inaktywacji [9,70], co jest szczególnie ważne w rozwoju chorób wywołanych stresem oksydacyjnym. Około 60-70% aktywności OGDHC ulega odwracalnemu zahamowaniu w ciągu kilku minut po zainicjowaniu reakcji, natomiast pozostałe 30-40% aktywności ulega nieodwracalnemu wygaśnięciu w tempie 0,1-0,2 U/min. Prędkość inaktywacji zależy od rodzaju metabolizowanego 2-oksokwasu. Wykazano, że pierwszy limitujący enzym E1



Rycina 4. Udział kompleksu dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej w regulacji cyklu Krebsa i produkcji ATP w zwierząt. Kolorem niebieskim zaznaczono dwa główne punkty regulacyjne cyklu Krebsa, zielone strzałki ze znakiem „+” wskazują aktywację enzymów i jej skutek, czerwone strzałki ze znakiem „-” wskazują hamowanie enzymów i jego skutek. 1 – acetylo CoA, 2 – cytrynian, 3 – izocytrynian, 4 – 2-oksoglutaran, 5 – sukcylny CoA, 6 – sukcynian, 7 – fumaran, 8 – jabłczan, 9 – szczawiooctan. Po lewej, wysokie stężenie ADP i Pi powoduje aktywację OGDHC i dehydrogenazy izocytrynianowej, co skutkuje podniesieniem tempa przemian cyklu Krebsa i zwiększeniem produkcji zredukowanych dinukleotydów, a w związku z tym także ATP. Po prawej, wysokie stężenie ATP wpływa hamująco na OGDHC i dehydrogenazę izocytrynianową ograniczając tempo przemian cyklu Krebsa i produkcję ATP.



Rycina 5. Regulacja aktywności prokariotycznego kompleksu dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej poprzez fosforylację/defosforylację białkowego inhibitora Odh1. Ufosforylowany przez serynowo-treoninową kinazę białkową G (PknG) białkowy inhibitor kompleksu (Odh1) traci powinowactwo do OGDHC i oddysocjuje, powodując wzrost jego aktywności. Defosforylacja Odh1 powoduje wzrost powinowactwa inhibitora do OGDHC, wiązanie go i hamowanie aktywności kompleksu.

podlega nieodwracalnej inaktywacji w trakcie katalizy, będąc odpowiedzialnym za inaktywację OGDHC [10,75,76]. Jeden z mechanizmów inaktywacji w obrębie struktury OGDHC obejmuje ukierunkowane działanie wolnego rodnika tiolowego reszty liponianowej związanej z enzymem E2 na kompleks E1-substrat. Inny prawdopodobny mechanizm inaktywacji enzymu E1, poznany u bakterii, wynika z możliwości generowania wolnych rodników w wyniku bezpośredniej reakcji z tlenem [77] lub obocznej reakcji oksygenazowej enzymu E1, która może prowadzić do powstawania wysoce reaktywnych nadtlenków kwasów, co tłumaczy silne hamowanie enzymu E1 wysokimi stężeniami 2-oksoglutaranu [70]. Inne organiczne nadtlenki mogą modyfikować aktywność OGDHC zarówno *in vitro* jak też *in situ* w mitochondriach. Inaktywacja zachodziła na poziomie centrów aktywnych E1, jednak enzym był skutecznie zabezpieczony przed tego typu czynnikami przez wysokie stężenia TPP [70,77].

Wysoce reaktywne metabolity, takie jak rodniki tiolowe, nadtlenki organiczne, nadtlenki kwasów mogą towarzyszyć reakcji katalizowanej przez OGDHC [52,70,77]. Generowanie tych wysoce aktywnych chemicznie cząsteczek ma silny związek z nieodwracalną inaktywacją kompleksu. Interesującym jest, że naturalne analogi 2-oksoglutaranu, takie jak malonian, sukcylian czy glutaran obniżają zakres autoinaktywacji kompleksu [76]. Jednakże nawet najsilniejszy z naturalnych analogów-protektorów, malonian w stężeniu 3 mM, powoduje jedynie 40% ochrony, podczas gdy syntetyczne analogi 2-oksoglutaranu zapewniają 50% protekcję OGDHC już w stężeniach 5  $\mu$ M [10]. Efektywna protekcja kompleksu przez syntetyczne pochodne 2-oksoglutaranu jest skorelowana z obniżeniem produkcji wolnych rodników generowanych podczas aktu katalizycznego kompleksu. Obserwacja ta jest szczególnie interesująca w świetle danych wskazujących, że obniżenie aktywności OGDHC jest skorelowane z występowaniem chorób neurodegeneracyjnych [70].

## UWAGI KOŃCOWE

W tym artykule zawarliśmy przegląd aktualnej wiedzy dotyczącej mechanizmów regulacji wieloenzymowego kompleksu dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej. Oprócz bardziej znanej regulacji poprzez interakcje różnych kofaktorów, substratów i efektorów, z centrami aktywnymi i allosterycznymi

enzymów składowych OGDHC, najnowsze dane doświadczalne wskazują na obecność i duże biologiczne znaczenie mniej znanych sposobów regulacji aktywności OGDHC związanych z obocznymi reakcjami modyfikującymi strukturę i właściwości składników kompleksu. Enzymatyczne reakcje oboczne są najczęściej odbierane jako enzymologiczne ciekawostki lub osobliwości, których znaczenie w kontekście regulacji aktywności OGDHC jest często niedoceniane. Wydaje nam się jednak, że zrozumienie tych mechanizmów może być bardzo przydatne w poszukiwaniach sposobów kontrolowania kluczowych dla metabolizmu enzymów, takich jak kompleks dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej. Jest to szczególnie cenne i aktualne w aspekcie naprawy metabolicznych nieprawidłowości leżących u podstaw szeregu poważnych stanów patologicznych [5,8,50,51,78]. Zgromadzona obecnie wiedza dotycząca regulacji OGDHC poprzez różnorodne efekторы z jednej strony, jak też wskazująca na możliwości kontroli enzymatycznych reakcji obocznych z drugiej strony, przyczyni się do odnajdywania nowych możliwości korygowania procesów zachodzących w żywych organizmach. Nabiera to coraz większego znaczenia w najnowszych metodach leczenia, które koncentrują się na zapewnieniu „zdrowia komórki” czyli odnajdywaniu nieprawidłowości i ich korygowaniu na jak najwcześniejszych etapach choroby (choroby nowotworowe, neurodegeneracyjne), nawet przed ujawnieniem się klasycznych objawów klinicznych.

## PIŚMIENNICTWO

1. He W, Miao FJ, Lin DC, Schwandner RT, Wang Z, Gao J, Chen JL, Tian H, Ling L (2004) Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature* 429: 188-193
2. Butow RA, Avadhani NG (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* 14: 1-15
3. Chen H, Laurent S, Bédou S, Ziarelli F, Chen HL, Cheng Y, Zhang CC, Peng L (2006) Studying the signaling role of 2-oxoglutaric acid using analogs that mimic the ketone and ketal forms of 2-oxoglutaric acid. *Chem Biol* 13: 849-856
4. Matsumoto K, Imagawa S, Obara N, Suzuki N, Takahashi S, Nagasawa T, Yamamoto M (2006) 2-Oxoglutarate downregulates expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin through decreasing hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and inhibits angiogenesis. *J Cell Physiol* 209: 333-340
5. Bunik VI, Fernie AR (2009) Metabolic control exerted by the 2-oxoglutarate dehydrogenase reaction: a cross-kingdom comparison of the crossroad between energy production and nitrogen assimilation. *Biochem J* 422: 405-421
6. Amsterdam A, Nissen RM, Sun Z, Swindell EC, Farrington S, Hopkins N (2004) Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12792-12797
7. Santos S, Gibson GG, Cooper AJL, Denton TT, Thompson CM, Bunik VI, Alves PM, Sonnewald U (2006) Inhibitors of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex alter [ $^{13}$ C]glucose and [ $^{13}$ C]glutamate metabolism in cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 83: 450-458
8. Gibson GE, Starkov A, Blass JP, Ratan RR, Beal MF (2010) Cause and consequence: mitochondrial dysfunction initiates and propagates neuronal dysfunction, neuronal death and behavioral abnormalities in age-associated neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1803: 122-134
9. Gibson GE, Blass JP, Beal MF, Bunik VI (2005) The  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex: a mediator between mitochondria and oxidative stress in neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31: 43-63
10. Kabysheva MS, Storozhevykh TP, Pinelis VG, Bunik VI (2009) Synthetic regulators of the 2-oxoglutarate oxidative decarboxylation alleviate the glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons. *Biochem Pharmacol* 77: 1513-1540

11. Bunik VI, Kabysheva MS, Klimuk EI, Storozhevych TP, Pinelis VG (2009) Phosphono analogs of 2-oxoglutarate protect cerebellar granule neurons upon glutamate excitotoxicity. *Ann NY Acad Sci* 1171: 521-529
12. Strumilo S (2005) Often ignored facts about the control of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *BAMBED* 33: 284-387
13. Bunik V, Kaehne T, Degtyarev D, Shcherbakova T, Reiser G (2008) Novel isoform of 2-oxoglutarate dehydrogenase is identified in brain, but not in heart. *FEBS J* 275: 4990-5006
14. Schulze E, Westphal AH, Hanemaaijer R, de Kok A (1990) The 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. 1. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the 2-oxoglutarate dehydrogenase component. *Eur J Biochem* 187: 229-234
15. Hommes NG, Kurth EG, Sayavedra-Soto LA, Arp DJ (2006) Disruption of *sucA*, which encodes the E1 subunit of alpha-ketoglutarate dehydrogenase, affects the survival of *Nitrosomonas europaea* in stationary phase. *J Bacteriol* 188: 343-347
16. Repetto B, Tzagoloff A (1990) Structure and regulation of KGD2, the structural gene for yeast dihydrolipoyl transsuccinylase. *Mol Cell Biol* 10: 4221-4232
17. Koike K (1998) Cloning, structure, chromosomal localization and promoter analysis of human 2-oxoglutarate dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta* 1385: 373-384
18. Nakano K, Takase C, Sakamoto T, Nakagawa S, Inazawa J, Ohta S, Matuda S (1994) Isolation, characterization and structural organization of the gene and pseudogene for the dihydrolipoamide succinyltransferase component of the human 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Eur J Biochem* 224: 179-189
19. Yang HS, Morris JI, Wang Q, Korotchkina LG, Kwon M, Patel MS (2001) Human dihydrolipoamide dehydrogenase gene transcription is mediated by cAMP-response element-like site and TACGAC direct repeat. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 902-913
20. Salmon KA, Hung SP, Steffen NR, Krupp R, Baldi P, Hatfield GW, Gunsalus RP (2005) Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: effects of oxygen availability and ArcA. *J Biol Chem* 280: 15084-15096
21. Venkatraman A, Landar A, Davis AJ, Chamlee L, Sanderson T, Kim H, Page G, Pompilius M, Ballinger S, Darley-Usmar V, Bailey SM (2004) Modification of the mitochondrial proteome in response to the stress of ethanol-dependent hepatotoxicity. *J Biol Chem* 279: 22092-22101
22. Boluyt MO, Brevick JL, Rogers DS, Randall MJ, Scalia AF, Li ZB (2006) Changes in the rat heart proteome induced by exercise training: increased abundance of heat shock protein hsp20. *Proteomics* 6: 3154-3169
23. Thongboonkerd V, Kanlaya R, Sinchaikul S, Parichatanond P, Chen ST, Malasit P (2006) Proteomic identification of altered proteins in skeletal muscle during chronic potassium depletion: implications for hypokalemic myopathy. *J Proteome Res* 5: 3326-3335
24. Bunik V, Westphal AH, de Kok A (2000) Kinetic properties of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from *Azotobacter vinelandii* evidence for the formation of a precatalytic complex with 2-oxoglutarate. *Eur J Biochem* 267: 3583-3591
25. Koike K, Hamada M, Tanaka N, Otsuka K, Ogasahara K, Koike M (1974) Properties and subunit composition of the pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase. *J Biol Chem* 249: 3836-3842
26. Ciszak EM, Korotchkina LG, Dominiak PM, Sidhu S, Patel MS (2003) Structural basis for flip-flop action of thiamin pyrophosphate-dependent enzymes revealed by human pyruvate dehydrogenase. *J Biol Chem* 278: 21240-21246
27. Frank RA, Titman CM, Pratap JV, Luisi BF, Perham RN (2004) A molecular switch and proton wire synchronize the active sites in thiamine enzymes. *Science* 306: 872-876
28. Bunik V, Buneeva OA, Gomazkova VS (1990) Change in alpha-ketoglutarate dehydrogenase cooperative properties due to dihydrolipoate and NADH. *FEBS Lett* 269: 252-254
29. Strumilo S, Markiewicz J (1995) Thiamine pyrophosphate as an effector of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from European bison heart. *Biochem Mol Biol Int* 37: 101-106
30. Frank RA, Price AJ, Northrop FD, Perham RN, Luisi BF (2007) Crystal structure of the E1 component of the *Escherichia coli* 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex. *J Mol Biol* 368: 639-651
31. Strumilo S, Czygier M, Kondracikowska J, Dobrzyn P, Czerniecki J (2002) Kinetic and spectral investigation of allosteric interaction of coenzymes with 2-oxo acid dehydrogenase complexes. *J Mol Structure* 614: 221-226
32. Bettendorff L, Wirtzfeld B, Makarchikov AF, Mazzucchelli G, Fréderich M, Gigliobianco T, Gangolf M, De Pauw E, Angenot L, Wins P (2007) Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide. *Nature Chem Biol* 3: 211-212
33. Mancinelli R, Ceccanti A (2009) Biomarkers in alcohol misuse: their role in the prevention and detection of thiamine deficiency. *Alcohol Alcoholism* 44: 177-182
34. Lavoie J, Butterworth RF (1995) Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in brains of alcoholics in the absence of Wernicke's encephalopathy. *Alcohol Clin Exp Res* 19: 1073-1077
35. Navarro D, Zwingmann C, Butterworth RF (2008) Region-selective alterations of glucose oxidation and amino acid synthesis in the thiamine-deficient rat brain: a re-evaluation using <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Neurochem* 106: 603-612
36. Strumilo S, Czygier M, Markiewicz J (1995) Different extent of inhibition of pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase both containing endogenous thiamine pyrophosphate, by some anti-coenzyme analogues. *J Enzyme Inhibition* 10: 65-72
37. Strumilo SA, Senkevich SB, Vinogradov VV (1984) Effect of oxythiamine on adrenal thiamine pyrophosphate-dependent enzyme activities. *Biomed Biochem Acta* 43: 159-163
38. Liu JY, Timm DE, Hurley TD (2006) Pyriothiamine as a substrate for thiamine pyrophosphokinase. *J Biol Chem* 281: 6601-6607
39. Butterworth RF, Kril JJ, Harper CG (1993) Thiamine-dependent enzyme changes in the brains of alcoholics: relationship to the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 1084-1088
40. Butterworth RF (2009) Thiamine deficiency-related brain dysfunction in chronic liver failure. *Metab Brain Dis* 24: 189-196
41. Hazell AS, Butterworth RF (2009) Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation. *Alcohol Alcoholism* 44: 141-147
42. Rindi G, Patrini C, Nauti A, Bellazzi R, Magni P (2003) Three thiamine analogues differently alter thiamine transport and metabolism in nervous tissue: an *in vivo* kinetic study using rats. *Metab Brain Dis* 18: 245-263
43. Rodriguez-Zavala JS, Pardo JP, Moreno-Sanchez R (2000) Modulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex by inorganic phosphate, Mg<sup>2+</sup>, and other effectors. *Arch Biochem Biophys* 379: 78-84
44. Morikawa T, Yasuno R, Wada H (2001) Do mammalian cells synthesize lipoic acid? Identification of a mouse cDNA encoding a lipoic acid synthase located in mitochondria. *FEBS Lett* 498: 16-21
45. Miller JR, Busby RW, Jordan SW, Cheek J, Henshaw TF, Ashley GW, Broderick JB, Cronan JE Jr, Marletta MA (2000) *Escherichia coli* lipA is a lipoyl synthase: *in vitro* biosynthesis of lipoylated pyruvate dehydrogenase complex from octanoyl-acyl carrier protein. *Biochemistry* 39: 15166-15178
46. Fujiwara K, Takeuchi S, Okamura-Ikeda K, Motokawa Y (2001) Purification, characterization, and cDNA cloning of lipoate-activating enzyme from bovine liver. *J Biol Chem* 276: 28819-28823
47. Zhao X, Miller JR, Jiang Y, Marletta MA, Cronan JE (2003) Assembly of the covalent linkage between lipoic acid and its cognate enzymes. *Chem Biol* 10: 1293-1302
48. Oizumi J, Hayakawa K (1989) Liberation of lipoate by human serum lipoamidase from bovine heart pyruvate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 162: 658-663
49. Bunik V (2003) 2-Oxo acid dehydrogenase complexes in redox regulation. Role of the lipoate residues and thioredoxin. *Eur J Biochem* 270: 1036-1042
50. Czarna M, Jarmuszkievicz W (2006) Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesyłaniem

sygnałów i programowaną śmiercią komórki. *Postepy Biochem* 52: 145-156

51. Wojtczak L, Zabłocki K (2008) Mitochondria w życiu, chorobie i śmierci komórki. *Postepy Biochem* 54: 129-141
52. Bunik V, Sievers C (2002) Inactivation of the 2-oxo acid dehydrogenase complexes upon generation of intrinsic radical species. *Eur J Biochem* 269: 5004-5015
53. Hanine Lmoumene CE, Conte D, Jacquot JP, Houee-Levin C (2000) Redox properties of protein disulfide bond in oxidized thioredoxin and lysozyme: a pulse radiolysis study. *Biochemistry* 39: 9295-9301
54. Koháryová M, Kolářová M (2008) Oxidative stress and thioredoxin system. *Gen Physiol Biophys* 27: 71-84
55. Applegate MA, Humphries KM, Szweda LI (2008) Reversible inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase by hydrogen peroxide: glutathionylation and protection of lipoic acid. *Biochemistry* 47: 473-478
56. Lindsay H, Beaumont E, Richards SD, Kelly SM, Sanderson SJ, Price NC, Lindsay JG (2000) FAD insertion is essential for attaining the assembly competence of the dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) monomer from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275: 36665-36670
57. Gomazkova VS, Krasovskaya OE (1979) Regulation of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex from pigeon breast muscle. *Biokhimiya* 44: 1126-1136
58. Strumilo SA, Taranda NI, Vinogradov VV (1981) Role of phosphate ions and divalent metals in the regulation of activity of the ketoglutarate dehydrogenase complex of the adrenal cortex. *Biokhimiya* 46: 156-161
59. Waskiewicz DE, Hammes GG (1980) Elementary steps in the reaction mechanism of the  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*: kinetics of succinylation and desuccinylation. *Biochemistry* 23: 3136-3143
60. Markiewicz J, Strumilo S (1995) Some regulatory properties of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from European bison heart. *Acta Biochim Pol* 42: 339-346
61. Furuta S, Shindo Y, Hashimoto T (1977) Purification and properties of pigeon breast muscle  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes. *J Biochem* 81: 1839-1847
62. Lawlis BV, Roche TE (1981) Regulation of bovine kidney  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex by calcium ions and adenine nucleotides. Effect on S0.5 for ketoglutarate. *Biochemistry* 20: 2512-2518
63. Nichols BJ, Rigoulet M, Denton RM (1994) Comparison of the effects of  $Ca^{2+}$ , adenine nucleotides and pH on the kinetic properties of mitochondrial NAD-isocitrate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and rat heart. *Biochem J* 303: 461-465
64. Ostrovtsova SA, Strumilo SA (1990) Participation of adenosine diphosphate in regulation of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from human heart. *Biomed Biochim Acta* 49: 515-517
65. Veech RL, Cook GA, King MT (1980) Relationship of free cytoplasmic pyrophosphate to liver glucose content and total pyrophosphate to cytoplasmic phosphorylation potential. *FEBS Lett* 117 suppl: K65-K72
66. Denton RM (2009) Regulation of mitochondria dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1309-1316
67. Brotto M, Weisleder N, Ma J (2007) Store-operated  $Ca^{2+}$  entry in muscle physiology. *Curr Chem Biol* 1: 8795
68. McCormack JG, Denton RM (1981) A comparative study of the regulation by  $Ca^{2+}$  of the activities of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex and NAD-isocitrate dehydrogenase from variety of sources. *Biochem J* 196: 619-624
69. Markiewicz J, Strumilo S (1997) The effect of  $Mn^{2+}$  on the catalytic function of heart muscle 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem Arch* 13: 127-129
70. Bunik V, Schloss JV, Pinto JT, Gibson GE, Cooper AJL (2007) Enzyme-catalyzed side reactions with molecular oxygen may contribute to cell signaling and neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 32: 871-891
71. Tylicki A, Czerniecki J, Godlewska A, Kieliszek M, Zebrowski T, Bielawski T, Wojcik B (2008) Changes in ECG and enzyme activity in rat heart after myocardial infarction: effect of TPP and  $MnCl_2$ . *J Physiol Biochem* 64: 93-102
72. Niebisch A, Kabus A, Schultz C, Weil B, Bott M (2006) Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. *J Biol Chem* 281: 12300-12307
73. Bott M (2007) Offering surprises: TCA cycle regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Trends Microbiol* 15: 417-425
74. Schultz C, Niebisch A, Gebel L (2007) Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 691-700
75. Bunik VI, Pavlova OG (1993) Inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase during oxidative decarboxylation of alfa-keto adipic acid. *FEBS Lett* 323: 166-170
76. Bunik VI, Pavlova OG (1997) Inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase during its enzymatic reaction. *Biochemistry (Moscow)* 62: 973-982
77. Frank RAW, Kay KWM, Hirst J, Luisi BF (2008) Off-pathway, oxygen-dependent thiamine radical in the Krebs cycle. *J Am Chem Soc* 130: 1662-1668
78. Piwońska M, Szewczyk A (2008) Mitochondrialna neuroprotekcja. *Postepy Biochem* 54: 169-178

## 2-oxoglutarate dehydrogenase complex and its multipoint control

Adam Tylicki<sup>1</sup>✉, Victoria I. Bunik<sup>2</sup>, Sławomir Strumilo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Cytobiochemistry, Institute of Biology University of Białystok, Swierkowa 20B, 15-950 Białystok, Poland

<sup>2</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow Lomonosov State University, 119992 Moscow, Russian Federation

✉e-mail: atyl@uwb.edu.pl

**Key words:** ATP, FAD, Krebs cycle, lipoic acid, metal ions, multienzyme complex, NADH, thiamine pyrophosphate


### ABSTRACT

Enzymes control the course of biochemical reactions. The enzymes involved in bioenergetic processes play most important role in cell metabolism. One of them is 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (OGDHC), the key regulatory enzyme of Krebs cycle. Krebs cycle integrates basic metabolic pathways of carbohydrates, fatty acids and amino acids during catabolic as well as anabolic reactions. Due to the key position of OGDHC in mitochondrial metabolism, its activity is controlled by many factors. Allosteric regulation by positive effectors (ADP, Pi,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) of the complex is very important. These effectors strongly enhances affinity of the first component of OGDHC to 2-oxoglutarate. Moreover there are negative effectors (ATP, NADH, succinyl-CoA) which affect all three enzymes of the complex. Regulation of biosynthesis of individual components of the complex by activation or inactivation of genes expression is very important for proper OGDHC activity too. Activity of OGDHC also depends on posttranslational modifications of its components. All of this control processes maintain OGDHC activity on adequate level and prevent the complex against its excessive action.

# Mechanizmy regulacji biosyntezy kwasów żółciowych – autoregulacyjna rola kwasów żółciowych

Areta Hebanowska 

Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Biochemii, Gdańsk

Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Biochemii, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk; tel.: (58) 349 14 64, e-mail: areta@gumed.edu.pl

Artykuł otrzymano 8 września 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 1 marca 2011 r.

**Słowa kluczowe:** kwasy żółciowe, 7 $\alpha$ -hydroksylaza cholesterolowa, 27-hydroksylaza sterolowa, 12 $\alpha$ -hydroksylaza sterolowa, hydroksylaza oksysterolowa, receptory jądrowe

**Wykaz skrótów:** BAAT – N-acylotransferaza kwas żółciowy-CoA:aminokwas; CYP27A1 – 27 $\alpha$ -hydroksylaza sterolowa; CYP7A1 – 7 $\alpha$ -hydroksylaza cholesterolowa; CYP8B1 – 12 $\alpha$ -hydroksylaza sterolowa; CYP7B1 – hydroksylaza oksysterolowa; FXR (ang. *farnesoid X receptor*) – receptor farnesoidowy X; HNF (ang. *hepatocyte nuclear factor*) – hepatocytarny czynnik jądrowy; LRH-1 (ang. *liver receptor homolog 1*) – homolog receptora wątrobowego 1; LXR (ang. *liver X receptor*) – wątrobowy receptor X; PPAR $\alpha$  (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$* ) – receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomalne  $\alpha$ ; PXR (ang. *pregnane X receptor*) – receptor pregnanu X; SHP (ang. *small heterodimer partner*) – mały heterodimeryczny czynnik towarzyszący; SREBP1c (ang. *sterol response element binding protein*) – białko wiążące element odpowiedzi na sterole 1c; VDR (ang. *vitamin D receptor*) – receptor witaminy D

**Podziękowania:** Praca powstała w ramach realizacji projektu ST-41.

## STRESZCZENIE

Kwasy żółciowe są produktami przemian cholesterolu w wątrobie. Najważniejszym enzymem regulującym biosyntezę kwasów żółciowych jest 7 $\alpha$ -hydroksylaza cholesterolowa (CYP7A1), której aktywność jest regulowana przede wszystkim na poziomie transkrypcji. Kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym, uczestniczącym w tym procesie, jest receptor jądrowy FXR, aktywowany przez inne receptory jądrowe (SHP, HNF-4 $\alpha$ , LRH-1) oraz same kwasy żółciowe. Skutkiem aktywacji FXR jest represja genu CYP7A1. Innymi represorami tego genu są PXR, VDR oraz PPAR $\alpha$ . Głównym aktywatorem transkrypcji CYP7A1 jest receptor LXR (u gryzoni). Aktywność CYP7A1 wzrasta także pod wpływem insuliny czy glukokortykoidów. Ponadto jest regulowana rytmem dobowym. Wiele z wymienionych czynników reguluje też aktywności innych ważnych enzymów biosyntezy kwasów żółciowych (CYP7B1, CYP27A1, CYP8B1, BAAT). Kwasy żółciowe są ligandami nie tylko receptora FXR, ale także innych receptorów jądrowych (PPAR $\alpha$ , VDR czy PXR), m.in. uczestniczących w przemianach glukozy i lipidów. Sugeruje to na istotną rolę kwasów żółciowych w regulacji wymienionych procesów. Celem artykułu jest przedstawienie najnowszych danych dotyczących mechanizmów regulacji aktywności kluczowych enzymów szlaku biosyntezy kwasów żółciowych. Poznanie tych mechanizmów może w istotny sposób przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat przyczyn i mechanizmów rozwoju takich chorób, jak np. cukrzyca czy miażdżycy, a także pomóc w bardziej efektywnym ich leczeniu

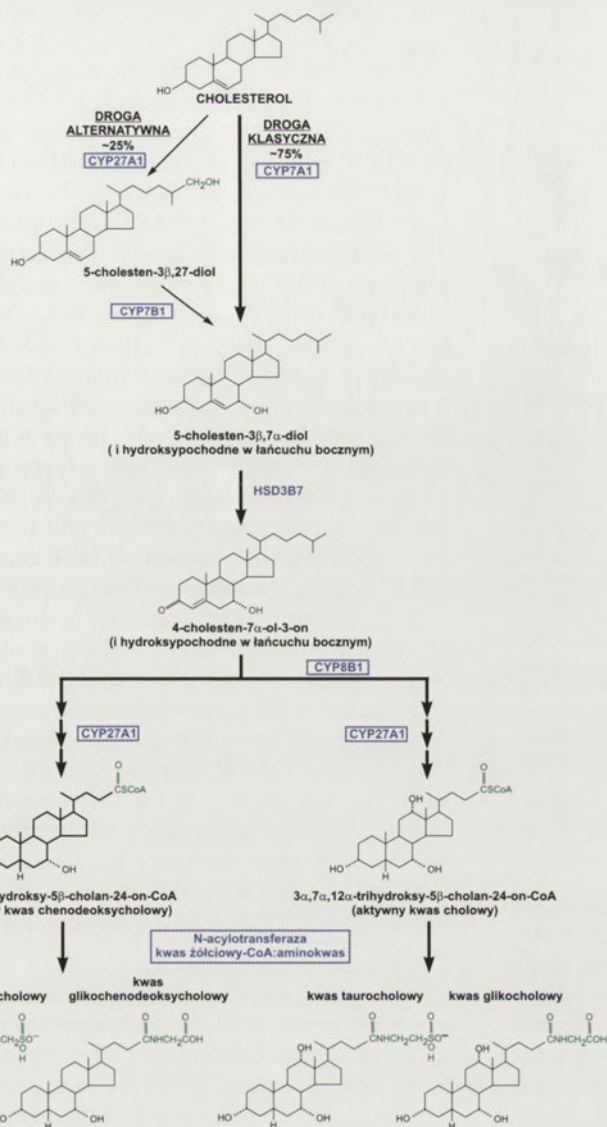
## WPROWADZENIE

Kwasy żółciowe są głównym składnikiem żółci, a ich podstawową funkcją jest emulgacja lipidów, co ułatwia ich trawienie. Pośrednio biorą także udział we wchłanianiu lipidów oraz witamin rozpuszczalnych w lipidach (A, D, E, K). Jednocześnie są produktami przemian cholesterolu odgrywając tym samym istotną rolę w regulacji jego homeostazy. Kwasy żółciowe są również regulatorami metabolizmu. Jako cząsteczki sygnalizacyjne aktywują receptory jądrowe, takie jak FXR (receptor farnesoidowy X, ang. *farnesoid X receptor*), PXR (receptor pregnanu X, ang. *pregnane X receptor*) czy jądrowy receptor witaminy D (VDR, ang. *vitamin D receptor*). Wpływają na przemiany glukozy, lipidów oraz swoje własne. Produkowane w nadmiarze mogą być toksyczne dla komórek. Proces biosyntezy kwasów żółciowych (Ryc. 1) musi być więc bardzo precyzyjnie kontrolowany. Kontrola ta dotyczy kilku białek uczestniczących w tym procesie, przede wszystkim hydroksylaz katalizujących reakcje jego pierwszej fazy. Głównym mechanizmem regulacji aktywności tych enzymów jest kontrola ekspresji genów. Najważniejszym enzymem podlegającym regulacji jest 7 $\alpha$ -hydroksylaza cholesterolowa (CYP7A1) katalizująca pierwszą reakcję na drodze klasycznej biosyntezy kwasów żółciowych. Pozostałe istotne enzymy biosyntezy kwasów żółciowych podlegające regulacji to 27 $\alpha$ -hydroksylaza sterolowa (CYP27A1), 7 $\alpha$ -hydroksylaza oksysterolowa (CYP7B1) oraz 12 $\alpha$ -hydroksylaza sterolowa (CYP8B1).

## RECEPTOR JĄDROWY FXR

Jak już wcześniej wspomniano, głównym receptorem wiążącym kwasy żółciowe jest receptor jądrowy FXR. Ekspresja genu kodującego ten receptor zachodzi w wielu tkankach, przy czym najwyższy jej poziom jest w wątrobie, jelicie cienkim, nerkach i nadnerczach. Udział dwóch promotorów w kontroli transkrypcji genu FXR, a ponadto możliwość alternatywnego składania produktów ekspresji, powoduje powstawanie czterech izoform receptora FXR (FXR $\alpha$ 1-4). FXR $\alpha$ 1 i 2 obecne są przede wszystkim w wątrobie, jelicie i nadnerczach, natomiast  $\alpha$ 3 i 4 w wątrobie, jelicie cienkim i nerkach. Izofornie te charakteryzują się różną aktywnością regulacyjną [1,2]. Ekspresja genu FXR jest kontrolowana przez wiele czynników, wśród których wymienić można glukozę, glutaminę (czynniki indukujące) oraz represory: insulinę, interleukinę 1 czy czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) [3-5]. Gen ten ulega indukcji również w stanie głodu [6].





Rycina 1. Regulowane etapy biosyntezy kwasów żółciowych (w ramkach – enzymy ulegające regulacji).

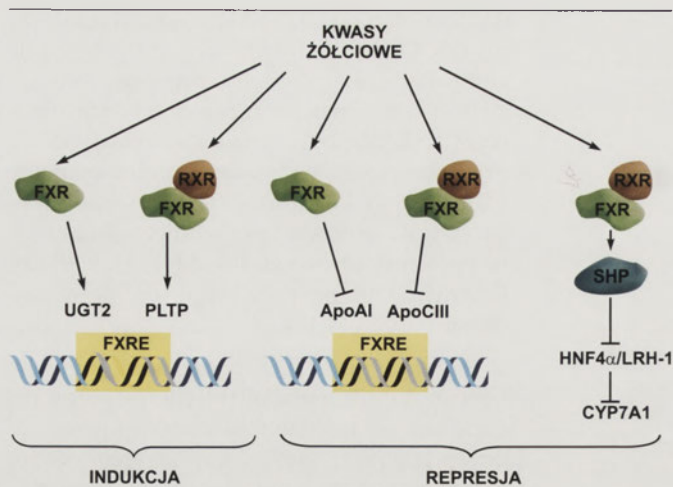
nukleotydamy [1,9]. FXR może wiązać się do DNA jako monomer (np. do promotora genu kodującego apolipoproteinę AI) lub jako heterodimer, z receptorem retinoidowym X (RXR, ang. *retinoic X receptor*), np. do promotora genu kodującego apolipoproteinę CIII, (Ryc. 2). Ponadto, FXR może regulować aktywność genów za pośrednictwem innych receptorów jądrowych (np. SHP, FGF-19 czy PPARα), a nie poprzez bezpośrednie wiązanie się z DNA [1,10].

Regulacji przez FXR podlega wiele genów kontrolujących metabolizm energetyczny organizmu. Są to przede wszystkim geny odpowiedzialne za metabolizm kwasów żółciowych, ich wydzielanie, transport, absorpcję i detoksykację. Ponadto FXR reguluje przemianę glukozy oraz lipidów, w tym lipoprotein i triacylogliceroli. Indukcji pod wpływem FXR ulegają np. geny kodujące apolipoproteinę CII, apolipoproteinę E, receptor VLDL (lipoprotein o bardzo niskiej gęstości, ang. *very low density lipoprotein*), represji natomiast gen kodujący apolipoproteinę CIII [11-13]. SREBP1c (białko wiążące element odpowiedzi na sterole 1c, ang. *sterol response element binding protein*), które jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywującym proces lipogenezy, także ulega represji pod wpływem FXR, natomiast PPARα oraz palmitoilotransferaza karnitynowa I indukcji, co z kolei prowadzi do aktywacji procesu utleniania kwasów tłuszczowych [6,14]. FXR hamuje także syntezę triacylogliceroli w hepatocytach, np. poprzez hamowanie aktywności mikrosomalnego białka przenoszącego triacyloglicerole (MTP) [15]. W ten sposób przyczynia się do zmniejszenia stężenia triacylogliceroli we krwi [16,17]. Wpływa on też na przemianę HDL (lipoproteiny o bardzo wysokiej gęstości, ang. *high-density lipoprotein*). Dostępne obecnie dane wskazują,

Najsilniejszym aktywatorem jest kwas chenodeoksycholowy. Kwasy lithocholowy i deoksycholowy są słabszymi ligandami [7]. W badaniach *in vitro* ligandami FXR okazały się także wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA, ang. *polyunsaturated fatty acids*), takie jak kwas arachidonowy czy linolenowy oraz metabolity pośrednie szlaku biosyntezy kwasów żółciowych. Znanych jest także wiele ligandów, środków farmakologicznych, takich jak syntetyczny agonista FXR, GW4064, czy też pochodna kwasu chenodeoksycholowego, kwas 6-etylochenodeoksycholowy (6-ECDCA) [8].

Wiele genów, których aktywność jest regulowana przez FXR zawiera w rejonie promotorowym sekwencje odpowiedzi na ten receptor (FXRE, ang. *FXR response element*). Sekwencje te mają różnorodną budowę. Wszystkie zawierają powtórzenia sekwencji AGGTCA ale w różnych konfiguracjach. Najczęściej są to odwrócone powtórzenia oddzielone jednym nukleotydem (tzw. IR-1). Ponadto, spotykane są odwrócone powtórzenia nie oddzielone od siebie (IR-0), proste powtórzenia lub elementy, w których sekwencja rdzeniowa jest podzielona na dwie części, rozdzielone ośmioma

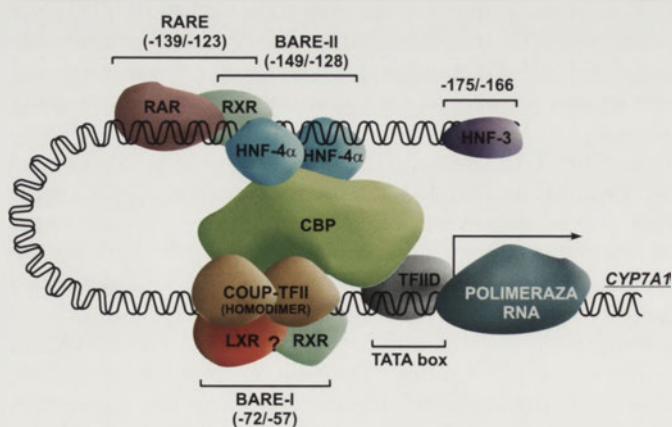
że gen kodujący apolipoproteinę AI ulega represji w obecności FXR, co może zmniejszać stężenie HDL we krwi [18,19]. Jednocześnie, FXR indukuje gen kodujący białko przenoszące fosfolipidy (PLTP, ang. *phospholipid transporting protein*) oraz gen lipazy wątrobowej, co z kolei może wywołać odwrotny skutek [20,21]. Można więc stwierdzić, że FXR wpływa na przemianę HDL. Metabolizm glukozy także pozostaje pod wpływem FXR. Przede wszystkim czynnik ten jest represorem genów odpowiedzialnych za regulację glukoneogenezy (karboksykinazy fosfoenolopirogronianu, glukozy-6-fosfatazy czy fruktozy-1,6-bisfosfatazy), indukuje natomiast geny związane z biosyntezą glikogenu [22-24]. Skutkiem jest zmniejszenie stężenia glukozy we krwi, a w efekcie wzrost wrażliwości na insulinę. Ostatnio zaobserwowano także ochronny wpływ FXR na hepatocyty. Aktywacja tego receptora następuje w trakcie regeneracji wątroby oraz zmniejsza prawdopodobieństwo rozwoju nowotworów wątroby [1]. Kwasy żółciowe, będące głównymi ligandami FXR, mogą więc za jego pośrednictwem regulować wszystkie wyżej wymienione procesy.



**Rycina 2.** Kwasy żółciowe jako regulatory ekspresji genów – rola czynnika FXR. Aktywowany przez kwasy żółciowe receptor jądrowy FXR może wywoływać zarówno indukcję, jak i represję regulowanych genów. Może on bezpośrednio, jako monomer, wiązać się do odpowiedniego elementu odpowiedzi (FXRE) w promotorach kontrolowanych genów, takich jak gen kodujący UDP-glukuronilotransferazę 2 czy apolipoproteinę AI. FXR może łączyć się z receptorem RXR i jako heterodimer oddziaływać z FXRE. Tak dzieje się w przypadku genów kodujących białko przenoszące fosfolipidy (PLTP) oraz apolipoproteinę CII. Gen *CYP7A1* kontrolowany jest w sposób pośredni, poprzez aktywację (przy pomocy heterodimeru FXR/RXR) receptora SHP. Następnie, aktywny SHP wpływa na czynniki transkrypcyjne HNF4α i LRH1 (dokładny opis mechanizmu tej regulacji znajduje się w tekście). W oparciu o [10].

## REGULACJA AKTYWNOŚCI CYP7A1

7 $\alpha$ -hydroksylaza cholesterolowa (*CYP7A1*) jest enzymem ograniczającym biosyntezę kwasów żółciowych. Katalizuje pierwszą reakcję, jaką jest hydroksylacja cholesterolu w pozycji 7, w klasycznym szlaku syntezy tych związków (Ryc. 1). Kontrola aktywności *CYP7A1* zachodzi przede wszystkim na poziomie transkrypcji. Kwasy żółciowe powodują represję genu 7 $\alpha$ -hydroksylazy cholesterolowej, natomiast jego indukcja następuje pod wpływem cholesterolu i oksysteroli. Nie są to jedyne czynniki regulacyjne, a ponadto mechanizmy ich działania różnią się w zależności od gatunku. U ludzi, w przeciwieństwie do gryzoni, stymulujący wpływ oksysteroli na aktywność *CYP7A1* nadal nie

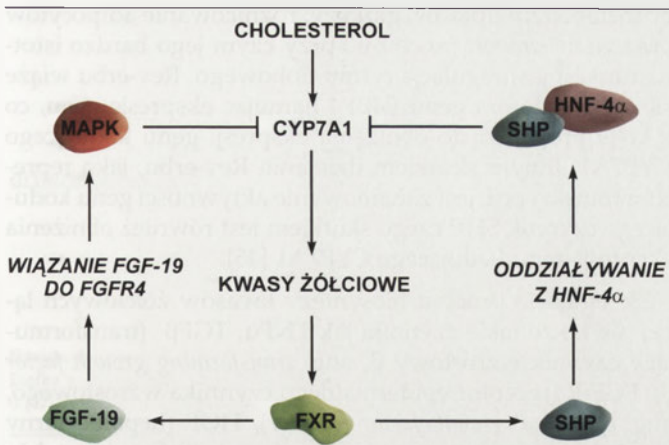


**Rycina 3.** Struktura promotora genu *CYP7A1* oraz miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych regulujących jego aktywność. Występująca u gryzoni regulacja ekspresji *CYP7A1* przez heterodimer LXR/RXR, u człowieka nie została do tej pory potwierdzona. W oparciu o [26].

został potwierdzony. W promotorze genu *CYP7A1* zidentyfikowano dwa rejony odpowiedzialne za oddziaływanie z wieloma różnymi czynnikami transkrypcyjnymi. Są to zachowane w ewolucji sekwencje BARE-I i BARE-II (element odpowiedzi na kwasy żółciowe, ang. *bile acid response element*) [25] (Ryc. 3). Elementy BARE-I i II zawierają powtórzenia sekwencji odpowiedzi na hormony (HRE, ang. *hormone response element*). BARE I jest położony bliżej miejsca inicjacji transkrypcji (-72/-52). W jego skład wchodzi dwie sekwencje HRE rozdzielone jednym nukleotydem, tzw. sekwencja DR4 (ang. *direct repeat 4*). Do tej sekwencji przyłącza się sierocy receptor jądrowy COUP-TFII (ang. *chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor*), który wraz z czynnikiem HNF-4 $\alpha$ , wiążącym się do BARE-II, silnie indukuje transkrypcję *CYP7A1*. Element BARE II jest położony dalej od miejsca startu transkrypcji (-149/-128). Zbudowany jest z nakładających się trzech sekwencji HRE. Tworzą one dwa miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, DR1 i DR5. W DR1 sekwencje HRE rozdzielone są jednym nukleotydem, natomiast w DR5 pięcioma. Element DR1 jest odpowiedzialny za wiązanie HNF-4 $\alpha$ , jednego z głównych czynników regulujących ekspresję genu *CYP7A1*. Do DR5 wiąże się heterodimer RXR/RAR (RXR, ang. *retinoic X receptor* – receptor retinoidowy X; RAR, ang. *retinoic acid receptor* – receptor kwasu retinowego), konkurujący z HNF-4 $\alpha$ . Przyłączenie RXR/RAR prowadzi do represji transkrypcji. W BARE II u gryzoni jest też element odpowiedzi na LXR (u człowieka nie występuje). W promotorze genu *CYP7A1* znajdują się także elementy wiążące inne czynniki, jak np. HNF-3, który jest transaktywatorem zarówno podstawowej transkrypcji *CYP7A1*, jak i indukowanej receptorami jądrowymi [26,27].

Kwasy żółciowe są najważniejszym czynnikiem regulującym ekspresję *CYP7A1*. Skutkiem ich działania jest represja genu 7 $\alpha$ -hydroksylazy, pod wpływem aktywowanego przez nie receptora FXR. Po związaniu liganda czynnik ten nie wiąże się bezpośrednio do elementu odpowiedzi w DNA, aktywuje natomiast inne receptory jądrowe, takie jak SHP (mały heterodimeryczny czynnik towarzyszący, ang. *small heterodimer partner*). Receptor jądrowy SHP nie ma możliwości wiązania się do DNA, ponieważ nie posiada odpowiedniej domeny wiążącej. Ma natomiast możliwość oddziaływania z wieloma białkami, zarówno czynnikami transkrypcyjnymi, koregulatorami transkrypcji, jak też receptorami jądrowymi. Jednym z tych ostatnich jest czynnik HNF-4 $\alpha$  (hepatocytarny czynnik jądrowy, ang. *hepatocyte nuclear factor*). Aktywuje on *CYP7A1*, wiążąc się z sekwencją BARE-II [28]. Utworzenie kompleksu HNF-4 $\alpha$  z SHP umożliwia prawidłowe oddziaływanie tego pierwszego z koaktywatorami (przede wszystkim PGC-1 $\alpha$  – koaktywatorem 1 receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksyosomalne, ang. *peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1*). Ich oddysocjowanie od HNF-4 $\alpha$  pod wpływem SHP wywołuje represję genu *CYP7A1* [22] (Ryc. 4).

SHP reguluje również procesy deacetylacji i metylacji histonów. Deacetylaza histonów (HDAC1) pod wpływem kwasów żółciowych przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie łączy się z SHP i grupą innych białek represyjnych. Skutkiem jest deacetylacja histonu H3. Następnie SHP poprzez oddziaływanie z metylotransferazą G9a akty-



**Rycina 4.** Regulacja ekspresji genu *CYP7A1* przez kwasy żółciowe, za pośrednictwem czynnika FXR. Pod wpływem FXR następuje represja genu *CYP7A1*. Pierwszy z mechanizmów represji polega na aktywacji receptora SHP przez FXR, a następnie wiązanie tego pierwszego z czynnikiem transkrypcyjnym HNF4α. To uniemożliwia wiązanie HNF4α do promotora *CYP7A1* i indukcję genu. Drugi mechanizm wykorzystuje do represji *CYP7A1* aktywowany przez FXR czynnik FGF-19 oraz kinazę MAP. W oparciu o [10].

wuje metylację histonu H3 i w końcu sam się z nim łączy, co prowadzi do wyciszenia transkrypcji genu *CYP7A1* [29,30]. Dodatkowo, SHP pomaga w przyłączeniu do BARE kompleksu Swi/Snf (ang. *mating-type switch/sucrose nonfermenting*), odpowiedzialnego za przebudowę chromatyny [31]. SHP współdziała także z innym korepresorem transkrypcji, GPS2 (ang. *G protein supressor 2*) [32]. Wszystkie te badania dotyczące wpływu SHP na strukturę chromatyny zostały wykonane w warunkach *in vitro*. Do tej pory nie wiadomo jednak, czy ten mechanizm regulacji aktywności *CYP7A1* jest możliwy w warunkach fizjologicznych. U myszy zablokowanie genu *Shp* nie prowadzi do istotnego wzrostu aktywności genu *CYP7A1* [33]. Być może taka regulacja aktywności 7α-hydroksylazy cholesterolowej następuje w wyjątkowych sytuacjach, takich jak uszkodzenie wątroby, cholestaza, regeneracja wątroby. Możliwe także, że chroni on komórki przed toksycznym działaniem wysokiego stężenia kwasów żółciowych [34].

FXR, poza oddziaływaniem z receptorem jądrowym SHP, może regulować szlak biosyntezy kwasów żółciowych, także za pośrednictwem czynnika wzrostowego fibroblastów (FGF-19, ang. *fibroblast growth factor-19*) (Ryc. 4). Wzrost stężenia kwasów żółciowych w świetle jelita, prowadzący do aktywacji jelitowej formy FXR, indukuje gen kodujący FGF-19. Indukcja genu kodującego FGF-19, pod wpływem FXR, zachodzi także w wątrobie, choć ilość powstającego czynnika jest tu stosunkowo niewielka. W obu przypadkach dochodzi do wzrostu stężenia FGF-19 we krwi. Czynnikiem ten wiąże się ze swoim receptorem w błonie komórkowej hepatocytów (FGF-R4, ang. *fibroblast growth factor receptor 4*) i stymuluje działanie ścieżki sygnałowej kinazy MAP. Skutkiem jest represja genu *CYP7A1* [35].

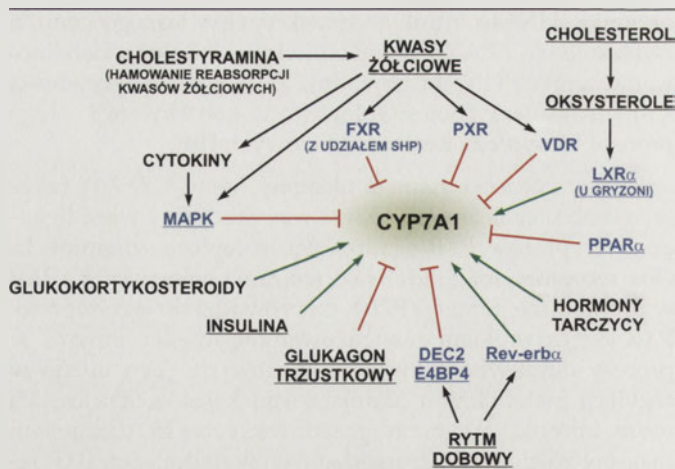
FXR reguluje ponadto aktywność *CYP7A1*, aktywując na poziomie transkrypcji czynnikiem PPARα (receptor aktywowany przez proliferatory peroksyosomalne α, ang. *peroxisome proliferator-activated receptor α*). Aktywny PPARα nie wiąże się bezpośrednio do *CYP7A1*. Konkuruje on natomiast z HNF4α o miejsce wiązania w promotorze genu tego

czynnika. HNF4α indukuje transkrypcję własnego genu, a związanie się PPARα uniemożliwia tę indukcję. Zahamowanie syntezy HNF4α powoduje zmniejszenie aktywności 7α-hydroksylazy cholesterolowej a w konsekwencji całego procesu biosyntezy kwasów żółciowych [14].

Kwasy żółciowe hamują ekspresję genu *CYP7A1* także w sposób niezależny od FXR. Kwas lithocholowy jest ligandem receptorów PXR i jądrowego receptora witaminy D. Oba receptory mają zdolność wiązania sekwencji BARE-I w promotorze genu *CYP7A1*, co prowadzi do jego represji. PXR jest czynnikiem zaangażowanym, między innymi, w procesy detoksykacji kwasów żółciowych. Jego udział w regulacji metabolizmu (detoksykacji) kwasów żółciowych może chronić organizm przed toksycznym działaniem kwasów żółciowych, gromadzonych w nadmiarze. PXR reguluje nie tylko biosyntezę kwasów żółciowych, ale także aktywuje ich wydalanie z organizmu. Blokuje oddziaływanie HNF4α z jego aktywatorem PGC1α, co uniemożliwia indukcję genu 7α-hydroksylazy cholesterolowej [36]. Wpływ VDR na ekspresję genu *CYP7A1* jest podobny do wpływu PXR, przy czym regulacja ta zachodzi przy udziale kilku mechanizmów. Jądrowy receptor witaminy D, podobnie jak PXR, uniemożliwia połączenie HNF4α z PGC1α, ale także współzawodniczy z HNF4α o miejsce wiązania w promotorze kontrolowanego genu. Ponadto współzawodniczy o wiązanie z koaktywatorami i ułatwia przyłączanie korepresorów DNA [37].

Kwasy żółciowe są głównym ale nie jedynym regulatorem aktywności *CYP7A1*. Czynnikiem indukującym biosyntezę kwasów żółciowych jest aktywowany przez oksysterole czynnik LXRα (wątrobowy receptor X, ang. *liver X receptor*). Element odpowiedzi na LXRα jest obecny w genie 7α-hydroksylazy cholesterolowej u myszy i u szczura. U człowieka i królika taki element nie występuje, natomiast u chomika jest on niefunkcjonalny [38,39]. Zdolność do aktywacji *CYP7A1* przez LXRα, u gryzoni, pozwala na zwiększenie zużycia cholesterolu np. przy spożywaniu diety bogatej w cholesterol. U ludzi nie ma takiej możliwości, co może przyczyniać się do rozwoju hipercholesterolemii [40].

Bardzo ważnym regulatorem biosyntezy kwasów żółciowych jest insulina. Wpływa ona na aktywność genu *CYP7A1* (i innych) za pośrednictwem dwóch czynników transkrypcyjnych: FoxO1 (ang. *forkhead box O1*) i SREBP-1c. U szczura przy niskim stężeniu insuliny czynnik FoxO1 wiąże się do elementu odpowiedzi na insulinę (IRE, ang. *insulin response element*), obecnego w promotorze genu *CYP7A1* i indukuje jego ekspresję. Obecność insuliny prowadzi do fosforylacji tego czynnika przez kinazę białkową B. To powoduje jego migrację z jądra komórkowego do cytosolu, a następnie represję genu *CYP7A1*. Aktywacja czynnika SREBP-1c przez insulinę prowadzi do wzrostu ekspresji *CYP7A1* u szczura. U ludzi mechanizm regulacji biosyntezy kwasów żółciowych jest inny i zależy od stężenia insuliny oraz czasu działania. Krótkotrwałe działanie insuliny w fizjologicznych stężeniach (1.4-14 nM) prowadzi do aktywacji tego procesu. Czynnikiem FoxO1 u ludzi nie wiąże się do DNA, ponieważ w promotorze genu *CYP7A1* nie ma odpowiedniego elementu wiążącego. Jest on jednak korepresorem transkrypcji. Uniemożliwia przyłączenie czynnika PGC1α do HNF4α, co pro-



Rycina 5. Czynniki regulujące aktywność CYP7A1. Najważniejsze podkreślono. Białka regulatorowe oznaczono kolorem niebieskim (opis w tekście). W oparciu o [47].

wadzi do represji *CYP7A1*. Obecność insuliny, prowadząca do degradacji FoxO1, indukuje transkrypcję *CYP7A1* [41]. Takie działanie insuliny w stanie resorpcyjnym prawdopodobnie ułatwia wchłanianie składników pokarmowych, przy jednoczesnym hamowaniu glukoneogenezy (FoxO1 jest aktywatorem genu karboksykinazy fosfoenolopirogronianu), co zapobiega hiperglikemii. Długotrwałe działanie insuliny (jak w cukrzycy typu II) prowadzi do wzrostu aktywności czynnika SREBP-1c, który u ludzi również działa jako korepresor hamujący działanie czynnika HNF4α. W takiej sytuacji biosynteza kwasów żółciowych ulega zahamowaniu [24].

O ile w stanie resorpcyjnym istnieje potrzeba syntezy kwasów żółciowych, stąd pozytywna regulacja tego procesu przez insulinę, o tyle w stanie głodu takiej potrzeby nie ma. Wzrost stężenia glukagonu hamuje (poprzez cykliczny AMP) wytwarzanie kwasów żółciowych, prowadząc do inaktywacji czynnika HNF4α. Aktywowana przez cykliczny AMP kinaza białkowa A fosforyluje HNF4α (Ser 304), co przyczynia się do zmniejszenia jego stabilności, zdolności do homodimeryzacji a także wiązania się do DNA. Podobny mechanizm zaobserwowano w hepatocytach szczura [42].

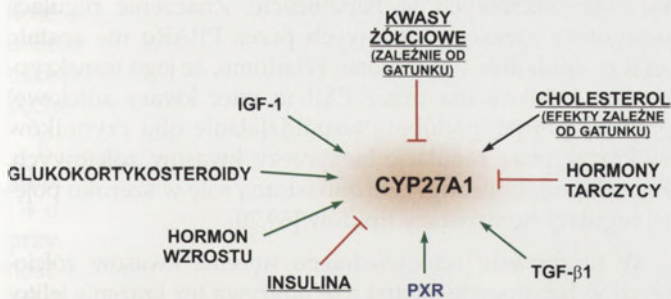
Poza regulacją biosyntezy kwasów żółciowych omawianą powyżej zaobserwowano także, że proces ten jest regulowany przez rytm dobowy, zarówno u ludzi jak i szczurów. W promotorze genu *CYP7A1* obecne są elementy wiążące czynniki transkrypcyjne regulujące rytm dobowy takie jak DBP (białko wiążące miejsce D, ang. *D-site binding protein*), DEC2 (czynnik transkrypcyjny zróżnicowanych, embryonalnych chondrocytów, ang. *differentiated embryo chondrocyte*) czy E4BP4. DBP indukuje, a DEC2 i E4BP4 hamują ekspresję *CYP7A1*. Czynniki DBP i DEC2 pojawiają się w komórce mniej więcej w tym samym czasie, jednak wiążą się do różnych sekwencji w DNA. Przypuszczalnie zadaniem czynnika DEC2 jest zapobieganie nadmiernej aktywności *CYP7A1* w obecności DBP. E4BP4 pojawia się w komórce w czasie gdy DBP jest nieobecny i wiąże się do sekwencji odpowiedzialnej na DBP hamując transkrypcję [43,44]. Aktywność E4BP4 jest kontrolowana przez białko Rev-erba (receptor jądrowy z rodziny NR1D1). Jest to sieroicy receptor regulujący

cy metabolizm lipidów, glukozy, różnicowanie adipocytów oraz wiele innych procesów, przy czym jego bardzo istotną funkcją jest regulacja rytmu dobowego. Rev-erba wiąże się do promotora genu E4BP4 hamując ekspresję genu, co z kolei prowadzi do obniżenia ekspresji genu kodującego *CYP7A1*. Innym skutkiem działania Rev-erba, jako represora transkrypcji, jest zahamowanie aktywności genu kodującego czynnik SHP czego skutkiem jest również obniżenia ekspresji genu kodującego *CYP7A1* [45].

Z regulacją procesu biosyntezy kwasów żółciowych łączy się także takie czynniki jak TNFα, TGFβ (transformujący czynnik wzrostowy β, ang. *transforming growth factor*), EGF-R (receptor epidermalnego czynnika wzrostowego, ang. *epidermal growth factor receptor*), HGF (hepatocytarny czynnik wzrostowy, ang. *hepatocyte growth factor*), a także hormony tarczycy i glukokortykoidy [36,42,46]. Cholestyramina, lek stosowany w leczeniu hipercholesterolemii, także wpływa na aktywność *CYP7A1*. Wiążąc w jelicie kwasy żółciowe zapobiega ich reabsorpcji, ale jednocześnie przyczynia się do wzrostu aktywności 7α-hydroksylazy cholesterolowej [47]. Najważniejsze czynniki wpływające na aktywność *CYP7A1* są wymienione na rycinie 5.

## REGULACJA AKTYWNOŚCI CYP27A1

Enzymem inicjującym a zarazem ograniczającym alternatywną drogę biosyntezy kwasów żółciowych jest 27-hydroksylaza sterolowa. Jest to enzym biorący także udział w etapie utleniania łańcucha bocznego, związany ponadto z innymi szlakami metabolizmu cholesterolu. Aktywność *CYP27A1* jest skoordynowana z aktywnością *CYP7A1* z tym, że nie wszystkie omówione powyżej czynniki regulujące wpływają jednocześnie na aktywność obu enzymów, a stopień tej koordynacji zależy od gatunku (Ryc. 6). Regulacja *CYP27A1* dotyczy przede wszystkim transkrypcji ale istnieje też duże prawdopodobieństwo udziału potranskrypcyjnych mechanizmów regulacyjnych. Stwierdzono, że istnieje znaczna różnica pomiędzy ilością powstającego mRNA a aktywnością enzymu [48]. W potranskrypcyjnej regulacji biorą udział prawdopodobnie fosfolipidy [49]. Mechanizm regulacji transkrypcji jest poznany dużo dokładniej. Wiadomo, że najważniejszymi czynnikami regulatorowymi są kwasy żółciowe i cholesterol. Kwasy żółciowe są czynnikiem hamującym aktywność genu *CYP27A1* np. u szczura, ale nie u królika czy myszy (Ryc. 6). U człowieka wpływ kwasów żółciowych na ekspresję *CYP27A1* jest dyskusyjny. W promotorze genu *CYP27A1* obecna jest sekwencja wiążąca czynnik HNF4α, ale jest ona różna od sekwencji BARE w promotorze *CYP7A1*. Wydaje się, że jest to jeden z najważniejszych regulatorów transkrypcji tego genu, przy czym nie wykazano współdziałania z czynnikami SHP i FXR. Jeśli więc ulega on inaktywacji powodując tym samym represję *CYP27A1*, to dzieje się to niezależnie od FXR. Być może, kwasy żółciowe, za pośrednictwem cytokin prozapalnych aktywują drogę sygnałową kinazy MAP (kinaza aktywowana mitogenami, ang. *mitogen-activated kinase*), prowadzącą do fosforylacji tego czynnika, co z kolei uniemożliwia jego wiązanie z transaktywatorami. Dodatkowo, dopuszcza się możliwość regulacji ekspresji *CYP27A1* przez receptory PXR oraz VDR [50,51]. Z kolei, cholesterol jest aktywatorem tego genu u królika, ale nie u szczura i myszy [52].

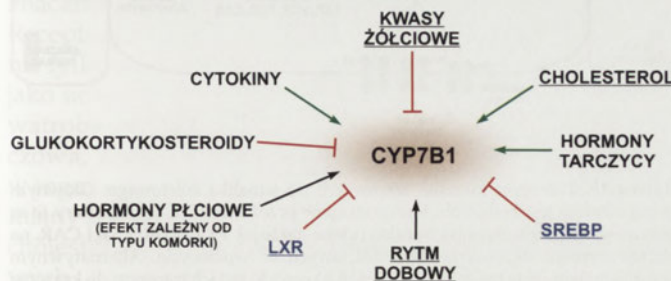


Rycina 6. Czynniki regulujące aktywność CYP27A1. Najważniejsze podkreślono. Białka regulatorowe oznaczono kolorem niebieskim (opis w tekście). W oparciu o [47].

CYP27A1 podlega także regulacji hormonalnej. Insulina i hormony tarczycy hamują jej aktywność [46]. Glukokortykoidy aktywują 27-hydroksylazę cholesterolową. Regulacja polega przede wszystkim na aktywacji ekspresji genu przez receptor glukokortykoidów, GR $\alpha$ , ale prawdopodobnie także na stabilizacji mRNA [53]. Ponadto CYP27A1 jest regulowany przez hormon wzrostu i IGF-1 (czynnik wzrostowy podobny do insuliny 1, ang. *insulin-like growth factor 1*), a także androgeny i estrogeny [54,55]. W innych niż wątroba tkankach aktywność 27-hydroksylazy sterolowej jest również regulowana. W makrofagach enzym ten odgrywa prawdopodobnie istotną rolę w ich ochronie komórek przed gromadzeniem nadmiernych ilości cholesterolu. Chroni więc przed rozwojem miażdżycy. Ważną funkcję pełnią tu czynniki RXR i PPAR $\gamma$  [56]. W jelicie cienkim czynnikiem aktywującym ekspresję CYP27A1 jest PXR. Wzrost aktywności enzymu po spożyciu pokarmu bogatego w cholesterol prowadzi do wzrostu stężenia oksysteroli a te przyczyniają się do aktywacji czynnika LXR. LXR, pobudzając transportery z rodziny ABC, przyczynia się do przyspieszenia zwrotnego transportu cholesterolu do światła jelita oraz produkcji HDL [57]

### REGULACJA AKTYWNOŚCI CYP7B1

Podobnie jak CYP27A1, CYP7B1 jest enzymem uczestniczącym w alternatywnej drodze biosyntezy kwasów żółciowych i jego aktywność również podlega regulacji (Ryc. 7). Rola podstawowych czynników regulujących biosyntezę kwasów żółciowych, czyli cholesterolu i samych kwasów żółciowych, nie jest tu tak oczywista jak w przypadku poprzednio omawianych enzymów. U gryzoni stwierdzono

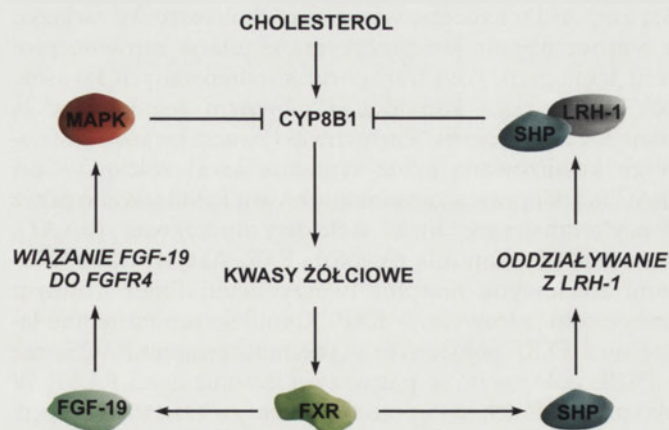


Rycina 7. Czynniki regulujące aktywność CYP7B1. Najważniejsze podkreślono. Białka regulatorowe oznaczono kolorem niebieskim (opis w tekście). W oparciu o [47].

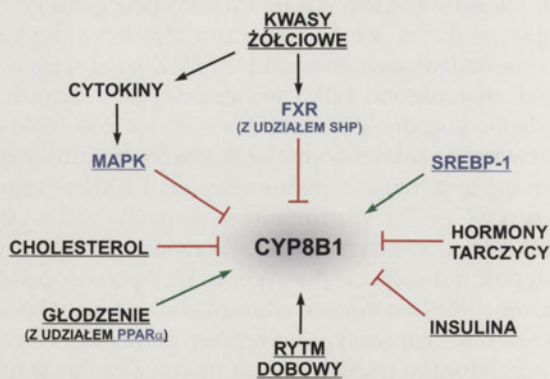
wpływ kwasów żółciowych na transkrypcję genu CYP7B1, natomiast u ludzi zaobserwowano działanie wyłącznie kwasu chenodeoksycholowego [47,58]. Z kolei wpływ cholesterolu stwierdzono tylko w hepatocytach szczura. Nie stwierdzono go jednak w warunkach *in vivo* [58]. Niedawno zaobserwowano udział czynnika ROR $\alpha$  (retinoidowy receptor sierocy, ang. *retinoic orphan receptor*) i LXR w regulacji transkrypcji CYP7B1. W promotorze genu CYP7B1 występuje element odpowiedzi na ROR $\alpha$ . Po związaniu tego czynnika następuje indukcja ekspresji genu. LXR prawdopodobnie konkuruje z ROR $\alpha$  o miejsce wiązania lub też o koaktywatory, prowadząc tym samym do represji genu [59]. Negatywnymi regulatorami transkrypcji są również czynniki SREBP (1 i 2), przy czym nie wiążą się one bezpośrednio do DNA a oddziałują prawdopodobnie za pośrednictwem LXR [60]. Rytm dobowy reguluje aktywność CYP7B1 w sposób skoordynowany z aktywnością CYP7A1, przy czym aktywność tego pierwszego narasta nieco później [58]. Dodatkowe czynniki wpływające na aktywność CYP7B1 to estrogeny i androgeny, hormony tarczycy, glukokortykoidy i cytokiny [58,61].

### REGULACJA AKTYWNOŚCI CYP8B1

12 $\alpha$ -hydroksylaza sterolowa (CYP8B1) jest enzymem biorącym udział w produkcji kwasu cholowego, wpływając w ten sposób na skład puli powstających kwasów żółciowych (stosunek ilości kwasu cholowego do chenodeoksycholowego). Kwasy żółciowe w istotny sposób regulują aktywność tego enzymu na poziomie transkrypcji. Mechanizm tej regulacji (Ryc. 8) jest bardzo podobny do mechanizmu regulacji ekspresji genu CYP7A1 (Ryc. 4). Udział w niej biorą czynniki FXR, SHP oraz HNF4 $\alpha$  i LRH-1, przy czym, inaczej niż w przypadku CYP7A1, ważniejsza jest tu rola LRH-1 niż HNF4 $\alpha$  [62]. Kwasy żółciowe mogą hamować CYP8B1 także na drodze niezależnej od SHP, z udziałem kinazy MAP, która prowadzi do zablokowania indukcji genu przez czynnik HNF4 $\alpha$  [63]. Aktywność 12 $\alpha$ -hydroksylazy jest też regulowana cyklem głodzenia/karmienia. W stanie głodu za pośrednictwem czynnika PPAR $\alpha$  dochodzi do indukcji genu CYP8B1 [64]. Insulina natomiast jest czynnikiem ha-



Rycina 8. Regulacja ekspresji genu CYP8B1 przez kwasy żółciowe, za pośrednictwem czynnika FXR. Pod wpływem FXR następuje represja genu CYP8B1. Pierwszy z mechanizmów represji polega na aktywacji receptora SHP przez FXR, a następnie wiązanie tego pierwszego z czynnikiem transkrypcyjnym LRH1. To uniemożliwia wiązanie LRH1 do promotora CYP8B1 i indukcję genu. Drugi mechanizm wykorzystuje do represji CYP8B1 aktywowany przez FXR czynnik FGF-19 oraz kinazę MAP. W oparciu o [10].



Rycina 9. Czynniki regulujące aktywność CYP8B1. Najważniejsze podkreślono. Białka regulatorowe oznaczono kolorem niebieskim (opis w tekście). W oparciu o [47].

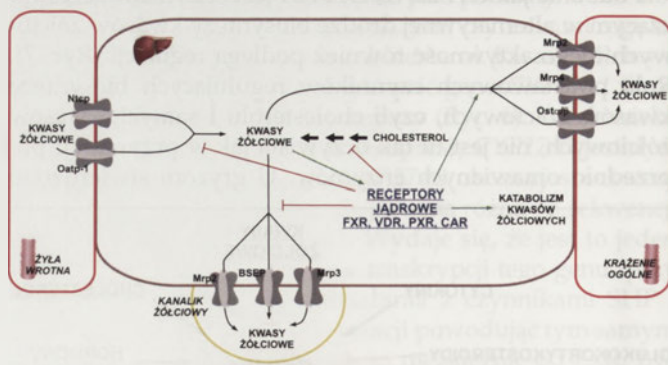
mującym [47,65]. Stwierdzono także, że czynniki SREBP mają zdolność regulacji genu kodującego 12 $\alpha$ -hydroksylazę sterolową. Skutek działania jest zależny od typu czynnika. SREBP-1 prowadzi do indukcji, natomiast SREBP-2 do represji genu [65,66]. Do innych czynników wpływających na funkcjonowanie genu *CYP8B1* zalicza się cholesterol i hormony tarczycy. Dieta bogata w cholesterol prowadzi do zahamowania ekspresji *CYP8B1*, inaczej niż w przypadku *CYP7A1*. Podobny efekt obserwuje się w przypadku hormonów tarczycy, które aktywują *CYP7A1* a hamują *CYP8B1* [65]. Aktywność 12 $\alpha$ -hydroksylazy jest też zależna od fazy dnia. Jest ona najwyższa wtedy, gdy aktywność 7 $\alpha$ -hydroksylazy cholesterolowej jest najniższa [67] (Ryc. 9).

## REGULACJA KONIUGACJI I TRANSPORTU KWASÓW ŻÓLCIOWYCH

Regulacji przez kwasy żółciowe podlega też ostatni etap biosyntezy, czyli koniugacja z glicyną lub tauryną. Prowadzi ona do zwiększenia rozpuszczalności kwasów żółciowych, dzięki czemu mogą być one przeniesione przez odpowiednie transportery z rodziny ABC do kanalików żółciowych i następnie uczestniczyć w trawieniu lipidów w jelicie. Kwasy żółciowe, które nie uległy koniugacji pozostają w hepatocytach, a gdy ich stężenie nadmiernie wzrośnie stają się dla komórki toksyczne, wywołując cholestazę. W związku z tym wymagana jest precyzyjna regulacja zarówno procesu koniugacji, jak i transportu koniugowanych kwasów żółciowych poza komórkę, a głównym regulatorem są same kwasy żółciowe. Zarówno aktywacja kwasów żółciowych katalizowana przez syntetazę kwas żółciowy-CoA (BACS), jak i przyłączanie aminokwasu katalizowane przez N-acylotransferazę kwas żółciowy:aminokwas (BAAT), pozostają pod kontrolą receptora FXR. Aktywowany kwasami żółciowymi receptor tworzy heterodimer z innym receptorem jądrowym – RXR. Kompleks ten następnie łączy się z FXRE położonym w promotorze genu *BACS* oraz z FXRE położonym w pierwszym intronie genu *BAAT*. W obu przypadkach następuje aktywacja procesu transkrypcji, prowadząca do przyspieszenia koniugacji kwasów żółciowych [68]. Etap koniugacji jest ponadto regulowany przez czynnik PPAR $\alpha$ . Jest on w tym przypadku negatywnym regulatorem. Jego aktywacja prowadzi jednocześnie do zahamowania koniugacji i przyspieszenia reakcji odwrotnej, czego skutkiem jest zwiększenie stężenia nieskoniugowanych

kwasów żółciowych w hepatocycie. Znaczenie regulacji biosyntezy kwasów żółciowych przez PPAR $\alpha$  nie zostało jeszcze dokładnie wyjaśnione. Wiadomo, że jego transkrypcja jest indukowana przez FXR (a więc kwasy żółciowe) oraz, że prawdopodobnie współdziałanie obu czynników wykracza poza regulację biosyntezy kwasów żółciowych. Prawdopodobnie odgrywa ono istotną rolę w szeroko pojętej regulacji homeostazy lipidów [69,70].

W utrzymaniu odpowiedniego stężenia kwasów żółciowych w hepatocycie istotną rolę odgrywa też krążenie jelitowo-wątrobowe. Kwasy żółciowe transportowane do kanalików, a następnie do pęcherzyka żółciowego, oraz kwasy żółciowe powracające z jelita żyłą wrotną do wątroby biorą udział w kontroli szlaku biosyntezy kwasów żółciowych *de novo*. Transport z wątroby do kanalików żółciowych odbywa się przede wszystkim przy udziale pompy eksportu soli kwasów żółciowych (BSEP) (Ryc. 10). Zaburzenia jej działania, spowodowane np. zwiększoną internalizacją w stanach zapalnych wątroby, prowadzą do gromadzenia się kwasów żółciowych we wnętrzu komórki, czego skutkiem może być rozwój cholestazy [71]. BSEP występuje tylko w wątrobie i jest glikoproteiną P [72]. Przenosi przez błonę hepatocytu głównie koniugowane kwasy żółciowe, przy czym największe powinowactwo wykazuje w stosunku do kwasu taurochenodeoksycholowego. Transportuje także inne jony organiczne, ale w bardzo ograniczonym stopniu. Jej aktywność jest stymulowana przez same kwasy żółciowe, za pośrednictwem heterodimeru FXR/RXR, który wiąże się do elementu odpowiedzi w promotorze genu *BSEP* [73]. Do uzyskania pełnej aktywności tego genu niezbędna jest też modyfikacja chromatyny przy udziale specyficznych metylotransferaz. Transporter ten regulowany jest też posttranslacyjnie. Ulega fosforylacji pod wpływem kinazy białkowej C $\alpha$  [71,74]. Z kolei przemieszczanie cząsteczek BSEP do błony komórkowej pozostaje pod kontrolą kwasów żółciowych i cAMP [75]. Pomocniczą rolę w usuwaniu kwasów żółciowych z hepatocytów do dróg żółciowych odgrywa białko Mrp2 (białko oporności wielolekowej 2). Przenosi koniugaty bilirubiny, glutationu, glukuronianu oraz siarczanu. Spośród kwasów żółciowych transportowane tym sposobem są przede wszystkim kwasy tauro- i glikolitocholowy [71]. Jego aktyw-



Rycina 10. Transport kwasów żółciowych do kanalika żółciowego. Głównym transporterem jest białko BSEP wspomagane przez Mrp3 i 2. Transportery te są aktywowane przez czynniki transkrypcyjne, takie jak FXR, VDR, PXR i CAR, na skutek wzrostu stężenia kwasów żółciowych w hepatocycie. Alternatywnym sposobem usuwania kwasów żółciowych z komórki jest ich transport do krążenia ogólnego, przy udziale przenośników Mrp 2, 4 i Osta/ $\beta$ . System ten ulega również aktywacji przez FXR, zwłaszcza przy zmniejszonej aktywności BSEP (np. w cholestazie). Za absorpcję kwasów żółciowych z żyły wrotnej do hepatocytu odpowiadają odmienne transportery (białka Ntcp i Oatp), których aktywność zmniejsza się, gdy stężenie kwasów żółciowych w hepatocycie jest wysokie.

ność regulowana jest na poziomie transkrypcji, prawdopodobnie za pośrednictwem receptorów LXR [76]. W procesie transportu kwasów żółciowych do kanalików, a następnie do pęcherzyka żółciowego, uczestniczy także białko Mrp3.

Kwasy żółciowe w pewnych warunkach mogą trafiać także do krążenia ogólnego za pośrednictwem białek Mrp2 i 4 oraz Osta/ $\beta$  (ang. *organic solute and steroid transporter*), przy czym to ostatnie jest najbardziej istotne. Jego aktywność jest stymulowana przez FXR, a więc przez same kwasy żółciowe [77,78].

Powracające z jelita kwasy żółciowe trafiają do hepatocytów za pośrednictwem dwóch białek. Kotreporter  $\text{Na}^+$ /kwasy żółciowe (Ntcp) przenosi kwasy żółciowe przez błonę komórki przy udziale jonów sodu, więc jego działanie wymaga udziału aktywnej ATPazy  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Transporter ten przenosi zarówno koniugowane jak i niekoniugowane kwasy żółciowe, z przewagą tych pierwszych [79]. Wysokie stężenie kwasów żółciowych w hepatocycie wywołuje represję genu kodującego Ntcp. Ma to uniemożliwić napływ dodatkowych kwasów żółciowych do komórki i dalszy wzrost stężenia. Za tę represję odpowiada FXR we współpracy z czynnikiem SHP, aktywującym heterodimer RAR/RXR. Ponadto, sugeruje się zachodzącą wówczas supresję czynników HNF1 $\alpha$  i 4 $\alpha$  [36]. Dodatkowymi czynnikami, hamującymi ekspresję genu Ntcp, są cytokiny prozapalne. Z kolei aktywacja zachodzi w obecności glukokortykoidów, cyklicznego AMP (transport do błony) oraz  $\text{Ca}^{2+}$  i kinazy białkowej C [80,81]. Drugi system transportu jest niezależny od sodu i wykorzystuje białko Oatp (transporter anionów organicznych). W ten sposób przenoszone są głównie niekoniugowane kwasy żółciowe, przy jednoczesnym usunięciu z komórki różnego rodzaju anionów (jak np.  $\text{HCO}_3^-$ ), czy zredukowanego glutationu. Podobnie jak w przypadku Ntcp, jednym z czynników regulujących działanie tego transportera są kwasy żółciowe, prawdopodobnie przy udziale HNF1 $\alpha$  i 4 $\alpha$  [71,82].

## PODSUMOWANIE

Do niedawna kwasy żółciowe postrzegane były jedynie jako detergenty ułatwiające trawienie i wchłanianie lipidów oraz związków rozpuszczalnych w lipidach. Ponieważ są także produktami przemian cholesterolu, uznawano ich istotną rolę w utrzymywaniu jego homeostazy w organizmie. Odkrycie receptorów jądrowych mogących wiązać kwasy żółciowe, w tym receptora FXR jako receptora dla nich specyficznego, pokazało jednak, że wywierają one znacznie większy wpływ na funkcjonowanie organizmu. Receptory te (zarówno FXR jak i VDR czy PXR) obecne są nie tylko w narządach/tkankach tradycyjnie postrzeganych jako uczestniczące w przemianach kwasów żółciowych, jak wątroba czy nabłonek jelita, ale także innych (tkanka tłuszczowa, nerki). Wymienione receptory jądrowe biorą udział w regulacji wielu procesów metabolicznych takich jak przemiany kwasów tłuszczowych, triacylogliceroli, lipoprotein, cholesterolu, glukozy, wreszcie samych kwasów żółciowych. Mogą także regulować proliferację komórek i brać udział w kontroli procesów zapalnych. Receptory jądrowe aktywowane przez kwasy żółciowe są obecnie obiektem badań mających na celu opracowanie nowych leków mogących pomóc w zwalczaniu takich stanów chorobowych jak

kamica żółciowa, stłuszczenie wątroby, otyłość, cholestaza, cukrzyca, oraz niektórych chorób układu krążenia. Już w tej chwili dostępnych jest kilka pochodnych kwasów żółciowych, poddanych wstępnym fazom badań klinicznych, które potencjalnie mogą zostać takimi lekami. Z tego względu, dokładne poznanie mechanizmów regulacji metabolizmu kwasów żółciowych jest niezwykle istotne. Większość badań, jakie wykonano do tej pory, dotyczyła jednak gryzoni i o ile regulacja aktywności ludzkiej 7 $\alpha$ -hydroksylazy cholesterolowej jest obecnie przedmiotem dość intensywnych prac, to ważne jest także bardziej dokładne poznanie mechanizmów kontroli aktywności pozostałych istotnych enzymów szlaku biosyntezy kwasów żółciowych u człowieka.

## PIŚMIENNICTWO


1. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B (2009) Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 80: 147-191
2. Zhang Y, Kast-Woelbern H, Edwards P (2003) Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J Biol Chem* 278: 104-110
3. Bungard C, McGivan J (2005) Identification of the promoter elements involved in the stimulation of ASCT2 expression by glutamine availability in HepG2 cells and the probable involvement of FXR/RXR dimers. *Arch Biochem Biophys* 443: 53-59
4. Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, Percevault F, Barbier O, Fruchart J, Kuipers F, Staels B (2004) Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes* 53: 890-898
5. Kim M, Shigenaga J, Moser A, Kenneth R, Feingold K, Grunfeld C (2003) Repression of farnesoid X receptor during the acute-phase response. *J Biol Chem* 278: 8988-8995
6. Zhang Y, Castellani L, Sinal C, Gonzalez F, Edwards P (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor-g coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev* 18: 157-169
7. Makishima M, Okamoto A, Repa J, Tu H, Learned M, Luk A, Hull M, Lustig K, Mangelsdorf D, Shan B (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284: 1362-1365
8. Wang Y-D, Chen W-D, Moore D, Huang W (2008) FXR: a metabolic regulator and cell protector. *Cell Res* 18: 1087-1095
9. Seol W, Choi H, Moore D (1995) Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol* 9: 72-85
10. Claudel T, Staels B, Kuipers F (2005) The farnesoid X receptor – a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 25: 2020-2031
11. Claudel T, Inoue Y, Barbier O, Duran-Sandoval D, Kosykh V, Fruchart J, Fruchart JC, Gonzalez FJ, Staels B (2003) Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression. *Gastroenterology* 125: 544-555
12. Kast H, Nguyen C, Sinal C, Jones S, Lafitte B, Reue K, Gonzalez F, Wilson T, Edwards P (2001) Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Mol Endocrinol* 15: 1720-1728
13. Sirvent A, Claudel T, Martin G, Brozek J, Kosykh V, Dartel R, Hum D, Fruchart J, Staels B (2004) The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression. *FEBS* 566: 173-177
14. Pineda Torra I, Claudel T, Duval C, Kosykh V, Fruchart JC, Staels B (2003) Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  gene *via* activation of the farnesoid X receptor. *Mol Endocrinol* 17: 259-272
15. Hirokane H, Nakahara M, Tachibana S, Shimizu M, Sato R (2004) Repressing microsomal triglyceride transfer protein gene expression mediated by hepatocyte nuclear factor-4. *J Biol Chem* 279: 45685-45692
16. Watanabe M, Houten S, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf D, Heyman A, Moore D, Auwerx J (2004) Bile acids lower triglyceride levels

- via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 113: 1408-1418
17. Zhang Y, Lee F, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez F, Willson T, Edwards P (2006) Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1006-1011
  18. Claudel T, Sturm E, Duez H, Pineda Torra I, Sirvent A, Kosykh V, Fruchart J, Dallongeville J, Hum D, Kuipers F, Staels B (2002) Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription *via* a negative FXR response element. *J Clin Invest* 109: 961-971
  19. Lambert G, Amar M, Guo G, Brewer B, Gonzalez F, Sinal C (2003) The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 278: 2563-2570
  20. Sirvent A, Verhoeven A, Jansen H, Kosykh V, Dartel R, Hum D, Fruchart J, Staels B (2004) Farnesoid X receptor represses hepatic lipase gene expression. *J Lipid Res* 45: 2110-2115
  21. Urizar N, Dowhan D, Moore D (2000) The farnesoid X-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. *J Biol Chem* 275: 39313-39317
  22. De Fabiani E, Mitro N, Gilardi F, Caruso D, Galli G, Crestani M (2003) Coordinated control of cholesterol catabolism to bile acids and of gluconeogenesis via a novel mechanism of transcription regulation linked to the fasted-to-fed cycle. *J Biol Chem* 278: 39124-39132
  23. Savkur R, Bramlett K, Michael L, Burris T (2005) Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by the farnesoid X receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 391-396
  24. Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, Fukamizu A (2004) Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and FoxO1. *J Biol Chem* 279: 23158-23165
  25. Foti D, Stroup D, Chiang J (1998) Basic transcription element binding protein (BTEB) transactivates the cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A). *Biochem Biophys Res Commun* 253: 109-113
  26. Crestani M, Sadeghpour A, Stroup D, Galli G, Chiang JY (1998) Transcriptional activation of the cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A) by nuclear hormone receptors. *J Lipid Res* 39: 2192-2200
  27. De Fabiani E, Mitro N, Anzulovich AC, Pinelli A, Galli G, Crestani M (2001) The negative effects of bile acids and tumor necrosis factor- $\alpha$  on the transcription of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) converge to hepatic nuclear factor-4: a novel mechanism of feedback regulation of bile acid synthesis mediated by nuclear receptors. *J Biol Chem* 276: 30708-30716
  28. Chanda D, Park J, Choi H (2008) Molecular basis of endocrine regulation by orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *Endocr J* 55: 253-268
  29. Boulias K, Talianidis I (2004) Functional role of G9a-induced histone methylation in small heterodimer partner-mediated transcriptional repression. *Nucleic Acids Res* 32: 6096-6103
  30. De Fabiani E, Mitro N, Godio C, Gilardi F, Caruso D, Crestani M (2004) Bile acid signaling to the nucleus: finding new connections in the transcriptional regulation of metabolic pathways. *Biochimie* 86: 771-778
  31. Kemper JK, Kim H, Miao J, Bhalla S, Bae Y (2004) Role of an mSn3A-Swi/Snf chromatin remodeling complex in the feedback repression of bile acid biosynthesis by SHP. *Mol Cell Biol* 24: 7707-7719
  32. Sanyal S, Bavner A, Haroniti A, Nilsson LM, Lundasen T, Rehrmark S, Witt MR, Einarsson C, Talianidis I, Gustafsson JA, Treuter E (2007) Involvement of corepressor complex subunit GPS2 in transcriptional pathways governing human bile acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15665-15670
  33. Kerr TA, Saeki S, Schneider M, Schaefer K, Berdy S, Redder T, Shan B, Russell DW, Schwarz M (2002) Loss of nuclear receptor SHP impairs but does not eliminate negative feedback regulation of bile acid synthesis. *Dev Cell* 2: 713-720
  34. Zhang L, Huang X, Meng Z, Dong B, Shiah S, Moore D, Huang W (2009) Significance and mechanism of CYP7A1 gene regulation during the acute phase liver regeneration. *Mol Endocrinol* 23: 137-145
  35. Song K, Li T, Owsley E, Strom S, Chiang J (2009) Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene. *Hepatology* 49: 297-305
  36. Chiang J (2009) Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 50: 1955-1966
  37. Han S, Chiang J (2009) Mechanism of vitamin D receptor inhibition of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 37: 469-478
  38. Chen J, Levy-Wilson B, Goodart S, Cooper A (2002) Mice expressing the human CYP7A1 gene in the mouse CYP7A1 knock-out background lack induction of CYP1A1 expression by cholesterol feeding and have increased hypercholesterolemia when fed a high fat diet. *J Biol Chem* 277: 42588-42595
  39. Chiang J, Kimmel R, Stroup D (2001) Regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by liver orphan receptor (LXR $\alpha$ ). *Gene* 262: 257-265
  40. Millatt L, Bocher V, Fruchart J, Staels B (2003) Liver receptors and the control of cholesterol homeostasis: potential therapeutic targets for the treatment of atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1631: 107-118
  41. Li T, Kong X, Owsley E, Ellis E, Strom S, Chiang J (2007) Insulin regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase expression in human hepatocytes. *J Biol Chem* 281: 28745-28754
  42. Song K, Chiang J (2006) Glucagon and cAMP inhibit cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) gene expression in human hepatocytes: discordant regulation of bile acid synthesis and gluconeogenesis. *Hepatology* 43: 117-125
  43. Lee Y, Alberta J, Gonzalez F, Waxman D (1994) Multiple, functional DBP sites on the promoter of the cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase P450 gene, CYP7A1. *J Biol Chem* 269: 14681-14689
  44. Noshiro M, Kawamoto T, Furukawa M, Fujimoto K, Yoshida Y, Sasabe E, Tsutsumi S, Hamada T, Honma S, Honma K, Kato Y (2004) Rhythmic expression of DEC1 and DEC2 in peripheral tissues: DEC2 is a potent suppressor for hepatic cytochrome P450s opposing to DEC1. *Genes Cells* 9: 317-329
  45. Duez H, Van der Veen J, Duhem C, Pourcet B, Touvier T, Fontaine C, Derudas B, Bauge E, Havinga R, Bloks V, Wolters H, Van der Sluijs F, Vennstrom B, Kuipers F, Staels B (2008) Regulation of bile acid synthesis by the nuclear receptor Rev-erba. *Gastroenterology* 135: 689-698
  46. Ellis E (2006) Suppression of bile acid synthesis by thyroid hormone in primary human hepatocytes. *World J Gastroenterol* 12: 4640-4645
  47. Norlin M, Wikvall K (2007) Enzymes in the conversion of cholesterol into bile acids. *Cur Mol Med* 7: 199-218
  48. Matsuzaki Y, Bouscarel B, Ikegami T, Honda A, Doy M, Ceryak S, Fukushima S, Yoshida S, Shoda J, Tanaka N (2002) Selective inhibition of CYP7A1 and of chenodeoxycholic acid synthesis in cholestatic hamster liver. *Biochim Biophys Acta* 1588: 139-148
  49. Murtazina D, Andersson U, Hahn I, Bjorkhem I, Ansari G, Pikuleva I (2004) Phospholipids modify substrate binding and enzyme activity of human cytochrome P450 27A1. *J Lipid Res* 45: 2345-53
  50. Chen W, Chiang J (2003) Regulation of human sterol 27-hydroxylase gene (CYP27A1) by bile acids and hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ). *Gene* 313: 71-82
  51. Garuti R, Croce M, Piccinini L, Tiozzo R, Bertolini S, Calandra S (2002) Functional analysis of the promoter of human sterol 27-hydroxylase gene in HepG2 cells. *Gene* 283: 133-143
  52. Bjorkhem I, Araya Z, Rudling M, Angelin B, Einarsson C, Wikvall K (2002) Differences in the regulation of the classical and the alternative pathway for bile acid synthesis in human liver. *J Biol Chem* 277: 26804-26807
  53. Araya Z, Tang W, Wikvall K (2003) Glucocorticoid receptor-mediated upregulation of human CYP27A1, a potential anti-atherogenic enzyme. *Biochem J* 372: 529-534
  54. Tang W, Norlin M, Wikvall K (2008) Hormonal regulation of the human sterol 27-hydroxylase gene CYP27A1. *Biochim Biophys Acta* 1781: 718-723




55. Tang W, Norlin M, Wikvall K (2007) Regulation of human CYP27A1 by estrogens and androgens in HepG2 and prostate cells. *Arch Biochem Biophys* 462: 13-20
56. Quinn CM, Jessup J, Wong J, Kritharides L, Brown A (2005) Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPAR $\gamma$  ligands. *Biochem J* 385: 823-830
57. Li T, Chen W, Chiang Y (2006) PXR induces CYP27A1 and regulates cholesterol metabolism in the intestine. *J Lipid Res* 48: 373-384
58. Ren S, Marques D, Redford K, Hylemon P, Gil G, Vlahcevic Z, Pandak W (2003) Regulation of oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7B1) in the rat. *Metabolism* 52: 636-642
59. Wada T, Kang H, Angers M, Gong H, Bhatia S, Khadem S, Ren S, Ellis E, Strom S, Jetten A, Xie W (2008) Identification of oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7B1) as a novel retinoid-related orphan receptor  $\alpha$  (ROR $\alpha$ ) (NR1F1) target gene and a functional cross-talk between ROR $\alpha$  and liver X receptor (NR1H3). *Mol Pharmacol* 73: 891-899
60. Norlin M, Chiang J (2004) Transcriptional regulation of human oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase by sterol response element binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 158-164
61. Tang W, Pettersson H, Norlin M (2008) Involvement of the PI3K/Akt pathway in estrogen-mediated regulation of human CYP7B1: identification of CYP7B1 as a novel target for PI3K/Akt and MAPK signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 112: 63-73
62. Lee Y, Schmidt D, Cummins C, Choi M, Peng L, Zhang Y, Goodwin B, Hammer R, Mangelsdorf D, Kliewer S (2008) Liver receptor homolog-1 regulates bile acid homeostasis but is not essential for feedback regulation of bile acid synthesis. *Mol Endocrinol* 22: 1345-1356
63. Jahan A, Chiang J (2005) Cytokine regulation of human sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase (CYP8B1) gene. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288: G685-G695
64. Hunt M, Yang Y, Eggertsen G, Carneheim C, Gafvels M, Einarsson C, Alexson S (2000) The peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) regulates bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* 275: 28947-28953
65. Vlahcevic Z, Eggertsen G, Bjorkhem I, Hylemon P, Redford K, Pandak W (2000) Regulation of sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase and cholic acid biosynthesis in the rat. *Gastroenterology* 118: 599-607
66. Del Castillo-Olivares A, Gil G (2002) Differential effects of sterol regulatory binding proteins 1 and 2 on sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase. *J Biol Chem* 277: 6750-6757
67. Parks D, Blanchard S, Bledsoe R, Chandra G, Consler T, Kliewer S, Stimmel J, Willson T, Zavacki A, Moore D, Lehmann J (1999) Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284: 1365-1368
68. Pircher P, Kitto J, Petrowski M, Tangirala R, Bischoff E, Schulman I, Westin S (2003) Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J Biol Chem* 278: 27703-27711
69. Li T, Chiang J (2009) Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs. *PPAR Res* doi: 10.1155/2009/501739
70. Solaas K, Kase F, Pham V, Bamberg K, Hunt M, Alexson S (2004) Differential regulation of cytosolic and peroxisomal bile acid amidation by PPAR $\alpha$  activation favors the formation of unconjugated bile acids. *J Lipid Res* 45: 1051-1060
71. Alrefai W, Gill R (2007) Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharmaceutical Res* 10: 1803-1823
72. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann A, Meier P (1998) The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273: 10046-10050
73. Redinger R (2003) The role of the enterohepatic circulation of bile salts and nuclear hormone receptors in the regulation of cholesterol homeostasis: Bile salts as ligands for nuclear hormone receptors. *Can J Gastroenterol* 17: 265-271
74. Suchy F, Ananthanarayanan M (2006) Bile salt excretory pump: biology and pathobiology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43 (Suppl. 1): S10-16
75. Kubitz R, Sutfels T, Kuhlkamp T, Kolling R, Haussinger D (2004) Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP kinase. *Gastroenterology* 126: 541-553
76. Adachi T, Nakagawa H, Hagiya Y, Yasuoka T, Ishikawa T (2009) Transport-metabolism interplay: LXR $\alpha$ -mediated induction of human ABC transporter ABCC2 (cMOAT/MRP2) in HepG2 cells. *Mol Pharm* 6: 1678-1688
77. Okuwaki M, Takada T, Iwayanagi Y, Koh S, Kariya Y, Fujii H, Suzuki H (2007) LXR  $\alpha$  transactivates mouse organic solute transporter  $\alpha$  and  $\beta$  *via* IR-1 elements shared with FXR. *Pharm Res* 24: 390-398
78. Soroka C, Mennone A, Hagey L, Ballatori N, Boyer J (2010) Mouse organic solute transporter  $\alpha$  deficiency enhances renal excretion of bile acids and attenuates cholestasis. *Hepatology* 51: 181-90
79. Weinman S, Carruth M, Dawson P (1998) Bile acid uptake *via* the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. *J Biol Chem* 273: 34691-34695
80. Eloranta J, Jung D, Kullak-Ublick G (2006) The human Na-taurocholate cotransporting polypeptide gene is activated by glucocorticoid receptor and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , and suppressed by bile acids *via* a small heterodimer partner-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* 20: 65-79
81. Li D, Zimmerman T, Thevananther S, Lee H, Kurie J, Karpen S (2002) Interleukin-1  $\beta$ -mediated suppression of RXR:RAR transactivation of the Ntcp promoter is JNK-dependent. *J Biol Chem* 277: 31416-31422
82. Hayhurst G, Lee Y, Lambert G, Ward J, Gonzalez F (2001) Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* 21: 1393-1403

## Mechanisms of bile acid biosynthesis regulation – autoregulation by bile acids

Areta Hebanowska 

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

 e-mail: areta@gumed.edu.pl

**Key words:** bile acid, 7 $\alpha$ -cholesterol hydroxylase, 27-cholesterol hydroxylase, 12 $\alpha$ -sterol hydroxylase, oxysterol hydroxylase, nuclear receptors

### ABSTRACT

Bile acids play significant role in body homeostasis regulation. They are products of cholesterol catabolism and ligands for some nuclear receptors regulating crucial metabolic pathways. The main enzyme regulating bile acids biosynthesis is CYP7A1 (7 $\alpha$ -cholesterol hydroxylase). Its activity is controlled mainly at the transcription level and the key transcription factor is FXR. It is activated by other nuclear receptors like SHP, HNF-4 $\alpha$  or LRH-1 and bile acids themselves, and represses CYP7A1 gene. The other transcription factors that inhibit CYP7A1 activity, are PXR, VDR, PPAR $\alpha$ . The main activator is LXR (in rodents), increasing CYP7A1 transcriptional activity. CYP7A1 activity increases in presence of insulin and glucocorticoids. It is also regulated by diurnal rhythm. Some of those factors influence the activities of other bile acids biosynthesis enzymes – CYP7B1, CYP27A1, CYP8B1. Because of bile acids significant function in body metabolism this article presents the newest knowledge on mechanisms of key enzymes activities control.

Donata Wawrzycka 

Instytut Biologii Roślin, Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

✉Instytut Biologii Roślin, Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Uniwersytet Wrocławski, ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław; tel.: (71) 375 41 28, e-mail: donata.wawrzycka@biol.uni.wroc.pl

Artykuł otrzymano 30 lipca 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 18 listopada 2010 r.

**Słowa kluczowe:** transportery; transportery ABC; drożdże *Saccharomyces cerevisiae*; oporność wielolekowa

**Wykaz skrótów:** ABC – ang. *ATP binding cassette*; MSD – domena transbłonowa białka; NBD – domena wiązania i hydrolizy ATP; NTE – N-terminalna domena białek ABCC; PDR – pleiotropowa oporność, oporność wielolekowa

**Podziękowania:** Praca została wykonana w ramach grantu 1014/S/IBR/2011.

## STRESZCZENIE

Transportery ABC (ang. *ATP Binding Cassette*) stanowią jedną z największych rodzin białek o kluczowym znaczeniu medycznym, przemysłowym i ekonomicznym. Występują we wszystkich organizmach. Białka te odpowiedzialne są za oporność mikroorganizmów na antybiotyki i fungicydy, jak i oporność komórek nowotworowych na chemioterapię. Mutacje w genach transporterów ABC powodują poważne choroby jak np. mukowiscydozę, adrenoleukodystrofię, ataksję. Białka ABC transporterów wykazują podobną budowę domenową, a do transportu używają energii uzyskanej z wiązania i rozkładu ATP. Działają nie tylko jako transportery ale również jako receptory, kanały, regulatory kanałów. Analiza sekwencji genomu *Saccharomyces cerevisiae* wykazała obecność 30 potencjalnych genów transporterów ABC, które podzielono na 6 podrodzin. Ich ogromne strukturalne i funkcjonalne podobieństwo do transporterów ABC człowieka pozwala na użycie w badaniach drożdży jako doskonałego modelowego organizmu. W niniejszej pracy przedstawiono charakterystykę białek ABC u *Saccharomyces cerevisiae*.

## WPROWADZENIE

Białka ABC występują powszechnie w komórkach wszystkich organizmów od mikroorganizmów do człowieka. Są zlokalizowane w błonach komórkowych i katalizują zależny od ATP transport różnych substratów przez błony. Chociaż białka ABC zostały zidentyfikowane już kilkadziesiąt lat temu, dopiero teraz stały się gorącym punktem zainteresowania. Związane jest to z ich ogromną medyczną, przemysłową i ekonomiczną rolą. Transportery ABC są bowiem odpowiedzialne za wieloraką oporność komórek na inhibitory. Wpływają na obniżenie stężenia leku w cytoplazmie, poprzez aktywne wyrzucanie go na zewnątrz komórki. Ekspresja genów kodujących białka ABC związana jest np. z opornością mikroorganizmów na antybiotyki i fungicydy, z opornością *Plasmodium* na leki antymalaryczne, z opornością roślin na herbicydy [1]. Wiele chorób człowieka zostało powiązanych z mutacjami w genach ABC transporterów. Mutacje powodujące nieprawidłowe funkcjonowanie transporterów ABC (mutacje typu *loss-of-function*) prowadzą np. do mukowiscydozy (mutacje w genie *CFTR*; ang. *Cystic fibrosis transmembrane regulator*), zespołu Dubina-Johnsona (mutacje w genie *cMOAT*; DJS, ang. *Dubin-Johnson syndrome*, hiperbilirubinemia II), zaburzeń w transporcie cholesterolu, choroby tangierskiej (mutacje w genie *ABCA1*, ang. *Tangier disease*), choroby Stargarda (mutacja w genie *ABCA4*; STGD, ang. *Stargardt's disease*) i wielu innych [2-5]. Obszerna lista chorób powodowanych przez mutacje w genach ABC dostępna jest na stronie <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>. Mutacje powodujące nadekspresję genów białek ABC prowadzą do nabycia przez komórki cech oporności wielolekowej. Cecha ta stanowi ogromny problem zarówno w antybiotykoterapii przeciwko bakteriom ale również w chemioterapii komórek nowotworowych. Dlatego ważne jest zrozumienie systemu aktywności i regulacji genów transporterów ABC, jak i zasady działania i specyfiki substratowej białek ABC.

Wszystkie znane transportery ABC wykazują podobną budowę domenową. Zbudowane są z zachowanej w ewolucji NBD domeny (ang. *Nucleotide-Binding Domain*) wiążącej i hydrolizującej ATP i domeny MSD (ang. *Membrane-Spanning Domain*) – domeny transmembranowej. Energia wykorzystana do transportu substancji przez błony niezgodnie z gradientem stężeń pozyskiwana jest z hydrolizy ATP, dlatego też białka ABC zwane są często pompami. Należy jednak pamiętać, że białka ABC działają nie tylko jako transportery ale również jako receptory, kanały, regulatory kanałów i proteazy [6].

W badaniach biochemicznych i genetycznych wykorzystuje się organizmy modelowe np. drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Drożdże od wieków są związane z postępem i rozwojem cywilizacji ludzkiej. Stosowane w przemyśle pie-

Tabela 1. Wykaz i charakterystyka białek ABC u *Saccharomyces cerevisiae* z podziałem na podrodziny.

Podrodzina	Gen	ORF	Wielkość białka (liczba AA)	Topologia	Lokalizacja w komórce	Funkcja
ABCB (MDR)	<i>STE6</i>	YKL209c	1290	(MSD-NBD) <sub>2</sub>	błona komórkowa	transport feromonu a homeostaza Fe/S białek
	<i>ATM1</i>	YMR301c	694	MSD-NBD	wew. błona mitochondrialna	transport peptydów
	<i>MDL1</i>	YLR188w	696	MSD-NBD	wew. błona mitochondrialna	?
	<i>MDL2</i>	YPL279w	820	MSD-NBD	wew. błona mitochondrialna	?
ABCC (MRP/CFTR)	<i>YOR1</i>	YGR281c	1477	(NBD-MSD) <sub>2</sub>	błona kom.	transport inhibitorów
	<i>YCF1</i>	YDR135c	1515	NTE-(NBD-MSD) <sub>2</sub>	błona wakuoli	transport metali
	<i>BPT1</i>	YLL015w	1559	NTE-(NBD-MSD) <sub>2</sub>	błona wakuoli	transport inhibitorów
	<i>VMR1</i>	YHL035c	1592	NTE-(NBD-MSD) <sub>2</sub>	błona wakuoli	transport inhibitorów
	<i>YBT1</i>	YLL048c	1661	NTE-(NBD-MSD) <sub>2</sub>	błona wakuoli	transport inhibitorów
<i>NFT1</i>	YKR103w/104w	1524	NTE-(NBD-MSD) <sub>2</sub>	?	?	
ABCD (ALDP)	<i>PXA1</i>	YPL147w	870	MSD-NBD	peroksysomy	pobieranie
	<i>PXA2</i>	YKL188c	853	MSD-NBD	peroksysomy	długołańcuchowych kw. tłuszczowych
ABCE (RLI)	<i>RLI1</i>	YDR091c	608	NBD-NBD	?	homeostaza Fe/S
ABCF (YEF)	<i>YEF3</i>	YLR249w	1044	NBD-NBD		wpływa na translację białek powiązany z bigenezą rybosomów
	<i>New1</i>	YPL226w	1196	NBD-NBD		?
	<i>GCN20</i>	YFR009w	752	NBD-NBD	cytoplazma, rybosomy	aktywacja kinazy Gcn2p
	<i>Hef3</i>	YNL014w	1044	NBD-NBD		?
	<i>ARB1</i>	YER036c	610	NBD-NBD		powiązany z biogenezą rybosomów
ABCG (PDR)	<i>PDR5</i>	YOR153w	1511	(MSD-NBD) <sub>2</sub>	błona komórkowa	wieloraka oporność
	<i>SNQ2</i>	YDR011w	1501	(MSD-NBD) <sub>2</sub>	błona komórkowa	wieloraka oporność
	<i>PDR15</i>	YOR406w	1529	(MSD-NBD) <sub>2</sub>	błona komórkowa	wieloraka oporność
	<i>PDR10</i>	YOR328w	1564	(MSD-NBD) <sub>2</sub>	błona komórkowa	wieloraka oporność
	<i>PDR12</i>	YPL058c	1511	(MSD-NBD) <sub>2</sub>	błona komórkowa	oporność na słabe kw. organicznych
	<i>PDR11</i>	YI:013c	1411	(MSD-NBD) <sub>2</sub>	błona komórkowa	transport steroli
	<i>PDR18</i>	YNR070w	1333	(MSD-NBD) <sub>2</sub>	błona komórkowa	?
	<i>AUS1</i>	YOR011w	1394	(MSD-NBD) <sub>2</sub>	błona komórkowa	transport steroli
	<i>ADP1</i>	YOL075c	1093	(MSD-NBD) <sub>2</sub>	błona komórkowa	?
Inne	<i>CAF16</i>	YFL028c	289	NBD		?
		YDR061w	539	NBD		?

ORF – ang. *open reading frame*, otwarta ramka odczytu, sekwencja, która potencjalnie może ulec translacji na białko; AA – aminokwasy; MSD – domena transbłonowa; NBD – domena wiązania i hydrolizy ATP; NTE – dodatkowa N-końcowa domena transbłonowa podrodziny ABCC.

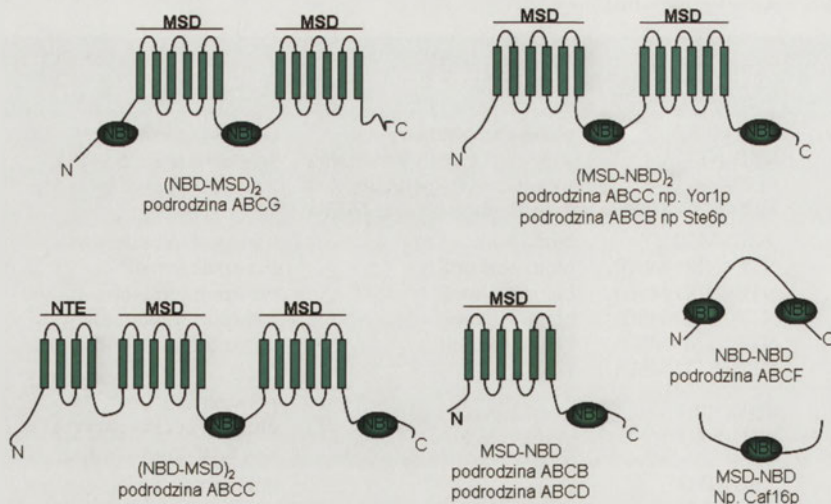
karnicznym, browarnictwie czy przemyśle farmaceutycznym komórki drożdży stały się najstarszym i najwdzięczniejszym biotechnologicznym partnerem człowieka. Drożdże są materiałem tanim, łatwo dostępnym i bezpiecznym. Duże podobieństwo strukturalne i funkcjonalne białek człowieka i drożdży daje ogromną szansę na scharakteryzowanie wielu białek człowieka poprzez badanie ich drożdżowych homologów lub poprzez heterologiczną ekspresję w komórkach drożdży.

## BUDOWA BIAŁEK ABC

Białka należące do rodziny ABC charakteryzują się zachowaną w ewolucji budową. Zbudowane są z dwóch homologicznych części, z których każda obejmuje domenę MSD i domenę NBD odpowiedzialną za hydrolizę ATP [6-8]. U eukariotów te homologiczne połowy są kodowane jako jeden polipeptyd (tzw. pełne ABC transportery) lub jako oddzielne białka (tzw. transportery połowiczne), które tworzą funkcjonalne homo- lub heterodimery [6,7,9]. Domeny MSD zwykle, choć nie zawsze, zawierają 6 $\alpha$ -helikalnych motywów transbłonowych. Domena wia-

zania i hydrolizy ATP, domena NBD, jest krytyczna dla funkcji białek ABC. Domeny te zawierają najbardziej zachowane w ewolucji rejony sekwencji reszt aminokwasowych charakterystyczne dla białek z rodziny ABC. Każda z domen NBD, zbudowanych z około 200 reszt aminokwasowych, zawiera zachowane w ewolucji motywy Walker A i Walker B [10], które są rozdzielone rejonem zbudowanym z 90-120 reszt aminokwasowych i tzw. „ABC signature motif” zawierającym sekwencję LSGGQ (czasem zwaną motywem C) [6,8,11].

Bazując na molekularnej architekturze, wzajemnym układzie domen NBD i MSD, obecności poszczególnych domen i homologii w obrębie domen NBD można wyróżnić kilka typów białek ABC transporterów, co jest podstawą ich klasyfikacji w podrodziny (Ryc. 1). Białka ABC człowieka zostały na tej podstawie podzielone na 7 podrodzin ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF i ABCG (<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>). U drożdży *S. cerevisiae* wyróżniono 6 podrodzin białek ABC (Tab. 1, Ryc. 2): ABCB/MDR, ABCC/MRP, ABCD/ALDP, ABCE/RLI, ABCF/YEF i ABCG/PDR [12-14].



Rycina 1. Topologia białek ABC. Układ domen w białkach ABC. Molekularna architektura cząsteczek i wzajemny układ domen stanowią podstawę do podziału białek ABC w podrodziny. NBD – domena wiązania i hydrolizy ATP; MSD – domena transbłonowa; NTE – ang. *N-terminal Extension*, dodatkowy rejon występujący w białkach z podrodziny ABCB.

## BIAŁKA ABC *S. CEREVISIAE*

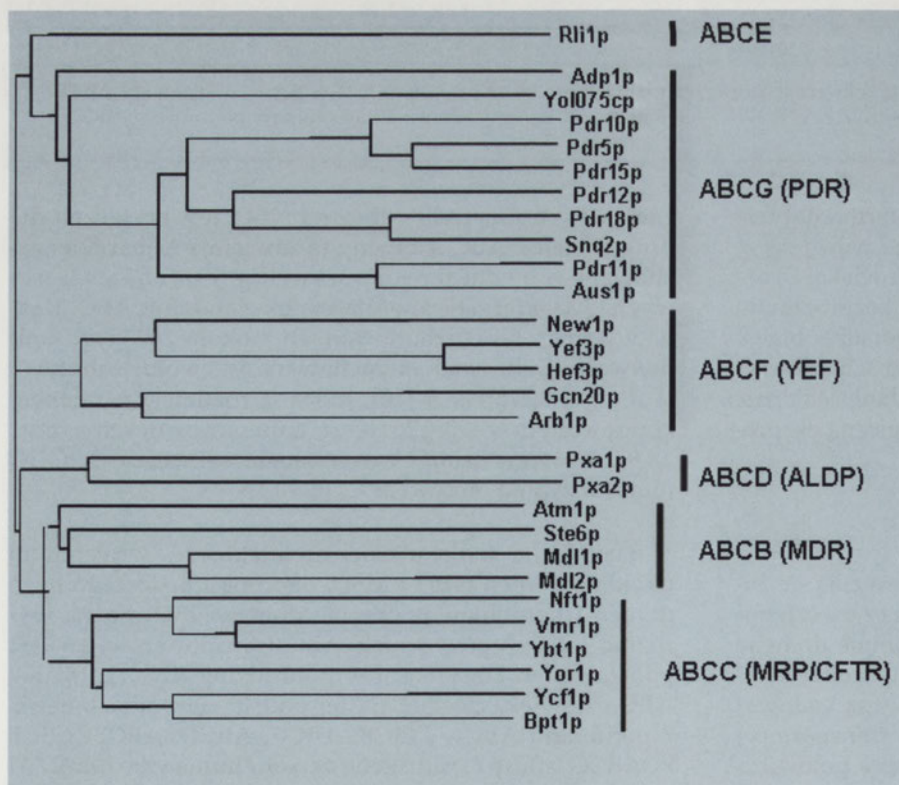
Całkowita sekwencja genomu *S. cerevisiae* została opublikowana w 1996 roku [15,16]. Drożdże piekarnicze były pierwszym organizmem eukariotycznym, dla którego wykonano analizę sekwencji genomu w celu wyszukania genów wszystkich potencjalnych ABC transporterów. Wyszukiwanie homologów oparto na znanej sekwen-

cji domeny NBD białka Ste6p, które było pierwszym zidentyfikowanym transporterem ABC. Wykazano w ten sposób istnienie 30 potencjalnych genów ABC transporterów u *S. cerevisiae*. Wśród wyszukanych białek znalazły się dwadzieścia dwa ABC transportery posiadające domeny NBD i domeny MSD i osiem białek posiadających tylko sekwencje NBD. Wśród drożdżowych transporterów wyróżniono sześć podrodzin: PDR, MDR, ALDP, MRP/CFTR, YEF3 i RLI [12,13]. Obecnie do klasyfikacji białek ABC drożdży zaproponowano system nazewnictwa stosowany w przypadku ich homologów występujących u człowieka. Wyróżniamy więc podrodziny od ABCB do ABCG (Tab. 1) [17]. U drożdży *S. cerevisiae* brak jest przedstawicieli podrodziny ABCA występującej u człowieka. Obecność białek ABC wykazano w błonie komórkowej, błonie wakuoli, błonie mitochondrialnej, błonie peroksysomów i cytoplazmie (Ryc. 4).

## PODRODZINA ABCB

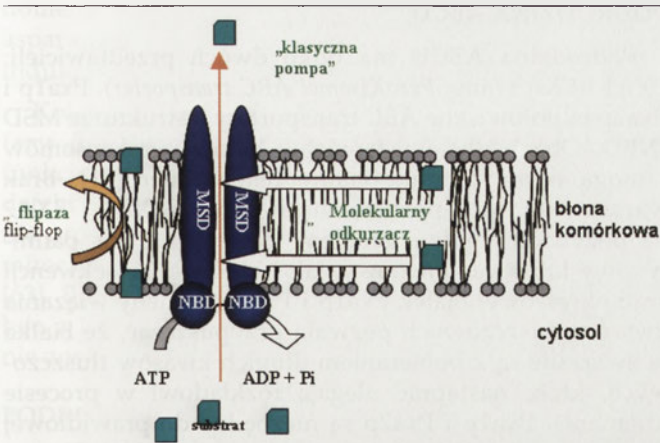
Do podrodziny ABCB zakwalifikowano cztery białka: Ste6p, Atm1p, Mdl1p i Mdl2p. Białko Ste6p lokalizuje się w błonie komórkowej, pozostałe białka lokalizują się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Białko Ste6p (ang. *STERile*) było pierwszym ABC transporterem zidentyfikowanym u drożdży i to na podstawie znanej sekwencji do-

meny NBD tego białka wyszukiwano homologów w obrębie całego genomu drożdżowego [18-21]. Chociaż obecność Ste6p wykazano w endosomach i pęcharzykach Golgiego, jednak funkcjonalna forma białka lokalizuje się tylko w błonie komórkowej. Ste6p jest pełnym transporterem o strukturze MDS1-NBD1-MDS2-NBD2 odpowiedzialnym za zależny od ATP transport feromonu  $\alpha$ , który jest niezbędny dla koniugacji drożdży. Ste6p jest białkiem specyficznym dla komórek haploidalnych typu koniugacyjnego MAT a [22-24]. Wyjaśnienie molekularnego mechanizmu katalizowanego przez Ste6p transportu feromonu  $\alpha$  jest szansą na wyjaśnienie ogólnego mechanizmu transportu inhibitorów i endogennych białek przez ABC transportery. Po wydzieleniu feromonu  $\alpha$  na zewnątrz komórki, Ste6p jest usuwany z błony przez zależną od ubikwityny endocytozę i degradowany w wakuoli [25].



Rycina 2. Drzewo filogenetyczne białek ABC u *Saccharomyces cerevisiae*. Analizie filogenetycznej poddano całe sekwencje reszt aminokwasowych białek. Sekwencje porównano przy użyciu programu Clustal W [81], analizę filogenetyczną wykonano przy użyciu metody „Neighbour-Joining Method” [82].

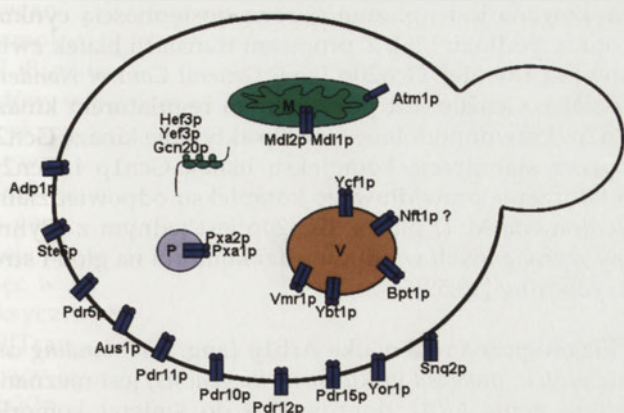
Do rodziny ABCB zostały zakwalifikowane również transportery polowiczne Mdl1p i Mdl2p (ang. *MultiDrug resistance Like*) o strukturze MSD-NBD,



**Rycina 3.** Model mechanizmu transportu katalizowanego przez ABC transportery. Zgodnie z modelem klasycznej pompy substrat usuwany jest z cytoplazmy przez kanał centralny. Substrat może być usuwany bezpośrednio z dwuwarstwy fosfolipidowej, poprzez kanał centralny białka (model molekularnego odkurzacza) lub poprzez ruch flip-flop (model flipazy). MSD – domena transbłonowa; NBD – domena wiązania i hydrolizy ATP.

występujące w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Pomimo wielkiego podobieństwa tych dwóch transporterów, funkcjonują one raczej jako homodimery niż heterodimery. Mdl1p został scharakteryzowany jako białko odpowiedzialne za zależny od ATP transport peptydów, zbudowanych z 6–20 reszt aminokwasowych, z wnętrza mitochondriów do przestrzeni międzybłonowej, skąd prawdopodobnie pasywnie są przepuszczane do cytoplazmy [26]. Krótkie peptydy transportowane przez Mdl1p są produktami degradacji białek źle sfałdowanych przez system m-AAA-proteaz (np. białka Afg3p i Yta12p). Pomimo lokalizacji w mitochondriach, funkcja Mdl1p nie jest związana z procesem oddychania, a gen *MDL1* nie jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania komórki. Wykazano jednak, że jego delecja powoduje uwrażliwienie komórek na stres oksydacyjny [27–29].

Białko Mdl2p również lokalizuje się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [11]. Funkcja tego białka nie jest znana. Mdl1p i Mdl2p są najbliższymi homologami ludzkich białek ABC transporterów TAP1 i TAP2 tworzących heterodimer odpowiedzialny za transport białek z cytoplazmy do siateczki śródplazmatycznej. Nieprawidłowe



**Rycina 4.** Wewnątrzkomórkowa lokalizacja białek ABC u drożdży *S. cerevisiae*. Rycina przedstawia lokalizacje poszczególnych białek ABC w organellach komórkowych: V – wakuola; P – peroksysony; M – mitochondria.

działanie TAP1 i TAP2 zostało powiązane z zespołem nagich limfocytów (BLS, ang. *Bare lymphocytes syndrome type1*) i ziarniakowatością Wegenera (ang. *Wegener granulomatosis*) [30].

Białko Atm1p (ang. *ABC Transporter Mitochondrial*) to kolejny połowiczny transporter należący do podrodziny ABCB. Atm1p zlokalizowane jest w wewnętrznej błonie mitochondriów, z częścią NBD po stronie matriks. Komórki pozbawione genu *ATM1* nie rosną na podłożach z niefermentowalnym źródłem węgla, a ich wzrost na glukozie jest ograniczony. Komórki są narażone na zniszczenia a nawet utratę mitochondrialnego DNA, co sugeruje rolę *ATM1* w stabilności mitochondrialnego DNA [31,32]. Nieprawidłowa funkcja Atm1p powoduje akumulację jonów Fe wewnątrz mitochondriów, jak również stanowi sygnał stresu oksydacyjnego dla komórki. Brak Atm1p zaburza gromadzenie klasterów Fe-S w cytoplazmie lecz nie wpływa na gromadzenie się klasterów Fe/S w mitochondriach [33]. Najbliższym homologiem Atm1p u człowieka jest ABCB7, który został powiązany z niedokrwistością syderoblastyczną (ang. *Sideroblastic anemia*) i ataksją (ang. *ataxia*) [34].

### PODRODZINA ABCC (MRP/CFTR)

Podrodzina ta zawiera białka związane z detoksykacją ksenobiotyków. Zostały do niej zaklasyfikowane białka Yor1p, Ycf1p, Ybt1p, Bpt1p, Vmr1p i Nft1p. Białka te zbudowane są według schematu MSD1-NBD1-MSD2-NBD2. Wszystkie za wyjątkiem Yor1p posiadają dodatkowy N-końcowy rejon NTE (ang. *N-Terminal Extention*), w obrębie którego znajduje się zwykle 4–5 rejonów transbłonowych. Białka z podrodziny ABCC transportują substraty raczej w formie koniugantów glutationu, kwasu glukuronowego lub kwasy siarkowego niż w formie niezmodyfikowanej [17].

Yor1p jest jednym z lepiej zbadanych białek grupy ABCC. Gen *YOR1* koduje białko o budowie MSD1-NBD1-MSD2-NBD2 bez dodatkowego N-końcowego fragmentu NTE. Jest to jedyny przedstawiciel tej rodziny zlokalizowany w błonie komórkowej. Choć *YOR1* (ang. *Yeast Oligomycin Resistance*) został wyizolowany jako gen nadający komórkom oporność na oligomycynę, w przypadku jego nadekspresji wzrasta oporność komórki na wiele niezwiązanych strukturalnie i chemicznie związków [35]. Białko Yor1p, obok Pdr5p i Snq2p, jest jednym z głównych mediatorów warunkujących wieloraką oporność komórek na inhibitory, a specyfika substratowa Pdr5p, Snq2p i Yor1p częściowo się pokrywa [36–38]. Wykazano, że Yor1p jest również odpowiedzialny za transport jonów kadmu w formie koniugantów glutationu [39].

Białko Ycf1p zlokalizowane jest wyłącznie w błonie wakuoli. Ycf1p (ang. *Yeast Cadmium Factor*) był pierwszym poznany przedstawicielem rodziny ABCC i jest obecnie najlepiej scharakteryzowanym. Białko Ycf1p jest kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za usuwanie kadmu w formie koniugantów glutationu do wakuoli [40,41]. Wykazano, że w formie koniugantów glutationu, Ycf1p transportuje do wakuoli również jony arsenu

(AsIII), ołowiu (PbII), rtęci (HgII) i antymonu (SbIII) [42]. Delecja genu *YCF1* powoduje nadwrażliwość komórek na jony metali, a nadwrażliwość ta może być komplementowana przez heterologiczną ekspresję homologów genu *YCF1* czyli genu *MRP1* człowieka lub *AtMRP1* roślin. Należy pamiętać, że białko *MRP1* jest jednym z głównych mediatorów oporności komórek nowotworowych na chemioterapię. Wprowadzanie mutacji do poszczególnych domen białka lub skracanie sekwencji *Ycf1p* pozwoliło na wstępne określenie roli poszczególnych domen białka. Jak w przypadku innych ABC transporterów, zmiany w sekwencji domen NBD są krytyczne, powodują nieprawidłową funkcję lub degradację białka *Ycf1p*. Badania mutacji w obrębie charakterystycznej tylko dla tej podrodziny domeny NTE wykazały, że hydrofilowa część sekwencji NTE jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania białka zaś część transbłonowa tej domeny jest niezbędna do prawidłowej wewnątrzkomórkowej lokalizacji [43-45].

Kolejni reprezentanci rodziny ABCC, białka *Bpt1p*, *Ybt1p* i *Vmr1p* nie są tak dobrze scharakteryzowane. Zarówno *Bpt1p*, *Ybt1p*, jak i *Vmr1p* są zlokalizowane w błonie wakuoli i są związane z detoksykacją egzogennych i endogennych substratów. Białko *Bpt1p* (ang. *Bile Pigment Transporter*), najbliższy homolog *Ycf1p*, jest odpowiedzialne za wakuolarny transport bilirubiny w nieskonjugowanej formie [46]. Usunięcie obu genów *YCF1* i *BPT1* powoduje całkowite zahamowanie transportu bilirubiny do wakuoli. Fizjologiczną rolą *Bpt1p* może więc być detoksykacja produktów degradacji białek, w których grupą prostetyczną jest hem. Badania *in vitro* wykazały, że białko *Bpt1p*, podobnie jak *Ycf1p*, transportuje glutation, koniuganty glutationu i kwasu glukuronowego do wakuoli, choć główna rola w tym transporcie przypada *Ycf1p* [47]. Wykazano również rolę *BPT1* w warunkowaniu oporności komórek na kadm. Sugeruje się, że *Bpt1p* i *Ycf1p* mogą tworzyć funkcjonalny heterodimer [48].

Białko *Vmr1p* (ang. *Vacuolar Multidrug Resistance*) również bierze udział w detoksykacji komórek drożdży. Komórki pozbawione genu *VMR1*, hodowane na podłożu z niefermentowalnym źródłem węgla wykazują zwiększoną wrażliwość na obecność kilkunastu różnych inhibitorów, w tym również kadmu i rtęci. Ekspresja genu *VMR1* jest indukowana w obecności glicerolu ale również w obecności różnych inhibitorów. Wykazano zmniejszony transport koniugatów glutationu do wakuoli komórek pozbawionych *Vmr1p*, co sugeruje, że podobnie jak w przypadku innych białek tej podrodziny, *Vmr1p* katalizuje transport substratu w formie koniugatów glutationu. *Vmr1p* wpływa na zależny od ATP transport rodaminy 6G w komórkach drożdży [49].

*YBT1* (ang. *Bile Acid Transporter*), kolejny przedstawiciel rodziny ABCC został scharakteryzowany jako zlokalizowany w błonie wakuoli transporter odpowiedzialny za zależne od ATP przenoszenie kwasów żółciowych z cytoplazmy do wakuoli [50]. Gen *NFT1* (ang. *New Full length Transporter*) od niedawna funkcjonujący jako potencjalny pełny transporter, uprzednio sekwencjonowany jako dwa niezależne geny *YKR103w* i *YKR104w* przedzielone kodonem nonsens. Jego fizjologiczna rola nie jest dotychczas poznana [45].

## PODRODZINA ABCD

Podrodzina ABCD ma tylko dwóch przedstawicieli: *PXA1* i *PXA2* (ang. *Peroxisomal ABC transporter*). *Pxa1p* i *Pxa2p* to połowiczne ABC transportery o strukturze MSD-NBD. Oba białka występują w błonie peroksysomów i mogą tworzyć funkcjonalny heterodimer [51]. Brak wzrostu komórek pozbawionych genów *PXA1* i *PXA2* na pożywkach, gdzie źródłem węgla jest kwas palmitynowy lub kwas oleinowy, jak i obecność w sekwencji aminokwasowej białek *Pxa1p* i *Pxa2p* domeny wiązania kwasów tłuszczowych pozwala przypuszczać, że białka te związane są z pobieraniem długich kwasów tłuszczowych, które następnie ulegają rozkładowi w procesie utleniania. *Pxa1p* i *Pxa2p* są niezbędne do prawidłowej biogenezy i funkcjonowania peroksysomów [52]. Homologami białek *Pxa1p* i *Pxa2p* w organizmie człowieka są *PMP70*, *ALDR* i *PMP69*, peroksysomalne białka związane z chorobami neurodegeneracyjnymi jak np. adrenoleukodystrofia (ALD, ang. *adrenoleukodystrophy*, choroba Siemerlinga-Creutzfeldta, ang. *Siemerling-Creutzfeldt disease*) i zespół Zellwegera (ang. *Zellweger syndrome*, zespół móżgowo-wątrobowo-nerkowy, ZS, ang. *cerebrohepatorenal syndrome*) [53].

## PODRODZINY ABCE I ABCF

W skład podrodziny ABCE i ABCF wchodzi białka *Yef3p*, *Hef3p*, *Gcn20p*, *New1p*, *Arb1p*, *Rli1p* nie będące transporterami. Poza *New1p*, który zbudowany jest z domeny MSD-NBD, wszystkie posiadają tylko domenę NBD. Białko *Yef3p* (ang. *Yeast Elongation Factor*) jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki. Zbudowane jest z dwóch domen NBD. Jest zlokalizowane w cytoplazmie i rybosomach, a związane jest z procesem translacji białek poprzez oddziaływanie z rybosomami. Nadekspresja genu *YEF3* powoduje zwiększenie tolerancji komórek na inhibitory translacji białek, paromomycynę i hygromycynę B [54,55].

Białko *Hef3p* (ang. *Homolog of EF3*) wykazuje ponad 80% identyczności z *Yef3p*. Podobna jest też jego funkcja. Nadekspresja *HEF3* powoduje komplementację fenotypu mutantów z defektem *Yef3p*, jednakże delecja *HEF3* nie jest dla komórki letalna [56,57]. Ekspresja genu *HEF3* indukowana jest np. zmniejszoną dostępnością cynku i azotu w podłożu [26]. Z procesem translacji białek związany jest również *Gcn20p* (ang. *General Control Nonderepressible*). *Gcn20p* jest pozytywnym regulatorem kinazy *Gcn2p*. Prawdopodobnie *Gcn20p* aktywuje kinazę *Gcn2p* poprzez stabilizację kompleksu białek *Gcn1p* i *Gcn2p*. Za tworzenie prawidłowego kompleksu odpowiedzialna jest domena MSD białka. *Gcn20p* jest jednym z czynników wymaganych w odpowiedzi komórki na głód i stres oksydacyjny [58,59].

Fizjologiczna rola białka *Arb1p* (ang. *ATP-binding cassette protein involved in Ribosome Biogenesis*) jest nieznana. Delecja genu *ARB1* doprowadza do śmierci komórki. Wyniki badań wskazują na rolę białka *Arb1p* w biogenezie podjednostek 40S i 60S rybosomów [60]. Z biogenezą rybosomów związany jest też *New1p* (Nu+). N-końcowa

domena New1p zawiera bogaty w reszty glutaminy i asparaginy rejon, który wspomaga formowanie [Nu+] i indukcję białek prionowych [Psi+] [61,62].

Kolejny przedstawiciel tej podrodziny, białko Rli1p (ang. *RNAse L Inhibitor*) jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Delecja genu *RLI1* powoduje defekt w eksporcie podjednostek rybosomów i zatrzymanie procesu translacji. Rli1p jest niezbędny do tworzenia mitochondrialnego i cytoplazmatycznego klastra Fe/S [63]. Białko Caf16p (ang. *CCR4 Associated Factor*) oddziałuje z RNA polimerazą II [64], natomiast gen *YDR061w* nie został jeszcze scharakteryzowany.

## PODRODZINA ABCG (PDR)

Podrodzina ABCG (PDR) jest najlepiej znana i opisana wśród wszystkich podrodzin ABC. Do podrodziny tej zaklasyfikowano dziesięć białek ABC transporterów, z czego dziewięć to białka tzw. pełnych transporterów o strukturze NBD1-MSD1-NBD2-MSD2 (białka Pdr5p, Pdr10p, Pdr15p, Pdr11p, Pdr12p, Snq2p, Pdr18p, Aus1p, Yol075cp) i białko Adp1p o strukturze MSD-NBD-MSD. Funkcją tej podrodziny jest prawdopodobnie detoksykacja komórki ponieważ większość jej przedstawicieli została scharakteryzowana jako białka warunkujące oporność komórek na inhibitory, stąd nazwa PDR (ang. *Pleiotropic Drug Resistance*). Najlepiej scharakteryzowane białka tej grupy to Pdr5p, Snq2p i Pdr12p. Nadekspresja genów *PDR5* (ang. *Pleiotropic Drug Resistance*) i *SNQ2* (ang. *Sensitivity to 4NitroQuinoline oxide*) powoduje wzrost tolerancji komórek na setki chemicznie niepowiązanych ze sobą inhibitorów. Udowodniono, że wśród związków transportowanych przez pompy Pdr5p i Snq2p są hydrofobowe fungicydy, ksenobiotyki, leki antynowotworowe, mykotoksyny, herbicydy. Pdr5p jest głównym mediatorem oporności komórek grzybów na azole. W obu przypadkach geny zostały wyizolowane jako czynnik nadający komórkom drożdży oporność na inhibitory, a ich produkty zlokalizowane są w błonie komórkowej. Pdr5p jest homologiem transportera ABC człowieka, glikoproteiny P, kodowanej przez gen *MDR1*. Glikoproteina P, która usuwa lipofilowe cząsteczki na zewnątrz komórek odgrywa kluczową rolę w oporności komórek nowotworowych na chemioterapeutyki. Wykazano aktywne usuwanie leków antynowotworowych daunorubicyny, doxorubicyny i tamoksifenu lecz nie metotreksatu przez Pdr5p [38,65-69]. Białko Pdr5p jest odpowiedzialne za translokację lipidów w warstwach błony komórkowej [70]. *PDR5* ulega ekspresji w czasie wzrostu logarytmicznego natomiast jest wygaszany w stacjonarnej fazie wzrostu jak i w czasie ograniczonego dostępu do substancji odżywczych. Delecja genu powoduje jednak hiperwrażliwość komórek na wiele inhibitorów. Szczepy z usuniętym genem *PDR5* są więc wykorzystywane w projektach dotyczących badań toksycznego działania związków na komórki drożdży [69]. Transporter Pdr12p został zidentyfikowany jako nadający komórkom oporność na słabe kwasy organiczne. Pdr12p jest zlokalizowany w błonie komórkowej i katalizuje zależny od ATP transport anionów karboksylowych na zewnątrz komórki [71,72]. Wykazano, że substratami pompy Pdr12p są związki stosowane jako konserwanty

żywności (np. kwas benzoowy, kwas sorbowy, kwas propionowy), jak i C1-C7 słabe kwasy organiczne powstające w czasie metabolizmu komórki [71].

Aus1p i jego najbliższy homolog Pdr11p są związane z transportem steroli. Oba białka są zlokalizowane w błonie komórkowej. Delecja genu *AUS1* i *PDR11* powoduje zmniejszenie akumulacji cholesterolu w komórce drożdży. Prawdopodobnym substratem białek Aus1p i Pdr11p może być ergosterol, który jest występującym w komórkach grzybów analogiem cholesterolu [73].

O pozostałych białkach należących do podrodziny ABCG nie wiadomo zbyt wiele. Białka Pdr10p i Pdr15p zostały powiązane z opornością komórek na inhibitory w odpowiedzi komórki na stress [74]. Są to najbliższe homologii głównego mediatora wielorakiej oporności komórki białka Pdr5p. Pdr15p nadaje komórkom oporność na chloramfenikol, który jest również substratem Pdr5p. Wykazano jednak, że aktywacja *PDR15* przypada na inną fazę wzrostu komórek niż aktywacja *PDR5*. Różna jest też kontrola regulacji ekspresji tych genów [75].

Białko Pdr10p występuje w formie małych agregatów w błonie komórkowej [76]. Delecja genu *PDR10* powoduje uwrażliwienie komórek na kalkoflor biały i kwas sorbowy, przy czym wykazano, że uwrażliwienie na kwas sorbowy wynika raczej ze zmienionego rozmieszczenia białka Pdr12p w błonie komórek z usuniętym genem *PDR10*, niż z braku Pdr10p [77]. Transportery ABC kodowane przez geny *PDR18* i *YOL075c* nie zostały dotychczas scharakteryzowane. Nieznana jest również funkcja i wewnątrzkomórkowa lokalizacja białka Adp1p.

## MECHANIZM TRANSPORTU

Cykl katalityczny transporterów ABC najprawdopodobniej obejmuje wiązanie nukleotydu i substratu, hydrolizę ATP, a następnie uwolnienie P<sub>i</sub> i ADP. Przeniesienie substratu na drugą stronę błony ma miejsce w czasie hydrolizy ATP [78]. Sam proces nie został jednak jeszcze wyjaśniony. Uznaje się, że domeny MSD odpowiedzialne są za rozpoznanie i przeniesienie substratu podczas gdy domena NBD dostarcza energii niezbędnej do zmiany konformacji białka lub dimeryzacji, poprzez rozkład ATP. Badania nad glikoproteina P (ABCB1) wskazują, że wiązanie się substratu do domeny MSD wymusza zmiany konformacyjne zwiększające powinowactwo domen NBD do ATP. Natomiast wiązanie dwóch cząsteczek ATP do domen NBD wymusza kolejne zmiany konformacyjne umożliwiające przeniesienie substratu na drugą stronę błony. Uwolnienie ADP i P<sub>i</sub> prowadzi do przywrócenia pierwotnej struktury białka [79].

Zaproponowano trzy mechanizmy transportu: klasycznej pompy, flipazy i „molekularnego odkurzacza” (Ryc. 3). Białka ABC tworzą w błonie kanały centralne, przechodzące przez dwuwarstwę lipidową. Zgodnie z modelem klasycznej pompy białka wiążą substraty bezpośrednio z cytoplazmy i kanałem przenoszą je do fazy wodnej na zewnątrz komórki. Taki model transportu wydaje się być najbardziej prawdopodobny w przypad-

ku transportu słabych kwasów tłuszczowych przy udziale Pdr12p [72]. Większość związków transportowanych przez ABC transportery ma charakter hydrofobowy są więc raczej rozpuszczalne w warstwie lipidowej nie w wodzie. Higgins zaproponował, że transportery ABC mogą usuwać substraty bezpośrednio z dwuwarstwy lipidowej [6]. W tym przypadku substrat nie wnika do cytoplazmy lecz jest przechwycony bezpośrednio w błonie. Zgodnie z hipotezą „molekularnego odkurzacza” substrat przenoszony jest w błonie do kanału centralnego transportera ABC i następnie usuwany kanałem na zewnątrz komórki. Badania P-glikoproteiny chomika wykazały istnienie połączenia pomiędzy kanałem centralnym białka a lipidami błony [78]. Model flipazy proponuje przeniesienie substratu z jednej warstwy błony na drugą warstwę błony skąd może swobodnie dyfundować, zapobiegając wniknięciu substratu do wnętrza komórki. W modelu tym białka ABC wykorzystywałyby aktywność flipazową odpowiedzialną za ruchliwość poprzeczną fosfolipidów (flip-flop) w asymetrycznej błonie komórkowej [80]. Aktywność transporterów ABC w transporcie fosfolipidów wykazano już zarówno dla transporterów ssaków [13], jak i dla drożdżowych białek Pdr5p i Yor1p [36,70].

## PODSUMOWANIE

Badania prowadzone na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* wniosły już duży wkład w zrozumienie roli różnych białek w komórkach eukariotycznych. Publikacja sekwencji całego genomu w połączeniu z doskonale rozwiniętymi metodami badań genetyki i biochemii drożdży przy jednoczesnym braku zastrzeżeń etycznych znacznie ułatwiły i przyspieszyły badania funkcji wielu białek w tym również białek z rodziny ABC. Heterologiczna synteza białek patogenów, białek ssaków czy roślin w komórkach drożdży ujawniła funkcjonalne podobieństwo pomiędzy białkami ABC z różnych organizmów. Wciąż jednak nie wyjaśniono molekularnego mechanizmu katalizowanego przez białka ABC transportu, fizjologicznej roli większości z tych białek, jak również oddziaływań z innymi białkami. Ze względu na łatwość manipulacji i szeroki zakres narzędzi biologii molekularnej możliwy do zastosowania w przypadku *S. cerevisiae*, a ograniczony w przypadku np. komórek człowieka czy patogenów, organizm ten pozostaje kluczowym w badaniach. Największą szansę upatruje się w wyjaśnieniu mechanizmów wielolekowej oporności komórek nowotworowych rozwijającej się u pacjentów stosujących chemioterapię, jak i w identyfikacji nowych inhibitorów możliwych do zastosowania w terapiach klinicznych.

## PIŚMIENNICTWO

- Holland IB, Cole S, Kuchler K, Higgins C (2003) ABC proteins: From Bacteria To Man. Academic Press Inc. New York
- Wada M, Toh S, Taniguchi K, Nakamura T, Uchiumi T, Kohno K, Yoshida I, Kimura A, Sakisaka S, Adachi Y, Kuwano M (1998) Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. Hum Molec Genet 7: 203-207
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielinski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterisation of complementary DNA. Science 245: 1066-1073

- Rust S, Walter M, Funke H, von Eckardstein A, Cullen P, Kroes HY, Hordijk R, Geisel J, Kastelein J, Molhuizen HOF, Schreiner M, Mischke A, Hahmann HW, Assmann G (1996) Assignment of Tangier disease to chromosome 9q31 by a graphical linkage exclusion strategy. Nature Genet 20: 96-98
- Kaplan J, Gerber S, Larget-Piet D, Rozet JM, Dollfus H, Dufier JL, Odent S, Postel-Vinay A, Janin N, Briard ML, Frezal J, Munnich A (1993) A gene for Stargardt's disease (fundus flavimaculatus) maps to the short arm of chromosome 1. Nature Genet 5: 308-311
- Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol 8: 67-113
- Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. J Lipid Res 42: 1007-1017
- Linton K (2007) Structure and function of ABC transporters. Physiology (Besheda) 22: 122-130
- Borst P, Eiferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. Annu Rev Biochem 71: 537-592
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gaj NJ (1982) Distantly related sequences in the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of ATP synthetase, myosin, kinase and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. EMBO J 8: 945-951
- Dean M, Allikmets R (1995) Evolution of ABC binding cassette transporter genes. Curr Opin Genet Dev 5: 779-785
- Decottignies A, Goffeau A (1997) Complete inventory of the yeast ABC proteins. Nat Gen 15: 137-145
- Michaelis S, Berkower C (1995) Sequence comparison of yeast ATP-binding cassette proteins. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 60: 291-307
- Bauer BE, Wolfger H, Kuchler K (1999) Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. Biochim Biophys Acta 1461: 217-236
- Goffeau A et al (1996) Life with 6000 genes. Science 247: 546-567
- Hieter P, Bassett D, Valle D (1996) The yeast genome: the commoncurrency. Nature 379: 589
- Paumi C, Chuck M, Snider J, Stagljar I, Michaelis S (2009) ABC transporters in *S. cerevisiae* and they interactors: new technology advances the biology of the ABCC (MRP) subfamily. Microbiol Mol Biol Rev 73: 577-593
- Chan RK, Melnick LM, Blair LC, Thorne J (1983) Extracellular suppression allows mating by pheromone-deficient sterile mutants of *S. cerevisiae*. J Bacteriol 155: 903-906
- Wilson KL, Herskowitz I (1984) Negative regulation of STE6 expression by the alpha 2 product of *S. cerevisiae*. Mol Cell Biol 4: 2420-2427
- Huyer G, Kisler A, Nouvet F, George C, Boyle M, Michaelis S (2006) *S. cerevisiae* a-factor mutants reveal residues critical for processing, activity and export. Eucaryot Cell 5: 1560-1570
- Ketchum CJ, Schmidt WK, Rajendrakumar GV, Michaelis M, Maloney PC (2001) The yeast a-phaCTOR transporter Ste6p, a member of the ABC superfamily, couples ATP hydrolysis to pheromone export. J Biol Chem 276: 29007-29011
- McGrath JP, Varshavsky A (1989) The yeast STE6 gene encodes a homolog of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. Nature 340: 40-404
- Kuchler K, Sterne RE, Thorne J (1989) *S. cerevisiae* STE6 gene product: a novel pathway for protein export in eucariotic cells. EMBO J 8: 3976-3984
- Loayza D, Tam A, Schmidt WK, Michaelis S (1998) Ste6p mutants defective in exit from the endoplasmic reticulum (ER) reveal aspects of an ER quality control pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell 9: 2767-2784
- Loayza D, Tam A, Schmidt WK, Michaelis S (1998) Ste6p mutants defective in exit from the endoplasmic reticulum (ER) reveal aspects of an ER quality control pathway in *S. cerevisiae*. Mol Biol Cell 9: 2767-2784
- Yuan DS (2000) Zinc-regulated genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by transposon tagging. Genetics 156: 45-58



27. Gompf S, Zuta A, Hofacker M, Haase W, van der Does C, Tampe R (2007) Switching of the homooligomeric ATP-binding cassette transport complex MDL1 from post-translational mitochondrial import to endoplasmic reticulum insertion. *FEBS J* 274: 5298-5310
28. Hofacker M, Gompf S, Zutz A, Presenti C, Haase W, van der Does C, Model K, Tampé R (2007) Structural and functional fingerprint of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 282: 3951-3961
29. Chloupkova M, Le Bard LS, Koeller DM (2003) MDL1 is a high copy suppressor of ATM1: evidence for a role in resistance to oxidative stress. *J Mol Biol* 331: 155-165
30. Moins-Teisserenc H T, Gadola SD, Cells M, Dunbar PR, Exley A, Blake N, Baykal C, Lambert J, Bigliardi P, Willemsen M, Jones M, Buechner S, Colonna M, Gross WL, Cerundolo V (2000) Association of a syndrome resembling Wegener's granulomatosis with low surface expression of HLA class-I molecules. *Lancet* 354: 1598-1603
31. Leighton J, Schatz G (1995) An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast. *EMBO J* 14: 188-195
32. Kispal G, Csere P, Guiard B, Lill R (1997) The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett* 418: 346-350
33. Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* 18: 3981-3989
34. Zutz A, Gompf S, Schagger H, Tampe R (2009) Mitochondrial ABC proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1787: 681-690
35. Katzmann DJ, Hallstrom TC, Voet M, Wysock W, Golin J, Volckart G, Moye-Rowley WS (1995) Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (*YOR1*) is required for oligomycin resistance in *S. cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15: 6875-6883
36. Decottignies A, Grant AM, Nichols JW, de Wet H, McIntosh DB, Goffeau A (1998) ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J Biol Chem* 273: 12612-12622
37. Cui Z, Hirata E, Tsuchiya H, Osada H (1996) The multidrug resistance associated protein (MRP) subfamily (YRS1/Yor1) of *S. cerevisiae* is important for the tolerance to a broad range of organic anions. *J Biol Chem* 271: 712-716
38. Rogers B, Decottignies A, Kolaczowski M, Carvajal E, Balzi E, Goffeau A (2001) The pleiotropic drug ABC transporters from *S. cerevisiae*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 207-214
39. Nagy Z, Montigny C, Leverier P, Yeh S, Goffeau A, Garrigos M, Falson P (2006) Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification. *Biochimie* 88: 665-671
40. Li ZS, Szczypka M, Lu YP, Thiele DJ, Rea PA (1996) The yeast cadmium factor protein (*YCF1*) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J Biol Chem* 272: 648-656
41. Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *S. cerevisiae*: *YCF1*-catalysed transport of bis(glutathione)cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 42-47
42. Gueldry O, Lazard M, Delort F, Dauplais M, Grigoras I, Blanquet S, Plateau P (2003) Ycf1-dependent Hg(II) detoxification in *S. cerevisiae*. *Eur J Biochem* 270: 2486-2496
43. Paumi C, Chuk M, Chebelev I, Staglar I, Michaelis S (2008) Negative regulation of the yeast ABC transporter Ycf1p by phosphorylation within its N-terminal extension. *J Biol Chem* 283: 27079-27088
44. Mason DL, Michaelis S (2002) Requirement of the N-terminal extension for vacuolar trafficking and transport activity of yeast Ycf1p, an ATP-binding cassette transporter. *Mol Biol Cell* 13: 443-455
45. Mason DL, Mallampalli P, Hyer G, Michaelis S (2003) A region within a luminal loop of *S. cerevisiae* Ycf1p directs proteolytic processing and substrate specificity. *Eucaryot Cell* 2: 588-598
46. Petrovic S, Pascolo L, Cupelli F, Ostrow JD, Goffeau A, Tiribelli C, Bruschi CV (2000) The product of Ycf1 and Yll015 (*BPT1*) cooperate for ATP-dependent vacuolar transport of unconjugated bilirubin in *S. cerevisiae*. *Yeast* 16: 561-571
47. Klein M, Mamnum YM, Eggmann T, Schuller C, Wolfger H, Martinova E, Kuchler K (2002) The ATP-binding cassette (ABC) transporter Bpt1p mediates vacuolar sequestration of glutathione conjugates in yeast. *FEBS Lett* 520: 63-67
48. Sharma KG, Mason DL, Liu G, Rea PA, Bachhawat AK, Michaelis S (2002) Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *S. cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eucaryot Cell* 1: 391-400
49. Wawrzycka D, Sobczak I, Bartosz G, Bocor T, Ulaszewski S, Goffeau A (2010) Vmr1p is a novel vacuolar multidrug resistance ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 10: 793-958
50. Ortiz DF, St-Pierre MV, Abdulmessih A, Arias IM (1997) A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid transport. *J Biol Chem* 272: 358-365
51. Shani N, Valle D (1996) A *S. cerevisiae* homolog of the human adrenoleukodystrophy transporter is a heterodimer of two half ATP binding cassette transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11901-11906
52. Hettema EH, van Roermund CW, Diesel B, van den Berg M, Vilela C, Rodrigues-Pousada C, Wanders RJ, Tabak HF (1996) The ABC transport proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *S. cerevisiae*. *EMBO J* 15: 3813-3822
53. Pedersen P (2007) transport ATPases into the year 2008: a brief overview to types, structures, functions and role in health and disease. *J Bioenerg Biomembr* 3: 349-355
54. Miyazaki M, Uritani M, Kagiyama H (1986) Intrinsic ATPase activity of yeast peptide chain elongation factor 3(EF-3) and its direct interaction with various nucleotides. *Nucleic Acids Symp* 17: 171-174
55. Kamath A, Chakraborty K (1989) Role of yeast elongation factor 3 in the elongation cycle. *J Biol Chem* 264: 15423-15428
56. Maurice TC, Mazzucco CE, Ramanathan CS, Ryan BM, Warr GA, Puziss JW (1998) A highly conserved intraspecies homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* elongation factor-3 encoded by the *HEF3* gene. *Yeast* 14: 1105-1113
57. Sarthy AV, Mcgonigal T, Capobianco JO, Schmidt M, Green SR, Moehle CM, Goldman C (1998) Identification and kinetic analysis of a functional homolog of elongation factor 3, YEF3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 239-253
58. Garcia-Barrio M, Dong J, Ufano S, Hinnebusch AG (2000) Association of *GCN1-GCN20* regulatory complex with the N-terminus of eIF2 $\alpha$  kinase *GCN2* is required for *GCN2* activation. *EMBO J* 19: 1887-1899
59. Kubota H, Ota K, Sakaki Y, Ito T (2001) Budding yeast *GCN1* binds the GI domain to activate the eIF $\alpha$  kinase *GCN2*. *J Biol Chem* 276: 17591-17596
60. Dong J, Lai R, Jennings JL, Link AJ, Hinnebusch AG (2005) The novel ATP-binding cassette protein *ARB1* is a shuttling factor that stimulates 40S and 60S ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* 25: 9859-9873
61. Santoso A, Chien, Osherovich LZ, Weissman JS (2000) Molecular basis of a yeast prion species barrier. *Cell* 100: 277-288
62. Osherovich LZ, Weissman JS (2001) Multiple Gln/Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast [PSI(+)] prion. *Cell* 106: 183-194
63. Kispal G, Sipos K, Lange H, Fekete Z, Bedekovics T, Janaky T, Bassler J, Aguilar Netz DJ, Balk J, Rotte C, Lill R (2005) Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO J* 24: 589-598
64. Liu HY, Chiang YC, Pan J, Chen J, Salvatore C, Audino DC, Badarinarayana V, Palaniswamy V, Anderson B, Denis CL (2001) Characterization of CAF4 and CAF16 reveals a functional connection between the CCR4-NOT complex and a subset of SRB proteins of the RNA polymerase II holoenzyme. *J Biol Chem* 276: 7541-7548
65. Balzi E, Goffeau A (1994) Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1187: 152-162
66. Decottignies A, Kolaczowski M, Balzi E, Goffeau A (1994) Stabilization and characterisation of the overexpressed *PDR5* multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast. *J Biol Chem* 269: 12797-12803

67. Kolaczowska A, Kolaczowski M, Goffeau A, Moye-Rowley S (2008) Compensatory activation of the multidrug transporter Pdr5p, SnQ2p, Yor1p, by Pdr1pp in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett 582: 977-983
68. Kolaczowski M, Van der Rest M, Cybularz Kolaczowska A, Soum-million JP, Konings WN, Goffeau A (1996) Anticancer drugs. Ionophoric peptides and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. J Biol Chem 271: 31543-31548
69. Decottignies A, Lambet L, Catty P, Degand E, Epping EA, Moye-Rowley WS, Balzi E, Goffeau A (1995) Identification and characterization of SNQ2, a new multidrug ATP-binding cassette transporter of the yeast plasmamembrane. J Biol Chem 270: 150-157
70. Mahe Y, Parie-McDermont A, Nourani A, Delahode A, Lamprecht A, Kuchler K (1996) The ATP-binding cassette multidrug transporter AnQ2 of *S. cerevisiae*: a novel target for the transcription factor Pdr1p and Pdr3p. Mol Microbiol 20: 109-117
71. Piper P, Mahe Y, Thompson S, Pandjaitan R, Holyoak C, Egner R, Mulhnbauer M, Coote P, Kuchler K (1998) The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organick acid resistance in yeast. EMBO J 17: 4259-4263
72. Holyoak CD, Bracey D, Piper PW, Kuchler K, Coote P (1999) The *S. cerevisiae* weak acid-inducible AABC transporter Pdr12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by the energy dependent mechanism. J Bacter 181: 4644-4652
73. Wilcox LJ, Balderes DA, Wharton B, Tinkelenberg AH, Rao G, Sturley SL (2002) Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. J Biol Chem 277: 466-472
74. Wolfger H, Mahe Y, Parle-McDemott A, Delahode A, Kuchler K (1997) The yeast ATP binding cassette (ABC) protein genes PDR10 and PDR15 are novel targets for the Pdr1 and Pdr3 transcriptional regulators. FEBS Lett 418: 269-274
75. Wolfger H, Mamnun YM, Kuchler K (2004) The yeast Pdr15p ATP binding cassette (ABC) protein is a general stress response factor implicated in cellular detoxification. J BiolChem 279: 593-599
76. Parle-McDemott A, Hand N, Goulding S, Wolfe K (1996) Sequence of 29kb around the *PDR10* locus on the right arm of *S. cerevisiae* chromosome XV: similarity to part of chromosome I. Yeast 12: 999-1000
77. Rockwell N, Wolfger H, Kuchler K, Thorner J (2009) ABC transporter Pdr10 regulates the membrane microenvironment of Pdr12 in *S. cerevisiae*. J Membr Biol 229: 27-52
78. Sharom FJ, Lugo MR, Eckford PD (2005) New insight into the drug binding, transport and lipid flippase activities of the p-glycoprotein multidrug transporter. J Bioenerg Biomembr 37: 481-7
79. Ambudkar SV, Kim IW, Sauna ZE (2006) The power of the pump: mechanism of action of P-glycoprotein (ABCB1). Eur J Pharm Sci 27: 392-400
80. Higgins CF, Gottesman MM (1992) Is the multidrug transporter a flipase? Trends Biochem Sci 17: 18-21
81. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22: 4673-4680
82. Saitou M, Nei M (1987) The Neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406-425

## The ABC transporters of *Saccharomyces cerevisiae*

Donata Wawrzycka<sup>✉</sup>

Institute of Plant Biology; Department of Genetics and Cell Physiology; Wrocław University; 6/8 Kanonia St., 50-328 Wrocław, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: donata.wawrzycka@microb.uni.wroc.pl

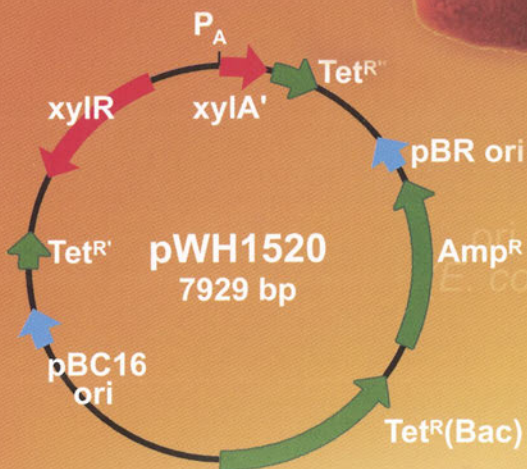
**Key words:** ABC transporters, yeast *Saccharomyces cerevisiae*, multidrug resistance

### ABSTRACT

The ABC transporters (ATP Binding Cassette) compose one of the biggest protein family with the great medical, industrial and economical impact. They are found in all organism from bacteria to man. ABC proteins are responsible for resistance of microorganism to antibiotics and fungicides and multidrug resistance of cancer cells. Mutations in ABC transporters genes cause serious diseases like cystic fibrosis, adrenoleucodystrophy or ataxia. Transport catalized by ABC proteins is charged with energy from the ATP hydrolysis. The ABC superfamily contains transporters, canals, receptors. Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* genome allowed to distinguish 30 potential ABC proteins which are classified into 6 subfamilies. The structural and functional similarity of the yeast and human ABC proteins allows to use the *S. cerevisiae* as a model organism for ABC transporters characterisation. In this work the present state of knowledge on yeast *S. cerevisiae* ABC proteins was summarised.

# SYSTEMY EKSPRESYJNE dla *Bacillus megaterium*

"One of the most efficient  
expression systems described  
in any organism so far!"  
Rygas and Hillen, 1991



- Stabilna ekspresja białek i wysoka wydajność
- System oparty o operon ksylozowy - ściśle regulowany i efektywnie indukowany przez ksylozę (350-krotnie większa indukcja)
- Brak proteolitycznej degradacji białek nawet w przypadku 5 godzinnej indukcji ze względu na brak aktywności alkalicznych proteaz
- Brak endotoksyn

- Polilinker (MCS) zlokalizowany bezpośrednio za promotorem ksylozowym - umożliwia łatwe klonowanie genów
- Łatwa identyfikacja i oczyszczanie produkowanych białek (domeny histydynowe)
- Zwiększona wydajność transformacji dzięki zastosowaniu specjalnie przygotowanych protoplastów *B. megaterium*
- Systemy ekspresyjne oparte na gospodarzu *B. megaterium* znajdują zastosowanie w przemysłowej produkcji białek m.in. o właściwościach terapeutycznych

## Numer katalogowy Produkt

BMEG03	pWH1520 shuttle vector, original; lyophilized DNA
BMEG12	pHIS1522 shuttle vector, 6xHis-tagged; lyophilized DNA
BMEG02	<i>Bacillus megaterium</i> protoplasts; (strain WH320)

Electron microscope image of *Bacillus megaterium*  
Dr. Manfred Rohde, Helmholtz-Center for infection research (HZI), Braunschweig, Germany

**Dodatkowe informacje o wektorach ekspresyjnych dedykowanych *B. megaterium*  
oraz pozostałych systemach wektorowych są dostępne na stronie producenta [www.mobitec.com](http://www.mobitec.com)**



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](mailto:abo@abo.com.pl); [www.abo.com.pl](http://www.abo.com.pl)



**Mo Bi Tec**  
MOLECULAR BIOTECHNOLOGY

# Ręczny automatyczny licznik komórek

## Scepter™ 2.0

Pierwszy przenośny licznik komórek, zapewniający wygodę i precyzję w codziennej pracy.

Scepter™ 2.0 przeznaczony jest do szybkiego i dokładnego liczenia komórek w zawiesinie. Czas pomiaru to tylko kilka sekund. Specjalny wyświetlacz pozwala urządzeniu na prezentację histogramu przypominającego wykresy z cytometru przepływowego. Dzięki temu łatwo jest określić skład poszczególnych frakcji komórek.

Do pomiaru niezbędne są 40 lub 60  $\mu\text{M}$  sensory za pomocą, których pobierana jest i liczona próbka o objętości 50  $\mu\text{l}$ .

- Sensory 40  $\mu\text{M}$ : pomiar komórek o wielkości od 3 do 17  $\mu\text{m}$ ; zakres stężeń - 50,000-1,500,000 komórek/ml.
- Sensory 60  $\mu\text{M}$ : pomiar komórek o wielkości od 6 do 36  $\mu\text{m}$ ; zakres stężeń - 10,000-500,000 komórek/ml.

Na ekranie licznika można wyświetlić:

- Histogram zawierający informację na temat rozkładu wielkości i objętości komórek.
- Średnią objętość komórek.
- Stężenie komórek.
- Średni rozmiar komórek.

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

