

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2009
TOM 55
NUMER 1

Uracyl w DNA — przyjaciel czy wróg?
Naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców
Białka z rodziny MADS a transkrypcja



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

www.postepybiochemii.pl

<http://rcin.org.pl>

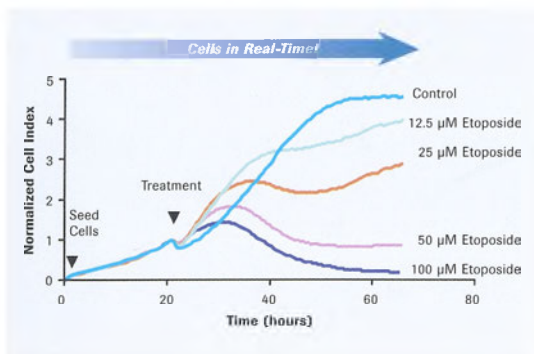


www.roche-applied-science.com

xCELLigence
Aparat RTCA SP

**xCELLigence system analizy komórek
w czasie rzeczywistym**

Głębsze spojrzenie, prawdziwe zrozumienie



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

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

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

System xCELLigence to głębsze spojrzenie dla prawdziwego zrozumienia

Odwiedź naszą stronę internetową www.xcelligence.roche.com w celu uzyskania dodatkowych informacji lub skontaktuj się z naszym lokalnym przedstawicielem.

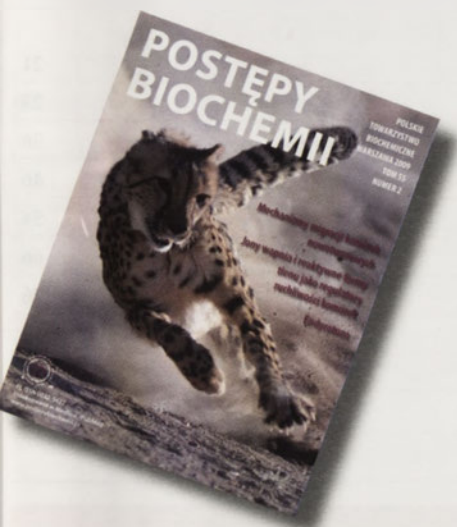


xCELLIGENCE jest zastrzeżonym znakiem towarowym Roche.
© 2008 Roche Diagnostics GmbH. Wszystkie prawa zastrzeżone.

<http://rcin.org.pl>

Roche Diagnostics Polska sp. z o.o.
Ul. Wybrzeże Gdyni 6B
01-531 Warszawa
www.roche-applied-science.com
biologia.molekularna@roche.com
tel. 022 481-55-55
fax. 022 481-55-92





W NASTĘPNYM NUMERZE:

Numer specjalny poświęcony mechanizmom ruchów komórkowych.

W numerze m.in.:

Mechanizmy migracji komórek nowotworowych

Jony wapnia i reaktywne formy tlenu jako regulatory ruchliwości komórek

Endycotoza

Zdjęcie na okładce:

Aktywacja kwaśnej β -galaktozydazy w starzejących się komórkach linii HCT116. Fotografię w kontraście fazowym wykonała Małgorzata Śliwińska z Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego w Warszawie (wykorzystano za zgodą Autorki)

MAPA POLSKIEJ BIOCHEMII

Udział łódzkiego oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w tworzeniu i działalności Towarzystwa do roku 1970

Alicja Klimczok

1

Sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego XVIII kadencji (2005–2008)

Lech Wojtczak

4

Informacja o posiedzeniu Rady FEBS w lipcu 2008 roku

Lech Wojtczak

8

WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

Wiadomości krajowe

pod red. Teresy Wesolowskiej

9

Proteazy retrowirusowe po 20 latach: reminiscencje

Mariusz Jaskólski

15

List do redakcji

Zofia Zarębska

20

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Benzonaza[®] – możliwości praktycznych zastosowań

Marcin Olszewski, Paweł Filipkowski

21

Uracyl w DNA – przyjaciel czy wróg?

Ryszard Oliński, Marek Jurgowiak

25

Naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców – nowe białka, nowe funkcje, nowe mechanizmy

Tomasz Popławski, Ewelina Stoczyńska, Janusz Błasiak

36

Regulacja ekspresji genu *PAI-1*

Paulina Wyrzykowska, Aneta Kasza

46

Białka z rodziny MADS – kombinatoryczne regulatory transkrypcji u grzybów, zwierząt i roślin

Łukasz Szafron, Tomasz Jagielski, Agnieszka Dzikowska

54

FHIT – białko supresorowe zaangażowane w indukcję apoptozy i regulację cyklu komórkowego

Róża Pęcherzewska, Barbara Nawrot

66

Budowa i funkcja metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej

Krzysztof Olszyński, Małgorzata Zimowska

76

Wykorzystanie systemów roślinnych do produkcji rekombinowanych cytokin

Anna Góra-Sochacka, Patrycja Redkiewicz,

Bogusława Napiórkowska, Agnieszka Sirko

85

Serotypy wirusów związanych z adenowirusami

Agnieszka Lipiec, Maciej Małecki, Karolina Hajdukiewicz

95

Map of polish biochemistry	1
Events/Opinions/Comments	9
Retroviral proteases 20 years later: reminiscences	15

REVIEWS

Benzonase® – possibility of practical application	21
Uracil in DNA – friend or foe?	25
Non-homologous DNA end joining – new proteins, new functions, new mechanisms	36
Regulation of PAI-1 expression	46
MADS-box proteins – combinatorial transcriptional regulators in fungi, animals and plants	54
FHIT – tumor suppressor protein involved in induction of apoptosis and cell cycle regulation	66
Structure and function of matrix metalloproteinases	76
Plant-based production of recombinant cytokines	85
Serotypes of adeno-associated viruses	95

JUBILEUSZ 50-LECIA POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Drodzy Koledzy,

dla uczczenia 50-lecia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego organizujemy **Sesję Jubileuszową**, która odbędzie się **3 kwietnia 2009 r. w Sali Lustrzanej Pałacu Staszica w Warszawie**.

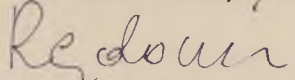
W pierwszej części spotkania o historii Towarzystwa opowie prof. Lech Wojtczak, wykłady wygłoszą prof. Maciej Żylicz („Kameleony białkowe”) i prof. Grzegorz Węgrzyn („50 lat PTBioch – 150 lat DNA”); zostaną także wręczone dyplomy Członkom Honorowym Towarzystwa.

Następnie odbędzie się część wspomnieniowa, podczas której, przy lampce wina i poczęstunku, zebrani będą mogli wspominać i porozmawiać w towarzystwie o Towarzystwie.

Przewidujemy pokaz multimedialny, prosimy więc zainteresowane osoby o nadsyłanie do 31 marca b.r. plików ze zdjęciami i filmami na adres: **j.redowicz@nencki.gov.pl**

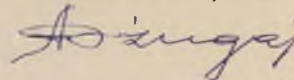
Serdecznie zapraszamy wszystkich członków i miłośników Towarzystwa na tę uroczystość.

Sekretarz Towarzystwa



Maria Jolanta Rędownicz

Prezes Towarzystwa



Andrzej Dżugaj

PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII

OLYMPUS

Your Vision, Our Future



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

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

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

Korekta językowa: Marta Magdalena Izdebska-Książek; marta.izdebska@gmail.com

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

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

Kwartalnik „Postępy Biochemii” jest wydawany z pomocą finansową Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

„Postępy Biochemii” są indeksowane w Medline, IndexCopernicus i Agrolibrex. Nakład 1000 egz.

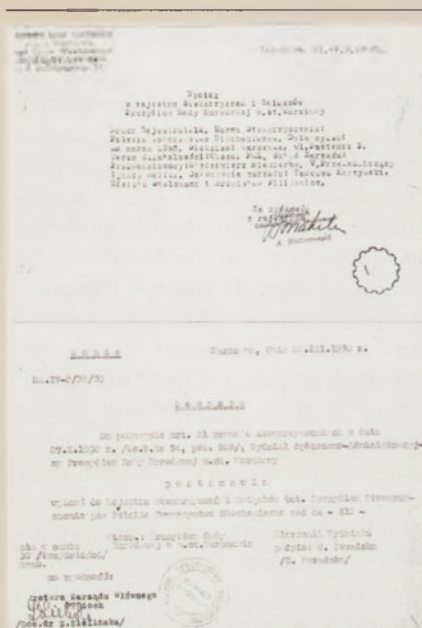
Udział łódzkiego oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w tworzeniu i działalności Towarzystwa do roku 1970

Alicja Klimczak¹

Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Katedra Historii Medycyny i Farmacji, Zakład Historii Nauk i Medycyny Wojskowej, ul. Żeligowskiego 7/9, 90-643 Łódź; tel.: (042) 639 32 70, 504 160 998, e-mail: ala_klimczak@o2.pl

Współzałożycielami oraz członkami Polskiego Towarzystwa Biochemicznego byli między innymi łódzcy biochemicy, pracownicy Uniwersytetu Łódzkiego i Akademii Medycznej. Pierwszym Prezesem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego był prof. Bolesław Skarzyński z Krakowa, lecz już drugim Prezesem, w latach 1961-1963, został prof. Bronisław Filipowicz, kierownik Katedry Chemii Ogólnej i Fizjologicznej Akademii Medycznej w Łodzi. W roku 1963 odbył się w Łodzi pierwszy Krajowy Kongres Biochemii. Wkład w tworzenie i działalność Towarzystwa łódzkich naukowców był znaczący, co odzwierciedla liczba członków oraz zgłaszane komunikaty i doniesienia zjazdowe, a także wygłoszone wykłady. W ramach działalności naukowej oddział organizował zebrania naukowe, na których wygłaszano referaty. Pod koniec omawianego okresu Oddział Łódzki był jednym z ośrodków w kraju, w którym odbyło się najwięcej zebrań naukowych poświęconych dyskusjom nad pracami własnymi.

Pracownicy Katedry Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego i Katedry Chemii Ogólnej i Fizjologicznej Akademii Medycznej w Łodzi byli aktywnymi członkami Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, które zostało powołane dnia 22 marca 1958 roku (Ryc. 1). Wśród założycieli Towarzystwa byli prof. Antoni Dmochowski z



Rycina 1. Kopia decyzji z dnia 22 marca 1958 r. w sprawie wpisu do Rejestru Stowarzyszeń i Związków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego oraz Wyciąg z rejestru Stowarzyszeń i Związków Prezydium Rady Narodowej m.st. Warszawy. Źródło: Archiwum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Warszawie, Sygn. S.A.IV/2/32/58.

Uniwersytetu Łódzkiego² i prof. Bronisław Filipowicz z ówczesnej Łódzkiej Akademii Medycznej³ Zadaniem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego było popieranie rozwoju biochemii i jej popularyzacja, w oparciu o społeczną pracę ich członków, poprzez organizację zjazdów, sympo-

zjów, zebrań naukowych, odczytów, wykładów i konkursów, wydawnictwo i popieranie czasopism naukowych, książek i publikacji z zakresu biochemii, współpracy z władzami, stowarzyszeniami.⁴

Jako naukowy wkład w działalność Towarzystwa, Katedra Chemii Ogólnej i Fizjologicznej wniosła w 1958 roku wyniki badań nad kwasami nukleinowymi i nukleoproteidami. Ponadto w wyniku współpracy z Katedrą Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego, ośrodek prowadził badania nad zawartością kwasów nukleinowych w surowicy ludzkiej (wykład na Kongresie Biochemii w Wiedniu), jak również zajmował się przemianą węglowodanową mięśnia sercowego przy zatruciach toksynami błoniczymi.⁵

W okresie pierwszej kadencji Polskiego Towarzystwa Biochemicznego powstały Oddziały w Lublinie, Warszawie, Białymstoku, Krakowie, Łodzi, Poznaniu, Gdańsku, Wrocławiu i Szczecinie. Liczba członków Towarzystwa wzrosła wtedy do 378. Głównym celem działalności Oddziałów, zgodnie ze statutem Towarzystwa, było organizowanie zebrań naukowych.

Na drugim Walnym Zgromadzeniu, które odbyło się w lutym 1961 roku w Warszawie, Prezesem Towarzystwa został wybrany prof. Bronisław Filipowicz.⁶ Swą funkcję pełnił do 1963 roku.⁷

W 1962 roku, w ramach działalności naukowej i popularyzacyjnej Oddział Łódzki Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zorganizował 5 zebrań naukowych, na których zostało

¹ Autorka tekstu 28.01. 2009 r. obroniła pracę doktorską pt. „Osiągnięcia chemii lekarskiej w łódzkiej uczelni medycznej w latach 1945-1970”. Promotorem pracy był prof. Jerzy Supady, kierownik Katedry Historii Medycyny i Farmacji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

² Prof. Antoni Dmochowski, wybitny polski biochemik, specjalista od kwasów nukleinowych, kierownik Katedry Biochemii na Uniwersytecie Łódzkim był, wraz z prof. Filipowiczem, członkiem założycielem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Warto także pamiętać, że Katedra kierowana przez prof. Dmochowskiego była pierwszą w Polsce uczelnianą placówką mającą w swej nazwie słowo „biochemia”. Prof. A. Dmochowski i prof. B. Filipowicz stali się później patronami dwóch ważnych nagród Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (za osiągnięcia w nauczaniu biochemii, biologii molekularnej i biotechnologii przyznawanej od 1996 roku i za popularyzację biochemii i nauk pokrewnych przyznawanej od 2001 roku).

³ Kronika, Postępy Biochemii, tom 4, zeszyt 3, 1958 r., str. 403

⁴ Statut Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Postępy Biochemii, tom 4, zeszyt 3, 1958 r., str. 403-407.

⁵ Postępy Biochemii, nr 8, Kronika, str. 370

⁶ Zarys działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Archiwum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Warszawie, Sygn. SA. IV/2/32/58, str. 1

⁷ www.ptbiochem.edu.pl



Rycina 2. Wykład prof. Włodzimierza Mozołowskiego inauguracyjny I Kongres Biochemii, Łódź 4-7.09.1963 r. W prezydium od lewej: prof. Kazimierz Zakrzewski (Warszawa), doc. Wanda Leyko (Uniwersytet Łódzki), prof. Antoni Dmochowski (Uniwersytet Łódzki), prof. Lech Przanowski (Politechnika Łódzka), Michalina Tatarówna-Majkowska (I sekretarz Komitetu Łódzkiego PZPR, prof. Bronisław Filipowicz, doc. Feliks Widy-Wirski (wiceminister zdrowia), prof. Bernard Zablocki, prof. Marian Stefanowski (Akademia Medyczna w Łodzi) i prof. Bolesław Skarżyński (Akademia Medyczna w Łodzi).

wyłoszonych pięć referatów. Pod koniec 1962 roku Oddział Łódzki liczył 38 członków,⁸ a w sierpniu 1963 roku – 39.⁹

W 1963 roku odbył się w Łodzi Pierwszy Krajowy Kongres Biochemii (Ryc. 2). Dzięki temu wydarzeniu ośrodek łódzki, a jednocześnie Katedra Chemii Ogólnej i Fizjologicznej w opinii polskich biochemików stała się poważnym ośrodkiem naukowym. Organizacja Kongresu została powierzona miejscowemu oddziałowi Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, którego przewodniczącym był prof. Józef Skarżyński. Pracownicy Katedry ogłosili na kongresie 11 referatów, a

⁸ Sprawozdanie z działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego za 1962 rok, Archiwum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Warszawie, str. 1, 2

⁹ Sprawozdanie z działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w okresie od dnia 9.II.1961 r. do dnia 31.VIII.1963 r., Archiwum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Warszawie, str. 1

w latach następnych 1964–1969, na 10 zjazdach i sympozjach ogółem 18 referatów.¹⁰

W 1965 roku Oddział przyjął w swe szeregi 6 nowych członków, co sprawiło, że ogólna liczba członków Oddziału Łódzkiego zwiększyła się do 50. W tym samym roku w ramach działalności Oddziału zorganizowano 6 zebrań naukowych, na których ogłoszono 14 referatów.¹¹

Rok 1966 przyniósł 6 zebrań naukowych oddziału, których tematyka dotyczyła m.in. grzybni *Neurospora crassa*, metabolizmu bakterii, pałeczek bakterii mlekowych, kwasów nukleinowych oraz dializy analitycznej. Przewodniczącym Oddziału był w tym okresie dr Henryk Panusz, a liczba członków Oddziału wynosiła 51 osób.¹² Dr Henryk Panusz był Przewodniczącym Oddziału do 31 maja 1967 roku, kiedy to Jego miejsce zajął doc. dr Marek Kański. W pierwszym półroczu 1967 Oddział liczył 65 członków. W trakcie tego okresu odbyły się 3 zebrań naukowe i 1 sesja. Poruszone na nich zostały następujące zagadnienia: (1) udziału histaminy w procesie syntezy kolagenu, (2) zastosowania metody dializy analitycznej do badania oddziaływań międzycząsteczkowych w układach modelowych, (3) naprawy uszkodzeń popromiennych DNA i (4) przemiany

¹⁰ Ibidem, 72

¹¹ Sprawozdanie z działalności Terenowych Oddziałów Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w 1965 roku, Archiwum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Warszawie, str. 4

¹² Sprawozdanie z działalności Łódzkiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego za 1966 rok, Archiwum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Warszawie, sygn. SA. IV\2\32\58, str. 1

cukrów w erytrocytach z uwzględnieniem wieku.

W 1968 roku w Łodzi odbyła się konferencja naukowa nt. „Metabolizmu krwinki czerwonej”. Pracownicy Katedry wzięli w niej czynny udział, wygłaszając 4 referaty naukowe (m.in. Wanda Leyko).¹³

W drugiej połowie 1967 roku oraz przez cały 1968 rok przewodniczącym Oddziału był doc. dr Marek Kański. W tymże okresie Oddział powiększył się o czterech nowych członków. W tym samym okresie ubyło jednak siedmiu członków, a zatem pod koniec 1968 roku Oddział liczył 62 członków.

Podsumowując, w latach 1963–1968 Oddział Łódzki zorganizował 11 zebrań naukowych. W ramach tych zebrań ogłoszonych zostało 17 referatów. W 6 przypadkach były to referaty przedstawione przez prelegentów z zewnątrz (Warszawy, Lublina, Poznania, Zabrze oraz Wolem, Niemcy), a w pozostałych 11 przez prelegentów z Łódzkiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, z Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego i z Polskiego Towarzystwa Chemicznego.¹⁴

28 maja 1969 roku podczas zebrania sprawozdawczo-wyborczego Oddziału, w wyniku tajnego głosowania, przewodniczącym Oddziału został wybrany doc. dr n. przyr. Jerzy

¹³ Pismo z dnia 27.IV.1968, Konferencja naukowa nt. „Metabolizm krwinki czerwonej”, CW 546. Druk WAM 65/68 uk. w kwietniu 1968 r.

¹⁴ Sprawozdanie z działalności Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Łodzi w okresie 31.07.1967–31.12.1968 z dnia 15 stycznia 1969 r., Archiwum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Warszawie, str. 1



Rycina 3. Budynki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Dom starców Chrześcijańskiego Towarzystwa Dobroczynności przy ul. Narutowicza 60 w Łodzi, obecnie Collegium Anatomicum Uniwersytetu Medycznego. Zdjęcie po prawej przedstawia szpital Poznański, wybudowany w roku 1890 przez małżonków Izraela i Leonie Poznańskich dla społeczności żydowskiej. Obecnie jest to Szpital Uniwersytecki im. dr Seweryna Sterlinga (mieści się przy ul. Sterlinga).



Rycina 4. Budynek Wydziału Farmacji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi przy ul. Muszyńskiego 1.



Rycina 5. Pałac Jakuba Herta (zięcia Izraela Poznańskiego), wybudowany w 1898 roku, przebudowany w 1945 roku. Obecnie mieści się w nim Rektorat Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (przy ul. Kościuszki 4).

Piotrowski.¹⁵ W okresie pierwszego półrocza 1969 r. na terenie Oddziału odbyło się 6 zebrań naukowych, na których wygłoszono 7 referatów. Jeden referat został wygłoszony przez gościa zagranicznego, 2 przez prelegentów polskich, zaproszonych spoza Łodzi. Pozostałe referaty wygłosili członkowie Oddziału Łódzkiego. Tematyka referatów dotyczyła m.in.

wpływu promieniowania na strukturę DNA, izolowania i właściwości proteazy z płynnego podłoża, na którym hodowano *Aspergillus fumigatus*, dehydrogenazy dwuhydrofolianowej i bakteryjnej dekarboksylazy histydynowej.¹⁶ W drugiej połowie 1969 r. w ramach działalności naukowej Oddziału odbyły się dwa zebrania, podczas których wygłoszono cztery refe-

hisonów w świetle współczesnego piśmiennictwa i (4) wyników wstępnych badań histonów węzłów chłonnych cieląt.¹⁷ Na koniec roku 1969 Łódzki Oddział Polskiego Towarzystwa Biochemicznego liczył 76 członków.¹⁸

Pod koniec omawianego okresu Oddział Łódzki był ośrodkiem, w którym odbyło się najwięcej zebrań naukowych poświęconych dyskusjom nad pracami własnymi. Efekty tych dyskusji były przedstawiane w formie doniesień i referatów podczas dorocznych Zjazdów Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Tabela 1 przedstawia liczbę komunikatów zgłoszonych przez poszczególne oddziały Towarzystwa w przeliczeniu na 100 członków danego oddziału Towarzystwa.¹⁹ Na Rycinach 3–5 przedstawiono wczoraj i dziś Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, gdzie pracuje i prowadzi działalność naukową wielu członków Oddziału Łódzkiego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, i w którego gościnnych murach we wrześniu 2009 roku odbędzie się 44 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Tabela 1. Liczba doniesień w przeliczeniu na 100 członków w danym oddziale Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1969–1970.

Siedziba Oddziału	1969 rok VII Zjazd Wrocław	1970 rok VIII Zjazd Katowice
Białystok	28	9,5
Gdańsk	23	17
Katowice	17	31
Kraków	27	13
Lublin	34	21
Łódź	50	23
Olsztyn	8	0
Poznań	15	17
Szczecin	6	20
Toruń	0	11
Warszawa	29	26
Wrocław	46	16

Źródło: Archiwum Akademii Medycznej w Łodzi, Dział Planowania i Organizacji, Rozwój Akademii Medycznej w Łodzi w latach 1945–1965, Sygn. Arch. 4/93.

mechanizmu działania retardantów wzrostu na starzenie się roślin, niektórych biochemicznych aspektów toksykologii rtęci, metalotioneiny,

raty dotyczące: (1) zmian biochemicznych we krwi po wysiłku, (2) wpływu przewlekłego traktowania histaminą na procesy glikolityczne tkanek, (3)

¹⁵ Protokół z zebrania sprawozdawczo-wyborczego Łódzkiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Łodzi z dnia 4 czerwca 1969 r., Archiwum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Warszawie, str. 1

¹⁶ Sprawozdanie z działalności Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Łodzi w okresie 1.I.1969–30.VI.1969 z dnia 21 sierpnia 1969 r., Archiwum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Warszawie, str. 1

¹⁷ Sprawozdanie z działalności Oddziału Łódzkiego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w okresie I.VII.–31.XII.1969 z dnia 2 stycznia 1970 r., Archiwum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Warszawie, str. 1

¹⁸ Sprawozdanie Zarządu Głównego z działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1967–1969 na VI Walnym Zgromadzeniu we Wrocławiu w dniu 19 września 1969 r.

¹⁹ Działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1969–1971

SPRAWOZDANIE Z DZIAŁALNOŚCI ZARZĄDU GŁÓWNEGO POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO XVIII KADENCJI (2005-2008)

Zarząd Główny, wybrany na Walnym Zebraniu 22 września 2005 r., ukonstytuował się w pełni 15 listopada 2005 r. następująco: Prezes – Lech Wojtczak (Warszawa), Wice-Prezes – Liliana Konarska (Warszawa, zmarła 17 sierpnia 2008 r.), Sekretarz – Sławomir Pikula (Warszawa), Skarbnik – Anna Dygas (Warszawa). Pozostali członkowie Prezydium: Jan Barciszewski (Poznań), Jolanta Barańska (Warszawa), Andrzej Dżugaj (Wrocław). Ponadto postanowiono, aby na czas przygotowań do najbliższego Zjazdu dokooptować do Prezydium Edwarda Bańkowskiego (Białystok). Pozostali członkowie Z.G.:

Marek Gniazdowski (Łódź, zmarł 18. 7. 2006 r.), Teresa Jakubowicz (Lublin), Wiesława Jarmuszkiewicz (Poznań), Michał Komoszyński (Toruń), Piotr Laidler (Kraków), Adam Szewczyk (Warszawa), Michał Woźniak (Gdańsk), Ludmiła Żylińska (Łódź).

DZIAŁALNOŚĆ POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO NA FORUM KRAJOWYM

ZEBRANIA ZARZĄDU GŁÓWNEGO I JEGO PREZYDIUM

Odbyły się następujące protokołowane plenarne zebrania Zarządu

Głównego i jego Prezydium. Większość zebrań Z.G. odbyło się w formie rozszerzonej, to jest z udziałem przedstawicieli Oddziałów:

ZARZĄD GŁÓWNY:

- 15 listopada 2005
- 31 maja 2006
- 12 września 2006 (w Białymstoku)
- 13 marca 2007
- 18 września 2007 (w Szczecinie)
- 12 listopada 2007
- 28 stycznia 2008
- 23 czerwca 2008
- 7 września 2008 (w Olsztynie)

PREZYDIUM:

- 17 stycznia 2006
- 16 marca 2006
- 12 grudnia 2006
- 31 maja 2007 (w Krakowie)
- 31 grudnia 2007 ("korespondencyjne", tylko w celu przyjęcia nowych członków)
- 28 kwietnia 2008

(Tam, gdzie nie podano miejscowości, zebrania odbywały się w Warszawie).

SPRAWY CZŁONKOWSKIE

Jako jednym z ważniejszych zadań Zarząd Główny zajął się uporządkowaniem spraw członkowskich. Postanowiono:

1. Zaprzestać przyjmowania nowych członków na status członka-studenta jako niezgodny ze Statutem Towarzystwa. Aby umożliwić przynależność do Towarzystwa młodym biochemikom (doktorantom, a nawet magistrantom, nie mającym jeszcze pełnych publikacji naukowych), postanowiono złagodzić statutowy wymóg dorobku naukowego dopuszczając możliwość zaliczenia do niego krótkich doniesień zjazdowych, rozpraw doktorskich, a także magisterium lub licencjatu z zakresu biochemii. Zachowano przy tym dotychczasowy system uprawnień do ulgowej składki dla magistrantów i doktorantów.

IV EDYCJA KONKURSU NA NAJLEPSZĄ PRACĘ DOKTORSKĄ Z BIOCHEMII W 2008 ROKU

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

Zgłoszenia kandydatów do Nagrody mogą dokonywać pracownicy naukowcy ze stopniem doktora habilitowanego lub tytułem profesora.

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

s.pikula@nencki.gov.pl

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

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

profesor Sławomir Pikula
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelgo Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

2. Bardziej rygorystycznie egzekwować terminowe opłacanie składek członkowskich, skreślając z listy członków – zgodnie ze Statutem – osoby zalegające z opłacaniem składek więcej niż dwa lata.
3. Uaktualnić listę członków-emerytów.

W wyniku tych działań skreślono ogółem 858 osób (łącznie z emerytami nieobowiązującymi do płacenia składki, z którymi – mimo prób – nie udało się nawiązać kontaktu). Natomiast w ciągu całej kadencji przyjęto 324 nowych członków. W rezultacie tego Towarzystwo nasze liczyło na dzień 9 września 2008 r. (koniec XVIII kadencji) 1125 członków, w tym 710 członków płacących pełną składkę, 277 członków uprawnionych do ulgowej składki, 122 członków-emerytów niepłacących składki i 16 członków honorowych, również zwolnionych statutowo z płacenia składki członkowskiej (ta liczba obejmuje również 5 osób, którym członkostwo honorowe nadano na Walnym Zebraniu w dniu 9.9.2008 r.).

ZMIANA STATUTU

Wypełniając uchwałę poprzedniego Walnego Zebrania, Zarząd Główny na jednym z pierwszych swych posiedzeń powołał komisję statutową dla opracowania projektu nowego Statutu lub zmian istniejącego. Komisja ta przygotowała projekt zmian, jednakże wprowadzenie go w życie wymaga uchwalenia ich przez Walne Zebranie przy obecności przynajmniej połowy liczby członków Towarzystwa (nie wystarczy tu „drugi termin” jak w przypadku wszelkich innych uchwał). Dlatego, za radą prawników, postanowiono głosować przez pełnomocników i dla uproszczenia sprawy uchwalić tylko jedną małą poprawkę do Statutu, umożliwiającą głosowanie przyszłych propozycji zmian statutu w drugim terminie niezależnie od liczby obecnych. Niestety, na Walnym Zebraniu w dniu 9 września 2008 r. okazało się, że mimo szeroko przeprowadzonej akcji zbierania pełnomocnictw we wszystkich Oddziałach Towarzystwa liczba pełnomocnictw wraz z liczbą obecnych na Zebraniu członków Towarzystwa była mniejsza niż połowa liczby członków Towarzystwa, co uniemożliwiło podjęcie

uchwały w sprawie zmiany Statutu. W tej sytuacji sprawę ewentualnych zmian Statutu przekazano nowo wybranym władzom Towarzystwa.

KRAJOWE ZJAZDY POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

W minionej kadencji odbyły się trzy ogólnopolskie Zjazdy Towarzystwa: 41. Zjazd w Białymstoku (12-16 września 2007), około 620 uczestników, 13 sesji tematycznych, główni organizatorzy: prof. Edward Bańkowski i prof. Krzysztof Sobolewski; 42. Zjazd w Szczecinie (18-21 września 2007), około 500 uczestników, 14 sesji tematycznych, główni organizatorzy: prof. Dariusz Chlubek i dr Barbara Dołęgowska; 43. Zjazd w Olsztynie wspólnie z ogólnopolską konferencją Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki (7-10 września 2008), łącznie około 800 uczestników, 14 sesji tematycznych, główni organizatorzy: prof. Elżbieta Kostyra i prof. Jerzy Moraczewski (PTBK). Warto podkreślić, że ten ostatni Zjazd (nazwany Kongresem Biochemii i Biologii Komórki) jest pierwszym w historii naszego Towarzystwa eksperymentem połączenia krajowego Zjazdu naszego Towarzystwa ze zjazdem innego towarzystwa z pokrewnej problematyce.

KONFERENCJA IM. JAKUBA K. PARNASA

W okresie 30 maja–2 czerwca 2007 r. odbyła się w Krakowie VI Polsko-Ukraińska Konferencja im. J.K. Parnasa z udziałem około 200 uczestników; organizatorzy: prof. Piotr Laidler i prof. Józef Dulak.

DZIAŁALNOŚĆ WYDAWNICZA

Towarzystwo wydaje dwa kwartalniki: „Postępy Biochemii” i „Acta Biochimica Polonica”. Ponadto wydawane również kwartalnie „Listy do Członków”, rozprowadzane bezpłatnie wśród wszystkich członków Towarzystwa, informują o bieżących wydarzeniach w ramach naszej organizacji.

„Postępy Biochemii” rozsyłane są bezpłatnie do wszystkich członków, którzy mają na bieżąco opłaconą składkę członkowską. Pismo cieszy się dużym zainteresowaniem jako ak-

tualne źródło informacji o współczesnych trendach w biochemii i biologii molekularnej. Wyróżnia się bardzo atrakcyjną szatą graficzną. Ponadto w dziale „Mapa polskiej biochemii” informuje o aktualnych wydarzeniach w życiu naukowym w kraju. Redaktorem naczelnym „Postępów Biochemii” jest prof. Sławomir Pikuła.

„Acta Biochimica Polonica” są wydawane wspólnie przez nasze Towarzystwo i Komitet Biochemii i Biofizyki PAN, jednakże Polskie Towarzystwo Biochemiczne ponosi główny ciężar organizacyjny, logistyczny i finansowy tego wydawnictwa. Pismo publikuje oryginalne prace doświadczalne i przeglądowe wyłącznie w języku angielskim. Poza artykułami polskich autorów w „Acta” ukazują się również prace autorów zagranicznych (około 30% prac). Pismo publikuje około 100 prac rocznie. W skład Rady Redakcyjnej „Acta” wchodzi uznane autorytety naukowe w połowie z Polski, w połowie z zagranicy. *Impact factor* pisma wahał się w ciągu ostatnich 3 lat w granicach 1,3–1,9. Pismo wydawane jest zarówno w wersji drukowanej jak i elektronicznej. Ta ostatnia jest dostępna bezpłatnie i bez żadnych ograniczeń w formie internetowej. Redaktorem Naczelnym „Acta” była zmarła 17 sierpnia 2008 r. prof. Liliana Konarska.¹

„Leksykon” jest wydawany wyłącznie w formie internetowej z nieograniczonym dostępem i zawiera stale uzupełniany wykaz terminów z zakresu biochemii i biologii molekularnej.

Wydawanie „Postępów Biochemii”, „Acta Biochimica Polonica” i „Leksykonu” jest w poważnym stopniu wspierane dotacją Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

NAGRODY

W ciągu XVIII kadencji przyznano następujące nagrody:

- A. Corocznie przyznawano nagrody (1) im. Jakuba K. Parnasa za najlepszą publikację pracy wykonanej w polskim laboratorium, (2) im. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy

¹ Funkcję Redaktora Naczelnego objął od 2009 r. prof. Grzegorz Węgrzyn z Uniwersytetu Gdańskiego.

artykuł przeglądowy opublikowany w „Postęпах Biochemii”, (3) im. Włodzimierza Mozołowskiego za najlepsze doniesienie zjazdowe przedstawione przez młodego naukowca, (4) im. Janiny Opieńskiej-Blauth za najlepsze doniesienie zjazdowe przedstawione przez studenta, (5) za najlepszą pracę w zakresie kwasów nukleinowych i (6) za najlepszą rozprawę doktorską w zakresie biochemii.

B. Jednorazowo przyznano nagrodę (1) im. Antoniego Dmochowskiego za wybitne osiągnięcia dydaktyczne w dziedzinie biochemii i (2) im. Bronisława Filipowicza za specjalne zasługi w dziedzinie popularyzacji nauki.

Nagroda im. J.K. Parnasa sponzorowana jest przez dr Piotra Chomczyńskiego, prezesa Molecular Research Center, Inc., USA, nagroda za najlepszą pracę w zakresie kwasów nukleinowych – przez firmę Sigma-Aldrich Polska, a nagroda za najlepszą rozprawę doktorską – przez firmę Merck Polska.

Nagrody im. Jakuba K. Parnasa otrzymali:

- w 2006 r. zespół K. Michalska, K. Brzeziński i M. Jaskólski za publikację pod tytułem „Crystal structure of isoaspartyl aminopeptidase in complex with L-aspartate”, która ukazała się w *J. Biol. Chem.* 280: 28484-28491 (2005);
- w 2007 r. zespół G. Kudła, L. Lipiński, F. Caffin, A. Helwak i M. Żylicz za publikację pod tytułem „High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells”, która ukazała się w *PLoS Biol.* 4, e180 (2006);
- w 2008 r. zespół J. Król, A. Fiszer, A. Mykowska, K. Sobczak, M. de Mezer, i W.J. Krzyżosiak za publikację „Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets”, która ukazała się w *Molecular Cell* 25: 575-586 (2007).

Nagrody im. Bolesława Skarżyńskiego otrzymali:

- w 2006 r. S. Kowalczyk, E. Hadowska i A. Piekarska za artykuł „Roślinne układy ubikwitylacji i degradacji białek w proteasomach - kluczowe elementy hormonalnych szlaków

sygnałowych” w „Postęпах Biochemii” 51: 171-187 (2005);

- w 2007 r. J. Skalska, G. Dębska-Vielhaber, M. Głąb, B. Kulawiak, D. Malińska, I. Koszela-Piotrowska, P. Bednarczyk, K. Dołowy i A. Szewczyk za artykuł „Mitochondrialne kanały jonowe” w „Postęпах Biochemii” 52: 137-144 (2006);
- w 2008 r. J. Węsierska-Gądek, J. Bednarek i Z.M. Kiliańska za artykuł „Nowe oblicze białek antyapoptotycznych. II. Surwiwina” w „Postęпах Biochemii” 53: 239-253 (2007).

Nagrody za najlepsze prace w zakresie kwasów nukleinowych otrzymali:

- w 2006 r. P. Śliwa i R. Korona za pracę „Loss of dispensable genes is not adaptive in yeast” opublikowaną w *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 17670-17674 (2005);
- w 2007 r. B. Brzezicha, M. Schmidt, I. Makołowska, A. Jarmołowski, J. Pieńkowska i Z. Szweykowska-Kulińska za pracę „Identification of human tRNA:m5C methyltransferase catalysing intron-dependent m5C formation in the first position of the anticodon of the pre-tRNA Leu(CAA)” opublikowaną w *Nucleic Acid Res.* 34: 6034-6043 (2006);
- w 2008 r. K. Sipa, E. Sochacka, J. Kazmierczak-Barańska, M. Maszewska, M. Janicka, G. Nowak i B. Nawrot za pracę „Effect of base modifications on structure, thermodynamic stability, and gene silencing activity of short interfering RNA” opublikowaną w *RNA* 13: 1301-1316 (2007).

Nagrody za najlepszą rozprawę doktorską otrzymali:

- w 2006 r. Małgorzata Rzychoń (promotorzy: Prof. Adam Dubin i dr hab. Matthias Bochtler) za rozprawę: „Stafostatyna B: Nowy typ inhibitora proteinaz cysteinowych”;
- w 2007 r. Anna Wójtowicz-Krawiec (promotor prof. Andrzej Płucieniczak) za rozprawę „Biotechnologiczne zastosowania proteaz odcinających ubikwitynę”;
- w 2008 r. Aleksandra Ellert-Miklaszewska (promotor: prof. Liliana Konarska) za rozprawę pod tytułem „Molekularne mechanizmy propoptotycznego działania kannabinoïdów na komórki glejaków”.

Nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego otrzymali:

- w 2006 r. Magdalena Spiechowicz (Instytut im. Nenckiego, Warszawa);
- w 2007 r. Izabela Sacewicz (Uniwersytet Medyczny w Łodzi); w 2008 r. Aleksandra Wiczak (Uniwersytet Gdański).

Nagrody im. Janiny Opieńskiej-Blauth otrzymali:

- w 2006 r. Andrzej Blauz i Tomasz Polaszek (Uniwersytet Łódzki);
- w 2007 r. Marta Rybicka (Pomorska Akademia Medyczna);
- w 2008 r. Jacek Grębowski i Paulina Kaźmierska (Uniwersytet Łódzki).

Nagrodę im. Antoniego Dmochowskiego otrzymał w 2007 r. prof. Jerzy Buchowicz za książkę pod tytułem „Biotechnologia Molekularna; genetyka, przedmiot, perspektywy badań i zastosowań”, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2006.

Trzy równorzędne nagrody im. Bronisława Filipowicza otrzymali w 2008 r. dziennikarze Jacek Michalak (telewizja), Krzysztof Michalski (radio) i Sławomir Zagórski (prasa) za popularyzację osiągnięć biochemii i biologii molekularnej.

50-LECIE ISTNIENIA POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Osiemnasta kadencja Zarządu Głównego upłynęła pod znakiem obchodów pięćdziesięciolecia istnienia Towarzystwa. Komitet Założycielski i tymczasowy Zarząd pod przewodnictwem prof. Włodzimierza Niemierki zawiązały się w 1957 r. W marcu 2008 r. Polskie Towarzystwo Biochemiczne zostało formalnie zarejestrowane, a w grudniu tegoż roku odbyło się pierwsze Walne Zebranie, na którym wybrano pierwszego Prezesa w osobie prof. Bolesława Skarżyńskiego. Tym wydarzeniom i historii naszego Towarzystwa poświęcony został artykuł obecnego Prezesa, prof. Lecha Wojtczaka, w „Postęпах Biochemii” (tom 54, zeszyt 4, str. 327-332) oraz wykład wygłoszony na otwarciu 43. Zjazdu w Olsztynie. Z okazji 50-lecia wybito również znaczek Towarzystwa, rozprowadzony między innymi wśród uczestników Zjazdu, który mają prawo nosić wszyscy członkowie Towarzystwa. Natomiast specjal-

ną uroczystą sesję z okazji Jubileuszu postanowiono przenieść na pierwszą połowę 2009 r.²

SPRAWY FINANSOWE

Na dochody Towarzystwa składały się: (a) składki członkowskie, (b) dotacje Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, (c) wpływy z prenumeraty czasopism Towarzystwa, (d) opłaty za publikację prac i artykułów przeglądowych w czasopismach Towarzystwa (t.zw. *page charge*)³ oraz (e) dobrowolne dotacje firm sponsorujących.

- a) Składka członkowska w pełnej wysokości wynosiła, podobnie jak w poprzedniej kadencji, 80 zł rocznie, a składka ulgowa (od studentów i uczestników studiów doktoranckich) 40 zł rocznie. Członkowie honorowi, zgodnie ze Statutem, nie opłacają składki. Zwolnieni są z niej również członkowie będący na emeryturze.
- b) Dotacje Ministerstwa przeznaczone są wyłącznie na dofinansowanie wydawnictw Towarzystwa („Postępów Biochemii”, „Acta Biochimica Polonica” i „Leksykonu”) oraz dorocznych Zjazdów.
- c) Prenumerata „Postępów Biochemii” i „Acta Biochimica Polonica” (w zróżnicowanej wysokości) opłacana jest głównie przez biblioteki i innych prenumeratorów instytucjonalnych (członkowie Towarzystwa, którzy opłacają składkę członkowską, otrzymują „Postępy Biochemii” bezpłatnie). Wpływy z tego źródła pokrywają tylko część kosztów wydawniczych.
- d) Sponsorowanie przez firmy komercyjne lub ich prezesów polega przede wszystkim na fundowaniu nagród pieniężnych oraz wspieraniu finansowym Zjazdów Towarzystwa i „Listów do Członków”. Ponadto Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego udostępnia Towarzystwu lokale na biuro i redakcje wydawnictw, a Instytut Biochemii i Biofizyki wspiera etat

sekretarza redakcji „Acta Biochimica Polonica”.

Po stronie wydatków główne pozycje stanowiły (uszeregowane od najwyższej do najniższej pozycji): (a) wydawanie „Postępów Biochemii” i „Acta Biochimica Polonica”, (b) dofinansowywanie dorocznych Zjazdów, (c) funkcjonowanie Biura Towarzystwa i Zarządu Głównego (w tym uposażenia pracowników biurowych, korespondencja i telefony, dystrybucja „Postępów Biochemii”), (d) nagrody, (e) składka członkowska na rzecz FEBS i Europejskiej Federacji Biotechnologicznej.

Zarząd Główny dokładał starań, by ograniczać koszty, w szczególności te wymienione w punkcie (c). Jednakże wobec wzrostu cen, w szczególności wzrostu kosztów wydawniczych i pocztowych, i w trosce o zapewnienie przyszłym władzom Towarzystwa prawidłowego funkcjonowania Zarząd Główny postanowił przedstawić na Walnym Zebraniu wnioski o podwyższenie składki członkowskiej w następnej kadencji⁴.

DZIAŁALNOŚĆ TOWARZYSTWA NA FORUM MIĘDZYNARODOWYM

Polskie Towarzystwo jest członkiem Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS). Zarząd Główny regularnie opłacał roczną składkę i utrzymywał stały roboczy kontakt z władzami FEBS. Przedstawiciele naszego Towarzystwa uczestniczyli w corocznych zebraniach Rady FEBS (FEBS Council), będącej najwyższym organem Federacji. Przedstawicielami tymi byli: Prezes, prof. Lech Wojtczak, w posiedzeniach FEBS Council w Istambule (2006) i Atenach (2008) oraz członek Prezydium, prof. Jolanta Barańska, w Wiedniu (2007). Ponadto członkowie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wchodziłi w skład centralnych organów FEBS, a mianowicie prof. Jolanta Barańska sprawowała w latach 2005–2006 funkcje vice-Przewodniczącego a następnie Przewodniczącego (President) całej Federacji, prof. Adam Szewczyk pełnił niezwykle odpowiedzialny urząd do-

radcy w sprawach kongresów FEBS (Congress Counselor), prof. Maciej J. Nałęcz jest przewodniczącym Komisji Stypendialnej, prof. Andrzej Dżugaj jest członkiem Komisji do spraw Europy Środkowej i Wschodniej, a prof. Mariusz Jaskólski został wybrany w 2008 r. na członka Komisji Wydawniczej.

W każdym z dorocznych kongresów FEBS uczestniczyło kilkudziesięciu polskich biochemików (brak dokładnych danych liczbowych), a w towarzyszących tym kongresom Forach Młodych Naukowców (Young Scientist Forum) od 6 do 10 osób rocznie. Całkowity koszt udziału w Forach Młodych (łącznie z podróżą, zakwaterowaniem oraz udziałem w pełnym kongresie FEBS) pokrywała Federacja. Ponadto młodzi polscy biochemicy korzystali w okresie sprawozdawczym ze stypendiów FEBS:

- a) stypendia krótkoterminowe (do 3 miesięcy, short-term fellowships), stypendia wakacyjne (summer fellowships) i krótkie stypendia popierające współpracę (collaborative experimental fellowships), razem 35 stypendiów w latach 2005–2007; ogólny koszt ok. 150.000 EUR⁵;
- b) stypendia długoterminowe (do 2 lat, long-term fellowships) – 2 stypendia;
- c) udział w kursach FEBS na koszt Federacji – 46 osób.

W 2006 r. odbył się w naszym kraju kurs FEBS (Advanced Course) poświęcony bioenergetyce, obejmujący zarówno wykłady jak i praktyczne zapoznanie się ze współczesnymi metodami badawczymi. Organizatorem merytorycznym był Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego w Warszawie. W kursie wzięło udział 28 słuchaczy i 17 wykładowców z całego świata. Wszystkie koszty organizacyjne jak i udział większości słuchaczy pokrył FEBS.

**prof. Lech Wojtczak,
Prezes Polskiego Towarzystwa
Biochemicznego w latach
2005–2008**

² Sesja ta odbędzie się w Warszawie 3 kwietnia 2009 r.

³ „Acta Biochimica Polonica” stosują ulgową opłatę wobec członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, a autorzy mający trudności z pokryciem tej opłaty mogą z niej być częściowo lub całkowicie zwolnieni.

⁴ Walne Zebranie w dniu 9 września 2008 r. uchwaliło podniesienie od 2009 r. składki członkowskiej pełnej do 100 zł i składki ulgowej do 50 zł rocznie.

⁵ Dane za 2008 rok nie są jeszcze dostępne

INFORMACJA O POSIEDZENIU RADY FEBS W LIPCU 2008 ROKU

Doroczne posiedzenie Rady FEBS (FEBS Council) odbyło się w dniach 3-4 lipca 2008 r. w Atenach bezpośrednio po zakończeniu 33. Kongresu FEBS. Rada FEBS jest najwyższą władzą FEBS i składa się z delegatów wszystkich zrzeszonych w Federacji narodowych towarzystw biochemicznych oraz z członków Komitetu Wykonawczego (Executive Committee). Dwudniowemu posiedzeniu w Atenach przewodniczył aktualny Przewodniczący (Chairman) FEBS, Nazmi Özer z Turcji. Polskie Towarzystwo Biochemiczne reprezentował jego Prezes, prof. Lech Wojtczak (Fot. 1). Ponadto z Polski uczestniczyli stali członkowie Komitetu Wykonawczego FEBS: prof. Maciej J. Nałęcz, przewodniczący Komisji Stypendialnej, i prof. Adam Szewczyk, doradca do spraw kongresów (Congress Counselor).

Rada wysłuchiwała sprawozdania z przebiegu właśnie zakończonego Kongresu, w którym wzięło udział około 2600 uczestników, w tym około 1700 z Europy. Zebrani z uznaniem wyrażali się o poziomie naukowym i organizacji Kongresu. Uwagi krytyczne dotyczyły dość skromnego pod względem liczby uczestników udziału zaproszonych prelegentów z krajów środkowej i wschodniej Europy. Zalecono, by organizatorzy przyszłego Kongresu (w 2009 r. w Pradze) zadbali o większą liczbę wykładowców z tej części naszego kon-

tynentu. Prof. Israel Pecht, Sekretarz Generalny FEBS, w ciepłych słowach podkreślił wkład prof. Adama Szewczyka, doradcy do spraw kongresów, pomagającego z ramienia Komitetu Wykonawczego w sprawnym przygotowaniu obecnego Kongresu.

Zebrani wysłuchali również raportu prof. J. Mowbraya, Skarbnika FEBS, o stanie finansów Federacji oraz sprawozdań poszczególnych przewodniczących z działalności podległych im komisji. Prof. Mowbray podkreślił, że FEBS opiera się na solidnej podstawie finansowej, a głównym źródłem wpływów są dochody z publikacji trzech czasopism: *FEBS Journal* (dawny *European Journal of Biochemistry*), *FEBS Letters* i *Molecular Oncology* (wychodzi od 2007 r.). Wprawdzie dochody z wydawnictw spadły w ostatnich latach na skutek wprowadzenia wersji elektronicznych, jednakże nowe, korzystne umowy z firmami wydawniczymi pozwoliły zrekompensować te straty. Dzięki temu FEBS może na dotychczasowym poziomie utrzymać, a nawet rozszerzyć, akcję stypendialną. Z tym ostatnim punktem wiązała się propozycja prof. Macieja Nałęcza, przewodniczącego Komisji Stypendialnej, aby wprowadzić nowy rodzaj stypendiów, przyznawanych młodym biochemikom z krajów członkowskich FEBS, którzy uzyskawszy stopień doktora w Europie, wyjechali na staże podoktorskie poza Europą,

a następnie chcą wrócić do któregoś z krajów członkowskich FEBS (niekoniecznie do kraju swego pochodzenia). Miałoby to przeciwdziałać „drenażowi mózgow”. Propozycja ta wywołała duże zainteresowanie i przyjęto ją tytułem próby na najbliższy rok, ustanawiając cztery takie stypendia. Jednym z wa-

runków ubiegania się o takie stypendium byłoby utrzymanie członkostwa w swoim macierzystym towarzystwie biochemicznym, również podczas pobytu poza Europą.

Ważnym punktem programu obrad były wybory przewodniczących i członków poszczególnych komisji FEBS w przypadkach, gdy kadencje obecnych przewodniczących lub członków kończyły się. Wobec upływu trzyletniej kadencji prof. Adama Szewczyka jako doradcy do spraw kongresów poddano pod głosowanie wnioski o wybranie go na to stanowisko na następną kadencję. Wniosek został przyjęty ogromną większością głosów. Również większością głosów na wakujące stanowisko członka Komisji Wydawniczej został wybrany polski kandydat, prof. Mariusz Jaśkowski.

Zebranie przychyliło się do wniosku Towarzystwa Biochemicznego Armenii, które dotychczas miało status członka obserwatora, aby przyjąć je na członka zwyczajnego.

Z uwagą wysłuchano obszernej prelekcji delegata Republiki Czeskiej, przedstawiającego zarys organizacji Kongresu FEBS w Pradze w lipcu 2009 r. Znacznie krócej i bardziej ogólnie mówił przedstawiciel Szwecji o Kongresie FEBS, organizowanym wspólnie przez Szwedzkie i Norweskie Towarzystwa Biochemiczne w 2010 r. w Göteborgu. Następnie przedstawiciele Włoch i Rosji współzawodniczyli o prawo organizacji Kongresu FEBS w 2011 r. Po wysłuchaniu obu prezentacji i przeprowadzeniu dyskusji odbyło się tajne głosowanie, w którym zwyciężył projekt powierzenia organizacji Kongresu Włoskiemu Towarzystwu Biochemicznemu. Kongres odbędzie się w Turynie.

Pełen tekst protokołu z posiedzenia Rady FEBS jest dostępny na stronie internetowej Polskiego Towarzystwa Biochemicznego pod adresem: <http://www.ptbioch.edu.pl/> menu: **Informacje → FEBS → Council Meetings**.

prof. Lech Wojtczak



Fotografia 1. Nasz delegat (prof. Lech Wojtczak) na posiedzeniu Rady FEBS w Atenach.

WIADOMOŚCI KRAJOWE

NIEKTÓRE WYDARZENIA W NAUCE POLSKIEJ W 2008 ROKU:

- Przeprowadzona w Centrum Onkologii w Gliwicach rekonstrukcja tchawicy po usunięciu nawrotu nowotworu tarczycy, zajęła II miejsce w dorocznym konkursie Amerykańskiego Towarzystwa Chirurgii Rekonstrukcyjnej i Mikronaczyniowej na najlepszy zabieg rekonstrukcyjny. Operacja, przeprowadzona przez zespół pod kierownictwem dr Adama Maciejewskiego, była pierwszą taką w Polsce i jedną z kilkunastu na świecie.
 - Badacze z Pracowni Neuromorfologii oraz Pracowni Neurobiologii Molekularnej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN ustalili, jak dochodzi do rozwoju jednej z najczęstszych odmian padaczki - choroby, na którą cierpi 400 tys. Polaków i miliony ludzi na całym świecie. Udało im się zidentyfikować odpowiedzialne za to białko – MMP-9.
 - Nieznany dotąd naturalny mechanizm obrony przed wirusami, powodującymi m. in. raka szyjki macicy, został odkryty przez zespół doktora Macieja Łazarczyka podczas badań, jakie naukowiec prowadził dzięki wsparciu FNP w Instytucie Pasteura w Paryżu. Artykuł na ten temat opublikowano na łamach „Journal of Experimental Medicine”.
 - W Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie opracowano innowacyjną terapię, która pozwala uchronić dzieci przed uwarunkowaną genetycznie padaczką i upośledzeniem umysłowym. Zespół prof. Sergiusza Józwiaka jako pierwszy na świecie zastosował zupełnie nowatorskie podejście - w jego metodzie dzieci ze stwardnieniem guzowatym poddawane są badaniu EEG mózgu już od 3. miesiąca życia. Gdy naukowcy wykryją jakiegokolwiek zmiany w zapisie, włączają leczenie wigabatryną jeszcze przed wystąpieniem napadu, co zmniejsza ryzyko padaczki i nieodwracalnego upośledzenia umysłowego. Wstępne doniesienie na ten temat ukazało się w międzynarodowym czasopiśmie "Epilepsia".
 - Zespół dr hab. Andrzeja Chmury z Katedry i Kliniki Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej AM w Warszawie przeprowadził nowatorski zabieg, dzięki któremu pacjent może uniknąć cukrzycy. Choremu, któremu usunięto trzustkę, przeszczepiono jednocześnie do wątroby własne wysepki trzustkowe. Operacja trwała 10 godzin, natomiast przygotowania do niej – aż 10 lat.
 - Po raz pierwszy w Polsce przeprowadzono usuwanie guza mózgu przy jednoczesnym obserwowaniu funkcji włókien nerwowych. Operacja przeprowadzona została przez zespół prof. Mirosława Ząbka z Kliniki Neurochirurgii Szpitala Bródnowskiego w Warszawie.
 - Pierwsze w Polsce zabiegi wymiany zastawki aortalnej serca metodą przeszskórną, bez otwierania klatki piersiowej, przeprowadzili lekarze w Śląskim Centrum Chorób Serca w Zabrzu (Śląskie) oraz Klinice Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii Collegium Medicum UJ.
 - Szczątki, znalezione w katedrze w Kwidzynie, na 96 procent należą do wielkich mistrzów krzyżackich - po blisko roku badań ustalili naukowcy z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Badacze przeanalizowali DNA szczątków znalezionych w 2007 r. w katedrze św. Jana Ewangelisty w Kwidzynie. Okazało się, że to szkielety XIV-wiecznych wielkich mistrzów krzyżackich - Wenera von Orselna, Ludolfa Königa i Heinricha von Plauena. To odkrycie na skalę europejską – w żadnym innym miejscu na kontynencie nie natrafiono dotąd na średniowieczne pochówki najwyższych dostojników zakonu krzyżackiego.
 - Pierwsza wiązka cząstek przeszła przez obwód akceleratora LHC (Wielkiego Zderzacza Hadronów) w ośrodku CERN pod Genewą. Uruchomienie LHC zakończyło dwudziestoletnie prace nad budową tego największego na świecie urządzenia badawczego, w których dużą rolę odegrali także Polacy - twórcy m. in. oprogramowania i symulacji oraz aparatury i systemów wyzwalania.
- Przy budowie zderzacza pracowało w sumie około 350 polskich fizyków z Instytutu Problemów Jądrowych w Warszawie, Uniwersytetu Warszawskiego, Politechniki Warszawskiej, Instytutu Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie, Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie, Uniwersytetu Jagiellońskiego i Politechniki Krakowskiej.
- Polak na czele ponad stu tysięcy fizyków – prof. Maciej Kolwas z Instytutu Fizyki PAN w Warszawie został wybrany na prezesa Europejskiego Towarzystwa Fizycznego (EPS). EPS zrzesza ponad sto tysięcy fizyków z 40 krajowych towarzystw fizycznych.
 - Astronomowie odkryli nowy układ planetarny, podobny do Układu Słonecznego, będący jego przeskalowaną wersją. Kluczową rolę w odkryciu odegrał polski zespół kierowany przez prof. Andrzeja Udalskiego z Obserwatorium Astronomicznego UW, pracujący w ramach projektu OGLE (Optical Gravitational Lensing Experiment). Wykryty układ jest odległy od Ziemi o 4500 lat świetlnych.
 - Polski teleskop - robot zarejestrował najjaśniejszy widziany przez człowieka błysk optyczny, pochodzący z odległego wszechświata. Wyniki obserwacji ukazały się w prestiżowym czasopiśmie naukowym "Nature". Obserwowana eksplozja była odległa o 7,5 miliardów lat świetlnych od Ziemi, w połowie odległości do krańców widzialnego Wszechświata. To najjaśniejszy rozbłysk zaobserwowany kiedykolwiek przez człowieka.
 - 14-letni miłośnik astronomii z Krapkowic znalazł komety na zdjęciach wykonanych przez obserwatorium słoneczne SOHO. Tym samym został prawdopodobnie najmłodszym odkrywcą komety w projekcie SOHO Comets.
 - Spektakularny sukces w konkursie na najlepszy projekt akademicki związany z projektowaniem układów elektronicznych odniósł student Politechniki Łódzkiej – Łukasz Kotynia. Laureat uczy się na piątym roku kierunku Elektronika i

Telekomunikacja na Wydziale Elektrotechniki Elektroniki Informatyki i Automatyki. Kotyňa pokonał konkurentów z całej Europy i zdobył główną nagrodę w kategorii projektów studenckich, którą wręczono mu podczas konferencji CDNLive w Monachium.

Wydział Lekarsko-Biotechnologiczny i Medycyny Laboratoryjnej powołano w Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie. PAM jest jedyną uczelnią ze specjalnością biotechnologia medyczna. W skład nowego wydziału weszły dwa kierunki: biotechnologia ze specjalnością biotechnologia medyczna i analityka medyczna. Jednocześnie powołano jednostki: katedry, zakłady i dziewięć samodzielnych pracowni, w tym jedną nową - pracownię onkologii klinicznej. Program nauczania na wydziale obejmuje m.in. zajęcia z przedmiotów ogólnych, onkologii, genetyki, pediatrii, biologii eksperymentalnej oraz z biologicznych aspektów biotechnologii medycznej.

W witrynie internetowej tygodnika „Science” 8 stycznia b.r. ukazała się publikacja, której pierwszą autorką jest dr Joanna Węgrzyn, absolwentka Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. Doktor Węgrzyn od jesieni 2003 roku pracuje w zespole prof. Andrew Larnera na Virginia Commonwealth University w Richmond (USA). Zespół prof. Larnera zajmuje się prowadzeniem badań nad mechanizmami regulacji ekspresji genów przez cytokiny i czynniki transkrypcyjne należące do rodziny STAT. Opublikowana w „Science” praca pt. „Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration” dotyczy właśnie tego zagadnienia. Jej wyniki stanowiły podstawę rozprawy doktorskiej, którą dr Węgrzyn obroniła w Krakowie w październiku 2007 roku. Opublikowany artykuł omawia



Fotografia 2. Life Science Open Space.

nieznaną wcześniej rolę STAT3 w regulacji oddychania komórkowego. Białko STAT3 znane dotychczas jako kluczowy mediator ekspresji wielu genów pod wpływem cytokin, spełnia tę funkcję w jądrze komórkowym. STAT3 występujący w mitochondriach nie wpływa na ekspresję genów, ale reguluje zdolność komórki do produkcji ATP. Odkrycie zespołu prof. Larnera stanowi podstawę dla dalszych badań funkcji tego białka, a badacze przypuszczają, że zaburzenia w pracy STAT3 mogą mieć związek m. in. z niewydolnością serca czy prawidłową pracą układu odpornościowego. W gronie współautorów powyższej publikacji znajduje się także kilku innych pracowników Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, tj.: prof. Józef Dulak oraz Marta Derecka, Karol Szczepanek, Magdalena Szeląg, Agnieszka Gornicka i Joanna Cichy. Rezultatem dotychczasowej współpracy między zespołem prof. Larnera i badaczami z Krakowa jest już kilka publikacji, a obecnie przygotowywane są kolejne rozprawy doktorskie. (informacja od prof. Józefa Dulaka, kierownika Zakładu Biotechnologii Medycznej Wydziału BBiB UJ, <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/1164551>).

Central European Congress of Life Science EUROBIOTECH 2008. W dniach 17-19 października 2008 odbyła się w Krakowie międzynarodowa impreza naukowa o nazwie „Central European Congress of Life Science EUROBIOTECH 2008” połączona z targami (Fot. 1-3). Kongres współorganizowały następujące instytucje: Uniwersytet Jagielloński (Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii [WBBiB] oraz Collegium Medium [CM]), Uniwersytet Rolniczy [UR] w Krakowie, Polska Federacja Biotechnologii [PFG] oraz firma „Targi w Krakowie”. Stałymi członkami Komitetu Organizacyjnego Kongresu

byli: prof. Kazimierz Strzałka (przewodniczący, WBBiB, UJ), prof. Henryk Kołoczek (vice-przewodniczący, UR w Krakowie) oraz prof. Tomasz Twardowski (PFB) i mgr Ewa Woch (Targi w Krakowie). W skład Komitetu wchodziło ponadto: prof. S. Bielecki (Komitet Biotechnologii przy Prezydium PAN), mgr P. Błachno (Jagiellońskie Centrum Innowacji, UJ), prof. M. Błażewicz (Akademia Górniczo-Hutnicza), prof. A. Dembińska - Kieć (CM UJ), prof. J. Dulak (UJ), prof. K. Kononowicz (CM UJ), prof. P. Laidler (CM UJ), dr K. Murzyn (Cluster Life Science, Kraków), prof. M. Pawlikowski (Akademia Górniczo-Hutnicza), prof. P. Pisulewski (UR, Kraków), prof. R. Słomski (Instytut Genetyki Człowieka PAN) oraz prof. Z. Smorąg (Instytut Zootechniki w Balicach). Honorowy patronat nad Kongresem objęli: Minister Zdrowia, Wojewoda i Marszałek Małopolski, Prezydent Krakowa, Rektorzy Uniwersytetu Jagiellońskiego i Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, Polska Akademia Umiejętności, Słowacka Akademia Nauk, Komitet Biotechnologii PAN, Polski Urząd Patentowy, Konsul Generalny Republiki Słowacji, Konsul Generalny Republiki Czech oraz British - Polish Chamber of Commerce, zaś w skład Honorowego Komitetu Naukowego weszło 27 wybitnych uczonych z Polski, Litwy, Czech, Ukrainy, Niemiec, Rosji, Słowacji oraz Białorusi.

Kongres EUROBIOTECH 2008 stanowił kontynuację zakończonej sukcesem „First International Conference: Biotechnology in Agriculture EUROBIOTECH 2007”, zorganizowanej w Krakowie w kwietniu 2007. Tym razem tematyka Kongresu poświęcona była szerszej problematyce „life science” ze szczególnym uwzględnieniem biotechnologii czerwonej. Program Kongresu zawierał 7 paneli tematycznych: (1) Medical Biotechnology, (2) Pharmaceutical Biotechnology, (3) Food for Life - Nutrigenomics, (4)



Fotografia 1. Central European Congress of Life Science EUROBIOTECH 2008 - ceremonia otwarcia.



Fotografia 3. Stoisko Słowackiej Akademii Nauk.

Animal Biotechnology, (5) Biomaterials, (6) Intellectual Property Rights and Red Biotechnology, (7) Searching for Private Capital for Life Sciences Projects. Dodatkowo, pod patronatem Cluster Life Sciences Kraków, zorganizowana została impreza „Life Science Open Space”, prowadzona przez moderatorów z Kanady i z Polski, której celem była swobodna wymiana myśli i poglądów na niektóre problemy wiążące się z biotechnologią. Kluczowym, dyskutowanym, zagadnieniem była kwestia innowacyjności w obszarze nauk o życiu oraz sprawa przełamania barier we wdrażaniu osiągnięć naukowych do praktyki. Oprócz sesji panelowych poświęconych różnym dziedzinom biotechnologii, dużym zainteresowaniem cieszył się panel „Intellectual Property Rights and Red Biotechnology”, a także panel „Searching for Private Capital for Life Sciences Project”, co świadczy o wzrastającym zainteresowaniu sprawami transferu technologii między nauką a praktyką. W Kongresie uczestniczyło około 480 osób z 21 krajów, głównie europejskich, ale także z Ameryki, Azji i Australii. W trakcie Kongresu wygłoszono 140 wykładów plenarnych i sesyjnych, zaprezentowano około 190 posterów, zaś w części targowej uczestniczyło 31 firm polskich i zagranicznych, których oferta handlowa dotyczyła w głównej mierze nowoczesnej aparatury naukowej, odczynników i materiałów do badań oraz literatury naukowej. W towarzyszącej wystawie, oprócz firm z sektora „biotech”, uczestniczyły również firmy patentowe, firmy doradcze oraz fundusze inwestycyjne. Kongres uzyskał pochlebny ocenę osób uczestniczących. Wybór 41 wybitnych specjalistów z poszczególnych dziedzin jako „keyspeakerów” gwarantował wysoki poziom naukowy paneli. Stały Komitet Organizacyjny, zachęcony sukcesem EUROBIOTECH 2007 oraz EUROBIOTECH 2008, zdecydował o organizacji w roku 2010 w Krakowie kolejnego Kongresu – Eurobiotech 2010, tym razem poświęconego białej biotechnologii. Już teraz serdecznie zapraszamy do uczestnictwa w tej międzynarodowej imprezie naukowej (informacja przygotowana przez prof. Kazimierza Strzałkę).

Nagroda Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, mająca opinię najważniejszej nagrody naukowej w Polsce, zwana „Polskim Noblem”, przyznana zo-

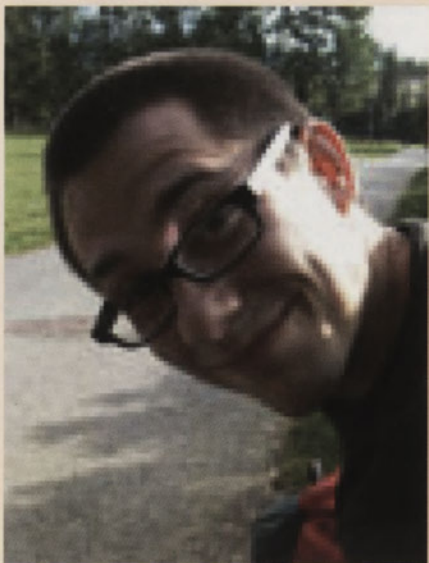
stała po raz 17. Nagrodę tę otrzymać mogą wybitni uczeni za osiągnięcia i odkrycia (z ostatnich czterech lat), stanowiące istotny wkład w życie duchowe i postęp cywilizacyjny kraju oraz zapewniające Polsce miejsce w nauce światowej. Nagroda przyznawana jest w czterech dziedzinach: nauk humanistycznych i społecznych, nauk przyrodniczych i medycznych, nauk ścisłych oraz nauk technicznych. Uroczystość wręczenia nagrody odbyła się w Sali Wielkiej Zamku Królewskiego w Warszawie. **W dziedzinie nauk humanistycznych i społecznych** laureatem nagrody został prof. **Stanisław Mossakowski** z Instytutu Sztuki PAN w Warszawie za „wszechstronną, interdyscyplinarną monografię dotyczącą Kaplicy Zygmuntowskiej - czołowego zabytku sztuki polskiego i włoskiego Renesansu”. **W dziedzinie nauk przyrodniczych i medycznych** nagrodzono prof. **Jacka Oleksyna** (Fot. 4) z Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku, z wykształcenia leśnika, za „wkład w odkrycie uniwersalnych biogeograficznych zależności między cechami roślin, istotnych dla zrozumienia procesów ekologicznych w skali globalnej”. **W dziedzinie nauk ścisłych** nagrodzony został prof. **Ryszard Horodecki** z Instytutu Fizyki Teoretycznej i Astrofizyki Uniwersytetu Gdańskiego za „wkład w stworzenie podstaw informatyki kwantowej”. Prof. Horodecki zbadał zjawisko splątania kwantowego, które, wg jury jest jednym z najtrudniejszych do zrozumienia fenomenów we współczesnej fizyce. **Prof. Andrzej Jajszczyk** z Katedry Telekomunikacji Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie otrzymał nagrodę FNP **w dziedzinie nauk technicznych** za „badania w zakresie teorii węzłów szybkich sieci telekomunikacyjnych, stanowiących podstawę budowy internetu nowej generacji”. W tym roku każdy z laureatów nagrody FNP otrzymał 200 tys. zł.

W IV edycji konkursu „**Skomplikowane i proste. Młodzi uczeni o swoich badaniach**” mgr **Michał P. Heller** (Fot. 5) z Instytutu Fizyki UJ **zdożył I nagrodę**. Naukowiec został doceniony za artykuł „Wibrujące struny, spadające jabłka i najdoskonalszy płyn w przyrodzie”, popularyzujący badania nad zastosowaniami teorii strun. Konkurs na artykuł popularnonaukowy pod hasłem „Skomplikowane i proste. Młodzi uczeni o swo-



Fotografia 4. Prof. Jacek Oleksyn (trzeci od lewej).

ich badaniach”, objęty honorowym patronatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, organizowany jest od 2005 r. przez redakcję miesięcznika „Forum Akademickie”. Biorą w nim udział młodzi naukowcy do 35 roku życia, głównie doktoranci. **II nagrodę** otrzymała mgr inż. **Marta Grabiec** z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie za artykuł „Neurogeneza – do czego służą nowe neurony w mózgu dorosłych zwierząt”, poświęcony badaniom rozwoju mózgu torbaczy. **III nagroda** przypadła mgr inż. **Joannie Brzeskiej** z Katedry Chemii i Towaroznawstwa Przemysłowego Akademii Morskiej w Gdyni za artykuł „Synteza nowych poliuretanów do celów medycznych”. Autorka poszukuje tworzyw sztucznych, które nadają się na implanty. **Wyróżnienia** otrzymali: mgr inż. Sławomir Boncel z Katedry Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Politechniki Śląskiej w Gliwicach za artykuł „Czarna sukienka”, popularyzujący badania włókien z nanorurek węglowych; dr Norbert Duda z Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku za artykuł „Komu podrzucić własne dziecko? Dylematy ptasiej mamy”, poświęcony pasożytnictwu lęgowemu mewy śmieszki; mgr inż. Przemysław Krakowiak z Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej za artykuł „Jak nie męczyć mikrobiologa”. Autor badał obecność bakterii w toaletach publicznych; mgr inż. Agata Pacek z Wydziału Ogrodniczego Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie za artykuł „Tłusty sposób na owada”, o kwiatach storczyka, z których pszczoły zbierają... tłuszcz. Wręczenie nagród odbyło się 12 lutego 2009 r., w Warszawie, w gmachu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, podczas obrad Rady Głównej Szkolnictwa Wyższego. Nagrodzone i wy-



Fotografia 5. Mgr Michał P. Heller.

różnione artykuły publikuje „Forum Akademickie”.

Marcin Andrychowicz, Maciej Klimek i Marcin Kościelnicki (Fot. 6) – studenci informatyki Uniwersytetu Warszawskiego, którzy wygrali mistrzostwa Europy Środkowej (CEPC'08) w programowaniu zespołowym (drużyna „Warsaw Swifts 08”) otrzymali stypendia naukowe. Uroczystość wręczenia stypendiów odbyła się 6 stycznia w Pałacu Kazimierzowskim w Warszawie.

Prof. dr hab. Stanisław Lech Woronowicz z Wydziału Fizyki UW otrzymał niezwykle prestiżową nagrodę naukową Fundacji Aleksandra von Humboldta. Humboldt Research Award otrzymują wyróżniający się naukowcy, spoza Niemiec, których badania, teorie lub odkrycia miały znaczący wpływ na rozwój danej dyscypliny naukowej. Tak nagrodzeni naukowcy są zapraszani do poprowadzenia na jednym z niemieckich uniwersytetów własnego projektu naukowego. Prof. Woronowicz będzie prowadził badania na Georg-August-Universität Göttingen, współpracując z prof. Ralfem Meyerem z Instytutu Matematyki oraz prof. Detlevem Buchholzem z Instytutu Fizyki Teoretycznej. Badania prof. Woronowicza od blisko 30 lat skupiają się na zagadnieniach związanych z teorią grup kwantowych; przez wielu uznawany jest za jednego z współtwórców tejszej teorii. Wcześniej prof. Woronowicz zajmował się aspektami matematycznymi teorii kwantów i aksjomatycznej kwantowej teorii pola oraz algebrą

operatorów. Badania prof. Woronowicza są uznawane za wybitne na całym świecie. Współpracuje on m.in. z Institute for Advanced Study w Princeton, Centr de Physique Theorique CNRS w Marsylii, Zentrum für Interdisziplinäre Forschung w Bielefeld, Institut für Theoretische Physik ETH w Zurychu oraz Research Institute for Mathematical Study Kyoto University. Jest laureatem wielu nagród, m.in.: Nagrody im. Stefana Banacha Polskiego Towarzystwa Matematycznego, Nagrody Fundacji Alfreda Jurzykowskiego oraz Nagrody Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w dziedzinie nauk ścisłych. W latach 1977–1984 prof. Woronowicz był prodziekanem, a następnie dziekanem Wydziału Fizyki UW; w latach 1993–1996 pełnił funkcję kierownika Katedry Metod Matematycznych Fizyki UW, której pracownikiem jest do dnia dzisiejszego (wg Nauka w Polsce).

Na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego ogłoszono wyniki Konkursu Prac Młodych Naukowców Unii Europejskiej 2009. Jury pod przewodnictwem prof. Jana Madeya przyznało dziewięć nagród.



Fotografia 6. Panowie Marcin Andrychowicz, Maciej Klimek i Marcin Kościelnicki (wymienieni w kolejności od lewej).

Z uwagi na ograniczenia regulaminowe Polskę we wrześniu w Paryżu będą reprezentować trzy najlepsze prace. Trzy pierwsze nagrody otrzymali: **Anna Kornakiewicz (Fot. 7)** studentka I roku Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego – za pracę dotyczącą rozwoju oporności na cyprofloksacynę u bakterii *Escherichia coli*. Badania laureatki dotyczą doboru dawki, która pozwala wyleczyć pacjenta, a jednocześnie nie prowadzi do powstania opornych szczepów bakterii. **Monika i Michał Turscy** – rodzeństwo, które bierze udział w eliminacjach już po raz trzeci. Monika jest uczennicą II klasy I Liceum Ogólnokształcącego

im. Stanisława Staszica w Lublinie, a Michał ukończył to samo liceum i studiuje na pierwszym roku Szkoły Głównej Handlowej w Warszawie. Ich wspólne badania dotyczyły obiegów w przyrodzie kwasu kinureninowego – tajemniczej substancji, którą w XIX wieku odkryto w moczu psa. Okazało się z czasem, że kwas występuje zarówno w roślinach, jak i organizmach zwierząt. Jak wykazały badania rodzeństwa z Lublina, szczególnie dużo kwasu kinureninowego zawierają zioła o korzystnym działaniu na układ pokarmowy (dziurawiec, melisa, lipa, pokrzywa). Zgadza się to z doniesieniami o tym, że kwas kinureninowy pobudza trawienie, a jednocześnie zapobiega wrzodom. **Aleksander Kubica**, student Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych Uniwersytetu Warszawskiego oraz **Wiktor Pilewski**, student I roku Wydziału Elektrycznego Politechniki Poznańskiej badali wtórne ogniska spiralnych soczewek dyfrakcyjnych. Te płaskie soczewki można wydrukować na przezroczystej folii – wystarczy drukarka laserowa o dużej rozdzielczości. Przeprowadzone za pomocą starego skanera i aparatu cyfrowego badania pozwoliły zbadać nietypowy kształt ognisk wtórnych tych soczewek. Spiralne soczewki dyfrakcyjne mogą znaleźć zastosowanie m. in. w skupianiu promieni rentgenowskich oraz budowie optycznej „pęsety” do przemieszczania mikroskopijnych obiektów. Wyjątkową właściwością spiralnej soczewki jest to, że „zakręcone” przez nią światło umożliwia także obracanie, np. bakterii. Trzy nagrody drugie otrzymali: Joanna Kośmicka z Bydgoszczy – za pracę o wpływie obróbki termicznej na zawartość witaminy C w ziemniakach; Martha Ubik z Krakowa – za pracę o punktach charakterystycznych na prostej Eulera i Michał Cieślewicz z Giżycka



Fotografia 7. Pani Anna Kornasiewicz.

– za badania wpływu człowieka na różnorodność gatunkową porostów w Giżycku. Trzecią nagrodę ex aequo zdobyli: Joachim Jelisiejew z Białogostoku – za pracę w dziedzinie matematyki, Rafał Sarniak z Włocławka – za badania fizyczne oraz Tomasz Trzeciak z Rzeszowa – za badania w dziedzinie chemii. W finale – za prace w dziedzinie biologii – znalazły się także: Katarzyna Czajkowska z Warszawy, Joanna Grzbiela z Gliwic oraz Katarzyna Niedziela z Gostynia. Polscy młodzi naukowcy co roku odnoszą sukcesy w ogólnoeuropejskim konkursie, pokonując konkurentów z Unii Europejskiej, a także z krajów spoza UE, m. in. z Chin i Rosji. W Kopenhadze, w roku 2008, Magdalena Bojarska z Warszawy zdobyła I nagrodę i nagrodę specjalną za pracę „Cykle Hamiltona w uogólnionych grafach Halina” (matematyka), zaś Paweł Maryniak z Prudnika – nagrodę specjalną rządu duńskiego za pracę dotyczącą szybkości uczenia się i zapamiętywania układu obiektów w przestrzeni u karaczana madagaskarskiego w zależności od płci (samice gorzej sobie z tym radzą). Polskie eliminacje do konkursu organizuje Krajowy Fundusz na rzecz Dzieci (wg inf. w witrynie Nauka w Polsce).

Krzysztof Cichy z Wydziału Fizyki UAM w Poznaniu, Aneta Kurzępa z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN oraz Dariusz Sobolewski z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego (Fot. 8) zostali laureatami I edycji nagród dla wybitnych młodych naukowców, przyznanych przez Wydawnictwo Naukowe Elsevier B.V. oraz Fundację Edukacyjną „Perspektywy”. **Krzysztof Cichy** studiował na Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, i tam w wieku 27 lat otrzymał stopień doktora. Potem został laureatem I edycji konkursu Prezesa NBP za pracę z dziedziny teorii wzrostu gospodarczego. Obecnie pracuje w Katedrze Ekonomii Matematycznej AE w Poznaniu oraz jest doktorantem stacjonarnych studiów doktoranckich na Wydziale Fizyki UAM. W badaniach z zakresu ekonomii wykorzystuje m. in. wiele metod symulacyjnych opracowanych przez fizyków. Zainteresowania laureata z dziedziny fizyki dotyczą tzw. chromodynamiki kwantowej na sieci. W badaniach tych dr Cichy tworzy efektywne algorytmy, implementuje je oraz wykorzystu-

je napisane przez siebie i przez inne osoby programy na najpotężniejszych na świecie superkomputerach. **Aneta Kurzępa** jest absolwentką chemii na Politechnice Wrocławskiej i studentką drugiego roku studiów doktoranckich w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN. Jej praca polega na badaniach bakteriofagów, może to w przyszłości skutkować opracowaniem skutecznej metody zwalczania wielu chorób. Prowadzi własny projekt badawczy w dziedzinie interakcji fagów z organizmami ssaków, ma na swym koncie liczne publikacje naukowe, zarówno jako współautorka, jak i samodzielny autor. **Dariusz Sobolewski** jest pracownikiem naukowo-dydaktycznym Uniwersytetu Gdańskiego, zatrudnionym na stanowisku adiunkta w Katedrze Syntezy Organicznej Wydziału Chemii UG. W ciągu ostatnich kilku lat pracy opublikował blisko 30 prac naukowych. Jego badania dotyczą prób znalezienia m. in. silnych i selektywnie działających analogów hormonów neuroprzysadkowych, które mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu takich chociażby chorób jak np. moczówka prosta, zaburzeń związanych z zatrzymywaniem wody w organizmie czy pewnych rodzajów nadciśnienia. Do I edycji nagrody dla młodych naukowców zakwalifikowało się 10 osób z różnych polskich uczelni, reprezentujących medycynę, technologię, biochemię, genetykę i biologię molekularną, fizykę i astronomię, chemię, inżynierię materiałową, rolnictwo i biologię, nauki społeczne, naukę o środowisku i informatykę. Nagrodą dla trójki zwycięzców jest uczestnictwo w wybranej przez laureata konferencji naukowej za granicą (każdemu zostaną opłacone bilety lotnicze, pokój w hotelu oraz uczestnictwo). Organizatorami konkursu i fundatorami nagród byli Wydawnictwo Naukowe Elsevier



Fotografia 8. Dr Krzysztof Cichy, mgr Aneta Kurzępa i dr Dariusz Sobolewski (wymienieni w kolejności od lewej).

B.V. oraz Fundacja Edukacyjna „Perspektywy”.

W dniach 26–31 października 2008 r. w Manchesterze odbyło się **Manchester International Science Festiwal**, czyli kolokwium dyrektorów festiwali nauki z całego świata. Ze strony polskiej udział w spotkaniu wzięli prof. Magdalena Fikus z Festiwalu Nauki w Warszawie oraz prof. Kazimierz Orzechowski z Dolnośląskiego Festiwalu Nauki. Pozostali uczestnicy kolokwium pochodzili m.in. z: Afryki Płd., Arabii Saudyjskiej, Brazylii, Chin, Chorwacji, Danii, Hiszpanii, Japonii, Jemenu, Kuby, Litwy, Niemiec, Rosji, Singapuru, Tajwanu i Ukrainy. Ich rozmowy skupiały się wokół zagadnień o charakterze pytań: „Dlaczego organizujemy Festiwal Nauki?”, „Jak organizujemy Festiwal Nauki?”, „Kiedy organizujemy Festiwal Nauki?” oraz „Gdzie organizujemy Festiwal Nauki?”, oraz „Darwin 200 – imprezy i obchody 200-lecia urodzin Darwina”. Wszyscy uczestnicy kolokwium przedstawiali własne Festiwale. Prezentacjom towarzyszyła ożywiona dyskusja. Z wniosków wypływało jedno zasadnicze stwierdzenie, iż cel organizatorów poszczególnych festiwali był zazwyczaj ten sam, jednak dopiero w trakcie wypowiedzi okazywało się, jak wiele różni festiwal w Chinach od festiwalu brazylijskiego czy licznych festiwali brytyjskich. Rozmaitość doświadczeń organizatorów festiwali i możliwość ich wymiany stanowiła o największej wartości tego kolokwium. Członkowie kolokwium mieli także okazję uczestnictwa w trwającym w tym czasie w Manchesterze Festiwalu Nauki. Obejrzeni ciekawe pokazy („Jak zostać wynalazcą?”, „Uliczny pokaz zjawisk naukowych”, „Ekspozycje Muzeum Nauki i Technologii”), wzięli udział w debacie o konsekwencjach szczepień profilaktycznych noworodków i dzieci oraz obejrzeni film „Kosmiczna Afryka” połączony z debatą na temat położenia mniejszości etnicznych w Wielkiej Brytanii. Zaproszeni naukowcy obecni byli również na wręczeniu nagrody dla brytyjskiego popularyzatora festiwalowego 2007. Uczestnictwo w Kolokwium sfinansowało w całości British Council.

Dzięki zainstalowaniu nowoczesnej kamery w całorocznej Polskiej Stacji Polarnej IGF PAN na Spitzbergenie, in-

ternauci mogą śledzić polarny krajobraz łącznie ze zwierzętami. Przystosowana do pracy w najtrudniejszych warunkach nowoczesna kamera (35-krotne powiększenie i 12-krotny zoom cyfrowy) została zainstalowana przez wyprawę z udziałem Witolda Kaszkina, a obrazy z polarnej stacji (z możliwością monitorowania odległych obiektów) są dostępne w sieci od przełomu listopada i grudnia 2008. Obraz z kamery dostępny jest pod adresem: <http://hornsund.com/>. Wg Unii Europejskiej, polska stacja na Spitzbergenie jest jednym z sześciu flagowych miejsc idealnych do badań biologicznych i geograficznych na kontynencie europejskim. Od blisko 50 lat organizowane są ekspedycje badawcze w ten rejon Ziemi (wg inf. Nauka w Polsce).

Naukowcy, instytucje nienaukowe i dziennikarze zachęceni są do popularyzowania osiągnięć polskiej nauki i przybliżania świata badań naukowych osobom, które na co dzień nie mają z nimi kontaktu.

W 2009 roku rozpoczyna się nowa edycja konkursu „Popularyzator Nauki”. Do 15 października będą przyjmowane zgłoszenia do konkursu, obejmujące zarówno kandydatury nowe, jak i te z lat poprzednich. Przedstawiciele organizatora, korzystając z prawa selekcji, wybiorą wśród nadesłanych zgłoszeń kandydatów, którzy wezmą udział w ścisłym finale i będą rekomendowani do nagrody głównej. Z grupy finałowej jury wyłoni laureatów konkursu. Tytuł „Popularyzatora Roku 2009” zostanie przyznany w dwóch kategoriach głównych – „Naukowiec i instytucja naukowa” oraz „Dziennikarz, redakcja, instytucja nienaukowa”. Wyróżnienia otrzymają najlepsze prezentacje wszystkich przyszłorocznych festiwali nauki. Kandydaci wyłonieni spośród wszystkich zgłoszeń do udziału w finale, otrzymają prestiżowe dyplomy uczestnictwa w konkursie.

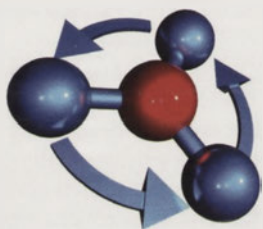
Serwis „Nauka w Polsce” ogłosił termin rozpoczęcia procedury kwalifikacyjnej.

Institute of International Education (IIE) zaprasza w imieniu King Abdullah University of Science and Technology (KAUST), na program stypendialny dla studentów kierunków inżynierskich i technologicznych. Król Arabii Saudyjskiej Abdullah bin Abdulaziz Al Saud

stworzył na wschodnim brzegu Morza Czerwonego unikalny międzynarodowy uniwersytet KAUST. O stypendia ubiegać się mogą studenci ostatnich lat studiów licencjackich i magisterskich następujących kierunków: Informatyka, Matematyka Stosowana, Chemia, Biotechnologia, Elektronika, Ochrona środowiska, Inżynieria Środowiska, Inżynieria Procesowa, Informatyka, Elektronika, Inżynieria materiałowa, Mechanika, Oceanografia oraz kierunków pochodnych. O stypendia mogą się starać także polscy studenci. Po ukończeniu studiów w Polsce, student będzie kontynuował naukę w KAUST w ramach programu magisterskiego rozpoczynającego się jesienią 2010 lub 2011 roku. Stypendium

obejmuje: opłacenie studiów w Polsce do ukończenia aktualnego programu, atrakcyjne stypendium podczas nauki w KAUST (opłata za studia, zakwaterowanie oraz pokrycie kosztów utrzymania, kosztów podróży, pomocy i sprzętu dydaktycznego (laptop, podręczniki), kosztów przejazdu do Arabii Saudyjskiej oraz podróży do domu podczas przerw świątecznych). Szczegółowe informacje na temat stypendium oraz formularze aplikacyjne dostępne są na stronach: www.perspektywy.pl/kaust oraz www.kaust.edu.sa/discovery.

Pod redakcją Teresy Wesołowskiej



34th FEBS Congress

July 4 - 9, 2009

Prague, Czech Republic



Life's Molecular Interactions

- Cells' modular components
- Social Life of the Cell
- Organism, the Network of Interactions



Federation of European Biochemical Societies



Czech Society for Biochemistry and Molecular Biology

www.febs2009.org

PROTEAZY RETROWIRUSOWE PO 20 LATACH: REMINISCENCJE

Mariusz Jaskólski[✉]

Zakład Krystalografii, Wydział Chemii UAM i Centrum Badań Biokrystalograficznych, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

[✉]Zakład Krystalografii, Wydział Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań; tel.: (061) 8291274, email: mariuszj@amu.edu.pl

Kronika wydarzeń związanych z odkryciem struktury proteazy wirusa HIV¹, pierwszego zbadanego strukturalnie białka retrowirusowego, musi rozpocząć się u progu 1988 roku. Przy okazji można odnotować ciekawą zbieżność dat: 20-lecie odkrycia struktury proteazy retrowirusowej przypada prawie dokładnie w 50. rocznicę ogłoszenia drukiem przez Johna Kendrew w roku 1958 pierwszej w historii struktury przestrzennej białka [1]. Tytułem przypomnienia warto nadmienić, że w 1988 roku, w pięć lat po odkryciu, że jest on przyczyną AIDS, biologia i genetyka retrowirusa HIV-1 była już dobrze rozpracowana. Wiedziono, że w jego genomie RNA są tylko 3 geny, *gag*, *pol* i *env*, kodujące, w postaci poliprotein, odpowiednio białka strukturalne, enzymy i glikoproteiny płaszcza. Najciekawszy był skład poliproteiny *pol*, zawierającej sekwencje proteazy, odwrotnej transkryptazy (przepisującej retrowirusowej RNA na DNA) oraz integrazy (wbudowującej wirusowy DNA do genomu zainfekowanej komórki). O ile dwa ostatnie enzymy związane są ściśle ze specyfiką retrowirusa, proteaza mogła być podobna do znanych enzymów pochodzenia komórkowego. Jej obecność jest jednak kluczowa

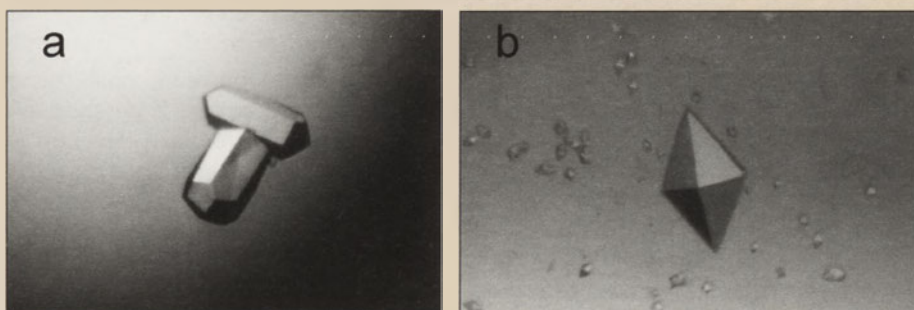
dla cyklu życiowego i infekcyjności HIV, gdyż tylko własny enzym retrowirusa potrafi precyzyjnie podzielić (w trakcie opuszczania zainfekowanej komórki T4 układu odpornościowego) niedojrzałe poliproteiny retrowirusowe na białka docelowe.

Zespół krystalografów mających zmierzyć się ze strukturą proteazy retrowirusowej został sformowany we Frederick Cancer Research Facility w USA przez mającego polskie korzenie Alexandra Włodawera. Obok Marii Miller (również polskiego pochodzenia) i Mohany Rao, także ja miałem szczęście znaleźć się w składzie tego zespołu (Ryc. 1). Z zespołem naszym współpracował ważny partner na Uniwersytecie Case Western Reserve w Cleveland (USA), Jonathan Leis, który dostarczył białko do badań, proteazę wirusa sarkomy Rousa (RSV), znanego również jako ASV (ang. *avian sarcoma virus*). Uzyskanie w tamtych czasach białek retrowirusa HIV, szczególnie w ilościach wymaganych przez krystalografię, nie było łatwe, więc decyzja by rozpracować enzym ze spokrewnionego wirusa drobiu była bardzo racjonalna. Białko to, ze względu na jego masę, nazwaliśmy p15. Jak się później okazało, prace nad strukturą autentycznego białka wirusa HIV-1 biegnęły równolegle w laboratoriach firmy Merck Sharp and Dohme w New Jersey. Na początku 1988 roku Maria Miller potrafiła już uzyskiwać monokryształy proteazy RSV (Ryc. 2a); dane dyfrakcyjne napływały powoli, ale systematycznie, najpierw o rozdzielczości 3 Å, potem 2.7 Å i ostatecznie 2 Å.



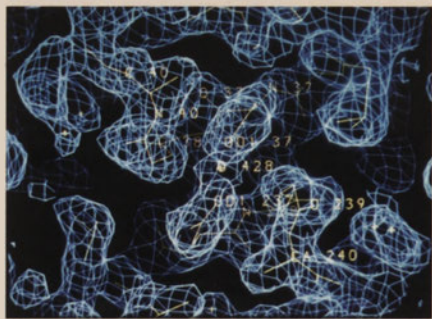
Rycina 1. Zespół krystalografów (w 1988 r.) z Frederick Cancer Research Facility (NCI, USA), który jako pierwszy ustalił strukturę proteazy retrowirusowej. Od lewej: Alexander Włodawer, Maria Miller, Mariusz Jaskólski, Mohana Rao.

Wiedzieliśmy oczywiście, z jakim białkiem mamy do czynienia. Złożone było ze 124 reszt aminokwasowych i zachowywało się jak proteaza asparcylowa, np. jego aktywność ulegała zahamowaniu przez pepstatynę, która jest standardowym inhibitorem pepsyn; lecz inne szczegóły nie były tak oczywiste. Spoglądając wstecz można się dziwić, że mieliśmy tak mało zaufania do informacji, która już była dostępna. Jednak cała ta sprawa wyglądała tak niewiarygodnie – przede wszystkim dlatego, że sam retrowirus wydawał się obiektem nie z tej planety. Ważną przesłanką przemawiającą za hipotezą proteazy asparcylowej była obecność w sekwencji aminokwasowej badanego enzymu charakterystycznego motywu DTG (lub DSG w przypadku RSV). Jednak motyw ten występował tylko raz, a nie dwa razy, jak w enzymach produkowanych przez komórki; białko było 3 razy mniejsze niż proteazy pepsy-



Rycina 2. Monokryształy proteazy RSV (a) i HIV-1 (b) wyhodowane przez dr Marię Miller.

¹ Wykaz skrótów: AIDS – zespół nabytego niedoboru odporności; EIAV – wirus niedokrwistości zakaźnej koni; FIV – wirus upośledzenia odporności kotów; HIV – wirus upośledzenia odporności człowieka; HTLV – wirus ludzkiej białaczki z komórek T; MIR – metoda podstawienia izomorficznego; rmsd – średnio–kwadratowe odchylenie; RSV (dawny skrót, obecnie ASV) – wirus mięsaka ptaków; SIV – wirus upośledzenia odporności małp



Rycina 3. Pierwotna mapa gęstości elektronowej w centrum aktywnym proteazy RSV. Widac nukleofilową cząsteczkę wody (O428) związaną przez grupy karboksylowe asparaginianów D37 i D237 obu podjednostek enzymu.

popodobne. Już wówczas znane były prace Jordana Tanga i współpracowników [2], którzy postulowali, że pepsynopodobne proteazy organizmów wyższych mogły powstać w wyniku duplikacji znacznie mniejszego genu przodka kodującego enzym homodimeryczny. Kiedy zsekwencjonowano proteazy pierwszych retrowirusów, Laurence Pearl i William Taylor opublikowali w 1987 r. pierwszy bardzo hipotetyczny model strukturalny oparty na tej przesłance [3]. Było to bardzo karkołomne przedsięwzięcie, gdyż ogólne podobieństwo sekwencji enzymów produkowanych przez komórki i retrowirusy jest znikome. Oczywiście model Pearl i Taylora był nam znany i intelektualnie stymulujący, jednak zaufanie do niego było niewielkie; nie braliśmy go poważnie pod uwagę jako modelu dla metody podstawienia cząsteczkowego. Jednym z powodów tego sceptycyzmu był (jak się potem okazało – pozorny) brak symetrii niekrytalograficznej; innym stosunkowo ograniczone możliwości metody podstawienia cząsteczkowego w latach 80. Jednak nawet przy dzisiejszym postępie w tym zakresie oraz nieporównywalnej mocy obliczeniowej komputerów, wcale nie jest oczywiste, czy model Pearl i Taylora byłby dostatecznie dokładny dla osiągnięcia sukcesu przy zastosowaniu tej metody.

W tej sytuacji jedyną dostępną wówczas metodą doświadczalną była metoda MIR zwana „metodą ciężkiego atomu”. W sprawnych rękach Marii Miller doświadczenia derywatywacyjne doprowadziły do uzyskania kilku pochodnych białka w postaci krystalicznej z atomem ciężkim. Wśród nich szczególnie ważny

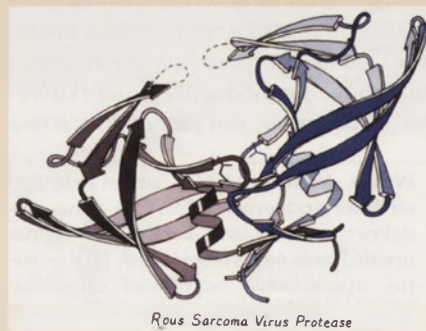
miał się okazać kryształ nasączony w roztworze octanu uranylu. Znakoomite umiejętności Mohany Rao jako programisty pozwoliły wycisnąć z pochodnych całą informację do rozwiązania krystalograficznego problemu fazowego. W efekcie, rodzące się w bólach mapy gęstości elektronowej zaczęły w końcu ukazywać rozpoznawalne cechy. W świetle tego, co potem miało miejsce, zaskakujące jest, że wśród pierwszych rozpoznanych elementów struktury były dwa fragmenty helikalne. Zidentyfikowaliśmy również gęstość elektronową wokół związanego jonu uranylu jako dwie reszty aspartylowe w konfiguracji typowej dla pepsyny (Ryc. 3). Gdy uwierzyliśmy w końcu, że są to literki D w symetrycznej parze motywów DSG w centrum aktywnym, wszystkie elementy tej skomplikowanej układanki szybko znalazły się na swoich miejscach i w październiku 1988 r. model doświadczalny struktury przestrzennej proteazy RSV był gotowy (Ryc. 4). Choć nie był on w 100% kompletny, od razu pokazał, że przewidywania Tanga były słuszne: mieliśmy oto na ekranie komputera dimeryczną proteazę aspartyłową, przypominającą monomeryczną dwudomenową pepsynę. Centrum aktywne miało tę samą architekturę, łącznie z charakterystycznym „siodełkiem strażackim” uformowanym przez dwa motywy DSG; centrum aktywne usadowione było w łatwo rozpoznawalnym układzie pętli o kształcie litery Ψ . Pomiedzy katalitycznymi resztami asparaginianów związana była cząsteczka wody – charakterystyczny czynnik nukleofilowy w katalizowanej przez enzym reakcji. Podobieństwo do pepsyny było tak duże, że mogliśmy nazwać wszystkie elementy struktury drugorzędowej białka zgodnie z obowiązującą terminologią, łącznie z odzwierciedleniem kolejnego, głębszego poziomu symetrii, widocznego pomiędzy N- i C-końcowymi rejonami naszego białka.

Ale były też poważne odstępstwa od struktury pepsyny. Z powodu symetrii, oba wydatne elastyczne ramiona były w postaci pętli. Choć nie można było wymodelować ich zakończeń, widać było, że są uniesione ponad pustym centrum katalitycznym. Kolejna rozbieżność w stosunku do pepsyny dotyczyła arkusza β w obszarze kon-

taktu obu podjednostek, który utworzony był ze wszystkich czterech zakończeń łańcuchów białkowych A i B w kolejności NA-CB-CA-NB.

Współrzędne krystalograficzne struktury proteazy RSV zostały natychmiast wykorzystane przez Irene Weber do zbudowania homologicznego modelu proteazy HIV-1. Model ten wyglądał bardzo przekonująco. Miał oczywiście wszystkie cechy wzorca, a różnice udało się ograniczyć do pętli o niskim stopniu homologii sekwencji. Struktura proteazy RSV została ogłoszona w *Nature* na początku lutego 1989 r. [4]. Tydzień później, w tym samym czasopiśmie, Manuel Navia, Paula Fitzgerald i współpracownicy z Merck Sharp and Dohme opisali strukturę krystaliczną proteazy HIV-1 [5]. Równocześnie na łamach *Science* Irene Weber ogłosiła swój model [6].

Krótki moment euforii i radości z osiągniętego sukcesu szybko przesłoniła konsternacja: struktury krystaliczne proteaz RSV i HIV-1, mimo że podobne w ogólnym zarysie, posiadały też istotne różnice, szczególnie w części C-końcowej białka. W miejscu wyraźnej helisy w strukturze proteazy RSV, model HIV-1 posiadał prościuteńki łańcuch β , całkowicie inna była też topologia międzycząsteczkowego arkusza β . Zamiast przepłotu z trzema międzycząsteczkowymi powiązaniem β , w strukturze proteazy HIV-1 był motyw spinki β i tylko jeden obszar kontaktu podjednostek oraz nieuporządkowany koniec aminowy (Ryc. 5). Miało to poważne konsekwencje dla wyjaśnienia trwałości dimeru i dla poglądów na to, w jaki sposób proteaza retrowirusowa jest w stanie uwolnić się z poliproteiny gag-pol. Co więcej, nie był to tylko dylemat czysto akademicki, ponieważ bez

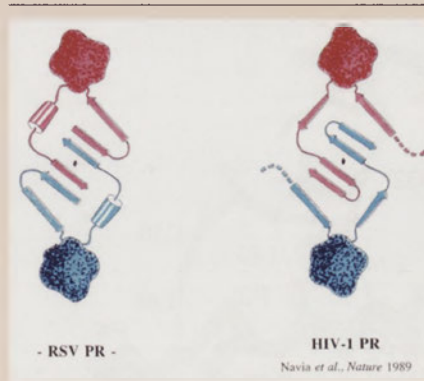


Rycina 4. Pierwszy model struktury krystalograficznej proteazy retrowirusa RSV. Rysunek wykonany odręcznie przez Jane Richardson (Duke University).

poprawnego modelu proteazy HIV-1 nie było mowy o racjonalnym projektowaniu inhibitorów, które mogłyby stać się lekami oczekiwany przez chorych na AIDS. Przypomnijmy, w tamtym czasie zapadnięcie na AIDS równało się wyrokowi śmierci, a świat przerażony był perspektywą epidemii mogącej stanowić zagrożenie w skali globalnej.

Warto nadmienić, że proteaza renowirusowa ulega translacji jako część ogromnej poliproteiny zawierającej białka strukturalne (produkty genu *gag*) oraz enzymy (produkty genu *pol*). W trakcie dojrzewania cząstek wirusowych wszystkie te białka, w tym sama proteaza, muszą zostać uwolnione z prekursorów. Za proces dojrzewania odpowiedzialna jest właśnie proteaza renowirusa, co stwarza zaskakującą zagadkę, jak białko to, kiedy jeszcze jest częścią poliproteiny, może ulec zwinięciu, uformować aktywny dimer i w końcu odciąć swój własny łańcuch, działając na dodatek w mikroskopijnej przestrzeni cząstki wirusowej, bo w niej właśnie proces dojrzewania ma miejsce. Nieuporządkowanie końca aminowego proteazy sugerowane przez model Mercka dawałoby ciekawą możliwość w tym zakresie, dopuszczając wycięcie proteazy nie tylko w procesie *trans* ale i *cis*!

Analizując organizację poliproteiny renowirusa dostrzegamy niezwykle właściwości proteazy, która musi precyzyjnie rozciąć całą gamę różnych sekwencji substratowych. Tracąc powinowactwo choćby do jednej z tych sekwencji, renowirus utraciłby równocześnie możliwość dojrzewania, a tym samym przestałby być infekcyjny. Dlatego właśnie efektywne inhibitory proteazy są doskonałymi kandydatami na leki przeciwko infekcji HIV. Z drugiej strony wirus potrafi w błyskawicznym tempie zmutować do formy odpornej na lek. Mutacje te są bardzo często zlokalizowane w sekwencji proteazy, ale mogą również dotyczyć miejsc proteolitycznych. Rozważając cechy genetyczne i enzymatyczne renowirusów zaskoczeni jesteśmy ich „oszczędnością” połączoną z efektywnością. Nie tylko zminimalizowały one liczbę genów poprzez produkcję poliprotein wraz z narzędziem do ich pocięcia, ale i samo narzędzie zostało genialnie zminiaturyzowane poprzez złożenie dwóch identycznych części.



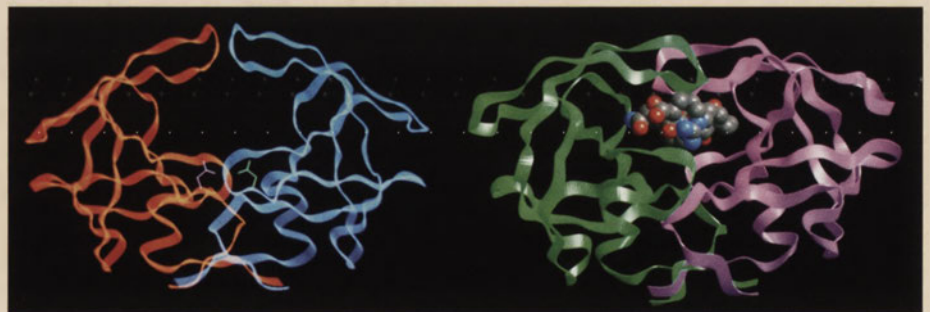
Rycina 5. Porównanie topologii arkusza β utworzonego z końcowych łańcuchów obu podjednostek w modelu proteazy RSV oraz modelu proteazy HIV-1 [5].

Wracając do sytuacji z lutego 1989 r. trzeba podkreślić, że była ona osobliwie kłopotliwa. Który model proteazy HIV-1 należało użyć do projektowania leków przeciw AIDS? Który model był prawdziwy? Dylemat mógł być rozstrzygnięty tylko na drodze eksperymentalnej. Problemem było, skąd wziąć białko do badań? Pomoc nadeszła nieoczekiwanie. Stephen Kent w CalTech pracował nad metodą chemicznej syntezy białek. Wraz z Jensem Schneiderem dostarczyli mikroskopijną ilość (0.2 mg) proteazy HIV-1, a Maria Miller w krótkim czasie wyhodowała odpowiednie monokryształy (Ryc. 2b). Było to samo w sobie przełomowym osiągnięciem, gdyż po raz pierwszy wykazano, że łańcuchy białkowe mogą zwiąć się poprawnie (i krystalizować) bez uprzedniego kontaktu ze środowiskiem biologicznym. Z próbki białka dostarczonej z CalTech Maria Miller zdołała także uzyskać kryształy derywatyzowane metalami ciężkimi.

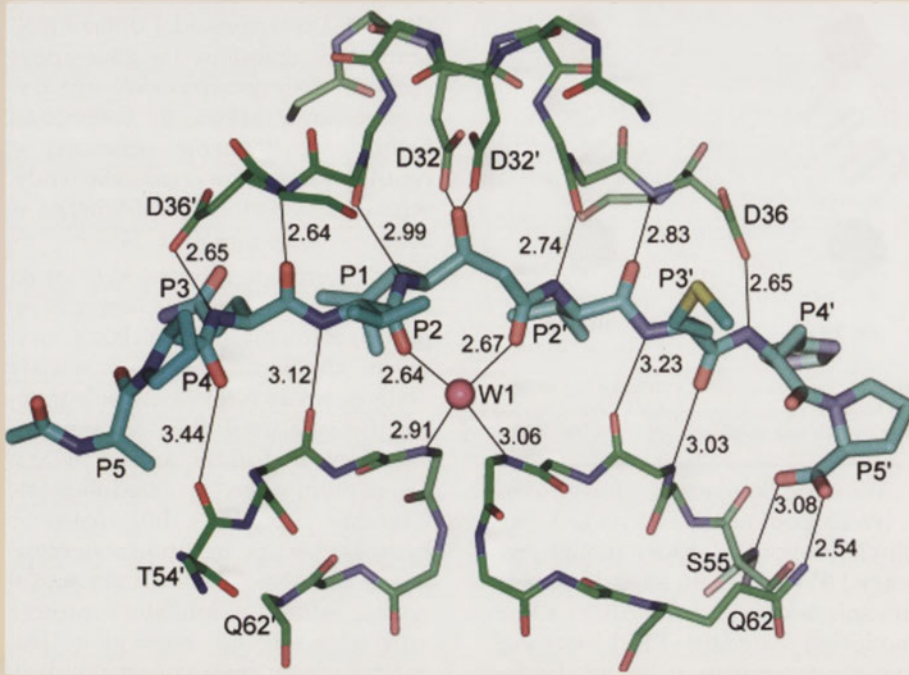
I oto z map gęstości elektronowej wyłonił się ostateczny obraz struktury proteazy HIV-1, zgodny z modelem

białka RSV i z modelem Irene Weber (Ryc. 6). Dimer posiadał dobrze zdefiniowane, uniesione ku górze pętle ramion, ściśle przeplecione międzycząsteczkowy arkusz β , C-końców helisę oraz wyraźnie widoczną w centrum aktywnym cząsteczkę wody. Struktura ta została opublikowana w *Science* w sierpniu 1989 r. [7].

Kolejnym celem badań była struktura proteazy renowirusowej w kompleksie z inhibitorem. Wybór pierwszych inhibitorów był oczywisty - oligopeptydy o sekwencji substratowej, posiadające w miejscu cięcia nie ulegający hydrolizie analog wiązania peptydowego, np. zredukowane wiązanie peptydowe lub rozmaicie hydroksylowane ugrupowanie etylowe. Podobnie można było wykorzystać istniejące inhibitory proteaz aspartylowych, np. pepstatynę. Jednak inhibitory proteazy renowirusowej stosowane jako leki nie powinny zakłócać funkcjonowania enzymów gospodarza. Dlatego projektanci leków powinni próbować osiągnąć wybiórczość, przez wykorzystanie unikatowych cech proteazy HIV-1, takich jak idealna symetria miejsca wiązania, istnienie dwóch ramion, czy obecność strukturalnej cząsteczki wody na granicy inhibitor-ramiona (Ryc. 7). Cząsteczkę wody, zakotwiczoną tetraedrycznie za pomocą wiązań wodorowych, zaobserwowała po raz pierwszy Maria Miller w strukturze kompleksu proteazy HIV-1 z inhibitorem MTV-101 [8] (Ryc. 6). Później, wykorzystano ją w szkielecie cyklicznego mocznika stanowiącego podstawę całej klasy inhibitorów. Jeszcze później wynaleziono jeszcze bardziej egzotyczne inhibitory, np. pochodne metallokarborenów. Niektóre z tych



Rycina 6. Pierwszy poprawny model proteazy HIV-1 [7] (z lewej) oraz pierwszy model struktury proteazy HIV-1 w kompleksie z inhibitorem [8] (z prawej). Podjednostki enzymu zaznaczone są różnymi kolorami. W formie apo (z lewej) pętle ramion uniesione są ku górze nad pustym centrum aktywnym, które zaznaczone jest poprzez dwie reszty aspartylowe motywów DTG. W formie holo (z prawej), ramiona są opuszczone, zamykając substrat/inhibitor (model van der Waalsa) we wnęce katalitycznej.

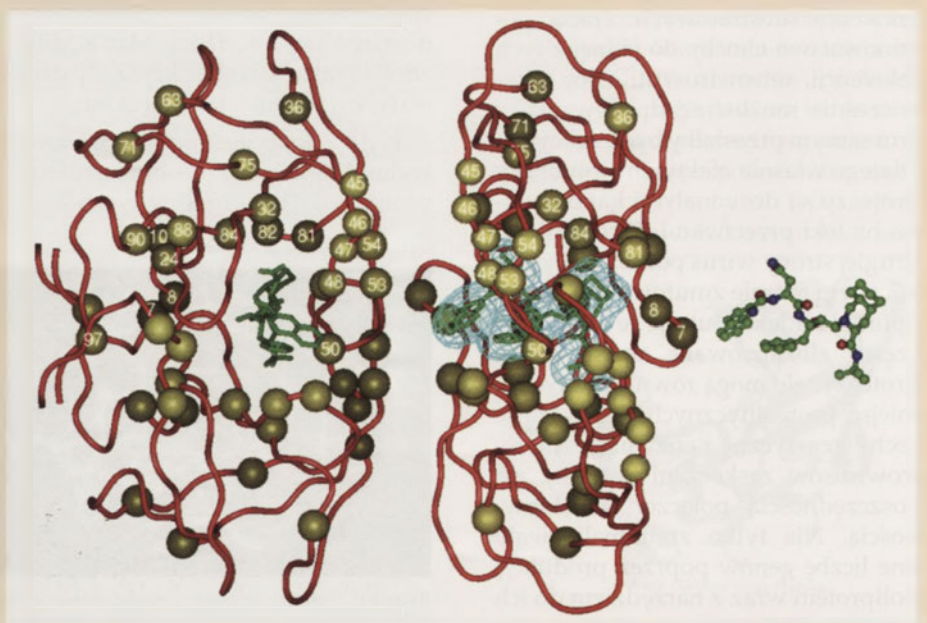


Rycina 7. Cząsteczka peptydowego inhibitora (kolor turkusowy) związana w centrum aktywnym proteazy HTLV-1 (kolor zielony). Długości niektórych wiązań wodorowych podane są w Å. Grupy karboksylowe reszt asparagilowych D32 i D32' w górnej części ryciny wiążą grupę OH inhibitora, która naśladuje nukleofilową cząsteczkę wody. Inna cząsteczka wody (W1) pośredniczy w kontaktach pętli ramion (na dole ryciny) z inhibitorem.

inhibitorów dały początek skutecznym lekom przeciwko infekcji HIV. Pierwszy z tych leków, saquinawir (Ryc. 8), został dopuszczony do użytku w grudniu 1995 r. Było to zaledwie sześć lat od opublikowania pierwszej struktury kompleksu inhibitorowego proteazy i niecałe siedem lat od momentu, gdy pierwszy model struktury tego białka ujrzał światło dzienne. Ilustruje to bezsprzeczny tryumf biologii strukturalnej, która ma obecnie wystarczającą moc, by w krótkim czasie wypracować skuteczną terapię dla choroby, która zaledwie kilka lat wcześniej uchodziła za zagrożenie w skali globu. Jak dotąd 11 inhibitorów proteazy znalazło się na liście leków przeciwko infekcji HIV (w USA). Wszystkie te cząsteczki są inhibitorami kompetycyjnymi, tj. współzawodniczą o centrum aktywne enzymu z substratami. Pierwszy inhibitor z tej grupy, MVT-101, dla którego wyznaczono strukturę w kompleksie z proteazą, charakteryzował się stałą dysocjacji w zakresie submikromolowych stężeń. W wyniku optymalizacji dopasowania do enzymu uzyskano inhibitory o powinowactwie w zakresie stężeń pikomolowych. Teoretycznie, inhibicja kompetycyjna nie jest jedyną opcją. Można wyobrazić sobie inhibitory modyfikujące nieodwracal-

nie centrum aktywne lub wiążące się z dala od niego, np. utrudniając ruch ramion czy zakłócając dimeryzację. Jednak wszystkie te drogi inaktywacji enzymu, nawet jeśli były podejmowane, nie doprowadziły do użytecznych specyfików farmakologicznych.

Przyciśnięty do muru przez skuteczny lek, wirus kontratakuję po-



Rycina 8. Cząsteczka pierwszego leku przeciw AIDS działającego jako inhibitor proteazy (saquinawir, po prawej). Po lewej, w dwóch rzutach, pokazana jest struktura kompleksu leku z proteazą HIV-1. Kulkami zaznaczono reszty aminokwasowe, których mutacje powodują oporność proteazy na leki-inhibitory.

przez wytwarzanie oporności, albo przez selekcję istniejących szczepów lekoopornych, albo przez nowe mutacje. Ważnym zadaniem wciąż trwających badań strukturalnych tego ciągle umykającego frontu „wyciągu zbrojeń” jest stworzenie jeszcze skuteczniejszych inhibitorów lub ich kombinacji. Inny obszar aktywności dotyczy struktury proteaz różnych retrovirusów. Oprócz białek RSV i HIV-1, zbadano również enzymy HIV-2, SIV (ang. *simian immunodeficiency virus*), FIV (ang. *feline immunodeficiency virus*) i EIAV (ang. *equine infectious anemia virus*). Białka te posiadają oczywiście ten sam zwój i organizację domenową (Ryc. 9). Jednak wiedza o występujących różnicach strukturalnych, szczególnie w kontekście kompleksów z inhibitorami, jest również ważna dla zrozumienia oporności na leki związanej ze zmianami sekwencji. Alla Gustchina zgromadziła niezwykle bogaty zasób informacji w tej dziedzinie. Ostatnio zbiór struktur proteaz retrovirusowych powiększył się o enzym wirusa HTLV-1 (ang. *human T-cell leukemia virus*) wywołującego białaczkę. Niespodziewanie więc wysiłki w kierunku wspomaganiej strukturalnie terapii AIDS i raka znalazły punkt wspólny [9]. Kiedy rozwiązano strukturę proteazy HTLV-1 wyjaśniło się, dlaczego leki przeciw AIDS podawane pacjentom z infekcją HTLV-1 były nieskuteczne (Ryc. 10). Warto tu

dodać, że chociaż sam wirus HTLV został odkryty przed HIV (w istocie początkowo błędnie przypisano wirusowi HIV nazwę HTLV), to struktura jego proteazy długo nie mogła zostać rozwiązana z powodu różnych komplikacji krystalograficznych. Dla przykładu odchylenia rms (ang. *root-mean-square*) pomiędzy atomami C α proteazy HTLV-1 i białek innych retrowirusów osiągają (RSV) 1.93 Å (średnio 1.72 Å), komplikując podstawienie cząsteczkowe i ujawniając, że w praktyce napotyka się na znaczne odchylenia w ramach kanonu połaďdowania proteazy retrowirusowej. Co ciekawe, podobne wartości odchyień rms uzyskujemy dla porównań z pepsyną. Jeśli natomiast skupimy uwagę na porównaniu atomów w obrębie centrum aktywnego, podobieństwo jest niemal idealne, a wartości odchyień rms nie przekraczają 0.5 Å, przy zestawieniu proteaz retrowirusowych z pepsyną.

Badania strukturalne szerokiej gamy proteaz retrowirusowych dają nam dodatkową możliwość spojrzenia na trudności i wąskie gardła z innej perspektywy. Jedną z takich trudności wiąże się z dwuznaczną zaletą symetrii homodimeru proteazy retrowirusowej. W przypadku proteazy HIV-1 skutkowało to kłopotami z ustaleniem grupy przestrzennej kryształów oraz prowadziło do nieuporządkowania inhibitorów w szczelinie wiążącej. Ten ostatni mankament został wyzyskany w pozytywnym aspekcie, gdy udało się zaprojektować inhibi-

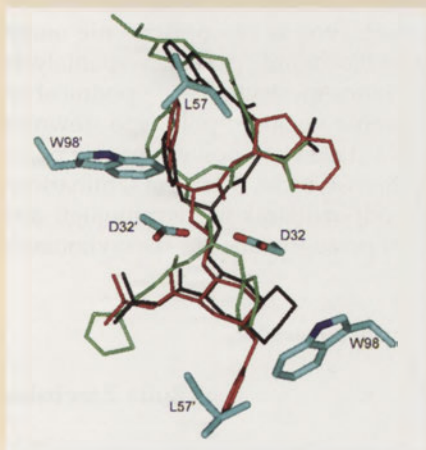


Rycina 9. Nałożenie śladów C α proteazy wirusa HIV-1 (zielony), HIV-2 (niebieski), SIV (oliwkowy), RSV (różowy), FIV (czerwony), EIAV (pomarańczowy) i HTLV-1 (turkusowy). Ponieważ współrzędne atomowe enzymów pochodzą z ich kompleksów z inhibitorami, pętle ramion zamykają od góry wnękę katalityczną, którą w tych strukturach zajmuje inhibitor (nie pokazany).

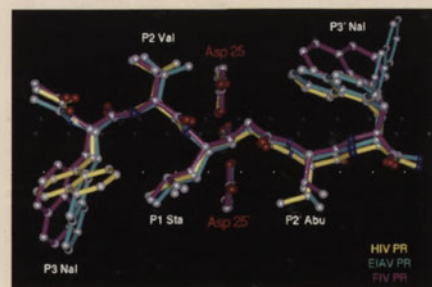
tory o symetrii (lub pseudosymetrii) C $_2$ zgodnej z symetrią enzymu. Wiele inhibitorów centrum aktywnego, łącznie z pepstatyną, ma swój „rodowód” w mechanizmie katalitycznym w tym sensie, że posiadają one grupę hydroksylową, która naśladuje nukleofilową cząsteczkę wody w trakcie formowania tetraedrycznego stanu przejściowego. Jeden z takich inhibitorów, LP130 (Ryc. 11), został zbadany strukturalnie w kompleksie z całą plejadą proteaz różnych retrowirusów. Poważnym problemem, jak z każdą proteazą, jest autodegradacja w trakcie inkubacji. Kłopot ten można zaniedbać, gdy krystalizujemy proteazę wraz z inhibitorem. Innym wyjściem jest mutacja centrum aktywnego, zwykle D \rightarrow N. W najprostszym wariacie podejście to prowadzi do jednoczesnego zastąpienia obu katalitycznych reszt aspartylowych. Jednak możliwe są także asymetryczne mutacje dzięki pomysłowemu trickowi inżynierii genetycznej polegającemu na połączeniu obu podjednostek w jeden łańcuch białkowy za pomocą łącznika CA-NB.

Badania strukturalne proteaz retrowirusowych ostatnich 20 lat stały się silnym bodźcem dla rozwoju biologii strukturalnej oraz dostarczyły wprost niewiarygodnej ilości informacji. Proteaza HIV jest dziś najlepiej przebadanym strukturalnie białkiem we Wszechświecie. Liczba określonych struktur obejmuje wiele setek; nie sposób jej już nawet ustalić,

mimo prób katalogowania struktur w dedykowanej bazie danych. Przytłaczająca większość struktur pochodzi z badań krystalograficznych, choć są również modele określone metodą spektroskopii NMR, w tym struktura białka monomerycznego. Proteaza HIV przyczyniła się do postępu biologii strukturalnej na wielu frontach. Wspomniałem już o tym, że całkowita synteza chemiczna może być źródłem białka do badań strukturalnych. Metoda syntezy chemicznej została wykorzystana przez Stephena Kenta do uzyskania enancjomeru D proteazy HIV-1 i do wykazania, że ten lustrzany bliźniak enzymu naturalnego zachowuje się identycznie w świecie "po drugiej stronie zwierciadła". Niedawno uzyskano ogromne monokryształy proteazy HIV-1 z zamiarem wykorzystania ich w dyfrakcji neutronów [10], która przez wizualizację atomów



Rycina 10. Trzy leki stosowane jako inhibitory proteazy w terapii AIDS: saquinawir (czarny), indinawir (czerwony), ritonavir (zielony) „wmodelowane” we wnękę katalityczną proteazy HTLV-1 (turkusowy). Widać, że wiązanie tych inhibitorów nie jest możliwe, gdyż prowadziłoby do kolizji z atomami enzymu.



Rycina 11. Jeden z inhibitorów proteazy, LP130, wykryty w kompleksie z enzymami różnych retrowirusów (m.in. HIV, EIAV, FIV). Na rycinie pokazano, że w wyniku nałożenia tych struktur uzyskujemy zawsze identyczny sposób wiązania inhibitora. Jego grupa hydroksylowa tworzy wiązania wodorowe z asparaginianami centrum aktywnego (D25, D25').

wodoru może wreszcie wyjaśni (ciągle nie do końca zrozumiałe) tajniki mechanizmu katalitycznego. Proteazę HIV-1 zbadano strukturalnie z zapierającą dech rozdzielczością 0.84 Å [11].

Istnieje zgodna opinia, że proteaza HIV-1 stała się platformą, dzięki której strategia racjonalnego projektowania leków zmieniła się z ulotnej mrzonki w codzienną rzeczywistość. Fakt, że dzięki temu podejściu powstały leki zdolne skutecznie zwalczać jeszcze do niedawna nieuleczalną chorobę należy do największych osiągnięć naukowych ubiegłego stulecia. Na sukces ten złożyło się kilka sprzyjających okoliczności. Osobiście bardzo cenię jedną z nich, nie zawsze dostrzeganą. Chodzi o niezwykłą otwartość badań i chęć dzielenia się wynikami z całym światem naukowym, jaka cechuje laboratorium Alexandra Włodawera. To właśnie dzięki m.in. takiej otwartości udaje się szybko korygować błędy, które są przecież nieuniknione, i osiągać sukces, którego beneficjentami jesteśmy wszyscy.

PIŚMIENNICTWO

1. Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Philips DC (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 181: 662-666
2. Tang J, James MNG, Hsu IN, Jenkins JA, Blundell TL (1978) Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases. *Nature* 271: 618-621
3. Pearl LH, Taylor WR (1987) A structural model for the retroviral proteases. *Nature* 329: 351-354.
4. Miller M, Jaskolski M, Rao JKM, Leis J, Włodawer A (1989) Crystal structure of retroviral protease proves relationship to aspartic protease family. *Nature* 337: 576-579
5. Navia MA, Fitzgerald PM, McKeever BM, Leu CT, Heimbach JC, Herber WK, Sigal IS, Darke PL, Springer JP (1989) Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* 337: 615-620
6. Weber IT, Miller M, Jaskolski M, Leis J, Skalka AM, Włodawer A (1989) Molecular Modeling of the HIV-1 Protease and Its Substrate Binding Site. *Science* 243: 928-931
7. Włodawer A, Miller M, Jaskólski M, Sathyanarayana BK, Baldwin E, Weber IT, Selk LM, Clawson L, Schneider J, Kent SB (1989) Crystal structure of a synthetic HIV-1 protease proves conserved fold in retroviral proteases. *Science* 245: 616-621
8. Miller M, Schneider J, Sathyanarayana BK, Toth MV, Marshall GR, Clawson L, Selk L, Kent SB, Włodawer A (1989) Structure of

complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3 Å resolution. *Science* 246: 1149-1152

9. Li M, Laco G, Jaskolski M, Rozycki J, Alexandratos J, Włodawer A, Gustchina A (2005) Crystal structure of HTLV protease: From treating AIDS to fighting cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18332-18337
10. Matsumura H, Adachi M, Sugiyama S, Okada S, Yamakami M, Tamada T, Hidaka K, Hayashi Y, Kimura T, Kiso Y, Kitatani T, Maki S, Yoshikawa HY, Adachi H, Takano K, Murakami S, Inoue T, Kuroki R, Mori Y

(2008) Crystallization and preliminary neutron diffraction studies of HIV-1 protease cocrystallized with inhibitor KNI-272. *Acta Cryst F64*: 1003-1006

11. Kovalevsky AY, Liu F, Lushchenko S, Ghosh AK, Louis JM, Harrisom RW, Weber IT (2006) Ultra-high resolution crystal structure of HIV-1 protease mutant reveals two binding sites for clinical inhibitor TMC114. *J. Mol. Biol* 363: 161-173

LIST DO REDAKCJI

Prof. Sławomir Pikula
Redakcja „Postępów Biochemii”
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
Warszawa, 23 lutego 2009

Wielce Szanowny Panie Profesorze!

Z uwagą przeczytałam list do Redakcji zamieszczony w „Postęпах Biochemii” 54/4: 347-349 (2008). Całkowicie zgadzam się ze słowami wstępu prof. Edwarda Bańkowskiego: „... Postępy Biochemii są jedynym czasopismem polskojęzycznym, poświęconym... [biochemii] (...). Mają być autorytetem w zakresie terminologii biochemicznej i źródłem nowoczesnej wiedzy, przede wszystkim dla młodych biochemików i innych adeptów szeroko pojętej biologii.” Redakcja zamieściła ten długi list w całości, co świadczy jak wielką wagę przywiązuje do zadań czasopisma określonych wyżej. Jednak długa lista **rażących** uchybień przytoczona przez prof. Bańkowskiego zawiera merytoryczne błędy. Przytoczę dwa z nich, aby nie być gołosłowną:

1) „Nie ma choroby zwanej artretyzmem”. Termin „artretyzm” figuruje w polskich słownikach medycznych równoważnie z terminami „dna, skaza moczana-wa”, a także w angielskich słownikach „arthritis, a disease...”.

2) „Nie ma skrzepów wewnątrznaczyniowych...”. Krzepnięcie krwi jest procesem, który przebiega w trzech etapach opisanych m.in. w *Biochemii Harpera*, PZWL, 2004, str. 938-939; we wczesnym etapie procesu krzepnięcia uprawnione jest używanie terminu „skrzep wewnątrznaczyniowy”; skrzeplina jest końcowym etapem tego procesu.

Uważam, że nadzór merytoryczny nad polszczyzną w czasopiśmie **nie może być dziełem jednej osoby**. Redakcja „Postępów Biochemii” posiada wspaniałych redaktorów o czym świadczy poziom pisma, który niesłuchanie się podniósł w ostatnich dwóch latach. Na pewno do podniesienia poziomu polskiego słownictwa przyczyni się będący w trakcie opracowania „Leksykon nowych nazw i pojęć w biochemii i biologii molekularnej”. W naszym Instytucie, w trakcie seminariów i obron doktorskich, poszukiwanie polskich odpowiedników terminologii angielskiej jest bardzo poważnie traktowane i posługiwanie się „Leksykonem” znacznie ułatwiłoby zadanie.

Załączam wyrazy szacunku i życzenia dalszych sukcesów,

Zofia Zarębska

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. A. Pawińskiego 5a, pok. 228C
02-106 Warszawa
Tel.: (022) 592-3328
Fax: (022) 592-2190
email: zozar@ibb.waw.pl

STRESZCZENIE

Benzonaza znajduje zastosowanie w efektywnym obniżaniu lepkości i usuwaniu kwasów nukleinowych z roztworów białkowych. Zbadano w praktyce jej możliwości aplikacyjne w oczyszczaniu białek rekombinantowych wiążących jednoniciowe DNA (ang. SSB – *single stranded DNA binding protein*).

WPROWADZENIE

Izolacja materiału biologicznego z różnego rodzaju organizmów prokariotycznych i eukariotycznych wymaga zastosowania odmiennych metod. Ogólnie, techniki ekstrakcji białek polegają na rozbiciu komórek i ich oddzieleniu od innych struktur komórkowych, głównie cząsteczek DNA i RNA oraz na zabezpieczeniu ich stabilności i późniejszym oczyszczaniu i zagęszczaniu.

Standardowy proces oczyszczania białka rekombinowanego, uzyskanego w hodowli, składa się z 3 lub 4 etapów: ekstrakcji i klaryfikacji, oczyszczania właściwego (ang. *capture*) i doczyszczania (ang. *polishing*). Czasem wymagany jest etap pośredniego oczyszczania (ang. *intermediate purification*).

Pierwszy etap oznacza zazwyczaj koncentrację biomasy, dezintegrację komórek w celu uwolnienia produktu, odrzucenie pozostających „resztek” komórkowych oraz koncentrację ekstraktu. Drugi etap, oczyszczanie właściwe, to najważniejszy etap oczyszczania polegający na oddzieleniu produktu od białek gospodarza. Ostatni etap polega na zastosowaniu metod chromatograficznych (zazwyczaj innych niż na etapie oczyszczania właściwego), które pozwolą na usunięcie resztkowych zanieczyszczeń (endotoksyny, kwasy nukleinowe) oraz substancji podobnych pod względem chemicznym do produktu (enanjomery, agregaty).

Dezintegrację komórek można przeprowadzić metodami fizycznymi, np. poprzez naprzemienne zamrażanie i rozmrażanie komórek, przez wywołanie szoku osmotycznego, zastosowanie ultradźwięków lub metodami chemicznymi (np. z zastosowaniem detergentów niejonowych lub jonowych, jak np. SDS, sarkozyl czy Triton X-100, rozpuszczalników organicznych, roztworów alkalicznych - głównie wobec komórek bakteryjnych). W przypadku drożdży efektywna jest także dezintegracja mechaniczna, jak np. rozcieranie z tlenkiem glinu lub perłkami szklanymi czy wykorzystanie zjawiska ekstruzji z zastosowaniem prasy French'a. Często stosowany jest także lizozym, lizostafyna, chitynaza lub inne specyficzne do stosowanych mikroorganizmów enzymy trawiące ścianę komórkową. Metody te muszą być na tyle „delikatne”, by nie powodować poważniejszych uszkodzeń, czy denaturacji docelowych białek. Jednocześnie w zasadzie żadna z nich w znaczący sposób nie powoduje usunięcia kwasów nukleinowych w trakcie wstępnych etapów oczyszczania, co wpływa znacznie na obniżenie wydajności na dalszych etapach [1].

Metody stosowane do usuwania kwasów nukleinowych, takie jak ekstrakcja czy precypitacja, nie są metodami specyficznymi. Ponadto zarówno denaturacja jak i precypitacja wpływają na obniżenie wydajności oczyszczania białek. Stosowanym do tej pory alternatywnym rozwiązaniem było wykorzystanie enzymów DNAzy i RNAzy.

Docelowo podczas izolacji w celu degradacji DNA stosuje się różnego rodzaju DNAzy. Ponieważ enzymy te ulegają aktywacji w obecności dwuwartościowych jonów metali, dlatego hydrolizę DNA prowadzi się w obecności tych jonów. Analogicznie, usunięcie kwasu rybonukleinowego z otrzymanych preparatów prowadzi się zazwyczaj metodą enzymatyczną przez inkubację próbek

Marcin Olszewski^{1,✉}

Paweł Filipkowski²

¹Katedra Mikrobiologii i ²Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

[✉]Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Mikrobiologii, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk; tel.: (058) 347 16 05, e-mail: molszewski@pg.gda.pl

Słowa kluczowe: benzonaza, endonukleaza, DNA, DNAza, RNAza, oczyszczanie białek

Wykaz skrótów: EDTA – wersenian dwusodowy; DSC – skaningowa kalorymetria różnicowa (ang. *differential scanning calorimetry*); PMSF – fluorek fenylometylosulfonowy; SDS – dodecylosiarczan sodu; SSB – białka wiążące się do jednoniciowego DNA (ang. *single stranded DNA binding protein*)

Podziękowania: Autorzy dziękują firmie Merck za udostępnienie produktu do przeprowadzenia doświadczeń oraz materiałów do przygotowania niniejszej pracy

Merck sp. z o.o., ul. Aleje Jerozolimskie 178, 02-486 Warszawa, <http://www.merck.pl>, <http://www.merckbiosciences.co.uk>



z RNAzą lub poprzez sączenie molekularne czy wirowanie w gradiencie gęstości.

Deoksyrybonukleazy (DNAzy) enzymy hydrolityczne (hydrolazy) katalizujące rozpad łańcucha DNA na krótsze łańcuchy lub pojedyncze nukleotydy, należą do nukleaz, np. DNAza typu I (endonukleaza) wykonuje nacięcia w różnych pozycjach obu nici DNA, generując wolne 3' końce [2,3].

Rybonukleazy (RNAzy) to enzymy z klasy nukleaz hydrolizujące cząsteczki RNA na krótsze łańcuchy lub pojedyncze nukleotydy przez hydrolizę wiązań fosfodiesterowych. Endorybonukleazy prowadzą reakcję trawienia cząsteczek RNA wewnątrz łańcucha, a egzorybonukleazy odłączają nukleotydy od 3' lub 5' końca RNA [4].

CHARAKTERYSTYKA ENZYMU

Benzonaza jest otrzymaną na drodze inżynierii genetycznej endonukleazą pochodzącą z *Serratia marcescens*. Enzym składa się z dwóch podjednostek o wielkości 30 kDa każda i wymaga około 1-2 mM jonów Mg^{2+} do wykazania swojej pełnej aktywności. Degraduje wszystkie formy DNA i RNA (jednoniciowe, dwuniciowe, liniowe i koliste, w tym superzwinione). Nie wykazano preferowania w trakcie hydrolizy żadnego typu par zasad. Benzonaza, podobnie jak inne endonukleazy, hydrolizuje wiązania fosfodiesterowe obecne w kwasach nukleinowych. W warunkach optymalnych, wszystkie obecne w roztworze kwasy nukleinowe zostają zredukowane do zakończonych na 5' końcu monofosfooligonukleotydów o długości od 3 do 8 par zasad. Endonukleaza nie wykazuje aktywności proteolitycznej i charakteryzuje się wysoką aktywnością właściwą.

Optymalną temperaturą do degradacji kwasów nukleinowych przez benzonazę jest 37°C. Enzym wykazuje jednak proporcjonalnie niższą aktywność w zakresie od 0 do 42°C. Cechuje się wysoką stabilnością w czasie przechowywania. W zakresie temperatur -20 do -80°C jego aktywność nie ulega znaczącej zmianie w okresie do 45 miesięcy. Enzym wykazuje 90% aktywność po roku w przypadku przechowania w 4°C i po około 8 miesiącach w temperaturze 37°C.

Według producenta benzonaza degraduje zarówno DNA jak i RNA w szerokim zakresie warunków: w obecności detergentów jonowych jak i niejonowych, czynników redukujących oraz mocznika (Tab. 1).

Poza odczynnikami przedstawionymi w Tabeli 1 zbadano także wpływ jonów manganu, Tritonu X-100, SDS, mocznika, siarczanu amonu, PMSF, EDTA, chlorowodoru guanidyny na aktywność działania benzonazy (dane dostępne w materiałach producenta).

Benzonaza wykazuje wyższą aktywność właściwą w stosunku do DNAz oraz szersze spektrum działania (hydroliza zarówno DNA jak i RNA). Cechuje ją także większa tolerancja na warunki w jakich prowadzona jest reakcja hydrolizy.

Tabela 1. Optymalne warunki zastosowania benzonazy[®].

Parametr	Warunki optymalne ¹⁾	Możliwy zakres ²⁾
Temperatura	37°C	0-42°C
pH	8,0-9,2	6,0-10,0
Ditiotreitol (DTT)	0-100 mM	Powyżej 100 mM
β -merkaptoetanol	0-100 mM	Powyżej 100 mM
Stężenie jonów jednowartościowych (np. Na^+ , K^+)	0-20 mM	0-150 mM
Stężenie PO_4^{3-}	0-10 mM	0-100 mM
Stężenie Mg^{2+}	1-2 mM	1-10 mM

¹⁾benzonaza wykazuje 90% i więcej aktywności właściwej, ²⁾benzonaza zachowuje powyżej 15% aktywności właściwej.

ZASTOSOWANIA

Podstawową korzyścią w zastosowaniu benzonazy w trakcie oczyszczania białek jest obniżenie poziomu lepkości m.in. poprzez efektywną degradację długołańcuchowych kwasów nukleinowych w roztworze. Efektem tego jest polepszenie wydajności oczyszczania białek z ekstraktów komórkowych i możliwość skrócenia czasu procedury oczyszczania. Enzym hydrolizuje kwasy nukleinowe do 5'ufosforylowanych oligonukleotydów o wielkości fragmentów od 3 do 8 par zasad doskonale nadając się do usuwania kwasów nukleinowych w trakcie oczyszczania białek rekombinantowych.

Potencjalne zastosowania benzonazy:

- obniżenie lepkości próbki w bakteryjnych i drożdżowych ekstraktach bezkomórkowych oraz podwyższenie efektywności oczyszczania białka docelowego,
- obniżenie lepkości próbek otrzymanych na drodze ekspresji w komórkach owadźcych oraz podwyższenie efektywności oczyszczania białka docelowego,
- zwiększenie wydajności oczyszczania białek z ciałek inkluzyjnych oraz skrócenie czasu procedury,
- zapobieganie tworzeniu skupisk przez komórki ssaków [5],
- w metodzie Western Blot i elektroforezie dwukierunkowej (2D) zastosowanie benzonazy ułatwia nanoszenie próbek i polepsza rozdzielczość uzyskanych prążków/punktów na żelach poprzez obniżenie wpływu naładowanych fragmentów DNA,
- wzrost do ok. 25% wydajności na dalszych etapach oczyszczania w warunkach produkcyjnych oraz w przypadku zastosowania filtracji *cross-flow* [6-8].

Otrzymana do badań benzonaza może być dostarczona przez producenta w dwóch różnych stopniach czystości 99% i 90%. Produkt nie zawiera stabilizujących białek albuminy wołowej ani żelatyny i jest zawieszony w 50% roz-

tworze glicerolu mającym na celu ochronę preparatu przed zamrażaniem w trakcie przechowywania.

Dobór optymalnych warunków do hydrolizy DNA i RNA przez benzonazę polega na zbadaniu wpływu trzech zmiennych: czasu i temperatury inkubacji oraz ilości użytej benzonazy.

MATERIAŁY I METODY

Postanowiono sprawdzić przydatność enzymu do degradacji DNA i RNA w trakcie oczyszczania białek SSB. Białka te ze względu na funkcję pełnioną w komórce (wiązaną jednoniciowego DNA) w przypadku badań oddziaływań termodynamicznych wykazują znacząco inne właściwości w obecności jednoniciowego DNA. Utrudnia to uzyskanie wiarygodnych, porównywalnych wyników, np. w badaniach skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC, ang. *differential scanning calorimetry*).

Rekombinowane białko otrzymywano zgodnie z opracowaną wcześniej procedurą polegającą na nadekspresji genu w bakteryjnym układzie ekspresyjnym, wydzielaniu białka z zastosowaniem chromatografii jonowej i w kolejnym etapie z zastosowaniem chromatografii powinowactwa do złoża zawierającego jednoniciowe DNA [9].

W celu potwierdzenia i doboru warunków optymalnych hydrolizy DNA i RNA przez benzonazę wyizolowano genomowe DNA *E. coli* z zastosowaniem zestawu Genomic Mini, zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta. Wyizolowane DNA genomowe zawieszono w 25 mM NaCl i 10 mM buforze fosforanowym o pH 8,0 i 2 mM MgCl₂. Wyizolowane DNA poddano reakcji hydrolizy z zastoso-

waniem benzonazy w ilości od 0 do 32 U/mL przez 2 godziny w temperaturze 37°C. Hydrolizaty naniesiono na 2% żel agarozowy. W celu detekcji DNA zastosowano bromek etydyny i wizualizowano przy pomocy światła UV. Na podstawie dobranych warunków zastosowano roztwór benzonazy w celu usunięcia DNA i RNA w oczyszczonym białku. Tak uzyskany preparat zastosowano w badaniach oddziaływań termodynamicznych białek z użyciem techniki skaningowej mikrokalorymetrii różnicowej.

WYNIKI

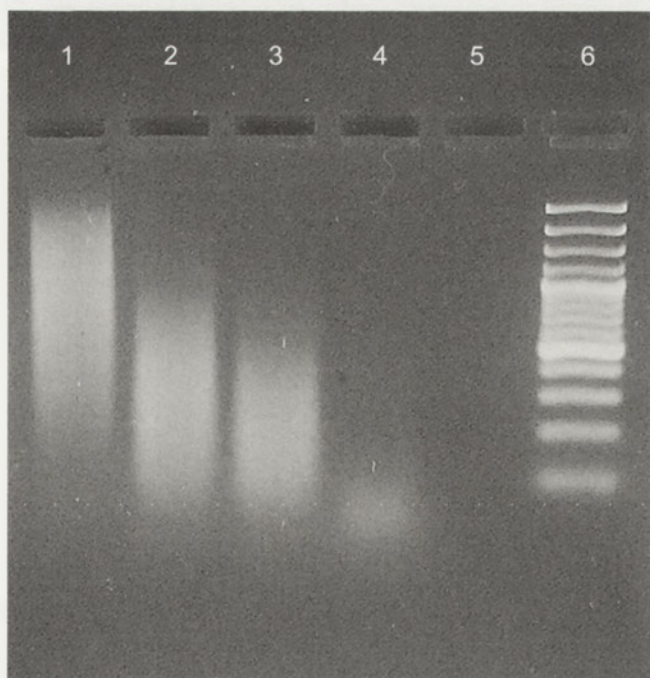
Wykazano, że w warunkach wymaganych do dalszych badań benzonaza degradowała DNA do poziomu niewykrywalnego za pomocą techniki elektroforetycznej z użyciem bromku etydyny w warunkach hydrolizy prowadzonej w roztworze 25 mM NaCl i 10 mM bufor fosforanowy o pH 8,0 i 2 mM MgCl₂ w temperaturze 37°C i czasie inkubacji równym 2 godziny (Ryc. 1, ścieżka 5).

Zbadano także efektywność działania benzonazy w temperaturze 8°C i 25°C (dane niepublikowane) – otrzymane wyniki były podobne, z wyjątkiem niższej temperatury, gdzie dla uzyskania takiego samego efektu konieczne było wydłużenie czasu inkubacji do ok. 8 godzin. Nie stwierdzono także aktywności proteolitycznej otrzymanego preparatu benzonazy z zastosowaniem techniki SDS-PAGE i barwienia kumasyną w stosunku do oczyszczanych białek (dane niepublikowane).

Zastosowanie preparatu benzonazy pozwoliło otrzymać wysokiej jakości próbki białek SSB do badań mikrokalorymetrycznych (potwierdzają to wyniki uzyskane w trakcie doświadczeń – dane niepublikowane). Wyniki doświadczeń nad oddziaływaniami termodynamicznymi białek wykonane z zastosowaniem skaningowej mikrokalorymetrii różnicowej zostaną opublikowane w najbliższym czasie.

PIŚMIENNICTWO

1. Dwyer JL (1993) *Process purification*, W: Franx F (red) *Protein biotechnology - isolation, characterization, and stabilization*. Humana Press, Totowa, New Jersey, str. 533-572
2. Takeshita H, Mogi K, Yasuda T, Nakajima T, Nakashima Y, Mori S, Hoshino T, Kishi K (2000) Mammalian deoxyribonucleases I are classified into three types: pancreas, parotid, and pancreas-parotid (mixed), based on differences in their tissue concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 481-484
3. Jones SJ, Worrall AF, Connolly BA (1996) Site-directed mutagenesis of the catalytic residues of bovine pancreatic deoxyribonuclease I. *J Mol Biol* 264: 1154-1163
4. Pizzo E, D'Alessio G (2007) The success of the RNase scaffold in the advance of biosciences and in evolution. *Gene* 406: 8-12
5. Smith JG, Smith JG, Liu X, Kaufhold RM, Clair J, Caulfield MJ (2001) Development and validation of a gamma interferon ELISPOT assay for quantification of cellular immune responses to Varicell-Zoster virus. *Clin and Diagnostic Lab Immuno* 8: 871-879
6. Reichert U, Knieps E, Slusarczyk H, Kula MR, Thömmes J (2001) Isolation of a recombinant formate dehydrogenase by pseudo-affinity expanded bed absorption. *J Biochem Biophys Methods* 49: 533-552
7. Fernandez-Lahore HM, Geilenkirchen S, Boldt K, Nagel A, Kula MR, Thömmes J (2000) The influence of cell absorbent interactions on protein absorption in expanded beds. *J Chromat* 873: 195-208



Rycina 1. Rozdział produktów hydrolizy genomowego DNA *E. coli* Benzonazą® w warunkach 37°C, 2 godziny. 2% żel agarozowy barwiony bromkiem etydyny, wizualizowany w świetle UV. Ścieżka: 1) rozdział produktów trawienia genomowego DNA 2U benzonazy/ml, 2) 4U/ml, 3) 8U/ml, 4) 16U/ml, 5) 32U/ml, 6) nukleotydowy marker wielkości 100-3000 par zasad.

8. Lee CT, Morreale G, Middelberg AP (2004) Combined in-fermenter extraction and cross-flow microfiltration for improved inclusion body processing. *Biotechnol Bioeng* 85: 103-113

9. Kur J, Olszewski M, Długolecka A, Filipkowski P (2005) Single-stranded DNA-binding proteins (SSBs) – sources and applications in molecular biology. *Acta Biochim Polon* 52: 569-574

Benzonase – possibility of practical application

Marcin Olszewski[✉], Paweł Filipkowski

Chemical Faculty, Gdansk University of Technology, 11/12 G. Narutowicza St., 80-952 Gdansk, Poland

[✉]e-mail: molszewski@pg.gda.pl

Key words: benzonase, endonuclease, DNA, DNase, RNase, protein purification

ABSTRACT

Benzonase nuclease degrades all forms of DNA and RNA while having no photolytic activity. In this study we check possibility of use this reagent to prepare proteins to microcalorimetric experiments.

Novagen[®]

Novagen

The GOLD Standard
for Protein Research

2009/2010

PCR and Cloning
Media and Cell Growth
Competent Cells
Cell-line Expansion
Bacterial Protein Expression
Insect and Multisystem Expression
Protein Purification
Protein Refolding
Diagnosis and Detection
Antibodies and Detection Kits
Markers and Molecular Biology Reagents
Phage Display & Protein Interactions
Sample Preparation for Proteomics
Multiplex Assays

MERCK

The GOLD Standard
for Protein Research

2009/2010

PCR and Cloning
Media and Cell Growth
Competent Cells
Cell-free Expression
Bacterial Protein Expression
Insect and Multisystem Expression
Protein Purification
Protein Refolding
Dialysis and Filtration
Antibodies and Detection Kits
Markers and Molecular Biology Reagents
Phage Display & Protein Interactions
Transfection
Sample Preparation for Proteomics
Multiplex Assays

Nowość

Zamów darmowy katalog
u naszych przedstawicieli lub na www.merckbio.eu

STRESZCZENIE

Uracyl może być obecny w DNA w niewielkich ilościach, jako efekt spontanicznej deaminacji cytozyny i/lub efekt wstawienia dUMP podczas replikacji DNA. Powstawanie uracylu poprzez enzymatyczną deaminację cytozyny związane jest z procesem różnicowania przeciwciał podczas ekspresji genów Ig i zwalczania zakażeń powodowanych przez rethrowirusy. Deaminacja DNA jest procesem obserwowanym w ontogenezie ssaków i w tym przypadku zmiany w genomie są wynikiem modyfikacji deoksycytydyny. W artykule dokonano przeglądu aktualnego piśmiennictwa dotyczącego: i/ źródeł i pochodzenia uracylu w DNA, ii/ funkcji enzymu AID (indukowanej aktywacją limfocytów B deaminazy cytydyny), z udziałem którego zachodzi deaminacja C w genach Ig limfocytów B, iii/ charakterystyki enzymów odpowiedzialnych za wycinanie uracylu z DNA i roli tego zjawiska w procesie różnicowania przeciwciał. Omawiana jest także rola zaburzeń aktywności AID, jako czynnika w procesie kancerogenezy.

WPROWADZENIE

Uracyl, który jest zasadą typową dla cząsteczki RNA, występuje także w niewielkich ilościach w DNA. Jest to wynik spontanicznej lub enzymatycznej deaminacji cytozyny (w efekcie pojawiają się błędnie sparowane zasady U:G) lub wynik włączania dUMP zamiast dTMP podczas replikacji DNA (pojawiają się pary U:A). Nie ma wątpliwości, że obecność par U:G może być przyczyną mutacji C→T. Nie wiadomo jednak, na ile obecność par U:A może wpływać destabilizująco na strukturę i funkcje DNA. Para U:A jest energetycznie mniej stabilna od pary A:T. Mimo parowania U z A, nie zmieniają się jednak właściwości helisy DNA [1]. Ponieważ uracyl w DNA nie jest zasadą kanoniczną, a jego obecność może skutkować pojawieniem się mutacji, jest on zwykle rozpoznawany i usuwany przez glikozylazy działające w ramach mechanizmu naprawy przez wycinanie zasad (BER, ang. *Base Excision Repair*). W komórkach ssaków występują cztery białka enzymatyczne o aktywności glikozylazy uracylowej: UNG, SMUG, TDG i MBD4 [2]. Enzymy te pełnią unikalne, specyficzne funkcje, ale prawdopodobnie mogą także wzajemnie uzupełniać swoje działanie [3]. Niespodzianką okazały się niedawne odkrycia, które ujawniły, że obecność uracylu w DNA limfocytów B jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego i to zarówno w przypadku rozwoju odporności swoistej, jak i nieswoistej. Co więcej, na przełomie XX i XXI wieku odkryto gen, którego białkowy produkt pełni funkcję deaminazy cytozyny, przekształcającej w cząsteczce DNA limfocytów B cytozynę w uracyl (AID, ang. *Activation-Induced Cytidine Deaminase*, indukowana aktywacją limfocytów B deaminaza cytydyny) [4]. Obecność uracylu w genach kodujących immunoglobuliny (Ig) jest jednym z mechanizmów prowadzących do różnorodności przeciwciał i pełni ważną funkcję zarówno przy powstaniu somatycznych hipermutacji (SHM, ang. *Somatic Hypermutation*), jak i somatycznej rekombinacji prowadzącej do przełączania izotypów przeciwciał (CSR, ang. *Class Switch Recombination*).

Przedmiotem artykułu jest opis udziału procesów prowadzących do pojawiania się uracylu w DNA w przebiegu dojrzewania i różnicowania przeciwciał, a także opis konsekwencji pojawiania się uracylu w innych niż geny Ig miejscach genomu i innych typach komórek niż limfocyty B, co prowadzić może do kancerogennych zmian w komórkach i rozwoju nowotworów.

ŹRÓDŁA OBECNOŚCI URACYLU W DNA

SPONTANICZNA DEAMINACJA CYTOZYN

Zasady azotowe tworzące DNA mogą ulegać w komórce spontanicznej deaminacji. Z badań przeprowadzonych *in vitro* wynika, że głównym substratem takiej reakcji jest cząsteczka cytozyny, która jest przekształcana w uracyl. Rezultaty doświadczeń prowadzonych *in vivo*, analizujących możliwość deaminacji

Ryszard Oliński[✉]

Marek Jurgowiak

Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Bydgoszcz

[✉]Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz; tel.: (052) 585 37 45, e-mail: ryszardo@cm.umk.pl

Artykuł otrzymano 7 lipca 2008 r.
Artykuł zaakceptowano 9 października 2008 r.

Słowa kluczowe: uracyl, naprawa DNA, indukowana aktywacją limfocytów B deaminaza cytydyny (AID), somatyczne hipermutacje, różnicowanie przeciwciał, kancerogeneza

Wykaz skrótów: 8-oksyoGua – 8-oksyoGua; 8-oksyoG – 8-oksyo-2'-deoksyoG; AP – miejsca apurynowe, apirymidynowe; AID – indukowana aktywacją limfocytów deaminaza cytydyny; BER – naprawa DNA przez wycinanie zasad; CSR – somatyczne rekombinacje prowadzące do przełączania izotypów przeciwciał; dsDNA – dwuniciowy DNA; dUTP – deoksyoUridyno-5'-trifosforan; GC/MS – chromatografia gazowa z wykorzystaniem techniki spektrometrii mas; LC/MS – chromatografia cieczowa z wykorzystaniem techniki spektrometrii mas; MMR – naprawa błędnie sparowanych zasad; MBD4, SMUG, TDG, UNG – glikozylazy DNA; PCNA – jądrowy antygen proliferujących komórek; ssDNA – jednociowy DNA; SHM – somatyczne hipermutacje

pojedynczej cząsteczki cytozyny w genie *lacZ* bakterii *E. coli*, potwierdziły, że okres półtrwania cytozyny w jednoniciowym DNA (ssDNA) wynosi około 200 lat i jest nieco krótszy niż okres półtrwania dla zasad purynowych. W dwuniciowym DNA (dsDNA) cytozyna jest zdecydowanie bardziej odporna na deaminację i jej okres półtrwania wynosi około 30 000 lat [5]. Taka różnica znajduje odzwierciedlenie w różnym stopniu deaminacji cytozyny w komórkach, zarówno *S. cerevisiae*, jak i *E. coli*. Deaminacja w przypadku drożdży *S. cerevisiae* jest czterdziestokrotnie szybsza prawdopodobnie dlatego, że okres trwania transkrypcji utrzymującej DNA w postaci jednoniciowych cząsteczek jest w tych komórkach dłuższy.

Przypuszcza się, że w komórce człowieka w przeciągu doby około 100 do 500 cząsteczek cytozyny może zostać przekształconych w uracyl. Szacunkowe ustalenia wskazują, że jest to ilość zbliżona do wartości określającej endogenny poziom przekształcania guaniny w 8-oksyguaninę (8-oksyoGua). Jak się wydaje obie te modyfikacje mogą być głównym źródłem zmian odpowiedzialnych za endogennie indukowane mutacje [5].

WŁĄCZANIE dUMP DO DNA

dUMP jest niezbędnym związkim uczestniczącym w procesie syntezy tymidylanu. W reakcjach katalizowanych przez syntazę tymidylanową (TS), w których donorem grupy metylowej i równoważników redukcyjnych jest N^{5,10} metylenotetrahydrofolian (mTHF), z dUMP powstaje dTMP, przekształcany następnie w dTTP. W związku z tym w komórce znajduje się odpowiednia pula dUMP (dUMP powstaje w wyniku deaminacji deoksycytydylanu przez deaminazę deoksycytydylanową). Biorąc pod uwagę stosunek puli dUTP/dTTP [6] oraz stwierdzony fakt, że polimerazy DNA uczestniczące w procesie replikacji mogą włączać dUMP z podobną wydajnością jak dTMP, obliczono, że w trakcie replikacji DNA jedna cząsteczka dUMP może być włączona do DNA na 10⁵ włączanych cząsteczek dTMP [7,8].

Z niektórych przeprowadzonych badań wynika, że nieprawidłowe włączenie uracylu w procesie replikacji jest wydajniejszym źródłem obecności tej cząsteczki w DNA niż zjawisko spontanicznej deaminacji cytozyny [9].

5-fluorouracyl (5FU) jest jednym z najczęściej stosowanych leków w przypadku terapii raka jelita grubego. Związek ten znajduje także zastosowanie w leczeniu raka piersi i nowotworów głowy i szyi. Sugeruje się, że hamowanie aktywności syntazy tymidylanowej może być podstawowym mechanizmem cytotoksyczności 5-FU. Zaobserwowano, że hamowaniu syntazy towarzyszy wzrost poziomu dUTP i włączenie uracylu do DNA [9].

Innym powodem hamowania aktywności syntazy tymidylanowej, połączonym z włączeniem uracylu do DNA, może być niedobór folianów. Stwierdzono, że niedobór folianów (poniżej 3 ng/ml osocza) jest jedną z najczęstszych form awitaminozy i występuje u około 10% osób w populacji Stanów Zjednoczonych. Z badań epidemiologicznych wynika, że niski poziom folianów może zwiększać ryzyko

wystąpienia raka jelita i macicy, a ich uzupełnianie zmniejsza ryzyko wystąpienia stanów przednowotworowych.

Wyjaśnieniem związku między niedoborem folianów i kancerogenezą mogą być wyniki niektórych badań, sugerujące, że deficyt folianów może być bezpośrednio związany ze zwiększoną pulą dUTP [10] i podwyższeniem poziomu uracylu w DNA. Wzrost poziomu uracylu może z kolei wynikać ze spadku wydajności reakcji katalizowanych przez TS, których kofaktorem są pochodne folianów (patrz wyżej) [11].

JAKI JEST ENDOGENNY POZIOM URACYLU W DNA?

W świetle przedstawionych powyżej danych literaturowych oczywistym wydaje się fakt występowania pewnej „puli uracylu” w DNA prawidłowej komórki (jest to tzw. endogenny, podstawowy poziom). Jest on wyrazem równowagi istniejącej pomiędzy procesami metabolicznymi odpowiedzialnymi za pojawianie się uracylu w DNA i usuwaniem tej cząsteczki z DNA przez swoiste enzymy. Problemy metodologiczne nie pozwalają jednak udzielić precyzyjnej odpowiedzi na pytanie, jak wysoki jest endogenny poziom uracylu w DNA. Różne stosowane techniki analityczne dają wartości w zakresie od kilku – do kilku tysięcy cząsteczek uracylu/10⁶ par zasad [12]. Zdecydowana większość metod stosowanych do analizy zawartości tej zasady w DNA opiera się na enzymatycznym wycinaniu uracylu z DNA przez UNG i późniejszej analizie uwolnionej cząsteczki technikami GC/MS lub LC/MS [12]. Różne wartości uzyskiwanych wyników mogą być powodowane, w tym przypadku, stosowaniem enzymu. Używany w tych analizach UNG wycina preferencyjnie uracyl z jednoniciowego DNA, a aktywność enzymu może również zależeć od kontekstu zasad występujących w sąsiedztwie uracylu [13,14]. Aktywność UNG zależy także od obecności jonów Mg i temperatury, a więc od warunków inkubacji [15,16]. Możliwe więc, że w/w techniki podają wartości zaniżone.

Opracowana w naszym laboratorium technika analizy zawartego w DNA uracylu opiera się na enzymatycznej degradacji DNA do nukleozydów i późniejszej analizie dU metodą LC/MS/MS. Uzyskane przez nas wartości są nieco wyższe niż przeciętne, opisane w ostatnio opublikowanych artykułach (opierających się na technikach wykorzystujących UNG) i oscylują na poziomie 40 cząsteczek dU na 10⁶ nukleozydów w DNA izolowanym z leukocytów człowieka (Gackowski D, Oliński R – dane niepublikowane).

Zasadne w tym kontekście jest pytanie - czy „komórka może tolerować” w warunkach fizjologicznych dużą ilość uracylu w DNA? Szacunkowa ilość innej, powszechnie występującej w DNA modyfikacji, 8-oksyoG, jest zbliżona do wartości 1 cząsteczka na 10⁶ nukleozydów [17].

Jak zaznaczono powyżej uracyl powstający w wyniku deaminacji cytozyny (pojawiają się wtedy błędnie sparowane zasady U:G) jest potencjalnie mutageny i powinien być efektywnie usuwany z DNA. Natomiast, jak się wydaje, rozproszone w genomie pary U:A, powstające w wyniku włączenia dUMP zamiast dTMP podczas replikacji DNA, mogą być przez komórkę „tolerowane”. Dane literaturowe

wskazują, że zastąpienie pary T:A parą U:A, nie wpływa na strukturę DNA [18]. Nawet przy założeniu, że para A:U jest energetycznie mniej stabilna od pary A:T [1], trudno przypuszczać aby stanowiła centrum destabilizacji w DNA zawierającym tysiące par G:C i A:T).

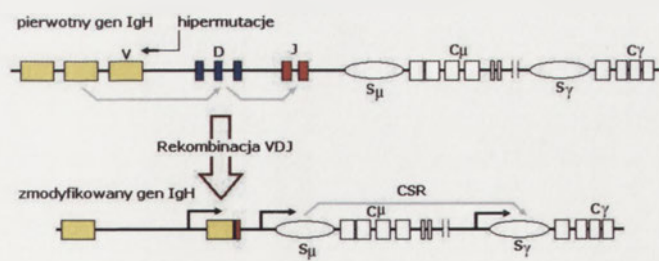
Warto wspomnieć w tym miejscu, że w cząsteczce DNA faga PBS2 (fag *Bacillus subtilis*) wszystkie cząsteczki tyminy są zastąpione uracylem [19], a zastąpienie w DNA *E. coli* 10% tyminy przez uracyl pozwala na funkcjonowanie komórki bakteryjnej [20]. Odnotowano także fakt około 100-krotnego wzrostu zawartości uracylu w DNA myszy *UNG^{-/-}* bez towarzyszących temu zjawisku zmian patologicznych we wczesnych okresach życia tego gryzonia [21].

URACYL W DNA, HIPERMUTACJE A RÓŻNICOWANIE PRZECIWCIAŁ

Organizmy kręgowców, w tym człowieka, zdolne są do wytwarzania dużego zestawu przeciwciał (Ig) w odpowiedzi na obecność różnego typu antygenów. Organizm wytwarza Ig zdolne do wiązania każdego antygeny, nawet jeśli wcześniej nie miał z nim kontaktu, zarówno w przebiegu filogenezy, jak i ontogenezy. Nie da się zatem wytłumaczyć tak dużego potencjału różnorodności w produkcji Ig wyłącznie adaptacją ewolucyjną. Liczbę różnych przeciwciał jakie może produkować nasz organizm podczas całego okresu życia szacuje się na 10^9 , co przewyższałoby, w relacji do liczby znanych genów, możliwości kodowania genomu człowieka. Tak jednak nie jest, a duża różnorodność przeciwciał wydaje się być raczej wynikiem procesu somatycznej dywersyfikacji (różnicowania) genów.

Zróżnicowanie przeciwciał wynika, między innymi, z różnorodności ich części zmiennych V (variable). Pomiedzy segmentami V i C genów Ig (C koduje obszar stały przeciwciała, tzw. ramię efektorowe), zlokalizowane są sekwencje kodujące segmenty łączące J (joining) oraz segmenty różnorodności D (diversity). DNA kodujący fragment przeciwciała rozpoznający antygen jest składany poprzez rearanżacje genu we wczesnej fazie dojrzewania limfocytów B. Scalenie segmentów V, D i J immunoglobulin prowadzi do powstania pierwotnej różnorodności i specyficzności przeciwciał. Kształtowanie tej różnorodności pochodzi zarówno z wyboru pierwotnej linii segmentów V, D, J genów Ig podczas integracji (zróżnicowanie rekombinacyjne), jak i integracji miejsc V, D, J powiązanej z delecjami i insercjami nukleotydów, co generuje różnorodność tych połączeń (Ryc. 1).

Geny kodujące przeciwciała podlegają różnicowaniu w procesie somatycznej hipermutacji (SHM). Region zmienny V przeciwciał jest stabilny tylko do momentu aktywacji limfocyty B. Związanie antygeny indukują proces mutacji somatycznych w regionie V, co prowadzi do większego zróżnicowania rejonów zmiennych. Efektem jest pojawienie się w trakcie odpowiedzi immunologicznej przeciwciał o coraz większym powinowactwie do antygeny. Częstotliwość tych mutacji szacuje się na 10^3 par zasad rejonu V na jedno pokolenie komórkowe. Jest to częstość 10^3 - 10^4 razy większa niż w przypadku mutacji spontanicznych w innych genach. Do niedawna nie było pewności jaki mechanizm doprowadza do tak dużej częstości mutacji w tym ściśle określonym rejonie genu.



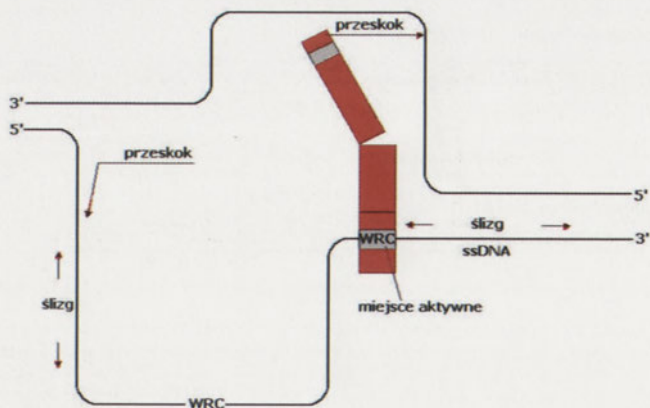
Rycina 1. Różnicowanie genów kodujących przeciwciała. Pomiedzy segmentami V i C genów Ig zlokalizowane są sekwencje kodujące segmenty łączące J oraz segmenty różnorodności D. DNA kodujący fragment przeciwciała rozpoznający antygen jest składany poprzez rearanżacje genu we wczesnej fazie dojrzewania limfocytów B. Scalenie segmentów V, D i J immunoglobulin skutkuje tworzeniem pierwotnej różnorodności i specyficzności przeciwciał. Kształtowanie tej różnorodności pochodzi z wyboru pierwotnej linii segmentów V, D, J genów Ig podczas scalenia, jak i scalenia miejsc V, D, J powiązanej z delecjami i insercjami nukleotydów (zróżnicowanie rekombinacyjne), co skutkuje powstaniem różnorodności tych połączeń. Geny kodujące przeciwciała podlegają różnicowaniu również w procesie somatycznej hipermutacji (SHM), uzależnionej od powstawania uracylu w segmentach V (objaśnienia w tekście). Na podstawie [28], zmienione.

Obecnie zakłada się, że hipermutacje somatyczne są wynikiem deaminacji cytozyny w segmentach V genu Ig podczas różnicowania i dojrzewania przeciwciał [22]. Hipermutacje te zachodzą z udziałem AID (indukowanej aktywacją limfocytów B deaminaza), enzymu katalizującego deaminację cząsteczek cytozyny w DNA. Działanie AID powoduje powstawanie par typu U:G, determinujących różne podstawienia zasad obserwowane w procesie somatycznych hipermutacji.

BIAŁKO AID JEST ODPOWIEDZIALNE ZA PRZEKSZTAŁCANIE C→U W GENACH IMMUNOGLOBULIN (IG)

Odkrycie AID i późniejsza charakterystyka właściwości tego enzymu nie pozostawiają wątpliwości, że obecność uracylu w specyficznych segmentach genu Ig jest zjawiskiem odgrywającym podstawową rolę w procesie różnicowania przeciwciał. Pojawienie się uracylu jest wynikiem deaminacji cytozyny w enzymatycznym procesie katalizowanym przez indukowaną aktywacją limfocytów B deaminazę cytydyny. Enzym ten został po raz pierwszy opisany w roku 1999 przez Honjo i współpracowników [4]. Pracę nad charakterystyką AID ułatwił znaczny stopień jej homologii z białkiem APOBEC1, które jest katalitycznym komponentem tkankowo specyficznego kompleksu deaminującego C do U w pozycji 6666 RNA, który koduje białko apolipoproteiny B. To z kolei jest związane z utworzeniem kodonu stop, wcześniejszego zakończenia translacji i syntezy krótszej formy apolipoproteiny [23].

Oba enzymy są ze sobą blisko spokrewnione i należą do większej rodziny deaminaz cytozyny (APOBEC), które przeprowadzają reakcje deaminacji cytozyny w DNA lub/i RNA [24]. Substratem dla tych enzymów jest cytozyna obecna w nici polinukleotydowej - nie deaminują one wolnej cytozyny bądź odpowiednich wolnych nukleotydów czy nukleotydów. W badaniach przeprowadzonych *in vitro* wykazano, że jedynym substratem dla oczyszczonego białka AID jest ssDNA (Ryc. 2). Prawdopodobnie jest to powiązane z



Rycina 2. Schemat procesu deaminacji C do U z udziałem AID. Białko AID przyłącza się jako dimer do ssDNA. Następnie AID deaminuje cytozynę w DNA w konsensusowej sekwencji **WRCY** (gdzie **W** = A/T, **R** = A/G, **Y** = C/T). Na podstawie [22], zmienione.

procesem transkrypcji, ponieważ AID współwytrąca się z polimerazą II RNA, a częstość indukowanych przez AID mutacji jest proporcjonalna do aktywności transkrypcyjnej [25,26]. Wyniki badań przeprowadzonych *in vivo* sugerują natomiast, że preferowanym przez AID substratem jest nie transkrybowana nić DNA [27].

Nie stwierdzono natomiast deaminacji RNA przez AID. Ciekawe, że białko APOBEC1, którego fizjologicznym substratem jest RNA, może w warunkach *in vitro* deaminować także DNA, chociaż nie może brać udziału w procesie różnicowania przeciwciał [28]. Uważa się, że białka rodziny APOBEC uczestniczą w deaminacji cytozyny intermediałów replikacyjnych lentiwirusów, co może być jednym ze sposobów eliminacji tych wirusów z organizmu [29-31].

Mutacje w genach Ig powstają w wąskim przedziale czasowym, przede wszystkim w rejonie V genów Ig, 150 nukleotydów w kierunku 3' od promotora IgV i obejmują ponad 2 tysiące par zasad [32-34].

Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 1 i na rycinie 3, powstawanie mutacji, które są efektem działania AID, dotyczy w równej mierze par C:G, jak i A:T. Według niektórych danych nawet około 60% mutacji dotyczy par A:T [35]. Stwierdzono jednak, że u myszy pozbawionych genu MSH2 wachlarz mutacji jest zmieniony, ze znacznym spadkiem ilości podstawień w parach A:T. W związku z tym zaproponowano hipotezę, zgodnie z którą hipermutacje somatyczne powstają w dwóch etapach: pierwszym, zależnym od aktywności AID, którego celem są pary zasad C:G, i drugim, zależnym od białek naprawy (UNG2, MSH2/6, a także polimeraz typu TLS), które rozpoznawałyby uszkodzenia indukowane w etapie pierwszym i w trakcie naprawy przyczyniały się do powstawania mutacji w genach Ig [22,28].

ENZYMY USUWAJĄCE URACYL Z DNA

GLIKOZYLAZA URACYLOWA – UNG

Glikozylaza uracylowa – UNG jest podstawowym enzymem usuwającym cząsteczki uracylu z DNA. UNG jest najbardziej aktywna wtedy, kiedy substratem jest ssDNA, ale

wykazuje także aktywność wobec dsDNA, niezależnie od tego czy U tworzy pary zasad z G czy z A [36]. Niektóre pochodne uracylu (alloksan, kwas izodialurowy i 5 hydroksyuracyl), będące wynikiem oksydacyjnej modyfikacji, są także rozpoznawane i usuwane przez UNG [37]. W genie UNG zakodowana jest informacja dotycząca zarówno mitochondrialnej (UNG1), jak i jądrowej (UNG2) glikozylazy uracylowej. Obie formy różnią się domenami N-końcowymi, co jest efektem rozpoznawania alternatywnych promotorów oraz splicingu i dojrzewania mRNA. Domeny N-końcowe przede wszystkim decydują o lokalizacji enzymów [38].

Najsilniejszą ekspresję genu kodującego mRNA dla UNG2 zaobserwowano w tkankach szybko rosnących takich narządów, jak jądra i jelita. Wysoki stopień ekspresji mRNA dla UNG2 obserwuje się także w aktywowanych limfocytach B. Stopień ekspresji jest zależny od przebiegu cyklu komórkowego, a najwyższy poziom mRNA dla UNG2 wykrywa się w późnej fazie G1/S cyklu [3]. Komórki nie namnażające się, szczególnie z dużą liczbą mitochondriów, są wzbogacone w UNG1. Poziom mRNA dla UNG1 wzrasta także w fazie S cyklu komórkowego, ale w znacznie mniejszym stopniu niż dla enzymu jądrowego.

Matrycowy RNA dla UNG2 koduje białko złożone z 313 reszt aminokwasowych, które po zsyntetyzowaniu jest przemieszczane do jądra komórkowego. W jądrze główna frakcja tego białka jest zlokalizowana w kompleksie replikacyjnym i oddziałuje z białkiem PCNA poprzez konsensusową sekwencję Qxx/IxxFF i z białkiem RPA poprzez N-końcowe miejsca wiążące [3]. Taki kompleks naprawczy zawiera także białko XRCC1. Uważa się, że UNG2 jest białkiem replikacyjnym, przesuującym się zgodnie z ruchem widełek replikacyjnych [24].

Glikozylaza UNG2 bierze udział zarówno w krótkim (podstawowym), jak i długim (alternatywnym) szlaku naprawy DNA typu BER. W kompleksie reperacyjnym, charakterystycznym dla obu tych szlaków, oprócz białek wymienionych powyżej występują także białka APE1, Pol β i Pol δ oraz ligaza [39].

Tabela 1. Procentowy udział zmian mutacyjnych prowadzących do podstawiania zasad podczas somatycznych hipermutacji w komórkach myszy i człowieka.

		zasady pirymidynowe		zasady purynowe		
		T	C	G	A	
zasady pirymidynowe	T		7	4	2	13
	C	16		2	4	22
zasady purynowe	G	7	6		15	28
	A	3	12	22		37

Mutacje opisane jako tranzycje zaznaczono kolorem czerwonym. Procentowy udział mutacji dotyczący wszystkich czterech zasad opisano z prawej strony tabeli (na podstawie [28], zmienione).

Pomimo swej nazwy, glikozylaza uracylowa specyficzna dla jednoniciowego DNA, enzym ten, przynajmniej w przypadku człowieka, wykazuje preferencje dla dsDNA [40,41]. Jego aktywność nie zależy od przebiegu cyklu komórkowego i w przeciwieństwie do UNG2 cząsteczka SMUG nie jest związana z kompleksem replikacyjnym podczas fazy S cyklu. Nie zidentyfikowano dotychczas mitochondrialnej formy tego enzymu. Preferowanym substratem dla SMUG w dsDNA są pary zasad U:G. Enzym usuwa także wydajnie z DNA 5-hydroksymetylowouracyl, jedną z głównych oksydacyjnych modyfikacji tyminy, nie rozpoznawaną przez UNG2. Zarówno SMUG, jak i UNG2 rozpoznają i usuwają włączony do DNA lek przeciwnowotworowy, jakim jest 5-fluorouracyl [42].

Wydaje się, że SMUG może uzupełniać/zastępować działanie UNG2 podczas usuwania uracylu z par U:G, ale nie wykazuje specyficzności w stosunku do par U:A. Przypuszcza się, że w przypadku obniżonej aktywności lub braku UNG2 (komórki *ung^{-/-}*), SMUG może usuwać uracyl z obu substratów. W komórkach pozbawionych jednego z dwóch genów, UNG2 lub SMUG, wykrywa się wzrost częstości mutacji odpowiednio 5, i 2,5-krotny, natomiast komórki pozbawione obu genów narażone są na 10-krotny wzrost częstości występowania mutacji. Przeważającą formą takich zmian mutacyjnych są tranzycje GC → AT [42].

GLIKOZYLAZA TYMINOWA TDG I GLIKOZYLAZA MBD4

Preferowanym substratem dla TDG jest błędnie sparowana para zasad U:G, chociaż enzym ten może także usuwać tyminę (produkt deaminacji 5-metylocytozyny) z par G:T. Podobnie jak w przypadku UNG2, aktywność glikozylazy tyminowej jest zależna od faz cyklu komórkowego. Komórki wchodzące w fazę S cyklu eliminują ten enzym na szlaku zależnej od ubikwityny degradacji przebiegającej w proteasomach. TDG nie występuje w komórce do chwili ukończenia replikacji DNA. Uważa się, że degradacja cząsteczki TDG jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu fazy S cyklu komórkowego i podziału komórki, co z kolei sugeruje, że TDG może negatywnie wpływać na kluczowe etapy replikacji DNA [43]. Uderzająca jest wzajemna, negatywna, regulacja aktywności TDG i UNG2 w cyklu komórkowym. Poziom ekspresji genu UNG2 wzrasta dokładnie w chwili, gdy ekspresja genu TDG ulega represji i odwrotnie. Wskazuje to na precyzyjną regulację kontroli poziomu uracylu w DNA zależną od źródła pochodzenia tej zasady. UNG2 jest aktywna w trakcie replikacji, gdy do DNA może być włączana cząsteczka dU naprzeciwko adeniny, natomiast wzrost aktywności TDG powiązany jest z deaminacją cytozyny i możliwością wzrostu zawartości par U:G. Zasadne jest pytanie, dlaczego cząsteczka TDG, mimo swej aktywności glikozylazy uracylowej, jest eliminowana z komórki w fazie S cyklu komórkowego w procesie skoordynowanym z replikacją DNA. Wydaje się, że przynajmniej częściową odpowiedzią na to pytanie są właściwości tego enzymu; niska wydajność w korygowaniu par U:A w połączeniu z wysokim powinowactwem do miejsc AP mogłyby prowadzić do zahamowania ruchu widełek replikacyjnych

i zakłócać proces replikacji [43]. Inną właściwością TDG, która może zakłócać proces replikacji DNA, jest zdolność do wycinania T z par G:T. Chociaż ta właściwość zapobiega mutacjom wynikającym z deaminacji 5metC, może być jednocześnie źródłem błędów replikacyjnych, wtedy kiedy błędne pary zasad G:T są wynikiem błędów polimerazy. Ponieważ TDG nie jest w stanie odróżnić nici macierzystej i nowo zsyntetyzowanej, usuwanie T z matrycy może prowadzić do utrwalenia tranzycji C→T. Wydajnym mechanizmem zabezpieczającym komórkę przed takimi mutacjami jest poredplikacyjna naprawa przez wycinanie błędnie sparowanych zasad.

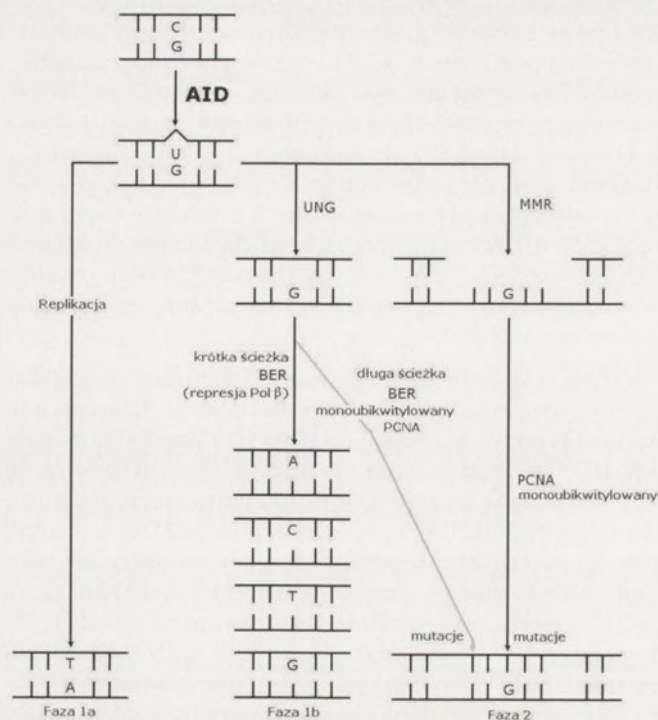
MBD4, podobnie jak TDG, należy do grupy glikozylaz DNA typu I. Enzym ten wykazuje specyficzne działanie wobec reszt tyminy i uracylu, powstałych w wyniku deaminacji 5MeC i C, sparowanych z guaniną (U:G i T:G), co może odgrywać rolę w utrzymywaniu stabilności metylowanych sekwencji CpG w DNA. Jak wykazano, MBD4 to enzym, który składa się odpowiednio z domeny wiążącej zmetylowane CpG i domeny C-końcowej, o aktywności glikozylazy specyficznej dla nieprawidłowo sparowanych zasad DNA. Metylacja reszt C występuje wyłącznie w sekwencjach CpG genomów ssaczych i odgrywa istotną rolę w procesach wyciszania genów i regulacji transkrypcji (patrz także: [44]).

ROLA URACYLU ORAZ MECHANIZMÓW NAPRAWCZYCH TYPU BER I MMR W POWSTAWANIU SOMATYCZNYCH HIPERMUTACJI (SHM) I RÓŻNICOWANIU IG

Z licznych badań wynika, że w procesie różnicowania przeciwciał i indukcji somatycznych hipermutacji podstawową rolę odgrywają dwa białka: AID i UNG2. Badania prowadzone na myszach pozbawionych genu UNG2, a w przypadku człowieka, z udziałem pacjentów z mutacjami w obu allelach genu UNG2, wykazały, że aktywność UNG2 jest niezbędna w dwóch fundamentalnych procesach towarzyszących różnicowaniu przeciwciał. Są to: powstawanie pęknięć nici DNA niezbędnych do somatycznej rekombinacji prowadzącej do przełączania izotypów przeciwciał (CSR), jak i proces hipermutacji [45,46]. Jak wiadomo uracyl jest substratem dla kilku enzymów, w związku z tym, zasadne jest pytanie, dlaczego inne glikozylazy, przede wszystkim SMUG, nie mogą zastąpić UNG2 w procesie generującym SHM.

Częściowej odpowiedzi na to pytanie udzielają wyniki eksperymentów, w których wykazano, że: i/ w przeciwieństwie do SMUG w aktywowanych limfocytach B indukowana jest ekspresja genu UNG2, ii/ AID deaminuje cytozynę w ssDNA, który jest faworyzowanym substratem dla UNG2, iii/ białko RPA, które pośredniczy w wiązaniu AID z DNA, oddziałuje także z UNG2. Należy jednak dodać, że w komórkach z nadekspresją genu SMUG białko to może wycinać uracyl indukowany działaniem AID. Prawdopodobnie jednak w tym przypadku zamiast sprzyjać różnicowaniu Ig, przyczynia się raczej do wolnej od błędów naprawy [3].

Jak zaznaczono powyżej UNG2 odgrywa także zasadniczą rolę w procesie rekombinacji somatycznej. W tym wypadku miejsca AP muszą być przetwarzane w taki sposób,



Rycina 3. Mechanizm powstawania hipermutacji. AID deaminuje cząsteczkę cytozyny podczas transkrypcji w ssDNA. Pojawiająca się błędnie sparowana para U:G może ulegać przemianom przy udziale różnych szlaków metabolicznych: A – w wyniku bezpośredniej replikacji w jednej z komórek potomnych pojawiają się w miejsce par C:G, pary T:A (faza 1a). B – po usunięciu przez UNG uracylu pozostaje miejsce AP, które może być rozpoznane przez polimerazy typu TLS i uzupełnione dowolnym nukleotydem (faza 1b). C – mechanizm naprawy typu MMR rozpoznaje parę U:G i nić DNA z uracylem zostaje częściowo zdegradowana. Monoubikwitylowany PCNA rekrutuje następnie polimerazy replikujące uszkodzony DNA (TLS), które wypełniają lukę, co w konsekwencji może prowadzić do licznych transwersji i tranzycji (faza 2). Na podstawie [22], zmienione.

żeby powstały podwójne pęknięcia nici DNA. Nie wiadomo, czy do procesu CSR wymagana jest replikacja DNA. W procesie tym biorą natomiast udział UNG2 oraz białka uczestniczące w naprawie typu MMR (MSH2/6) [47].

AID, wytwarzając błędnie sparowane zasady (U:G), dostarcza typowego substratu dla białek uczestniczących w naprawie typu MMR. Przyłączenie się białek uczestniczących w szlaku MMR zapoczątkuje proces syntezy DNA, który jest odpowiedzialny za wprowadzenie dodatkowych mutacji, prowadzących do podstawienia par A:T (drugi etap hipermutacji) (Ryc. 3). W komórkach pozbawionych białek MSH2/6 akumulacja tego typu mutacji jest w znaczący sposób obniżona [48,49]. Natomiast w przypadku jednoczesnego braku białek UNG2 i MSH2/6 (*Ung2^{-/-}* i *Msh2/6^{-/-}*) podstawienia par A:T zostają w ogóle zniesione. U takich transgenicznych zwierząt nie obserwuje się także CSR, a powodowana białkiem AID deaminacja cytozyny i pojawienie się uracylu prowadzi w tym wypadku wyłącznie do tranzycji C→T i G→A [50]. Tak więc wydaje się, że podczas nieobecności białek UNG i MSH pary zasad U:G nie są rozpoznawane jako uszkodzenia i są bezpośrednio replikowane (w komórkach potomnych wytwarzane są wówczas pary T:A). Nie wiadomo, czy szlaki naprawy, w który uczestniczą UNG i białka MMR rywalizują ze sobą przy rozpoznawaniu uracylu, czy też zaangażowane są w rozpoznawanie tej cząsteczki podczas różnych faz cyklu komórkowego.

UDZIAŁ POLIMERAZ REPLIKUJĄCYCH USZKODZONY DNA (ang. TLS-TRANSLATION DNA SYNTHESIS) W PRZETWARZANIU ZMIAN Z UDZIAŁEM URACYLU

Wydaje się, że lokalizacja białka UNG2 na początku widełek replikacyjnych jest niezwykle ważna z punktu widzenia roli, jaką może odgrywać ten enzym zarówno w procesie powstawania hipermutacji, jak i somatycznej rekombinacji [3]. Powstawanie miejsc AP po wycięciu uracylu przed widełkami replikacyjnymi jest odpowiedzialne za zahamowanie procesu replikacji i zainicjowanie homologicznej rekombinacji bądź rekrutacji wyspecjalizowanych polimeraz typu TLS, które charakteryzuje niska wierność replikacji. Taki model, ograniczający aktywność UNG do fazy S cyklu komórkowego, pozostaje jednak w sprzeczności z ostatnio wysuniętą hipotezą zakładającą, że udział UNG w procesie różnicowania przeciwiiał ograniczony jest do fazy G₁ i G₂ cyklu komórkowego.

W ostatnich latach scharakteryzowano kilka polimeraz TLS, a niektóre z nich mogą brać udział w procesach związanych z inicjowaniem somatycznych hipermutacji. Jednym z takich enzymów jest transferaza deoksycytydylowa (Rev1), która uczestniczy w syntezie DNA z miejscami AP w genach Ig. Transferaza Rev1 preferencyjnie włącza cząsteczki deoksycytydyny do nowo syntetyzowanej nici, co może być bezpośrednio związane z transwersjami C→G i G→C [51,52]. Ten typ podstawień jest w znacznym stopniu ograniczony podczas różnicowania genów Ig w komórkach pozbawionych białka Rev1 [53,54]. Jak się wydaje, także polimeraza η z grupy TLS jest odpowiedzialna za wytwarzanie szerokiego wachlarza mutacji w parach A:T, związanego z procesem SHM, ponieważ zaobserwowano znaczny spadek zmian mutacyjnych w parach A:T zarówno u myszy pozbawionych genu polimerazy η, jak i w komórkach człowieka pobranych od pacjentów chorych na *Xeroderma pigmentosum* (XP) (grupa komplementacyjna XP-V z uszkodzonym genem polimerazy η [55]). Niektóre dane sugerują także udział polimeraz θ oraz ι w powstawaniu hipermutacji w genach Ig [56,57].

DLACZEGO OBECNOŚĆ URACYLU W DNA PODCZAS RÓŻNICOWANIA PRZECIWIĄŁ ZWIĄZANA JEST Z WYTWARZANIEM MUTACJI, A NIE Z PRAWIDŁOWĄ NAPRAWĄ USZKODZEŃ ?

W tym miejscu warto wrócić do pytania, w jaki sposób białka uczestniczące w procesach wolnej od błędów naprawy (BER i MMR) są wykorzystywane do zwiększania potencjału mutagennego związanego z obecnością uracylu w DNA w trakcie różnicowania przeciwiiał.

Jeżeli do wycięcia uracylu z nici DNA dojdzie tuż przed przejściem widełek replikacyjnych, bez możliwości prawidłowej reperacji, to utworzone miejsce AP będzie pozbawione matrycowej informacji i, w związku z tym, może powodować powstanie poreplikacyjnych mutacji. Należy jednak zaznaczyć, że brak jest bezpośrednich eksperymentalnych dowodów potwierdzających taką hipotezę (patrz: poniżej opisane zastrzeżenia dotyczące roli BER i MMR w określonych fazach cyklu komórkowego). Inna propozycja wyjaśnienia obecności hipermutacji i CSR, zakłada udział

kompleksu białek Mre11-NBS-Rad50 w powstawaniu pęknięć w miejscu AP w obrębie genów Ig oraz późniejszym udziałem mechanizmów z niską wiernością naprawy. Możliwe jest wtedy powstawanie pęknięć dwuniciowych w gorących miejscach regionu S genu Ig, w których białko AID wprowadza dużą ilość uracylu do obu nici DNA. Ostatnio wykazano możliwość specyficznego łączenia się białka Mre11 (zamiast AP1) z miejscami AP w rejonach rearanzacji genu Ig limfocytów B [58].

Nie można wykluczyć, chociaż brak w tym przypadku doświadczalnego potwierdzenia, że częściowym wytłumaczeniem przedstawionych powyżej dylematów jest potrąslacyjna modyfikacja białek biorących udział w usuwaniu uracylu z DNA, powiązana z późniejszymi zjawiskami odpowiedzialnymi za procesy SHM i SCR. Takie modyfikacje mogłyby prowadzić do powstawania przejściowych kompleksów zaangażowanych w różne procesy metaboliczne [47].

Wyniki badań uzyskane w ostatnich latach pozwalają na lepsze zrozumienie w jaki sposób mechanizm naprawy typu BER, uczestnicząc w usuwaniu z DNA uracylu indukowanego działaniem AID, przyczynia się do powstawania mutacji.

Po usunięciu z DNA uracylu przez UNG mogą być następnie inicjowane dwie niezależne ścieżki naprawy typu BER, a są to ścieżka podstawowa (krótka) i alternatywna (długa) (Ryc. 3). Nie wyjaśniono dotychczas jakie zjawiska są odpowiedzialne za wykorzystanie jednej lub drugiej ścieżki naprawy typu BER w powstawaniu somatycznych hipermutacji. Przypuszcza się, że w procesie różnicowania przeciwciał wykorzystywane są oba szlaki naprawy [22,59]. Wydaje się, że co najmniej dwa białka odpowiedzialne są za wybór jednego lub drugiego szlaku naprawy w przypadku usuwania uracylu z DNA. Czynnikiem decydującym o wyborze ścieżki naprawy może być stężenie składników uczestniczących w naprawie. Obecność wysokiego stężenia PCNA w miejscu uszkodzenia wpływa na wybór szlaku alternatywnego. Rekrutacja polimerazy β w miejscu AP, po działaniu UNG, decyduje o wyborze ścieżki podstawowej [22,60]. Od niedawna wiadomo, że monoubikwitylowany PCNA bierze udział w procesie powstawania somatycznych hipermutacji [61-64]. Z kolei ubikwitylacja PCNA może decydować o rekrutacji skłonnych do błędów polimeraz typu TLS, i to zarówno w trakcie naprawy typu BER, jak i MMR. [22].

W badaniach *in vitro* wykazano jednocześnie, że w komórkach BL2, w procesie wytwarzania SHM, dochodzi do hamowania aktywności polimerazy β biorącej udział w podstawowym szlaku naprawy BER, co umożliwiłoby naprawę uszkodzeń przez polimerazy TLS (nie obserwowano jednak modulacji aktywności polimerazy β w trakcie procesu CSR) [22,65].

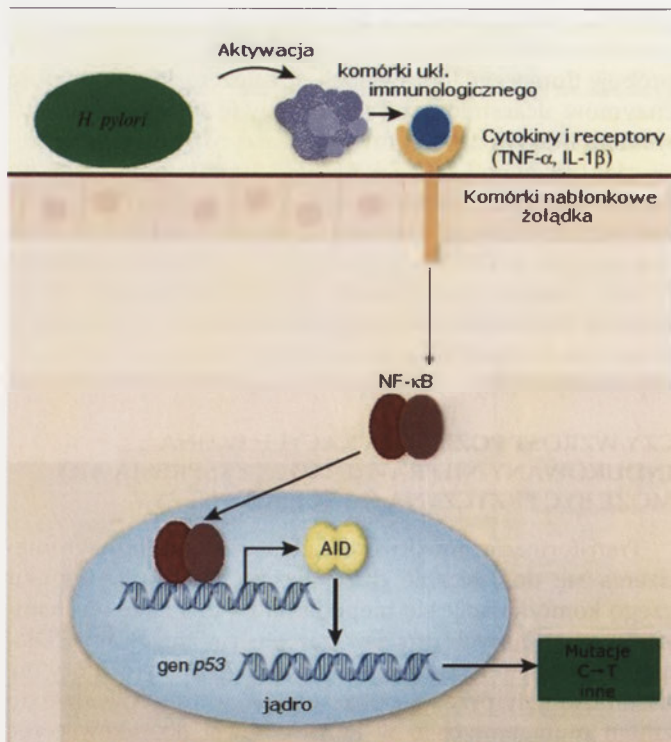
Wyniki dotychczasowych badań udowadniają, że w procesie SHM bierze udział system naprawczy typu BER, jak i MMR. Nierozstrzygnięty pozostaje jednak problem dla którego mechanizmy, które charakteryzuje wysoka wierność naprawy i odpowiedzialność za utrzymanie stabilności

genomu, powiązane są, w aktywowanych limfocytach B, z powstawaniem zmian mutacyjnych. Jedną z hipotez, która próbuje tłumaczyć to zjawisko jest założenie, że aktywność enzymów uczestniczących w naprawie związanej z usuwaniem uracylu z DNA towarzyszącej różnicowaniu przeciwciał (zarówno UNG, jak i MSH2/6) jest ograniczona do fazy G_1 i G_2 cyklu komórkowego. Hipoteza ta jednocześnie zakłada, że wolna od błędów naprawa związana z obecnością uracylu w DNA powiązana jest z procesem replikacji [22,66]. Ciekawa jest również hipoteza zakładająca, że w indukcji hipermutacji w kompleksach naprawczych uczestniczą specyficzne białka, modyfikujące działanie enzymów naprawczych [22].

CZY WZROST POZIOMU URACYLU W DNA INDUKOWANY NIEPRAWIDŁOWĄ EKSPRESJĄ AID MOŻE BYĆ PRZYCZYNĄ KANCEROGENEZY ?

Transformacja nowotworowa jest rezultatem nagromadzenia się dostatecznie dużej liczby mutacji, w wyniku czego komórka staje się niepodatna na działanie mechanizmów regulujących procesy wzrostu i różnicowania. Dlatego obecność potencjalnie mutagennego uracylu, który nie został usunięty przed replikacją DNA, może prowadzić do zmian mutagennych i, w konsekwencji, do rakowacenia komórki. Szczególnie niebezpieczna może być nadmierna aktywność bądź niewłaściwa lokalizacja białka AID, co w konsekwencji może prowadzić do powstania dużej ilości błędnie sparowanych zasad (U:G), niebezpiecznych zwłaszcza w komórce z upośledzonymi mechanizmami naprawy DNA. W warunkach fizjologicznych ekspresja genu AID ograniczona jest do aktywowanych limfocytów B, a dokładniej, do odpowiednich segmentów (segmenty V) genów Ig. Nieprawidłowa ekspresja związana może być jednak z akumulacją mutacji w innych genach, co z kolei może prowadzić do kancerogenezy [67].

W tym kontekście bardzo ciekawie przedstawiają się wyniki badań uzyskane przez grupę badawczą kierowaną przez prof. Chiba z Japonii [68,69], które wskazują na związek między nieprawidłową ekspresją genu AID i nowotworami żołądka oraz wątroby. Wspomniana grupa badaczy wykazała, że zakażenie błony śluzowej żołądka bakterią *H. pylori*, która może być odpowiedzialna za indukcję raka żołądka, prowadzi do nadmiernej syntezy AID (Ryc. 4). Z kolei taka produkcja AID powiązana jest z dużą liczbą mutacji genu *p53* w komórkach nabłonkowych, a efekt ten zniknął po wyciszeniu genu AID za pomocą odpowiedniego siRNA. Co ciekawe, takie mutacje wykryto w guzie już we wczesnych fazach rozwoju raka żołądka. Jak stwierdzono, ekspresja genu AID była zależna od aktywacji czynnika NF κ B i indukcji prozapalnych cytokin. W ostatnich latach znacznie wzrosła nasza wiedza dotycząca roli i znaczenia indukowanych stanów zapalnych w procesie kancerogenezy [70]. Cytowani autorzy zaproponowali dość intrygujący model, który wskazuje na nowe czynniki wiążące stany zapalne z kancerogenezą. W wyniku zakażenia *H. pylori* dochodzi do wydzielania prozapalnych cytokin (TNF-1 α , IL-1 β), które mogą decydować o przeniesieniu NF κ B do jądra komórkowego i przyłączeniu się do DNA, co z kolei może bezpośrednio odpowiadać za ekspresję genu AID w docelowych komórkach. Nieprawidłowa ekspresja genu AID, pro-



Rycina 4. Wpływ bakterii *H. pylori* na ekspresję genu kodującego AID. W wyniku zakażenia *H. pylori* dochodzi do wydzielania prozapalnych cytokin (TNF-1 α , IL-1 β), które mogą decydować o przeniesieniu czynnika NF κ B do jądra komórkowego i przyłączeniu się do DNA, co z kolei może bezpośrednio odpowiadać za ekspresję genu AID w komórkach docelowych (komórki nabłonkowe żołądka). Nieprawidłowa ekspresja genu AID, prowadząca do syntezy białka deaminazy, może powodować hipermutacje w niektórych genach, takich jak np. p53. Na podstawie [69], zmienione.

wadząca do syntezy białka deaminazy, powodowałaby hipermutację w niektórych genach, takich jak *p53* (Ryc. 4). Potwierdzeniem przedstawionego powyżej modelu są wyniki badań, w których wykazano indukcję ekspresji genu AID w kulturach hodowlanych hepatocytów człowieka [68]. Podobnie jak w przypadku komórek nabłonkowych żołądka, indukcja AID powiązana była ze szlakiem sygnalizacyjnym NF κ B i wydzielaniem prozapalnych cytokin. Jednak w tym przypadku nieprawidłowa ekspresja genu AID prowadziła do gromadzenia mutacji w genach *c-myc* i *pim*.

Konstytutywną ekspresję genu AID związaną z mutacjami genu *c-myc*, wykryto w chłoniakach wywodzących się z limfocytów T. Taki sam typ ekspresji w limfocytach B prowadzi do rozwoju chłoniaków niezłaznowych i białaczki limfatycznej przewlekłej [71].

Warto także zauważyć, że nieprawidłową ekspresję genów innych deaminaz cytozyny (APOBEC3G) stwierdzono w przypadku pacjentów z nowotworami, takimi jak gruczolakorak i chłoniak Burkitta [71].

UWAGI KOŃCOWE

Deaminacja cytozyny w DNA ssaków jest jedynym, jak do tej pory poznany, zaprogramowany mechanizm, w wyniku którego zostaje zmienione znaczenie kodu genetycznego przez zamierzoną modyfikację jednej z jego liter.

Mimo prawie dziesięciu lat, jakie upływają od czasu odkrycia AID i potwierdzonej roli uracylu w procesie różnicowania przeciwciał, wiele kluczowych dla tego procesu zagadnień pozostaje nadal nierozstrzygniętych. Niewyjaśniona zostaje, sygnalizowana powyżej, kwestia wykorzystania naprawy DNA na drodze BER i MMR, które charakteryzuje wysoka wierność naprawy i odpowiedzialność za utrzymanie stabilności genomu, z powstawaniem zmian mutacyjnych w aktywowanych limfocytach B. Hipoteza tłumacząca tą pozorną sprzeczność ekspresją genów białek uczestniczących w usuwaniu uracylu indukowanego AID w fazach cyklu komórkowego niezwiązanych z replikacją, nie ma jeszcze wystarczających dowodów eksperymentalnych.

Jednym z ciekawszych pytań, wciąż pozostających bez odpowiedzi, jest to, w jaki sposób tak duża liczba mutacji jest indukowana w niewielkim regionie genu Ig, podczas gdy pozostała część tego genu i innych, które w aktywowanych limfocytach B ulegają w tym czasie ekspresji jest w znacznym stopniu od mutacji wolna. Z drugiej strony, wyniki ostatnich badań sugerują, że obocznym skutkiem aktywacji AID mogą być mutacje w innych genach limfocytów B [72,73]. To z kolei rodzi następne pytanie dotyczące rzeczywistej ilości genomowych uszkodzeń indukowanych podczas aktywacji limfocytów B. Jak się wydaje, liczba takich uszkodzeń obecnych w innych niż gen Ig częściach genomu, może być znacząca [66,74,75].

Jak zaznaczono powyżej, w komórce człowieka w przeciągu doby około 100 do 500 cząsteczek cytozyny może zostać spontanicznie przekształconych w uracyl, a większa liczba cząsteczek uracylu może być do DNA włączana podczas replikacji. W związku z tym rodzi się kolejne istotne, pozostające nadal bez odpowiedzi pytanie, czy i ewentualnie, w jaki sposób takie uszkodzenia są rozróżniane od tych indukowanych działaniem AID. Są to znaczące kwestie, ponieważ dla prawidłowego funkcjonowania limfocytu B z jednej strony powinny zachodzić procesy różnicowania (a więc i hipermutacje w rejonie V genu Ig), z drugiej zaś strony pozostała część genomu musi charakteryzować wysoka stabilność, niezbędna do tworzenia potomnych komórek (plazmocytów), wyspecjalizowanych w wydzielaniu specyficznych immunoglobulin.

Jakiegokolwiek zakłócenie kontroli tych procesów może bezpośrednio prowadzić do rozwoju chłoniaków wywodzących się z limfocytów B (ang. *B cells lymphoma*).

Pojawiający się w genomie, w miejscu cytozyny, uracyl jest jednym z najbardziej pierwotnych uszkodzeń DNA. Wydaje się, że w przebiegu ewolucji układ immunologiczny człowieka i innych kręgowców „wykorzystał” obecność uracylu, gromadząc takie potencjalne uszkodzenie we własnym genomie, co prowadzi do różnicowania przeciwciał lub w genomach atakujących komórkę wirusów, w celu ich skutecznej eliminacji.

Niestety, ponieważ gen AID, ale także geny innych białek z rodziny APOBEC, mogą ulegać niewłaściwej ekspresji i wprowadzać zmiany mutacyjne w wielu sekwencjach DNA, można zakładać, że dodatkowym, ubocznym kosztem jaki organizm płaci za wyrafinowane procesy różnicowania przeciwciał i możliwość kontroli rozwoju retrowirusów, może być zwiększone ryzyko pojawienia się zmian prowadzących do kancerogenezy.

Powszechnie akceptowaną obecnie hipotezą jest, że pierwotnym materiałem genetycznym na Ziemi był RNA. W związku z tym, do końca nie jest jasne, dlaczego w trakcie ewolucji uracyl został zastąpiony w DNA przez tyminę. Jedno z prawdopodobnych założeń jest takie, że w trakcie ewolucji tymina zastąpiła uracyl w DNA w parach z adeniną, aby zapobiec mutagennym skutkom spontanicznej deaminacji cytozyny. Powstający w tym procesie uracyl może być wtedy rozpoznany jako „uszkodzenie” i usuwany przez odpowiednie glikozylazy. Wspomniany powyżej fag PBS2 byłby więc pierwotnym „reliktem ewolucji”. W tym kontekście ciekawa wydaje się hipoteza zakładająca regulacyjną funkcję uracylu w parach A:U. Sekwencje bogate w pary A:T (ang. „A-tracts”) mogą mieć wpływ na ekspresję genetyczną [76], formowanie nukleosomów i mogą odpowiadać za połączenia z macierzą jądrową. Zastąpienie tyminy uracylem w sekwencjach bogatych w pary A:T może wpływać zarówno na rozpoznanie tych sekwencji przez czynniki transkrypcyjne [76], jak i na stabilność helisy DNA (obecność grupy metylowej reszty tyminy stabilizuje oddziaływania warstwowe w DNA) [1]. W związku z tym można założyć, że obecność uracylu w miejscu tyminy mogłaby wpływać na funkcje genomu.

PIŚMIENNICTWO

1. Warmlander S, Sponer JE, Sponer J, Leijon M (2002) The influence of the thymine C5 methyl group on spontaneous base pair breathing in DNA. *J Biol Chem* 277: 28491-28497
2. Krokan H.E, Nilsen H, Skorpen F, Otterlei M, Slupphaug G (2000) Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett* 476: 73-77
3. Kavli B, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE (2007) Uracil in DNA-general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair (Amst)* 6: 505-516
4. Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Davidson NO, Honjo T (1999) Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* 274: 18470-18476
5. Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715
6. Traut TW (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* 140: 1-22
7. Friedberg EC, Walker GC, Siede W (1995) DNA repair and mutagenesis, ASM Press, Washington, DC
8. Goulian M, Bleile B, Tseng BY (1980) The effect of methotrexate on levels of dUTP in animal cells. *J Biol Chem* 255: 10630-10637
9. Andersen S, Heine T, Sneve R, Konig I, Krokan HE, Epe B, Nilsen H (2005) Incorporation of dUMP into DNA is a major source of spontaneous DNA damage, while excision is not required for cytotoxicity of fluoropyrimidines in mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis* 26: 547-555
10. Melnyk S, Pogribna M, Miller BJ, Basnakian AG, Pogribny IP, James SJ (1999) Uracil misincorporation, DNA strand breaks, and gene amplification are associated with tumorigenic cell transformation in folate deficient/repleted Chinese hamster ovary cells. *Cancer Lett* 146: 35-44
11. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN (1997) Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3290-3295
12. Mashiyama ST, Hansen CM, Roitman E, Sarmiento S, Leklem JE, Shultz TD, Ames BN (2008) An assay for uracil in human DNA at baseline: effect of marginal vitamin B6 deficiency. *Anal Biochem* 372: 21-31
13. Bellamy SR, Baldwin GS (2001) A kinetic analysis of substrate recognition by uracil-DNA glycosylase from herpes simplex virus type 1. *Nucleic Acids Res* 29: 3857-3863
14. Slupphaug G, Eftedal I, Kavli B, Bharati S, Helle NM, Haug T, Levine DW, Krokan HE (1995) Properties of a recombinant human uracil-DNA glycosylase from the UNG gene and evidence that UNG encodes the major uracil-DNA glycosylase. *Biochemistry* 34: 128-138
15. Ko R, Bennett SE (2005) Physical and functional interaction of human nuclear uracil-DNA glycosylase with proliferating cell nuclear antigen. *DNA Repair (Amst)* 4: 1421-1431
16. Scaramozzino N, Sanz G, Crance JM, Sagarbaev M, Drillien R, Laval J, Kavli B, Garin D (2003) Characterisation of the substrate specificity of homogeneous vaccinia virus uracil-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* 31: 4950-4957
17. Gedik CM, Collins A (2005) Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB J* 19: 82-84
18. Champeil P, Brahm J (2008) Conformational properties of some viral DNAs. *Eur J Biochem* 45: 253-259
19. Price AR, Cook SJ (1972) New deoxyribonucleic acid polymerase induced by *Bacillus subtilis* bacteriophage PBS2. *J Virol* 9: 602-610
20. Hitzeman RA, Price AR (1978) *Bacillus subtilis* bacteriophage PBS2-induced DNA polymerase. Its purification and assay characteristics. *J Biol Chem* 253: 8518-8525
21. Barnes DE, Lindahl T (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 38: 445-476
22. Peled JU, Kuang FL, Iglesias-Ussel MD, Roa S, Kalis SL, Goodman MF, Scharff MD (2008) The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* 26: 481-511
23. Blanc V, Kennedy S, Davidson NO (2003) A novel nuclear localization signal in the auxiliary domain of apobec-1 complementation factor regulates nucleocytoplasmic import and shuttling. *J Biol Chem* 278: 41198-41204
24. Hagen L, Pena-Diaz J, Kavli B, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE (2006) Genomic uracil and human disease. *Exp Cell Res* 312: 2666-2672
25. Bachl J, Carlson C, Gray-Schopfer V, Dessing M, Olsson C (2001) Increased transcription levels induce higher mutation rates in a hypermutating cell line. *J Immunol* 166: 5051-5057
26. Nambu Y, Sugai M, Gonda H, Lee CG, Katakai T, Agata Y, Yokota Y, Shimizu A (2003) Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* 302: 2137-2140
27. Samaranyake M, Bujnicki JM, Carpenter M, Bhagwat AS (2006) Evaluation of molecular models for the affinity maturation of antibodies: roles of cytosine deamination by AID and DNA repair. *Chem Rev* 106: 700-719
28. Di Noia JM, Neuberger MS (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76: 1-22
29. Harris RS, Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS (2002) RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Mol Cell* 10: 1247-1253
30. Harris RS, Liddament MT (2004) Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* 4: 868-877
31. Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS (2003) In vitro deamination of cytosine to uracil in single-stranded DNA by apolipoprotein B editing complex catalytic subunit 1 (APOBEC1). *J Biol Chem* 278: 19583-19586
32. *Immunol Rev* (1998) 162: (caty Tom)
33. Neuberger MS, Milstein C (1995) Somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol* 7: 248-254
34. Rajewsky K (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381: 751-758

35. Longrich S, Basu U, Alt F, Storb U (2006) AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *Curr Opin Immunol* 18: 164-174
36. Krokan HE, Otterlei M, Nilsen H, Kavli B, Skorpen F, Andersen S, Skjelbred C, Akbari M, Aas PA, Slupphaug G (2001) Properties and functions of human uracil-DNA glycosylase from the UNG gene. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68: 365-386
37. Dizdaroglu M, Karakaya A, Jaruga P, Slupphaug G, Krokan HE (1996) Novel activities of human uracil DNA N-glycosylase for cytosine-derived products of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 24: 418-422
38. Nilsen H, Otterlei M, Haug T, Solum K, Nagelhus TA, Skorpen F, Krokan HE (1997) Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene. *Nucleic Acids Res* 25: 750-755
39. Akbari M, Otterlei M, Pena-Diaz J, Aas PA, Kavli B, Liabakk NB, Hagen L, Imai K, Durandy A, Slupphaug G, Krokan HE (2004) Repair of U/G and U/A in DNA by UNG2-associated repair complexes takes place predominantly by short-patch repair both in proliferating and growth-arrested cells. *Nucleic Acids Res* 32: 5486-5498
40. Kavli B, Andersen S, Otterlei M, Liabakk NB, Imai K, Fischer A, Durandy A, Krokan HE, Slupphaug G (2005) B cells from hyper-IgM patients carrying UNG mutations lack ability to remove uracil from ssDNA and have elevated genomic uracil. *J Exp Med* 201: 2011-2021
41. Nilsen H, Haushalter KA, Robins P, Barnes DE, Verdine GL, Lindahl T (2001) Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: role of the SMUG1 uracil-DNA glycosylase. *EMBO J* 20: 4278-4286
42. An Q, Robins P, Lindahl T, Barnes DE (2007) 5-Fluorouracil incorporated into DNA is excised by the Smug1 DNA glycosylase to reduce drug cytotoxicity. *Cancer Res* 67: 940-945
43. Hardeland U, Kunz C, Focke F, Szadkowski M, Schar P (2007) Cell cycle regulation as a mechanism for functional separation of the apparently redundant uracil DNA glycosylases TDG and UNG2. *Nucleic Acids Res* 35: 3859-3867
44. Sliwinski T, Blasiak J (2005) Base excision repair. *Postepy Biochem* 51: 120-129
45. Imai K, Slupphaug G, Lee WI, Revy P, Nonoyama S, Catalan N, Yel L, Forveille M, Kavli B, Krokan HE, Ochs HD, Fischer A, Durandy A (2003) Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol* 4: 1023-1028
46. Schrader CE, Linehan EK, Mochegova SN, Woodland RT, Stavnezer J (2005) Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. *J Exp Med* 202: 561-568
47. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE (2008) Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 26: 261-292
48. Frey S, Bertocci B, Delbos F, Quint L, Weill JC, Reynaud CA (1998) Mismatch repair deficiency interferes with the accumulation of mutations in chronically stimulated B cells and not with the hypermutation process. *Immunity* 9: 127-134
49. Phung QH, Winter DB, Cranston A, Tarone RE, Bohr VA, Fishel R, Gearhart PJ (1998) Increased hypermutation at G and C nucleotides in immunoglobulin variable genes from mice deficient in the MSH2 mismatch repair protein. *J Exp Med* 187: 1745-1751
50. Rada C, Di Noia JM, Neuberger MS (2004) Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol Cell* 16: 163-171
51. Nelson JR, Lawrence CW, Hinkle DC (1996) Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein. *Nature* 382: 729-731
52. Prakash S, Johnson RE, Prakash L (2005) Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem* 74: 317-353
53. Jansen JG, Langerak P, Tsaalbi-Shtylik A, van den Berk P, Jacobs H, de Wind N (2006) Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice. *J Exp Med* 203: 319-323
54. Ross AL, Sale JE (2006) The catalytic activity of REV1 is employed during immunoglobulin gene diversification in DT40. *Mol Immunol* 43: 1587-1594
55. Zeng X, Winter DB, Kasmer C, Kraemer KH, Lehmann AR, Gearhart PJ (2001) DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. *Nat Immunol* 2: 537-541
56. Martomo SA, Yang WW, Vaisman A, Maas A, Yokoi M, Hoeijmakers JH, Hanaoka F, Woodgate R, Gearhart PJ (2006) Normal hypermutation in antibody genes from congenic mice defective for DNA polymerase iota. *DNA Repair (Amst)* 5: 392-398
57. Masuda K, Ouchida R, Hikida M, Nakayama M, Ohara O, Kurosaki T, Wang J (2006) Absence of DNA polymerase theta results in decreased somatic hypermutation frequency and altered mutation patterns in Ig genes. *DNA Repair (Amst)* 5: 1384-1391
58. Larson ED, Cummings WJ, Bednarski DW, Maizels N (2005) MRE11/RAD50 cleaves DNA in the AID/UNG-dependent pathway of immunoglobulin gene diversification. *Mol Cell* 20: 367-375
59. Martin SW, Goodnow CC (2002) Burst-enhancing role of the IgG membrane tail as a molecular determinant of memory. *Nat Immunol* 3: 182-188
60. Fortini P, Dogliotti E (2007) Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)* 6: 398-409
61. Arakawa H, Moldovan GL, Saribasak H, Saribasak NN, Jentsch S, Buerstedde JM (2006) A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation. *PLoS Biol* 4: e366
62. Bachl J, Ertongur I, Jungnickel B (2006) Involvement of Rad18 in somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12081-12086
63. Langerak P, Nygren AO, Krijger PH, van den Berk PC, Jacobs H (2007) A/T mutagenesis in hypermutated immunoglobulin genes strongly depends on PCNAK164 modification. *J Exp Med* 204: 1989-1998
64. Simpson LJ, Ross AL, Szuts D, Alviani CA, Oestergaard VH, Patel KJ, Sale JE (2006) RAD18-independent ubiquitination of proliferating-cell nuclear antigen in the avian cell line DT40. *EMBO Rep* 7: 927-932
65. Poltoratsky V, Prasad R, Horton JK, Wilson SH (2007) Down-regulation of DNA polymerase beta accompanies somatic hypermutation in human BL2 cell lines. *DNA Repair (Amst)* 6: 244-253
66. Faili A, Aoufouchi S, Gueranger Q, Zober C, Leon A, Bertocci B, Weill JC, Reynaud CA (2002) AID-dependent somatic hypermutation occurs as a DNA single-strand event in the BL2 cell line. *Nat Immunol* 3: 815-821
67. Okazaki IM, Hiai H, Kakazu N, Yamada S, Muramatsu M, Kinoshita K, Honjo T (2003) Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J Exp Med* 197: 1173-1181
68. Endo Y, Marusawa H, Kinoshita K, Morisawa T, Sakurai T, Okazaki IM, Watashi K, Shimotohno K, Honjo T, Chiba T (2007) Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF-kappaB signaling. *Oncogene* 26: 5587-5595
69. Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T, Morisawa T, Azuma T, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T (2007) Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med* 13: 470-476
70. Moss SF, Blaser MJ (2005) Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2: 90-97
71. Cascalho M (2004) Advantages and disadvantages of cytidine deamination. *J Immunol* 172: 6513-6518
72. Parsa JY, Basit W, Wang CL, Gommerman JL, Carlyle JR, Martin A (2007) AID mutates a non-immunoglobulin transgene independent of chromosomal position. *Mol Immunol* 44: 567-575
73. Wang CL, Harper RA, Wabl M (2004) Genome-wide somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7352-7356
74. Okazaki IM, Kotani A, Honjo T (2007) Role of AID in tumorigenesis. *Adv Immunol* 94: 245-273

75. Ranuncolo SM, Polo JM, Dierov J, Singer M, Kuo T, Greally J, Green R, Carroll M, Melnick A (2007) Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. *Nat Immunol* 8: 705-714

76. Pu WT, Struhl K (1992) Uracil interference, a rapid and general method for defining protein-DNA interactions involving the 5-methyl group of thymines: the GCN4-DNA complex. *Nucleic Acids Res* 20: 771-775

Uracil in DNA – friend or foe?

Ryszard Oliński[✉], Marek Jurgowiak

Department of Clinical Biochemistry, *Collegium Medicum*, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 24 Karłowicza St., 85-092 Bydgoszcz, Poland

[✉]e-mail: ryszardo@cm.umk.pl

Key words: uracil, DNA repair, activation induced cytidine deaminase (AID), somatic hypermutation (SHM), Ig diversification process, carcinogenesis

ABSTRACT

Uracil may arise in DNA, in small quantities as a result of spontaneous cytosine deamination or/and misincorporation of dUMP during DNA replication. However, just recently uracil formation *via* enzymatic deamination of cytosine, has been found to underlies diversification of Ig genes and inhibition of retroviral infection. DNA deamination is the only known programme in mammalian development in which the coding capacity of the genome is changed by targeted modification of deoxycytidine. In this paper we will review: i/ sources of the origin of uracil in DNA, ii/ the function of activation induced cytidine deaminase (AID) the enzyme which is responsible for cytidine deamination in Ig genes of B cell clones iii/ some properties of the enzymes responsible for the excision of uracil. The role of uracil and above mentioned enzymes in Ig diversification process, which comprises somatic hypermutation and class switch recombination will also be discussed. Finally, we will discuss possible involvement of aberrantly expressed AID and presence of uracil in DNA, in carcinogenesis.

Konkurs o nagrodę im. Antoniego Dmochowskiego za osiągnięcia w nauczaniu biochemii, biologii molekularnej i biotechnologii

Polskie Towarzystwo Biochemiczne organizuje konkurs za szczególne osiągnięcia w nauczaniu biochemii, biologii molekularnej i biotechnologii. O nagrodę mogą ubiegać się autorzy podręczników, skryptów, cykli publikacji naukowych poświęconych dydaktyce, a także opublikowanych opracowań programów pracowni eksperymentalnych uwzględniających nowoczesne metody i najnowsze osiągnięcia w tych dyscyplinach. Prace przedstawione do nagrody powinny obejmować ostatnie dwa lata przed rokiem przystąpienia do konkursu. W przypadku cykli publikacji, co najmniej jedna praca powinna ukazać się w ciągu tego okresu.

Zgłoszenia w formie listu przewodniego z dołączonym jednym egzemplarzem pracy należy przesyłać pocztą w nieprzekraczalnym terminie do 15 maja 2009 r. (decyduje data stempla pocztowego) z dopiskiem („Nagroda Dmochowskiego”) na adres:

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
dr hab. Beata Olas, prof. nadzw. UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź

Uroczyste wręczenie Nagrody odbędzie się na Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Łodzi we wrześniu 2009 r.

Więcej informacji dotyczących regulaminu konkursu można uzyskać na stronie internetowej Polskiego Towarzystwa Biochemicznego: www.ptbioch.edu.pl

Naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców – nowe białka, nowe funkcje, nowe mechanizmy

Tomasz Popławski

Ewelina Stoczyńska

Janusz Błasiak✉

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

✉Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel.: (042) 635 43 34, faks: (042) 635 44 84, e-mail: janusz.b@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 17 lipca 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 21 stycznia 2009 r.

Słowa kluczowe: naprawa DNA, NHEJ, rekombinacja V(D)J, Ku70/80, Artemis, Cernunnos, DNA-PK_{CS}

Wykaz skrótów: 53BP1 – białko wiążące p53; ATM – białko kodowane przez gen zmutowany w syndromie *Ataxia teleangiectasia*; BRCA1, 2 – białka podatności na raka piersi; BRCT – domena powtórzeń C-końcowych BRCA1; DNA-PK_{CS} – podjednostka katalityczna kinazy białkowej zależnej od DNA; DSBs – dwuniciowe pęknięcia DNA; EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu; H2AX i γ -H2AX – wariant histonu H2A i jego fosforylowana postać; hPNK – kinaza polinukleotydowa człowieka; HRR – naprawa DNA przez rekombinację homologiczną; Lig4 – podjednostka katalityczna ligazy DNA IV; MDC1 – mediator uszkodzeń DNA w punkcie kontrolnym 1; NHEJ – naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców; NLS – sygnał lokalizacji jądrowej; MRN – kompleks MRE11/RAD50/NBS1; PIKKs – kinazy białkowe spokrewnione z kinazami fosfatydylo-3-inzytolu; SSA – naprawa DNA przez dopasowanie fragmentów jednoniciowych; WRN – białko zespołu Wernera

Podziękowanie: Autorzy dziękują Paniom mgr Monice Kicińskiej i Annie Łuczynskiej za pomoc w sporządzeniu rycin

STRESZCZENIE

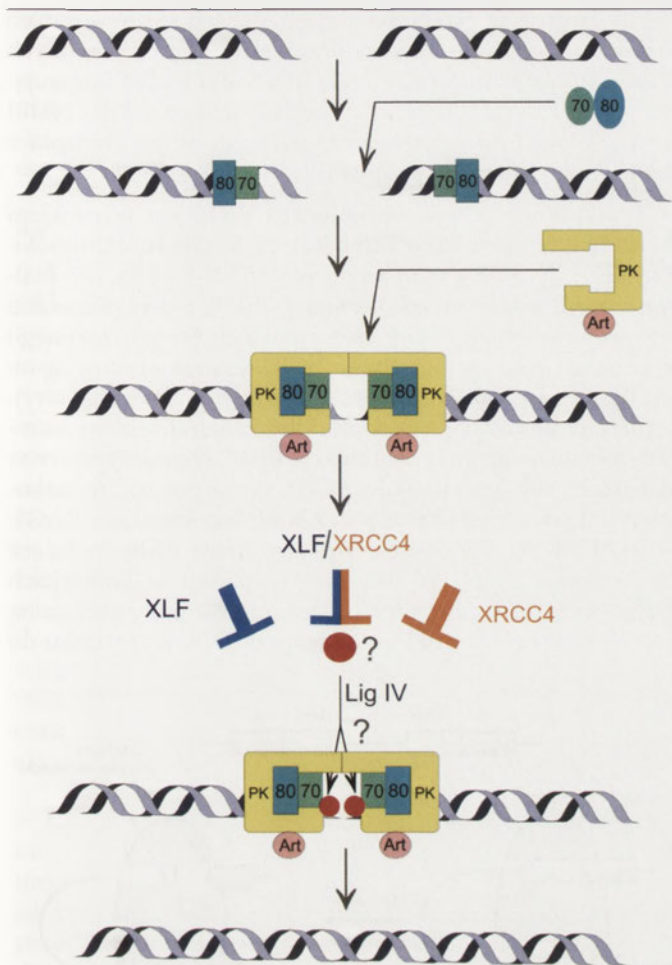
U człowieka naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ) jest podstawowym szlakiem naprawy pęknięć dwuniciowych DNA (DSBs), które mogą stanowić zagrożenie dla życia komórki. W NHEJ następuje bezpośrednie połączenie końców fragmentów DNA powstałych wskutek DSBs. System ten odgrywa kluczową rolę w rozwoju układu odpornościowego u kręgowców, poprzez udział w rekombinacji V(D)J. W klasycznym szlaku NHEJ u kręgowców uczestniczy kompleks białek Ku, podjednostka katalityczna kinazy białkowej zależnej od DNA (DNA-PK_{CS}), Artemis, Cernunnos-XLF i kompleks XRCC4/ligaza DNA IV. Klasyczny NHEJ może być jeszcze wspomagany przez polimerazy DNA μ i λ . Ostatnie dwa lata przyniosły nowe informacje dotyczące białek, funkcji i znaczenia tego szlaku naprawy DNA. W 2006 roku odkryte zostało białko Cernunnos-XLF, mające zasadnicze znaczenie w NHEJ. Zostały także opisane szlaki, w których nie uczestniczą wszystkie kluczowe białka klasycznego NHEJ, za to pojawiają się inne czynniki, takie jak BRCA1, 53BP1, hPNK, WRN czy MDC1. Wyniki dotychczas wykonanych badań sugerują, że nie wszystkie kluczowe elementy NHEJ i mechanizmy jej działania zostały już zidentyfikowane. Dalszych badań wymaga określenie roli tego systemu naprawy DNA w procesach starzenia, transformacji nowotworowej, rozwoju systemu odpornościowego i podstawowym metabolizmie.

WPROWADZENIE

Dwuniciowe pęknięcia DNA (DSBs) są najpoważniejszymi uszkodzeniami DNA, które, jeżeli nie będą naprawione lub zostaną „naprawione” błędnie, mogą zagrażać życiu komórki. Niekiedy jedno nienaprawione takie pęknięcie może powodować włączenie programowanej śmierci komórki. U wyższych eukariontów DSBs podlegają naprawie przez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ), rekombinację homologiczną (HRR) i, okazjonalnie, przez dopasowanie fragmentów jednoniciowych (SSA). NHEJ wydaje się być szlakiem naprawy preferencyjnie wykorzystywanym w komórkach ssaków, przynajmniej w fazach cyklu komórkowego G₀, G₁ i późnej S. [1]. Może to być uwarunkowane tym, że genomy ssaków zawierają w większości sekwencje powtórzone, co powoduje, że, za wyjątkiem fazy S, wybór partnera homologii w szlaku HRR może być utrudniony. Może to prowadzić do *crossing-over* podczas naprawy, skutkującego często białkami promującymi transformację nowotworową. Podstawowy mechanizm NHEJ wydaje się prosty: przygotowanie końców uszkodzonego DNA do ligacji i sama ligacja. Jednoznaczny mógłby się wydawać również dobór „głównych aktorów na scenie NHEJ”: kompleks białek Ku, podjednostka katalityczna kinazy białkowej zależnej od DNA (DNA-PK_{CS}), Artemis, Cernunnos-XLF i kompleks XRCC4/ligaza DNA IV. Wyniki badań przeprowadzonych w ostatnich latach jednoznacznie wskazują, że NHEJ może przebiegać poprzez różne szlaki, zależne od tylko niektórych z tych białek i z udziałem białek dodatkowych. Szlaki te określa się jako „alternatywny NHEJ”. Ponadto, regulacja NHEJ, przynajmniej w niektórych jej etapach, wydaje się być jeszcze słabo poznana. Wreszcie, mechanizm wyboru pomiędzy NHEJ i HRR, przede wszystkim w fazach cyklu komórkowego: późnej S i G₂, jest prawie nieznan. Dlatego celowe wydaje się bliższe spojrzenie na przebieg alternatywnych szlaków NHEJ i kwestie ich regulacji. Rozważania będą dotyczyły NHEJ u kręgowców, gdyż u drożdży, roślin i bezkręgowców naprawa ta przebiega nieco inaczej ze względu na brak DNA-PK_{CS} lub białka Artemis. Przynajmniej w części tych organizmów aktywność nukleazowa może być przypisana do kompleksu Rad50/Mre11/Xrs2, odpowiednika kompleksu MRE11/RAD50/NBS1 (MRN) u człowieka [2].

KLASYCZNA NHEJ

Obecnie można rozważać 7 głównych składników białkowych NHEJ: heterodimer Ku70 i Ku86 (znanego również jako Ku80, faktycznie Ku83), DNA-PK_{CS}, Artemis, Cernunnos-XLF i kompleks ligazy IV/XRCC4. Heterodimer Ku



Rycina 1. Klasyczna naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców. 70 i 80 – białka, odpowiednio, Ku70 i Ku80, PK – podjednostka katalityczna kinazy białkowej zależnej od DNA (DNA-PK_{cs}), Art – białko Artemis, XLF – białko Cernunnos-XLF, Lig IV – ligaza DNA IV.

łączy się z końcami DNA i rekrutuje DNA-PK_{cs}, która jest kinazą serynowo-treoninową. DNA-PK_{cs} tworzy kompleks funkcjonalny z białkiem Artemis, mającym wewnętrzną aktywność egzonukleazy 5' → 3'. DNA-PK_{cs} fosforyluje i stymuluje aktywność endonukleolityczną Artemis, co pozwala temu białku nacinać struktury drugorzędowe, w tym struktury szpilki do włosów. Artemis, wykazujące po fosforylacji aktywność zarówno egzo-, jak i endonukleazy, może przygotowywać końce DNA do ligacji. Ligacja jest specyficzna dla NHEJ i przeprowadzana jest przez kompleks ligaza IV/XRCC4 przy udziale białka Cernunnos, znanego także jako XLF (ang. *XRCC4-like factor*) lub XLF/Cernunnos.

Większość DSBs w komórkach kręgowców może być usuwana przez NHEJ zależną od DNA-PK_{cs}, obejmującą co najmniej trzy zasadnicze czynniki: Ku70/80, DNA-PK_{cs}/Artemis, ligazę IV/XRCC4, wspomaganą przez Cernunnos-XLF i charakteryzującą się szybką kinetyką reakcji naprawczej ($t_{1/2}$ 5-30 min) [3]. Szlak ten, dla zaznaczenia jego zależności od DNA-PK_{cs}, nazywa się czasem D-NHEJ. Gdy szlak ten ulegnie inaktywacji, komórki ciągle mogą naprawiać DSBs przez alternatywną, niezależną od DNA-PK_{cs}, NHEJ, charakteryzującą się wolniejszą kinetyką ($t_{1/2}$ 2-20 h), skłoną do błędów i nazywaną niekiedy B-NHEJ (ang. *backup-NHEJ*) [4]. W szlaku tym może występować ligaza DNA III w połączeniu z polimerazą poli(ADP-ry-

bozy)-1 (PARP-1) i białkiem XRCC1, tworząc kompleks PARP-1/XRCC1/ligaza DNA III. Kompleks ten może brać także udział w naprawie pęknięć jednoniciowych [5]. Przebieg klasycznej reakcji NHEJ jest przedstawiony na rycinie 1. D-NHEJ działa efektywnie we wszystkich fazach cyklu komórkowego, z niewielkimi fluktuacjami aktywności pomiędzy G1, S i G2 [6]. Większe różnice można obserwować pomiędzy efektywnością D-NHEJ w komórkach w fazie intensywnego wzrostu i fazie stacjonarnej. Wyniki niektórych badań sugerują, że istnieje bezpośredni związek pomiędzy stanem wzrostu i naprawą DSBs, poprzez udział receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) w szlaku sygnalizacji aktywności DNA-PK_{cs} [7]. Związek pomiędzy stanem wzrostu i D-NHEJ nasuwa pytanie czy związek taki istnieje także dla B-NHEJ. Odpowiedź na to pytanie brzmi: tak, i doświadczalne świadectwa tego związku należy uznać za nie budzące wątpliwości, jednakże mechanizm leżący u jego podstaw jest jeszcze nieznan.

NHEJ A REKOMBINACJA V(D)J

Podstawowym zadaniem systemu odpornościowego człowieka jest identyfikacja oraz likwidacja patogenów wnikających do jego organizmu, które mają miejsce w wyniku odpowiedzi niespecyficznego lub specyficznego (adaptacyjnego). Limfocyty B oraz T odpowiadają za odpowiedź adaptacyjną usuwając patogeny z organizmu człowieka przez związanie ich z receptorami znajdującymi się na ich powierzchni. Różnorodność tych receptorów, pozwalająca na usunięcie możliwie jak największej liczby różnorodnych patogenów, jest uzyskiwana w procesie rekombinacji V(D)J.

Rekombinacja V(D)J zachodzi w szpiku kostnym oraz grasicy i jest procesem koniecznym do produkcji dojrzałych limfocytów. Proces ten polega na łączeniu segmentów zmiennego V (ang. *variable*), różnorodnego D (ang. *diversity*) oraz łącznikowego J (ang. *joining*) genów kodujących białka receptorowe. Segmenty te występują w genomie człowieka w dużej ilości kopii i są położone powyżej części stałej C (ang. *constant*) tych genów. Rekombinację V(D)J można zdefiniować jako typową, dwuetapową reakcję typu „wytnij i wklej”. W pierwszym etapie w cząsteczce DNA powstają pęknięcia dwuniciowe w miejscu występowania sekwencji sygnałowych RSS (ang. *recombination signal sequences*), które następnie są naprawiane przez NHEJ. Sekwencje RSS znajdują się powyżej oraz poniżej każdego segmentu V, D oraz J. Składają się one z dwóch sekwencji ściśle zdefiniowanych o długości 7 (CACAGTG) i 9 (ACAAAACC) par zasad rozdzielonych fragmentem DNA o wielkości 12 lub 23 pz o niespecyficznego sekwencji.

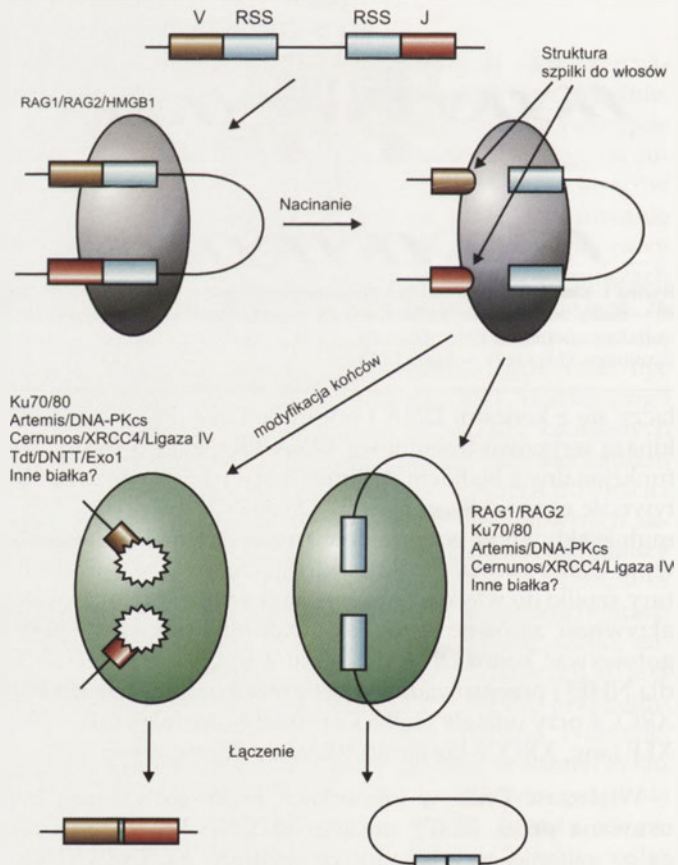
Rekombinacja V(D)J jest zapoczątkowywana przez białka RAG1, RAG2 oraz HMGB1. Białka te tworzą kompleks przecinający nić DNA na końcu sekwencji RSS przylegających do segmentów V i J lub D i J. Efektywna rekombinacja zachodzi tylko pomiędzy sekwencjami RSS zawierającymi 12- i 23-nukleotydowe sekwencje przedzielające. Przecięcie nici przez kompleks zbudowany z białek RAG1: RAG2:HMGB1 powoduje powstanie końca DNA 3' z grupą hydroksylową i 5' z resztą fosforanową, przy czym koniec 3' znajduje się zawsze po stronie segmentu V, D lub J [8]. Grupa hydroksylowa na zakończeniu nici DNA 3' bierze

udział w ataku nukleofilowym prowadzonym przez kompleks białkowy RAG1:RAG2:HMGB1 na komplementarną nić DNA, w wyniku którego dochodzi do wytworzenia na końcach DNA zawierających segmenty kodujące V, D lub J struktury szpilki do włosów oraz tępych zakończeń fragmentu DNA otoczonego przez sekwencje sygnałowe RSS. Struktury szpilki do włosów są rozcinane przez kompleks białkowy Artemis:DNA-PKcs [9], a powstałe w ten sposób końce DNA są modyfikowane w celu zapewnienia jak największej różnorodności receptorów (Ryc. 2). Modyfikacje mogą polegać na usunięciu sekwencji (delecja), wstawieniu nowej sekwencji (insercja) lub podwojeniu sekwencji palindromowej (duplikacja). Do tej pory zidentyfikowano jedynie kilka elementów białkowych uczestniczących w tym procesie: transferazy TdT i DNNT, polimerazy po μ i λ , egzonukleaza Exo1 [10-12]. Ze względu na szeroki wachlarz modyfikacji końców segmentów kodujących, wydaje się, że w procesie tym bierze udział znacznie więcej białek. Segmenty kodujące po modyfikacji końców 3' są następnie łączone z udziałem białek Ku oraz kompleksu Cernunos-XLF:XRCC4:ligaza IV DNA [13]. Te same białka biorą udział w łączeniu segmentów sygnałowych, przy czym różnica pomiędzy łączeniem segmentów kodujących a sygnałowych polega na tym, że te ostatnie nie ulegają modyfikacji, a proces ich łączenia trwa znacznie dłużej niż proces modyfikacji i łączenia segmentów kodujących.

W rekombinacji V(D)J mogą uczestniczyć również inne białka. Jednym z nich może być H2AX, będący wariantem histonu H2A. Histon ten pełni funkcję sygnałową w komórce i jest fosforylowany w odpowiedzi komórki na pęknięcia dwuniciowe DNA. Fosforylacja H2AX prowadzi do wytworzenia skupisk zawierających H2AX i inne białka naprawy DSBs [14]. Powstawanie skupisk histonu H2AX zaobserwowano w pobliżu pęknięć DNA powstałych z udziałem kompleksu białkowego RAG1:RAG2:HMGB1 w procesie rekombinacji V(D)J [15]. Wyniki tych badań sugerują, że H2AX może brać udział w rekombinacji V(D)J, aczkolwiek myszy pozbawionych białka H2AX nie cechuje fenotyp charakterystyczny dla organizmów z zaburzeniami procesu rekombinacji V(D)J i proces różnicowania limfocytów zachodził u nich prawidłowo [16]. Rekombinacja V(D)J z udziałem zmutowanej wersji białka RAG2 FS361 (przesunięcie ramki odczytu od kodonu 361) przebiegała bez udziału białek biorących udział w klasycznym szlaku NHEJ: DNA-PKcs, Ku i XRCC4 [17]. Wyniki tych badań sugerują, że rekombinacja V(D)J może przebiegać z udziałem alternatywnych szlaków NHEJ, zależnych od XRCC3 i ligazy III DNA. Cechą charakterystyczną dla tak łączonych końców DNA jest obecność w produktach reakcji NHEJ kilkunukleotydu (3-7) sekwencji mikrohomologicznych oraz powstawanie delecji kilkudziesięcionukleotydu (do 35) fragmentów DNA. Jaki jest udział alternatywnych szlaków NHEJ w procesie rekombinacji V(D)J w prawidłowej komórce? Wydaje się, że tylko niewielka część łączonych segmentów kodujących powstaje przy udziale alternatywnych szlaków NHEJ. Ze względu na znacznie większy stopień przekształcania sekwencji nukleotydowej spotykany we fragmentach łączonych przez alternatywne szlaki niż przez klasyczny NHEJ, istnieje większa szansa rearanżacji chromosomalnych, takich jak translokacje, które z kolei mogą prowadzić do transformacji nowotworowej po-

przez zmiany w protoonkogenach, genach supresorowych i mutatorowych, a także poprzez ekspresję onkogennych białek fuzyjnych. Potwierdzają to wyniki badań sugerujące podwyższoną aktywność alternatywnego szlaku NHEJ w komórkach raka pęcherza moczowego w porównaniu z komórkami prawidłowymi [18].

Prawidłowy proces rekombinacji V(D)J jest warunkiem koniecznym do różnicowania komórek układu immunologicznego. U osób z mutacjami w genach kodujących białka biorące udział w rekombinacji V(D)J zidentyfikowano zespół chorobowy znany pod nazwą ciężkiego złożonego niedoboru immunologicznego, SCID. Charakteryzuje się on podatnością na nawracające zakażenia o podłożu bakteryjnym oraz wirusowym i osobniczym zahamowaniem wzrostu. Nieprawidłowa rekombinacja V(D)J, charakterystyczna dla około 30% przypadków SCID, może polegać na zaburzeniu wytwarzania DSBs przez kompleks białkowy RAG1:RAG2:HMGB1 lub też ich naprawy przez białka należące do systemu NHEJ. W drugim przypadku w komórkach pobranych od osób chorych zaobserwowano zwiększoną wrażliwość na czynniki uszkodzające DNA w stosunku do



Rycina 2. Rekombinacja V(D)J RAG1 i RAG2 oraz HMGB1 tworzą kompleks białkowy wiążący się z sekwencją sygnałową rekombinacji (RSS), zawierającą palindromiczny heptamer i nonamer, przedzielone sekwencją sygnałową 12 lub 23 pz. RAG nacina DNA obok heptameru każdej z RSS, które tworzą synapsę, następnie RAG promuje atak grupy OH każdego nacięcia na komplementarną nić, co prowadzi do wytworzenia struktury szpilki do włosów na końcach kodujących segmentów V, D i J. V — segment zmiennej, J — segment łącznikowy. Następnie białka Ku wiążą się z jednym lub obydwoiema końcami kodującymi i promują przyłączenie kompleksu Artemis-DNA-PKcs, co skutkuje odłączeniem kompleksu RAG. Dwa końce sygnałowe mogą ulec połączeniu przez kompleks Cernunos-XLF/XRCC4/ligaza IV bezpośrednio po odłączeniu RAG lub podlegać koniecznym modyfikacjom typowym dla NHEJ z udziałem transferazy deoksyterminalnej (TdT), egzonukleazy 1 (Exo1), kompleksu Artemis-DNA-PKcs oraz polimeraz zależnych od matrycy (μ i λ).

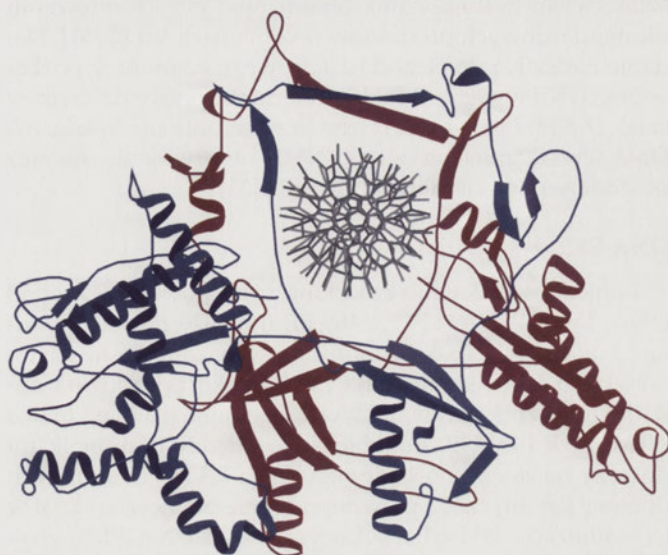
komórek prawidłowych (RS-SCID). Do tej pory zidentyfikowano kilkanaście mutacji warunkujących wystąpienie SCID w genach kodujących białka biorące udział w pierwszej fazie rekombinacji V(D)J RAG1, RAG2 [19] oraz białkach drugiej fazy: Ku [20], Artemis [21], ligazy DNA IV oraz Cernunnos-XLF [22].

Ku

Ku, heterodimer dwóch białek o masie 70 kDa (Ku70) i 83 kDa (Ku80 lub Ku86), wchodzi w skład holoenzymu kinazy białkowej zależnej od DNA (DNA-PK). Kompleks białek Ku został zidentyfikowany po raz pierwszy jako autoantygen rozpoznawany przez przeciwciała u pacjentów z syndromem *scleroderma-polymyositis* [23]. Przeciwciała skierowane przeciw Ku zostały również wykryte u pacjentów cierpiących z powodu różnych chorób autoimmunologicznych. Tworzenie heterodimeru Ku odgrywa kluczową rolę w regulacji fizjologicznej funkcji tego kompleksu *in vivo*, jest konieczne dla naprawy pęknięć dwuniciowych DNA, a także pełni zasadniczą funkcję w aktywacji DNA-PK [24]. Poprzez udział w NHEJ, białko Ku może odgrywać rolę w wielu procesach komórkowych związanych z przekazywaniem informacji genetycznej, transformacją nowotworową oraz regulacją cyklu komórkowego. Ku wykazuje również aktywność ATPazy i helikazy zależnej od DNA [25].

Ku wiąże się z zakończeniami DNA, niezależnie od sekwencji. Przyłączenie Ku jest również niezależne od struktury DNA, może wiązać się zarówno z tępych końcami, jak i jednoniciowymi o polaryzacji zarówno 3', jak i 5'. Po przyłączeniu do końców DNA, Ku może przemieszczać się wzdłuż DNA w sposób niezależny od ATP, przypominając przesuwanie się koralików na sznurku. Krystaliczna struktura Ku, przyłączonego do dwuniciowego DNA, potwierdza brak specyficznej domeny wiązania z DNA. Ku70 i Ku80 formują asymetryczną strukturę przypominającą pierścien z dużym centralnie położonym otworem, przez który jest przesuwany DNA [26] (Ryc. 3). Heterodimer Ku łączy się z DNA, jednakże obszar wiązania nie obejmuje samego zakończenia cząsteczki DNA, czyniąc ją w ten sposób dostępną dla innych białek NHEJ.

Ku70 i Ku80 wykazują podobieństwo strukturalne, choć ich sekwencja aminokwasowa jest zgodna tylko w 14%. W każdej podjednostce można wyróżnić trzy domeny: N-końcową α/β , region centralny o strukturze harmonijki β i helikalną domenę C-końcową. Zarówno domena karboksylowa, jak i aminowa oddziałują *in vitro* z innymi białkami, formując kompleksy napraw DNA. W części aminowej znajduje się domena von Willebranda (vWA), obecna zarówno w Ku70 (aa 37-260), jak i Ku80 (aa 9-235). Domena ta bierze udział w oddziaływaniu z białkami i w wiązaniu się białek Ku ze sobą. Region centralny łączy się niespecyficznym ze szkieletem fosforanowo-cukrowym DNA [25]. Pętla otaczająca dwuniciowy DNA uformowana jest głównie przez domenę harmonijki β i część C-końcową. Region centralny oraz domena vWA wykazują znaczny stopień homologii w obu podjednostkach Ku, natomiast wyraźne różnice występują w ich końcach karboksylowych. Ostatnie 12 aa unikatowego regionu C-końcowego Ku80 jest konieczne dla oddziaływania heterodimeru Ku z DNA-PKcs. C-końcowy obszar



Rycina 3. Struktura Ku oddziałującego z DNA. DNA reprezentowany jest przez kolor srebrny i biegnie prostopadle do płaszczyzny ryciny, Ku70 – kolor bordowy, Ku80 – ciemnoniebieski, helisy alfa (spirale) i harmonijki beta (strzałki) poprzecdzielane są fragmentami o niespecyficznej strukturze. Rycina powstała na podstawie danych z RCSB Protein Data Bank nr 1JEY z użyciem programu ACD/ChemSketch 11.0.

Ku80 (Ku CTD, aa 545-732, 19 kDa) oprócz stymulowania przyłączania DNA-PKcs do miejsca uszkodzenia DNA, oddziałuje z białkiem Wernera. W unikatowym C-końcu Ku70 znajduje się motyw SAP, odgrywający rolę w utrzymaniu struktury chromosomów [27]. Delecja C-końcowego fragmentu Ku nie zakłóca heterodimeryzacji podjednostek Ku ani ich wiązania z DNA [28]. W domenach C-końcowych obydwu białek Ku znajdują się sekwencje lokalizacji jądrowej NLS, jednak transport Ku70 i Ku80 do jądra może odbywać się niezależnie, przy użyciu własnych NLS [29].

Komórki pozbawione białek Ku wykazują cechy charakterystyczne dla komórek bez DNA-PKcs, w tym wrażliwość na promieniowanie, defekty w naprawie pęknięć dwuniciowych DNA i niedobory odporności. Dodatkowo, komórki myszy pozbawione Ku charakteryzują się przedwczesnym starzeniem [30]. Jednak nie wszystkie komórki z inaktywacją Ku wykazują defekty w naprawie NHEJ. Aktywne łączenie końców DNA obserwuje się w ekstraktach pozbawionych białek Ku z komórek HeLa, a także w ekstraktach z komórek MO59J, które nie mają zarówno białek Ku, jak i DNA-PKcs. Wyniki te sugerują istnienie alternatywnego szlaku NHEJ, niezależnego od Ku i DNA-PKcs. Mimo że mutacje w którymś z podstawowych składników klasycznego szlaku obniżają procesywność NHEJ, komórki ostatecznie usuwają większość DSBs w szlaku alternatywnym (B-NHEJ) do szlaku klasycznego (D-NHEJ) [4]. Dane uzyskane *in vitro* potwierdzają działanie alternatywnych szlaków i wiążą białko Ku z dokładnością procesu naprawy i wyłączeniem szlaku z wykorzystaniem mikrohomologii [31]. Również wyniki badań na linii komórek ptaków DT40 pozbawionych ligazy IV i Ku70 sugerują istnienie alternatywnego szlaku NHEJ. Co więcej, istnieje wyraźne podobieństwo między łączeniem końców z mikrohomologią a szlakiem B-NHEJ [32]. W dodatku rekombinacja V(D)J, pomimo wyraźnej zależności od DNA-PKcs i kompleksu ligaza IV/XRCC4, może również wykorzystywać alternatywny, niezależny od DNA-PKcs

szlak, wykorzystujący mikrohomologię przy formowaniu niestandardowych produktów rekombinacji V(D)J [31]. Dodanie białek Ku do ekstraktu jądrowego z komórek pozbawionych Ku wyłącza B-NHEJ i kieruje naprawę na szybszy szlak D-NHEJ przez efektywne przyłączanie się do końców DNA. Przelączenie na szlak D-NHEJ obserwuje się również po dodaniu do ekstraktu DNA-PK_{CS} [33].

DNA-PK_{CS}

Podjednostka katalityczna kinazy białkowej zależnej od DNA, DNA-PK_{CS} (4129 aa, 469 kDa) należy do rodziny kinaz białkowych spokrewnionych z kinazami fosfatydylo-3-inzytolu (PIKKs). Rodzina PIKKs, jako podrodzina eukariotycznych kinaz białkowych, obejmuje również białka ATM, ATR i mTOR. Podobieństwo między tymi białkami dotyczy także obecności domen FAT i FATC, flankujących domenę katalityczną i prawdopodobnie biorących udział w jej stabilizacji. W karboksylowym końcu DNA-PK_{CS} znajduje się również obszar oddziałujący z Ku (aa 3002-3850). DNA-PK_{CS} zaliczana jest do kinaz serynowo-treoninowych i aby mogła fosforylować pozostałe białka biorące udział w naprawie NHEJ, musi dojść do aktywacji jej aktywności kinazowej poprzez autofosforylację. Do miejsc autofosforylacji DNA-PK_{CS} należą reszty treoniny w pozycjach 2609, 2620, 2638, 2647 i reszta seryny w pozycji 2612. Natomiast duża, bogata w leucyny helikalna domena aminowa DNA-PK_{CS} ma szereg miejsc oddziaływania z białkami innymi niż Ku [34].

Jak już wspomniano, Ku łączy się z DNA, zostawiając jego końce dostępne dla innych białek. DNA-PK_{CS} wykorzystuje tę dostępność i łączy się z DNA, przemieszczając Ku na jeszcze większą odległość od końców (Ryc. 4). Po przyłączeniu DNA-PK_{CS} do końców DNA i utworzeniu kompleksu z Ku następuje jego fosforylacja, która jednak nie jest konieczna dla prawidłowego działania szlaku NHEJ [35]. Poza podstawową funkcją, jaką jest stymulowanie przyłączenia do DNA białek NHEJ, DNA-PK_{CS} może ułatwiać zbliżenie uszkodzonych końców. Po przyłączeniu się do nich, może tworzyć kompleks synaptyczny złożony z dwóch cząstek DNA-PK_{CS}. Taki kompleks, jak most łączący dwa brzegi rzeki, ułatwia połączenie końców.

ZASADNICZA ROLA BIAŁKA CERNUNNOS-XLF

W 2003 roku stwierdzono zaburzenia naprawy DSBs i rekombinacji V(D)J w komórkach otrzymanych od dziecka z zaburzeniami funkcjonowania układu odpornościowego [36]. Zaburzenia te nie zostały zniesione przez transformowanie tych komórek którymkolwiek z genów kodujących znane czynniki NHEJ. Sugerowało to, że być może istnieje jeszcze jedno, wówczas niezidentyfikowane, białko NHEJ, o zasadniczym znaczeniu dla tego szlaku naprawy DNA. Rozpoczęto „polowanie”, które zakończyło się zidentyfikowaniem owego białka niezależnie przez dwa zespoły w 2006 roku. Jeden z nich nadał mu nazwę Cernunnos, od enigmatycznego celtyckiego boga polowań, krainy cieni i płodności [37], podczas gdy drugi poprzestał na nazwie opisowej XLF, od *XRCC4-like factor* [38]. Inną stosowaną nazwą dla tego białka jest połączenie tych dwóch nazw – Cernunnos-XLF, a jeszcze inną – NHEJ1.

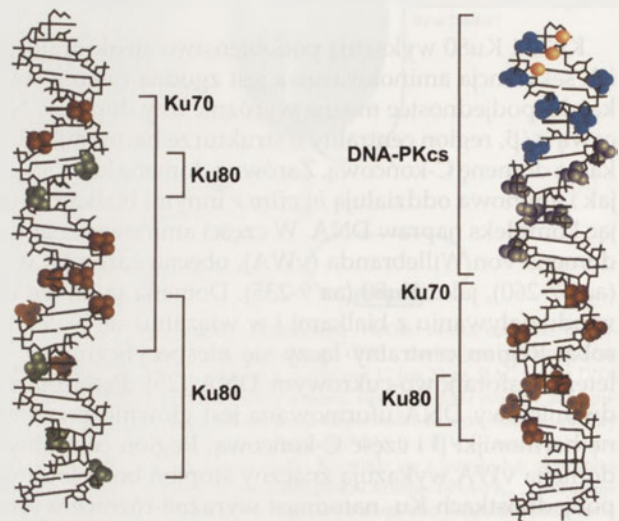
Strategie zastosowane przez obydwie zespoły dla identyfikacji nowego białka NHEJ, były różne. Jeden z zespołów [37] zidentyfikował grupę pacjentów o fenotypie sugerującym defekty NHEJ: zaburzeniami odporności z niską liczbą limfocytów B i T oraz dojrzałymi komórkami NK, które nie podlegają rekombinacji V(D)J. Dodatkowo, wydzielona została podgrupa z zaburzeniami rozwoju typowymi dla innych syndromów związanych z defektami naprawy DNA, w tym z upośledzeniem wzrostu, mikroencefalopatią i opóźnieniem rozwoju umysłowego, wynikającymi prawdopodobnie z ogólnego braku zdolności do naprawy spontanicznych uszkodzeń DNA w całym organizmie. W komórkach izolowanych z tej małej grupy pacjentów stwierdzono podwyższoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące, defekty naprawy DSBs i zaburzoną rekombinację V(D)J. Po wykluczeniu sześciu znanych czynników NHEJ, jako przyczyny obserwowanych efektów, przystąpiono do klonowania poszukiwanego genu przez komplementację cDNA genów wrażliwości komórkowej na czynniki indukujące DSBs. Jeden z cDNA komplementacji zawierał sekwencje kodujące nowego genu, *Cernunnos*, zawierającego nieznane dotychczas motywy. Mutacje tego genu stwierdzono potem u każdego pacjenta z wyselekcjonowanej wcześniej grupy.

Druga grupa podjęła zupełnie inną strategię identyfikacji nieznanego składnika NHEJ. Rozpoczęto od przeglądania białek oddziałujących z XRCC4 poprzez zastosowanie dwuhybridowego systemu drożdżowego. Jeden z otrzymanych klonów zawierał, nieznaną dotychczas, otwartą ramkę odczytu, kodującą białko 33 kDa. Pomimo że standardowa analiza sekwencji nie wykazała ewolucyjnie zachowanych domen homologicznych do istniejących w poznanych dotychczas genach naprawy DNA, wyniki głębszej analizy sugerowały podobieństwo strukturalne do XRCC4, co stanowiło motywację do nazwania odkrytego białka XLF. Oddziaływanie Cernunnos-XLF z XRCC4 i ligazą IV zostało potwierdzone zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.

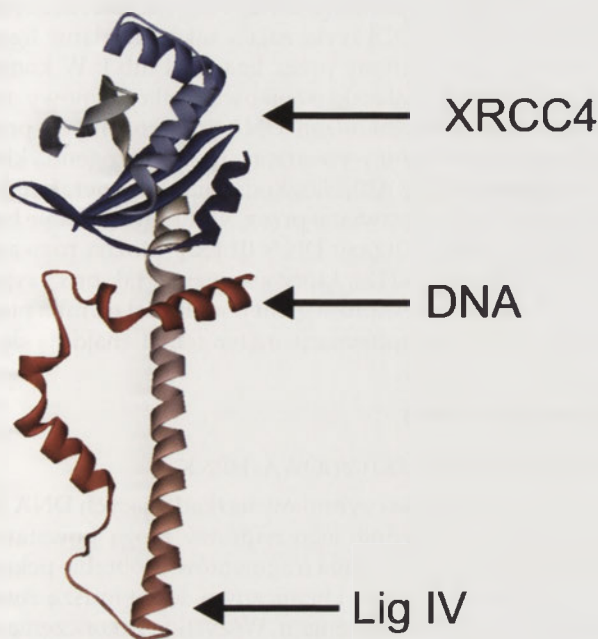
Komórki z defektami DNA-PK_{CS} lub Artemis wykazują mniejszą wrażliwość na promieniowanie i zaburzenia w

Ku bez DNA-PK_{CS}

DNA-PK_{CS} i Ku



Rycina 4. Ku łączy się z DNA, pozostawiając jego końce dostępne dla innych białek (po lewej), wiązanie DNA-PK_{CS} powoduje przemieszczenie się Ku (po prawej).



Rycina 5. Reprezentacja wstążkowa struktury krystalicznej homodimeru białka Cernunnos-XLF, fragment N-końcowy oznaczony jest kolorem niebieskim, C-końcowy – czerwonym, spirala obrazuje α helisę. Miejsca oddziaływania z białkami XRCC4, Ligazą IV oraz DNA zaznaczono strzałkami. Rycina powstała na podstawie danych z RCSB Protein Data Bank nr 2QM4 z użyciem programu ACD/ChemSketch 11 i na podstawie [39].

naprawie DSBs niż komórki z dysfunkcjami Ku70, Ku80, XRCC4 i ligazy IV. DNA-PK_{cs} i Artemis wypełniają funkcje w części cyklu NHEJ, natomiast pozostałe czynniki biorą udział we wszystkich jego fazach [37]. Bezpośrednie oddziaływanie Cernunnos-XLF z kompleksem XRCC4-ligaza IV oraz podobny poziom wrażliwości na promieniowanie jonizujące i podobny stopień zaburzeń naprawy DSBs w komórkach pozbawionych Cernunnos-XLF lub XRCC4 i ligazy IV, sugeruje, że Cernunnos-XLF może brać udział we wszystkich etapach NHEJ. Niestety, dziś jest to jedynie przypuszczenie czekające na weryfikację. Cernunnos-XLF uczestniczy także w rekombinacji V(D)J, co potwierdza uniwersalność tego białka w NHEJ [37]. Zasadnicza rola Cernunnos-XLF w NHEJ została pokazana w doświadczeniach, w których stwierdzono, że wyłączenie poprzez ukierunkowaną mutagenezę tego białka u myszy, przyniosło zaburzenia w naprawie DSBs i niestabilność genomową, co sugeruje, że Cernunnos-XLF może należeć do grupy białek określanych jako „strażnicy genomu” [40]. Interesujące wydaje się, że oczyszczone, zmutowane białko Cernunnos-XLF otrzymane od pacjenta z defektami NHEJ i SCID, miało zdolność do stymulacji kompleksu XRCC4-ligaza IV lecz nie miało zdolności migracji do jądra komórkowego, co mogło być podstawą zaburzenia NHEJ u tego pacjenta [41].

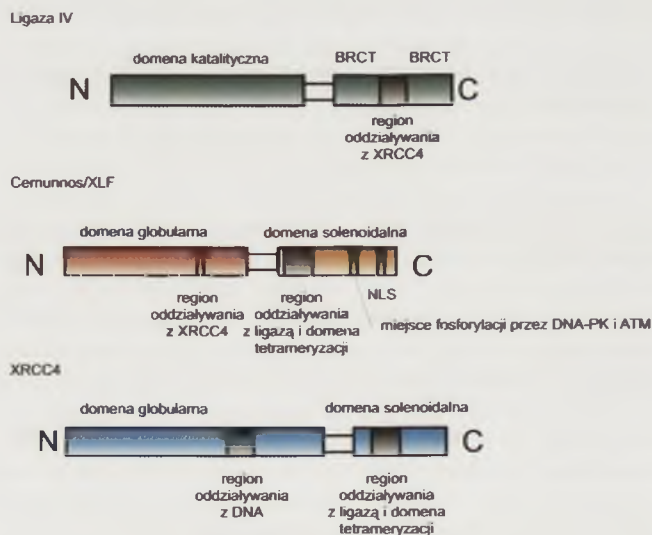
W formie krystalicznej Cernunnos-XLF ma wyraźną N-końcową „główkę” globularną i C-końcową część alfa-heliką (Ryc. 5). Obydwa końce mogą oddziaływać ze sobą. Jak już wspomniano, Cernunnos-XLF wykazuje silne podobieństwo strukturalne do XRCC4. Jest to białko zawierające N-końcową domenę „głowy”, a pozostała jego część

przybiera strukturę skręconego solenoidu. Podobieństwo pomiędzy Cernunnos-XLF i XRCC4 nie obejmuje podobieństwa w sekwencji aminokwasów, szczególnie w obszarze XRCC4 oddziałującym z ligazą IV. Schematyczną budowę białek Cernunnos-XLF, XRCC4 oraz Ligazy IV przedstawiono na rycinie 6.

KOMPLEKS CERNUNNOS-XLF/XRCC 4/LIGAZA IV

Ligacja nici DNA jest krytycznym etapem NHEJ, przeprowadzanym przez ligazę DNA IV, która przez długi czas była „flagowym białkiem” tego szlaku naprawy DNA, to jest białkiem, które występowało we wszystkich jego odmianach. Ligaza IV tworzy kompleks z białkiem XRCC4, co zwiększa jej stabilność w komórce i stymuluje etap adenylacji procesu ligacji [42]. Przy izolacji natywnego kompleksu z komórek człowieka, wykazującego aktywność ligazy IV, otrzymuje się kompleks o masie cząsteczkowej 160-180 kDa [43]. Kompleks ten może się składać z jednej cząsteczki ligazy IV (105 kDa), jednej cząsteczki białka Cernunnos-XLF (33 kDa), jednej XRCC4 (42 kDa) lub z dwóch cząsteczek Cernunnos-XLF, lub z dwóch XRCC4. Obserwowano silniejsze wiązanie ligazy IV z XRCC4 niż z Cernunnos-XLF [41]. Nie wiadomo czy białka Cernunnos-XLF mogą się wiązać z sobą w nieobecności ligazy IV. Podjednostką katalityczną ligazy IV jest Lig4, zawierająca domenę ligazy zależną od ATP, składającą się z subdomen: wiążącej DNA (DBD, ang. *DNA-binding domain*), adenylacji (AdD, ang. *Adenylation domain*) i wiązania oligonukleotydów (OBD, ang. *Oligonucleotide-binding domain*) oraz tandemowej pary domeny C-końcowej BRCT biorącej udział w wiązaniu XRCC4 [44].

Według obecnego stanu wiedzy „egzekutorem” reakcji ligacji jest kompleks XRCC4/ligaza IV stymulowany przez Cernunnos-XLF, lecz nie wiadomo czy w czasie stymulacji dochodzi do rozłączenia ligazy IV i XRCC4 [38]. Cernunnos-XLF może stymulować połączenie zarówno końcowych fragmentów DNA z obszarami mikrohomologii, jak i bez nich [45,46] Część fragmentów końcowych nie zawierają-



Rycina 6. Domeny białek Cernunnos-XLF, XRCC4 i ligazy DNA IV. BRCT – domena powtórzeń C-końcowych BRCA1. NLS – domena sygnałowa lokalizacji jądrowej.

cych mikrohomologii może być łączona jedynie w obecności białka Ku [47]. Gdy obszar mikrohomologii obejmuje 1 nt, Ku nie jest potrzebne, lecz wciąż wywiera stymulujące działanie, ale gdy obszar mikrohomologii obejmuje 4 nt, obecność Ku nie ma znaczenia dla efektywności reakcji ligacji [47].

ALTERNATYWNE SZLAKI NHEJ

Kompleks Ku może brać udział we wszystkich etapach NHEJ, gdyż utrzymywanie w bliskości końców, które mają być łączone, wydaje się niezbędne dla efektywnego przeprowadzenia reakcji NHEJ. Jednakże, jak wspomniano, w procesie ligacji przy występowaniu mikrohomologii obejmującej obszar 4 nt, Ku może być zbędne. Co więcej, *in vitro* DNA-PK_{CS} może łączyć się z końcami DNA wówczas, gdy brak Ku [48]. Efektywność wiązania przy braku Ku jest znacznie niższa niż przy jego obecności. Można zatem przypuszczać, że jeżeli jeden z zasadniczych składników NHEJ nie występuje, to może to nie być przeszkodą dla przeprowadzenia reakcji naprawczej przez pozostałe składniki. Na przykład u myszy, u których brak było kompleksu XRCC4/ligaza IV/Cernunnos-XLF stwierdzano wyższą częstość wykorzystania mikrohomologii o szerszym zakresie niż u myszy bez tego defektu [49]. Może to być spowodowane tym, że mniej efektywna reakcja NHEJ obejmuje trawienie dłuższych fragmentów końcowych łączonych cząsteczek DNA, co stwarza większe szanse na znalezienie stosunkowo obszernej mikrohomologii. Szlak taki określa się jako NHEJ niezależny od ligazy IV, łączenie końców w oparciu o mikrohomologię (MMEJ od *microhomology-mediated end joining* lub μ homNHEJ), alternatywny NHEJ (Alt-NHEJ lub A-NHEJ) lub zapasowy NHEJ (B-NHEJ od *backup NHEJ*). Ligacja w takim szlaku może być prowadzona przez ligazę DNA I lub III [50].

W poszukiwaniu mechanizmów alternatywnych szlaków NHEJ badano komórki z mutacjami w genach kodujących Ku80, DNA-PK_{CS} i XRCC4 [51]. U mutantów tych obserwowano znaczny spadek aktywności i dokładności NHEJ, jednak reakcja naprawy nie została zniesiona całkowicie. Świadczy to o tym, że NHEJ w każdym z mutantów przebiegała według alternatywnego szlaku, innego w każdym mutancie. Najsilniejsze hamowanie reakcji obserwowano w przypadku braku białka Ku80 i XRCC4, natomiast hamowanie w mutantach DNA-PK_{CS} powodowało spadek aktywności do połowy różnicy pomiędzy komórkami z aktywnością obserwowaną w komórkach dzikiego typu a mutantami Ku80 i XRCC4. Mając na uwadze mechanizm klasycznego szlaku NHEJ, można zadać pytanie, jak są realizowane szlaki alternatywne, skoro zarówno Ku, jak i DNA-PK_{CS} oraz XRCC4 odgrywają zasadniczą rolę w klasycznym NHEJ. Rola kompleksu Ku polega na zbliżeniu do siebie i utrzymaniu w bliskości końców uszkodzonego DNA tak, aby stworzyć warunki dla przeprowadzenia reakcji ligacji wymagającej odpowiedniego pozycjonowania tych końców. W komórkach człowieka DNA ma organizację nukleosomalną i po indukcji DSB wolne końce powstałych wskutek niego fragmentów są utrzymywane blisko siebie. Sytuacja oczywiście zmienia się, gdy indukcji DSB towarzyszą obszerne delecje, sprawiające, że końce pofragmentowanego DNA mogą się znaleźć po przeciwnych stronach oktameru histo-

nowego. Jest to problem, który nawet w klasycznej NHEJ nie jest do końca wyjaśniony. DNA-PK_{CS} nie jest niezbędna w NHEJ, a brak XRCC4 wyłącza także działanie ligazy IV, może być wypełniony przez ligazę III lub I. W komórkach przewlekłej białaczki szpikowej odkryto nowy mechanizm naprawy uszkodzeń DNA indukowanych przez reaktywne formy tlenu wytwarzane przez onkogenną kinazę tyrozynową BCR/ABL. Uszkodzenia te zawierały także DSBs, które były naprawiane przez NHEJ przy udziale białka Wernera, WRN i ligazy DNA III [52]. Można rozważać jeszcze jeden szlak NHEJ, który jest niemal tak precyzyjny, jak HRR i zależy od ekspresji genu podatności na raka piersi BRCA1 [53]. Dalsze informacje na ten temat znajdują się w następnym rozdziale.

INNE BIAŁKA NHEJ

KINAZA POLINUKLEOTYDOWA, hPNK

W efekcie działania czynników uszkadzających DNA lub jako produkty pośrednie jego naprawy mogą powstawać pęknięcia nici, a zakończenia fragmentów w obrębie pęknięcia ulegają modyfikacjom chemicznym, które muszą zostać przekształcone przed łączeniem. Wszystkie zakończenia od strony 3' muszą zostać przekształcone do grup hydroksylowych, a zakończenia od strony 5' – do grup fosforanowych, ażeby możliwe było działanie polimeraz i ligaz DNA, konieczne dla resyntezy DNA i jego połączenia. Kinaza polinukleotydomowa człowieka (hPNK) jest dwufunkcyjnym enzymem o aktywności 5'-kinazy i 3'-fosfatazy. hPNK może się wiązać z XRCC4, co sugeruje udział w NHEJ. Udział ten potwierdzono doświadczalnie, wskazując jednocześnie, że hPNK uczestniczy w szlaku NHEJ zależnym od DNA-PK_{CS} i nie bierze udziału ani w HRR ani w naprawie przez wyciniwanie nukleotydów [54].

BRCA1

BRCA1 jest białkiem dziedzicznej podatności na raka piersi i charakter ekspresji jego genu jest jednym z wyznaczników ryzyka takiego raka [55]. Białko to bierze także udział w naprawie uszkodzeń DNA, gdyż w komórkach ze zmutowanym genem BRCA1 oraz w transgenicznym myszach z takimi mutacjami obserwowano zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące [56]. Najlepiej jest poznana rola BRCA1 w HRR, w której współdziała ono z BRCA2 – białkiem, które nie bierze udziału w NHEJ. BRCA1 może oddziaływać zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* z kompleksem MRN, który może uczestniczyć, przynajmniej u niektórych gatunków, zarówno w HRR, jak i NHEJ. *In vitro* BRCA1 może hamować aktywność nukleazy MRE11, a po ekspozycji na promieniowanie jonizujące BRCA1 jest wymagane dla fosforylacji NBS1, która jest zależna od kinazy ATM [57]. Oddziaływania te znacznie podnoszą dokładność NHEJ, która staje się porównywalna z HRR. Można zatem przypuszczać, że BRCA1 może brać udział w alternatywnym szlaku NHEJ, który charakteryzuje się wysoką dokładnością. W kontroli NHEJ BRCA1 może współdziałać z kinazą Chk2 [58].

WRN

Zespół Wernera (WS) jest rzadkim schorzeniem autosomalnym, charakteryzującym się przedwczesnym pojawie-

niem się chorób charakterystycznych dla wieku starszego. Gen WS koduje białko WRN, należące do rodziny helikaz RecQ i wykazujące aktywność helikazy i egz nukleazy. WRN może oddziaływać z kompleksem Ku70/Ku80, który stymuluje jego aktywność egz nukleolityczną [59]. WRN może regulować relacje pomiędzy HRR i NHEJ, blokując NHEJ i aktywując HRR wtedy, gdy działanie NHEJ mogłoby być śmiertelne dla komórki, tak jak naprawa DSBs podczas replikacji. Ponadto, WRN, o czym już wspomina no, może tworzyć kompleks z ligazą DNA III α i uczestniczyć w naprawie DSBs. Stwierdzono także, że WRN może powodować odłączanie DNA-PK $_{CS}$ od końców DNA, co sugeruje niemożność tworzenia kompleksu trójskładnikowego WRN/Ku70/80/ DNA-PK $_{CS}$, aczkolwiek w roztworze WRN może tworzyć kompleks zarówno z Ku70, jak i DNA-PK $_{CS}$ [60].

53BP1

53BP1 jest białkiem wiążącym białko supresorowe transformacji nowotworowej, p53, poprzez C-końcową domenę zawierającą, podobnie jak w białku BRCA1, powtórzenia BRCT. Wyniki szeregu badań sugerują, że białko to może brać udział w naprawie DNA poprzez oddziaływanie z MDC1 i H2AX [61]. Tę sugestię potwierdzają wyniki badań, z których wynika, że 53BP1 pełni funkcję supresora nowotworów, podobnie jak Ku. W badaniach tych stwierdzono również, że 53BP1 wykazuje fenotypowe podobieństwo do Ku70 i bierze udział w NHEJ. Jaka jest wobec tego rola tego białka w NHEJ? Wydaje się, że 53BP1 pomaga ułożyć łączne końce DNA w pobliżu siebie, umożliwiając tym samym ich połączenie. Hipotezę tę potwierdzają wyniki badań pokazujących, że 53BP1 wiąże się w białkami histonowymi w odpowiedzi na dwuniciowe pęknięcia DNA [62] oraz przyczynia się do zachowania stabilności genomowej podczas procesu rekombinacji V(D)J [63]. Sugeruje się również, że 53BP1 może współdziałać z białkiem Artemis w szlaku NHEJ zależnym od ATM przy naprawie złożonych DSBs, takich jak wywoływane przez promieniowanie korpuskularne, które na ogół nie mogą zostać naprawione przez klasyczną NHEJ. Ponieważ Artemis może wiązać 53BP1 z porównywalną efektywnością jak DNA-PK $_{CS}$, to 53BP1 może ułatwiać wiązanie kompleksu Artemis/DNA-PK $_{CS}$ z końcami DNA. Możliwe jest także uczestnictwo 53BP1 w późniejszych etapach NHEJ poprzez stymulowanie aktywności ligazy kompleksu XRCC4/ligaza IV [64].

MDC1

Telomery są strukturami znajdującymi się na końcach liniowych chromosomów eukariotycznych, które, między innymi, sygnalizują ich naturalne pochodzenie, chroniąc je przed połączeniem przez systemy naprawy DNA, które w przypadku braku struktur telomerowych rozpoznawałyby je jako DSBs. Białko MDC1 (mediator uszkodzeń DNA w punkcie kontrolnym 1) jest ważnym białkiem regulującym reakcje komórki na uszkodzenia DNA u ssaków [65]. MDC1 może oddziaływać z kompleksem MRN, promując jego stabilne wiązanie z DNA w miejscu uszkodzenia, podwyższając efektywność działania kinazy ATM i promując tworzenie skupisk (*foci*) czynników reakcji na uszkodzenia DNA. Gdy końce chromosomów utracą swoją naturalną ochronę, poprzez, na przykład, zahamowanie funkcji białek telome-

rowych, stają się substratem dla systemów naprawy DNA. DCM1 kieruje taką naprawą na drodze NHEJ. Mechanizm leżący u podstaw tego efektu nie jest w pełni znany, wiadomo, że jego efektywność spada około 100 razy przy braku ligazy DNA IV i około 10 razy przy braku Ku70 i obejmuje, między innymi, oddziaływanie z białkiem 53BP1 i ufosforylowanymi postaciami histonu H2AX (g-H2AX) i białka ATM [66]. MDC1 może mieć także decydujące znaczenie dla naprawy poprzez NHEJ DSBs powstałych podczas replikacji [67].

PODSUMOWANIE

Dla zrozumienia mechanizmów regulacji i działania NHEJ konieczne jest poznanie mechanizmów oddziaływania pomiędzy kluczowymi białkami tego systemu. W klasycznym modelu NHEJ przekształcanie końców poprzedza fazę ich połączenia przez kompleks ligaza IV/XRCC4. Obecnie uważa się, że co najmniej dla pewnego podzbioru DSBs, w szczególności obejmującego fragmenty DNA o lepkich końcach, ligaza IV/XRCC4 wraz z Ku mogą dopasować do siebie końce DNA. Taki mechanizm pozwala na połączenie fragmentów jednej nici i pozostawienie luki w drugiej, która może zostać wypełniona przez polimerazę. Poznanie funkcjonowania i regulacji tego mechanizmu wydaje się być jednym z kluczowych dla zrozumienia ogólnego mechanizmu NHEJ.

Ciągle otwarta pozostaje kwestia zrozumienia wyboru szlaków naprawy DSBs pomiędzy NHEJ i HRR. Wydaje się, że najważniejszymi aspektami takiej regulacji są ekspresja genów białek naprawczych i fosforylacja tych białek, modyfikacje chromatyny wpływające na dostępność tych białek do substratu DNA oraz dostępność matrycy dla HRR. Podczas gdy wiele białek może funkcjonować wyłącznie w NHEJ albo HRR, szereg białek bierze udział w obydwu tych szlakach naprawy DNA. Wydaje się, że szczególną rolę odgrywa tu DNA-PK $_{CS}$, która wypełnia kluczowe funkcje w NHEJ u ssaków, ale może także wpływać na HRR poprzez złożony szlak regulacji, zawierający oddziaływanie z białkiem ATM i regulację co najmniej 12 białek HRR, fosforylowanych przez DNA-PK $_{CS}$ lub/i ATM.

Badania nad mechanizmami NHEJ powinny być kontynuowane ze względu na duże znaczenie tego systemu naprawy DNA w procesach starzenia, transformacji nowotworowej, reakcjach immunologicznych oraz podstawowym metabolizmie.

PIŚMIENNICTWO

1. Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V (2008) DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle* 7: 2902-2906
2. Zhang Y, Hefferin ML, Chen L, Shim EY, Tseng HM, Kwon Y, Sung P, Lee SE, Tomkinson AE (2007) Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* 14: 639-646
3. Hefferin ML, Tomkinson AE (2005) Mechanism of DNA doublestrand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair* 4: 639-648
4. DiBiase SJ, Zeng ZC, Chen R, Hyslop T, Curran WJ Jr, Iliakis G (2000) DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus. *Cancer Res* 60: 1245-1253

5. Caldecott KW (2001) Mammalian DNA single-strand break repair: An X-ray(γ)ted affair. *Bio Essays* 23: 447-455
6. Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23: 5706-5715
7. Toulany M, Kasten-Pisula U, Brammer I, Wang S, Chen J, Dittmann K, Baumann M, Dikomey E, Rodemann HP (2006) Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells *in vitro* by affecting DNA repair. *Clin Cancer Res* 12: 4119-4126
8. Gellert M (2002) V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* 71: 101-132
9. Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (2002) Hairpin opening and overhang processing by an Artemis: DNA-PKcs complex in V(D)J recombination and in nonhomologous end joining. *Cell* 108: 781-794
10. Purugganan MM, Shah S, Kearney JF, Roth DB (2001) Ku80 is required for addition of N nucleotides to V(D)J recombination junctions by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Nucleic Acids Res* 29: 1638-1646
11. Bertocci B, De Smet A, Weill JC, Reynaud CA (2006) Nonoverlapping functions of DNA polymerases mu, lambda, and terminal deoxynucleotidyltransferase during immunoglobulin V(D)J recombination *in vivo*. *Immunity* 25: 31-41
12. Bertocci B, De Smet A, Berek C, Weill JC, Reynaud CA (2003) Immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement is impaired in mice deficient for DNA polymerase mu. *Immunity* 19: 203-211
13. Ferguson DO, Sekiguchi JM, Chang S, Frank KM, Gao Y, DePinho RA, Alt FW (2000) The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6630-6633
14. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273: 5858-5868
15. Chen HT, Bhandoola A, Difilippantonio MJ, Zhu J, Brown MJ, Tai X, Rogakou EP, Brotz TM, Bonner WM, Ried T, Nussenzweig A (2000) Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX. *Science* 290: 1743-1752
16. Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Olaru A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296: 922-927
17. Corneo B, Wendland RL, Deriano L, Cui X, Klein IA, Wong SY, Arnal S, Holub AJ, Weller GR, Pancake BA, Shah S, Brandt VL, Meek K, Roth DB (2007) Rag mutations reveal robust alternative end joining. *Nature* 449: 483-486
18. Bentley J, Diggle CP, Harnden P, Knowles MA, Kiltie AE (2004) DNA double strand break repair in human bladder cancer is error prone and involves microhomology-associated end-joining. *Nucleic Acids Res* 32: 5249-5259
19. Schwarz K, Gauss GH, Ludwig L, Pannicke U, Li Z, Lindner D, Friedrich W, Seger RA, Hansen-Hagge TE, Desiderio S, Lieber MR, Bartram CR (1996) RAG mutations in human B-cell negative SCID. *Science* 274: 97-99
20. Taccioli GE, Rathbun G, Oltz E, Stamato T, Jeggo PA, Alt FW (1993) Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants. *Science* 260: 207-210
21. Ege M, Ma Y, Manfras B, Kalwak K, Lu H, Lieber MR, Schwarz K, Pannicke U (2005) Omenn syndrome due to ARTEMIS mutations. *Blood* 105: 4179-4186
22. Dai Y, Kysela B, Hanakahi LA, Manolis K, Riballo E, Stumm M, Harville TO, West SC, Oettinger MA, Jeggo PA (2003) Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2462-2467
23. Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, Inada S, Yoshida S, Homma M (1981) Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis scleroderma overlap. *J Clin Invest* 68: 611-620
24. Koike M (2002) Dimerization, translocation and localization of Ku70 and Ku80 proteins. *J Radiat Res* 43: 223-236
25. Gullo C, Au M, Feng G, Teoh G (2006) The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1765: 223-234
26. Fisher TS, Zakian VA (2005) Ku: a multifunctional protein involved in telomere maintenance. *DNA Repair* 4: 1215-1226
27. Drouet J, Frit P, Delteil C, de Villartay JP, Salles B, Calsou P (2006) Interplay between Ku, Artemis and DNA-PKcs at DNA ends. *J Biol Chem* 281: 27784-27793
28. Harris R, Esposito D, Maman ASJD, Hinks JA, Pearl LH, Driscoll PC (2004) The 3D Solution Structure of the C-terminal Region of Ku86 (Ku86CTR). *J Mol Biol* 335: 573-582
29. Koike M, Koike A (2005) Ku70-binding site of Ku80 is required for the stabilization of Ku70 in the cytoplasm, for the nuclear translocation of Ku80, and for Ku80-dependent DNA repair. *Exp Cell Res* 305: 266-276
30. Jackson SP (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23: 687-696
31. Verkaik NS, Esveltd-van Lange RE, van Heemst D, Brüggewirth HT, Hoeijmakers JH, Zdzienicka MZ, van Gent DC (2002) Different types of V(D)J recombination and endjoining defects in DNA double-strand break repair mutant mammalian cells. *Eur J Immunol* 32: 701-709
32. Katsura Y, Sasaki S, Sata M, Yamaoka K, Suzukawa K, Nagasawa T, Jun Yokota J, Kohno T (2007) Involvement of Ku80 in microhomology-mediated end joining for DNA double-strand breaks *in vivo*. *DNA Repair* 6: 639-648
33. Perrault R, Wang H, Wang M, Rosidi B, Iliakis G (2004) Backup pathways of NHEJ are suppressed by DNA-PK. *J Cell Biochem* 92: 781-794
34. Perry J, Kleckner N (2003) The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins. *Cell* 112: 151-155
35. Douglas P, Gupta S, Morrice N, Meek K, Lees-Miller SP (2005) DNA-PK-dependent phosphorylation of Ku70/80 is not required for nonhomologous end joining. *DNA Repair* 4: 1006-1018
36. Dai Y, Kysela B, Hanakahi LA, Manolis K, Riballo E, Stumm M, Harville TO, West SC, Oettinger MA, Jeggo PA (2003) Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2462-2467
37. Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondaneche MC, Sanal O, Plebani A, Stephan JL, Hufnagel M, Le Deist F, Fischer A, Durandy A, de Villartay TP, Revy P (2006) Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* 124: 160-162
38. Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP (2006) XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 124: 301-313
39. Li Y, Chirgadze DY, Sibanda BL, Bolanos-Garcia VM, Davies OR, Blundell TL (2008) Crystal structure of human XLF/Cernunnos reveals unexpected differences from XRCC4 with implications for NHEJ. *EMBO J* 27: 290-300
40. Zha S, Alt FW, Cheng HL, Brush JW, Li G (2007) Defective DNA repair and increased genomic instability in Cernunnos-XLF-deficient murine ES cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 4518-4523
41. Lu H, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (2007) Length-dependent Binding of Human XLF to DNA and stimulation of XRCC4/DNA Ligase IV Activity. *J Biol Chem* 282: 11155-11162
42. Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M, Lieber MR (1997) Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 388: 492-495
43. Robins P, Lindahl T (1996) DNA ligase IV from HeLa cell nuclei. *J Biol Chem* 271: 24257-24261
44. Dore AS, Furnham N, Davies OR, Sibanda BL, Chirgadze DY, Jackson SP, Pellegrini L, Blundell TL (2006) Structure of an Xrcc4-DNA ligase

- IV yeast ortholog complex reveals a novel BRCT interaction mode. *DNA Repair* 5: 362-368
45. Tsai CJ, Kim SA, Chu G (2007) Cernunnos/XLF promotes the ligation of mismatched and noncohesive DNA ends. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 7851-7856
46. Daley JM, Wilson TE (2007) Evidence that base stacking potential in annealed 3' overhangs determines polymerase utilization in yeast nonhomologous end joining. *DNA Repair (AMST)* 7: 67-76
47. Gu J, Lu H, Tsai AG, Schwarz K, Lieber MR (2007) Single-stranded DNA ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex: influence of terminal DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 35: 5755-5762
48. Gu J, Lu H, Tippin B, Shimazaki N, Goodman MF, Lieber MR (2007) XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J* 26: 1010-1023
49. Ferguson DO, Alt FW (2001) DNA double-strand break repair and chromosomal translocations: lessons from animal models. *Oncogene* 20: 5572-5579
50. Yan CT, Boboila C, Souza EK, Franco S, Hickernell TR, Murphy M, Gumaste S, Geyer M, Zarrin AA, Manis JP, Rajewsky K, Alt FW (2007) IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 449: 478-482
51. Kuhfittig-Kulle S, Feldmann E, Odersky A, Kuliczowska A, Goedecke W, Eggert A, Pfeiffer P (2007) The mutagenic potential of non-homologous end joining in the absence of the NHEJ core factors Ku70/80, DNA-PKcs and XRCC4-LigIV. *Mutagenesis* 22: 217-233
52. Sallmyr A, Tomkinson AE, Rassool FV (2008) Up-regulation of WRN and DNA ligase III α in chronic myeloid leukemia: consequences for the repair of DNA double strand breaks. *Blood* 112: 1413-1423
53. Baua DT, Maua YC, Shen CY (2006) The role of BRCA1 in non-homologous end-joining. *Cancer Letters* 240: 1-8
54. Karimi-Busheri F, Rasoluli-Nia A, Allalunis-Turner, Weinfeld M (2007) Human polynucleotide kinase participates in repair of DNA double-strand breaks by nonhomologous end joining but not homologous recombination. *Cancer Res* 67: 6619-6625
55. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266: 66-71
56. Shen SX, Weaver Z, Xu X, Li C, Weinstein M, Chen L, Guan XY, Ried T, Deng CX (1998) A targeted disruption of the murine Brca1 gene causes gamma-irradiation hypersensitivity and genetic instability. *Oncogene* 17: 3115-3124
57. Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A, Jeggo P (2003) A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO J* 22: 2860-2871
58. Zhuang J, Zhang J, Willers H, Wang H, Chung JH, van Gent DC, Hallahan DE, Powell SN, Xia F (2006) Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining. *Cancer Res* 66: 1401-1408
59. Cooper MP, Machwe A, Orren DK, Brosh RM, Ramsden D, Bohr D (2000) Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein. *Genes Dev* 14: 907-912
60. Li B, Comai L (2002) Displacement of DNA-PKcs from DNA ends by the Werner syndrome protein. *Nucl Acid Res* 30: 3653-3661
61. Nakamura K, Sakai W, Kawamoto T, Bree RT, Lowndes NF, Takeda S, Taniguchi Y (2006) Genetic dissection of vertebrate 53BP1: a major role in non-homologous end joining of DNA double strand breaks. *DNA Repair* 5: 741-749
62. Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA, Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD (2004) Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* 432: 406-411
63. Difilippantonio S, Gapud E, Wong N, Huang CY, Mahowald G, Chen HT, Kruhlak MJ, Callen E, Livak F, Nussenzweig MC, Sleckman BP, Nussenzweig A (2008) 53BP1 facilitates long-range DNA end-joining during V(D)J recombination. *Nature* 456: 529-533
64. Iwabuchi K, Basu BP, Kysela B, Kurihara T, Shibata M, Guan D, Cao Y, Hamada T, Imamura K, Jeggo PA, Date T, Doherty AJ (2003) Potential role for 53BP1 in DNA end-joining repair through direct interaction with DNA. *J Biol Chem* 278: 36487-36495
65. Lukas C, Melander F, Stucki M, Falck J, Bekker-Jensen S, Goldberg M, Lerenthal Y, Jackson SP, Bartek J, Lukas J (2004) Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J* 23: 2674-2683
66. Dimitrova N, de Lange T (2006) MDC1 accelerates nonhomologous end-joining of dysfunctional telomeres. *Genes Dev* 20: 3238-3243
67. Schwartz M, Zlotorynski E, Goldberg M, Ozeri E, Rahat A, le Sage C, Chen BP, Chen DJ, Agami R, Kerem B (2005) Homologous recombination and nonhomologous end-joining repair pathways regulate fragile site stability. *Genes Dev* 19: 2715-2726

Non-homologous DNA end joining – new proteins, new functions, new mechanisms

Tomasz Popławski, Ewelina Stoczyńska, Janusz Błasiak

Department of Molecular Genetics, University of Lodz, Lodz, Poland

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

Key words: DNA repair, NHEJ, V(D)J recombination, Ku70/80, Cernunnos, DNA-PK_{cs}

ABSTRACT

Humans use primarily nonhomologous end joining (NHEJ) to repair DNA double strand breaks (DSBs), which are the most serious DNA damage, resulting in cell death if non-repaired or misrepaired. NHEJ directly joins together DNA ends resulted from DSBs. This pathway plays a key role in the development of vertebrate immune system through its involvement in the V(D)J recombination. Classical NHEJ in vertebrates involves a heterodimer of Ku proteins, the catalytic subunits of DNA-dependent protein kinase (DNA-PKCS), Artemis, Cernunnos-XLF and XRCC4/ligase DNA IV complex. This classical pathway may be assisted by DNA polymerases μ and λ . Last 2 years brought new information on the mechanisms, proteins and functions of this DNA repair pathway. In 2006 Cernunnos-XLF was discovered, a protein playing a key role in NHEJ. Some alternative NHEJ pathways were also identified, lacking some of the main proteins of classical NHEJ, but involving other factors, including BRCA1, 53BP1, hPNK, WRN or MDC1. The results obtained so far suggest that not all key components and basic mechanisms of NHEJ have been identified. Future aspects of NHEJ research should include the determination of its role in cancer, aging, immune system development and basic nuclear metabolism.

Paulina Wyrzykowska[✉]

Aneta Kasza

Zakład Biochemii Komórki, Wydział Biofizyki, Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

[✉]Zakład Biochemii Komórki, Wydział Biofizyki, Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; tel.: (012) 664 65 21, e-mail: paulinawyrzykowska@tlen.pl

Artykuł otrzymano 11 lipca 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 4 września 2008 r.

Słowa kluczowe: PAI-1, regulacja ekspresji genów, rejon regulatorowy, migracja, nowotwory

Wykaz skrótów: EGF – czynnik wzrostu naskórki; ERE - element odpowiedzi na estrogeny; FGF – czynnik wzrostu fibroblastów; HGF – czynnik wzrostu hepatocytów; HRE – element odpowiedzi na hipoksję; IGF – insulinopodobny czynnik wzrostu; MAP – kinazy aktywowane miogenami; PAI – inhibitor aktywatora plazminogenu; SBE – element odpowiedzi na białka Smad; TGFβ – transformujący czynnik wzrostu typu β; TNFα - czynnik martwicy nowotworów; t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu; uPA – urokinazowy aktywator plazminogenu; uPAR – receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu

Podziękowania: Artykuł powstał w trakcie realizacji projektu badawczego MNI 2PO4A07829

STRESZCZENIE

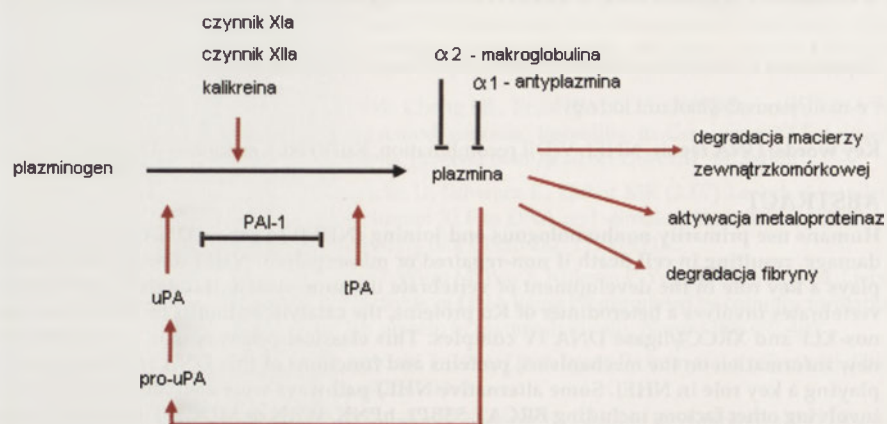
PAI-1 (ang. *plasminogen activator inhibitor-1*) jest białkiem należącym do kaskady aktywacji plazminogenu, która, obok metaloproteinaz, jest głównym systemem proteolitycznym. Jego rolą jest zahamowanie powstawania proteazy - plazminy. PAI-1 wykazuje również powinowactwo do witronektyny oraz do kompleksu uPA/uPAR, co angażuje białko w migrację i adhezję komórek. Ekspresja genu *PAI-1* jest regulowana przez cytokiny, hormony oraz liczne czynniki wzrostowe, z których najważniejszym jest TGFβ. Rejon regulatorowy PAI-1 posiada sekwencje dla szeregu czynników transkrypcyjnych, takie jak SBE, CAGA box, HRE, ERE, miejsce wiążące czynniki NFκB, Sp-1, AP-1. Aktywacja czynników transkrypcyjnych jest ściśle regulowana zarówno na etapie oddziaływań białek związanych z rejonem regulatorowym, jak i poprzez wzajemne oddziaływania szlaków sygnałowych powodujących ich aktywację czy zahamowanie. Obecny stan wiedzy dotyczący tych zależności opisano w zaprezentowanej pracy przeglądowej.

SYSTEM AKTYWACJI PLAZMINOGENU

System aktywacji plazminogenu obejmuje białka biorące udział w procesie przekształcenia nieaktywnego zymogenu (plazminogenu) do aktywnej plazminy. Plazmina jest wydajną proteazą, hydrolizującą wiązania peptydowe pomiędzy resztami lizyny i argininy w łańcuchu polipeptydowym. Aktywacja plazminy jest regulowana poprzez aktywatory oraz inhibitory tego procesu. Tkankowy aktywator plazminogenu (tPA) oraz urokinaza (uPA) tną proteolitycznie wiązanie peptydowe (Arg561-Val562) w plazminogenu, co uaktywnia proteazę. Aktywacja plazminogenu jest również regulowana przez sprzężenie zwrotne dodatnie, gdzie zymogen pro-uPA jest aktywowany przez plazminę. W migracji komórek większą rolę odgrywa uPA, natomiast tPA - w fibrylizacji.

Wyodrębniono cztery inhibitory aktywacji plazminogenu (PAI): PAI-2, PAI-3, PN-1 oraz najpowszechniej badany – PAI-1.

PAI-1 należy do rodziny inhibitorów proteinaz serynowych zwanej serpinami (ang. *serine protease inhibitor*). Jego masa cząsteczkowa wynosi około 54 kDa i zależy od glikozylacji białka, która może zachodzić na resztach asparaginowych (Asn209 i/lub Asn265) [1]. Glikoproteina nie posiada reszt cysteinowych, więc jest mało stabilna w roztworach, z okresem półtrwania 8-10 minut. Głównym magazynem nieaktywnej formy są alfa-granule w płytkach krwi, skąd PAI-1 jest uwalniany do osocza [2]. Jest wydzielany konstytutywnie przez liczne typy komórek tuż po syntezie [3]. PAI-1 jest inhibitorem obu uPA i tPA, gdyż jego wiązanie peptydowe pomiędzy Arg346 - Met347 naśladuje „substrat” proteaz serynowych i reaguje z resztą serynową w aktywnym miejscu enzymów [4]. Do-



Rycina 1. Kaskada aktywacji plazminogenu.

datkowo przez oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy ujemnie naładowanymi resztami aminokwasowymi PAI-1 oraz dodatnio naładowanymi resztami uPA czy tPA, dochodzi do trwałego zablokowania aktywności proteaz. W formie nieaktywnej wiązanie peptydowe pełniące funkcję pułapki, jest ukryte w strukturze β -karkki (ang. *locked conformation*).

System aktywacji plazminogenu jest regulowany również przez α 2-antyplazminę i α 2-makroglobulinę, które bezpośrednio hamują plazminę [5].

PAI-1, poprzez udział w kaskadzie aktywacji plazminogenu, jest zaangażowany w przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*). ECM jest barierą dla odmiennych fragmentów tkanek i rusztowaniem dla komórek. Magazynuje liczne czynniki wzrostu, których uwalnianie wpływa na współpracę komórek w tkance. ECM jest głównie zbudowana z kolagenów, glikoprotein, proteoglikanów oraz glikozaminoglikanów. Aby podążać za dynamicznym charakterem komórek, musi być nieustannie przebudowywana, a system aktywacji plazminogenu bierze w tym procesie czynny udział. Plazmina aktywuje też nieaktywne metaloproteinazy, które stanowią drugi, obok kaskady aktywacji plazminogenu, główny system proteolityczny.

ADHEZJA I MIGRACJA KOMÓREK

Składniki kaskady aktywacji plazminogenu, czyli uPA, jej receptor (uPAR, CD87) i PAI-1 odgrywają również rolę w adhezji i migracji komórek zupełnie niezależnie od swoich proteolitycznych (uPA) czy hamujących (PAI-1) właściwości. Kompleks uPAR-uPA znajduje się głównie w kontaktach zogniskowanych pomiędzy komórkami, na szczycie filopodiów i lamellipodiów i odgrywa rolę w zakotwiczeniu komórki poprzez oddziaływanie z witronektyną. Witronektyna (VN) jest składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej i może wiązać się z komórkami albo przez integryny, albo właśnie przez błonowy receptor uPA. Do bezpośredniego kontaktu dochodzi pomiędzy integrynami β 1 i β 3 a uPAR, co szczególnie widoczne jest w jednym z rodzajów tratw lipidowych, kawecolach. Oddziaływanie uPAR-VN jest silniejsze w obecności uPA zaś ulega całkowitemu zerwaniu w obecności PAI-1 [6]. Dzieje się tak, ponieważ PAI-1 ma większe powinowactwo do domeny SMB (ang. *somatomedin-B domain*) witronektyny niż uPAR [7]. Dodatkowo, związany z witronektyną PAI-1 zasłania motyw RGD (Arg-Gly-Asp) rozpoznawany przez liczne integryny, takie jak α 5 β 1, α 5 β 3, α 5 β 5, α 1 β 3 i α 8 β 1 [8]. W obecności PAI-1 osłabieniu ulega oddziaływanie komórek z białkami macierzy (z witronektyną) zarówno zależne od integryn, jak i od uPAR.

Co więcej, PAI-1 wiążąc się z kompleksem uPA-uPAR, prowadzi do jego ekspozycji do wnętrza przy udziale białka LRP (ang. *low-density lipoprotein (LDL) receptor-related protein*). Dochodzi do zmniejszenia gęstości receptora uPA na powierzchni komórki. Paradoksalnie może to zarówno hamować, jak i promować migrację komórek w zależności od miejsca występowania aktywności (czoło komórki lub jej tył). Komórki wykorzystują zlokalizowaną na błonie aktywność proteolityczną uPA-uPAR do miejscowej aktywacji

dużych ilości plazminy, która ułatwia przemieszczanie się przez macierz zewnątrzkomórkową.

FUNKCJA PAI-1

Udział PAI-1 w migracji i adhezji komórek przekłada się na jego uczestnictwo w licznych i podstawowych procesach biologicznych, takich jak angiogeneza, owulacja, embriogeneza, gojenie ran, migracja komórek układu odpornościowego czy przebudowa kości. W fizjologicznych warunkach aktywację plazminogenu reguluje równowaga pomiędzy inhibitorami i aktywatorami. Niestety wszelkie nieprawidłowości w systemie kontroli mogą być przyczyną chorób, wśród których wymienia się najczęściej: schorzenia sercowo-naczyniowe, takie jak miażdżyca i stwardnienie tętnic [9], zaburzenia metaboliczne, takie jak otyłość oraz cukrzyca typu 2 [3,10], astma [11], reumatoidalne zapalenie stawów [12], łuszczyca [13] oraz choroba nowotworowa (progresja i przerzuty nowotworu) [14].

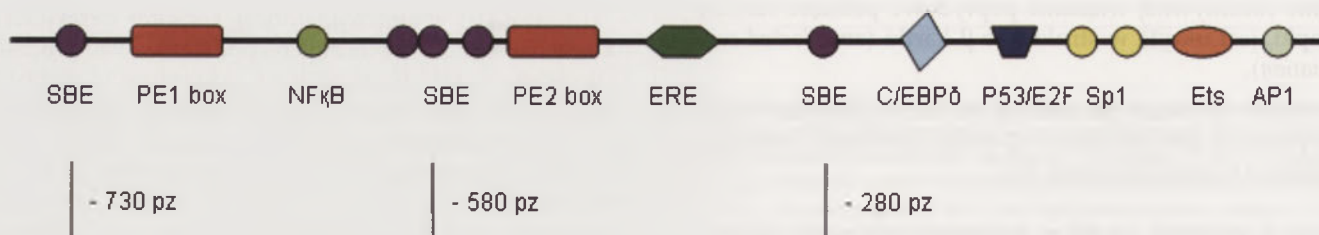
PAI-1 W NOWOTWORACH

PAI-1, pełniąc niejednoznaczną funkcję w migracji i adhezji komórek, jest intrygującym białkiem z punktu widzenia badań nad rozprzestrzenianiem się nowotworów. Komórki nowotworowe używają zmodyfikowanego systemu aktywacji plazminogenu do niepohamowanego wzrostu, rozprzestrzeniania się i tworzenia przerzutów. Aktywacja plazminy i metaloproteinaz umożliwia usunięcie przeszkód strukturalnych, czyli macierzy zewnątrzkomórkowej oraz błony podstawnej. Oprócz tego uwolnienie związanych z macierzą czynników wzrostowych (TGF β , EGF, FGF, IGF) zachęca komórki do dalszego wzrostu oraz zmusza prawidłowe, sąsiednie komórki do współpracy w przebudowie zmienionej nowotworowo tkanki, np. aktywując proces powstania nowych naczyń krwionośnych (angiogeneza). Inwazja komórek nowotworowych związana jest z uwolnieniem dużych ilości uPA [15]. PAI-1 hamuje jej aktywność proteolityczną i wydawałoby się, że powinien wpływać hamująco na progresję nowotworów. Jednak u myszy z nadekspresją genu PAI-1 następuje wzrost guzów, efekt przeciwny zaobserwowano u myszy z knock-outem genu PAI-1 [16]. Prawdopodobnie związane jest to z powinowactwem białka PAI-1 do witronektyny oraz z zaburzeniami migracji spowodowanymi przez zwiększoną ilość PAI-1.

Rola PAI-1 w rozwoju nowotworu nie jest do końca zrozumiała, jednak faktem jest, że jego zwiększona ilość jest czynnikiem słabego prognozowania w wielu nowotworach [17]. PAI-1 wzbudza zainteresowanie naukowców już od wielu lat, a regulacja ekspresji genu tego białka jest szczególnie intensywnie badana. W kolejnym akapicie przedstawiono obecny stan wiedzy dotyczący budowy rejonu regulatorowego genu dla białka PAI-1 i szlaków sygnalizacyjnych wpływających na jego ekspresję.

SERPINE1

Gen PAI-1 (*SERPINE1*) człowieka jest zlokalizowany na dłuższym ramieniu 7 chromosomu (q21.3-q22). Składa się z 9 eksonów i 8 intronów o łącznej wielkości 12,2 kpz [18]. Posiada alternatywne miejsce poliadenylacji, więc, w wy-



Rycina 2. Schematyczne przedstawienie budowy rejonu regulatorowego genu *PAI-1*. Zaznaczono opisane w tekście miejsca rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne.

niku transkrypcji, powstają dwa alternatywne transkrypty (2,4 kpz i 3,2 kpz). Rejon regulatorowy na końcu 5' zawiera TATA box oraz liczne miejsca rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne z rodziny SMAD, czynniki z rodziny MYC, receptory jądrowe ER α i ER β (ang. *estrogen receptor type a i b*), AP-1 (ang. *activator protein-1*), Sp-1, NF- κ B, ets-1.

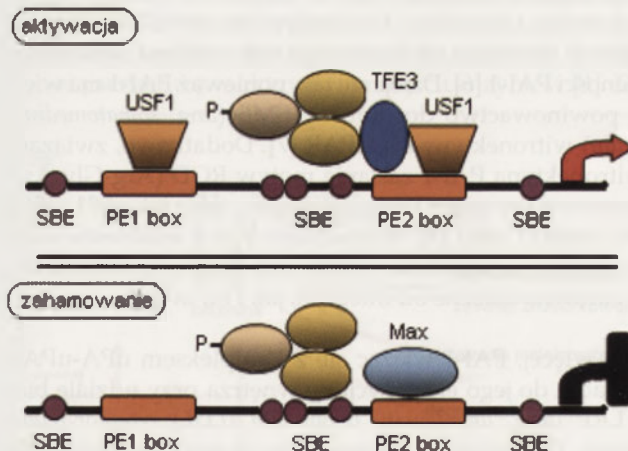
Dzięki mnogości motywów wiążących czynniki transkrypcyjne obecnych w rejonie regulatorowym genu *PAI-1*, jego ekspresja jest stymulowana przez liczne cytokiny, czynniki wzrostowe i hormony, m.in.: TGF β , TNF α , IL-1 β , IL-6, EGF, HGF, IGF, przez insulinę, estrogeny czy estry forbolu.

AKTYWACJA *PAI-1* PRZEZ CZYNNIKI WZROSTOWE

TGF β - TRANSFORMUJĄCY CZYNNIK WZROSTU

Głównym aktywatorem *PAI-1* jest TGF β , równocześnie *PAI-1* jest najsilniej aktywowanym genem w transkryptomie TGF β [19]. Procesy związane z migracją komórek czy z przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej opisane dla *PAI-1* zależą w dużej mierze od TGF β . W procesach patologicznych zwiększony poziom TGF β pociąga za sobą podwyższenie poziomu *PAI-1*. Rejon regulatorowy genu *PAI-1* zawiera trzy motywy wiążące białka Smad (ang. *SMAD binding element* – SBE) oraz dwa motywy PE box. Motywy SBE zawierają powtarzającą się sekwencję AGAC (CAGA box) i są zlokalizowane około -730 pz, -580 pz i -280 pz powyżej miejsca startu transkrypcji [20]. Szlak sygnałowy prowadzący od TGF β , przez białka Smad, do sekwencji AGAC, jest klasyczną drogą, którą dochodzi do aktywacji genów regulowanych przez TGF β . Aktywacja białek Smad zachodzi po związaniu liganda (TGF β) do receptora TGF β I i jego heterooligomeryzacji z TGF β RII. Ufosforylowane białka Smad2/3 wraz z białkiem Smad4 migrują do jądra. Mogą wtedy wiązać się z CAGA box zlokalizowanym -732 do -721 pz powyżej miejsca startu transkrypcji [21]. Choć CAGA box, rozpoznawany przez białka Smad, powtarza się trzykrotnie w rejonie regulatorowym *PAI-1*, to jednak wydaje się, że największą rolę odgrywa ten zlokalizowany od -565 do -569 pz powyżej miejsca startu transkrypcji. Wiąże się to z sąsiedztwem sekwencji zwanej PE2 box. Jak wspomniano, w rejonie regulatorowym genu *PAI-1* znajdują się dwa motywy PE box o charakterystycznej sześcionukleotydomowej sekwencji 5'-CACGTG-3'. Stanowią one platformę dla wielu czynników transkrypcyjnych zarówno aktywujących, jak i hamujących transkrypcję. Głównie przyłączają się do nich czynniki zawierające motyw wiążący DNA, zwany bHLHLZ (ang. *basic helix-loop-helix/leucine zipper*), należące do rodziny MYC (MYC, MAX, TFE3, USF-1 and USF-2). CAGA box, sąsiadujący o 3 pz z sekwencją PE2 box, umożliwia oddziaływanie wspomnianych czynników transkrypcyjnych z białkami Smad, co może potęgować efekt stymulacji. Takie współdziałanie zaobserwowano dla czynnika TFE3 związanego z PE2 box, który oddziałuje z białkami Smad3/Smad4. Następnie cały kompleks rekrutuje koaktywatory transkrypcji takie jak p300 i CREB (ang. *cAMP Response Element-Binding protein*) [22]. I odwrotnie – oddziaływanie może również hamować transkrypcję poprzez rekrutację korepresorów, np. mSIN oraz N-CoR. Taki mechanizm zaobserwowano dla pary czynników Max i Smad3 [23].

Innym czynnikiem wiążącym się z motywem PE2 box jest USF-1 (ang. *upstream stimulatory factor-1*). Allen i współaut. [24] udawadniają, że właśnie USF-1 jest najważniejszym czynnikiem transkrypcyjnym uczestniczącym w TGF β – zależnej regulacji genu *PAI-1*. Wprowadzona mutacja do PE2 box CACGTG \rightarrow CAATTG znacznie obniża poziom ekspresji *PAI-1*. Ta sama grupa badawcza [25] zaproponowała szlaki sygnalizacyjne, które prowadzą od TGF β do aktywacji Smad i USF-1 w komórkach VSMC (ang. *vascular smooth muscle cells*). Pierwszy z nich obejmuje fosforylację białek Smad przez TGF β R, modulowaną przez białka Rho/ROCK.



Rycina 3. Oddziaływanie białek Smad wiążących się z sekwencjami AGAC, z białkami należącymi do rodziny czynników transkrypcyjnych Myc, wiążącymi się do sąsiedniej sekwencji PE2 box, może zarówno aktywować, jak i hamować ekspresję genu *PAI-1*.

Funkcja Rho/ROCK w aktywacji Smad 2/3 nie jest poznana, ale wydaje się, że białka te mogą promować fosforylację przez nieznaną dziś mechanizm bądź hamować działanie fosfataz, co może przedłużać występowanie Smad w formie aktywnej. Drugi szlak obejmuje receptor EGF, aktywację kinazy niereceptorowej pp60^{c-src}, MEK i w rezultacie – czynnika transkrypcyjnego USF-1. Rolę receptora EGF w tej sieci oddziaływań udowodniono, stosując farmakologiczny inhibitor receptora (AG1478) oraz poprzez transfekcję formą receptora bez aktywności kinazowej lub z mutacją punktową eliminującą fosforylowaną w trakcie aktywacji tyrozynę. Jednak nadal nie wiadomo w jaki sposób receptor EGF jest aktywowany. Czy receptor TGFβ kieruje do niego aktywną już kinazę src, czy może aktywuje metaloproteiny z rodziny MMP lub ADAM do usuwania z błony aktywnej formy jego liganda (EGF). Ten rozgałęziony przekaz sygnału umożliwia równoczesną aktywację białek Smad2/3 oraz aktywację USF-1, więc pozwala na ich wzajemne oddziaływanie w rejonie regulatorowym genu *PAI-1* przy wykorzystaniu wspomnianych już elementów PE2 box i CAGA box.

Jak widać, przekaz sygnału od TGFβ jest znacznie bardziej złożony niż klasyczna aktywacja białek Smad i angażować może różne ścieżki sygnalizacyjne, krzyżujące się na różnych etapach. Za kolejny przykład może służyć przekaz sygnału od TGFβ w komórkach endotelialnych [26]. Aktywacja receptorów TGFβ prowadzi do aktywacji kaskady kinaz MAP. Aktywowana jest kinaza MEK, ale, co ciekawe, niezależnie od białka Ras, które klasycznie ją fosforyluje. Co więcej, wprowadzenie dominującej, hamującej formy Ras nawet zwiększa ekspresję *PAI-1* po stymulacji TGFβ. Rozwiązaniem tej zagadki może być zaangażowanie kinazy TAK1 oraz jej białka efektorowego p38.

Szlak kinaz MAP odgrywa również rolę w aktywacji genu *PAI-1* w warunkach stresu oksydacyjnego. Dokładny mechanizm nie jest znany, jednak wydaje się, że to TGFβ zwiększa poziom reaktywnych form tlenu. W komórkach NIH3T3 przekaz sygnału zachodzi poprzez kinazy JNK i p38, które następnie włączają czynniki transkrypcyjne charakterystyczne dla kaskady MAP, jak AP-1 i Sp-1 oraz, co ciekawe, również białka Smad [27]. Oprócz klasycznej ścieżki Smad i kaskady MAP, do aktywacji genu *PAI-1* przez TGFβ może dochodzić również poprzez kinazę białkową C typu β. Efektem w tym układzie może być czynnik transkrypcyjny Fox D1, wiążący się w pobliżu -720 pz powyżej miejsca startu transkrypcji [28]. Szlak ten odgrywa raczej rolę modulującą i przy okazji potwierdza mnogość sposobów w jakie sygnał od TGFβ może być przekazany do rejonu regulatorowego genu *PAI-1*.

HGF – CZYNNIK WZROSTU HEPATOCYTÓW

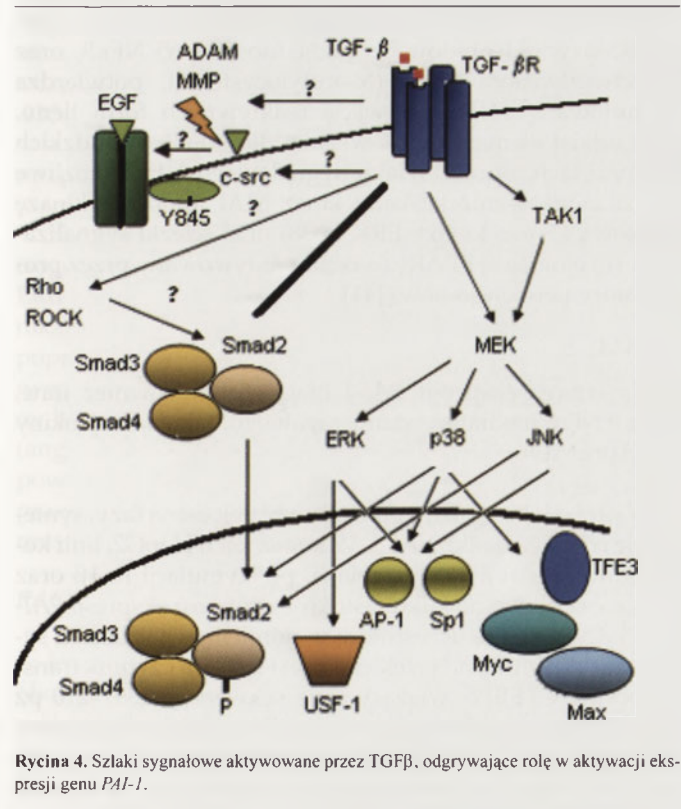
PE box wraz z czynnikiem transkrypcyjnym USF-1 są zaangażowane również w przekaz sygnału od HGF w komórkach linii wątrobiaka HepG2. Wydaje się, że większe znaczenie fizjologiczne ma motyw zlokalizowany w części proksymalnej rejonu regulatorowego (-159/-153), choć oczywiście *in vitro* możliwa jest aktywacja obu sekwencji PE box. Kaskada kinaz MAP, a konkretnie rodzina ERK1/2, bierze udział w aktywacji ekspresji genu *PAI-1*; *PAI-1* produkowany w wątrobie, jest źródłem PAI-1 w osoczu. W schorzeniach sercowo-naczyniowych oraz w insulinooporności poziom HGF jest podniesiony. Zależność *PAI-1* od HGF może stanowić kolejne ogniwo łączące stany patologiczne związane z metabolizmem glukozy ze schorzeniami sercowo-naczyniowymi [29].

Co ciekawe, motyw PE box tak silnie zaangażowany w przekaz sygnału od TGFβ oraz od HGF, bierze udział również w dobowej regulacji poziomu *PAI-1* w osoczu. Ilość *PAI-1* jest największa w godzinach porannych. W regulacji tej biorą udział oba motywy PE box, które mogą wiązać heterodimer czynników transkrypcyjnych BMAL1 oraz BMAL2 [30].

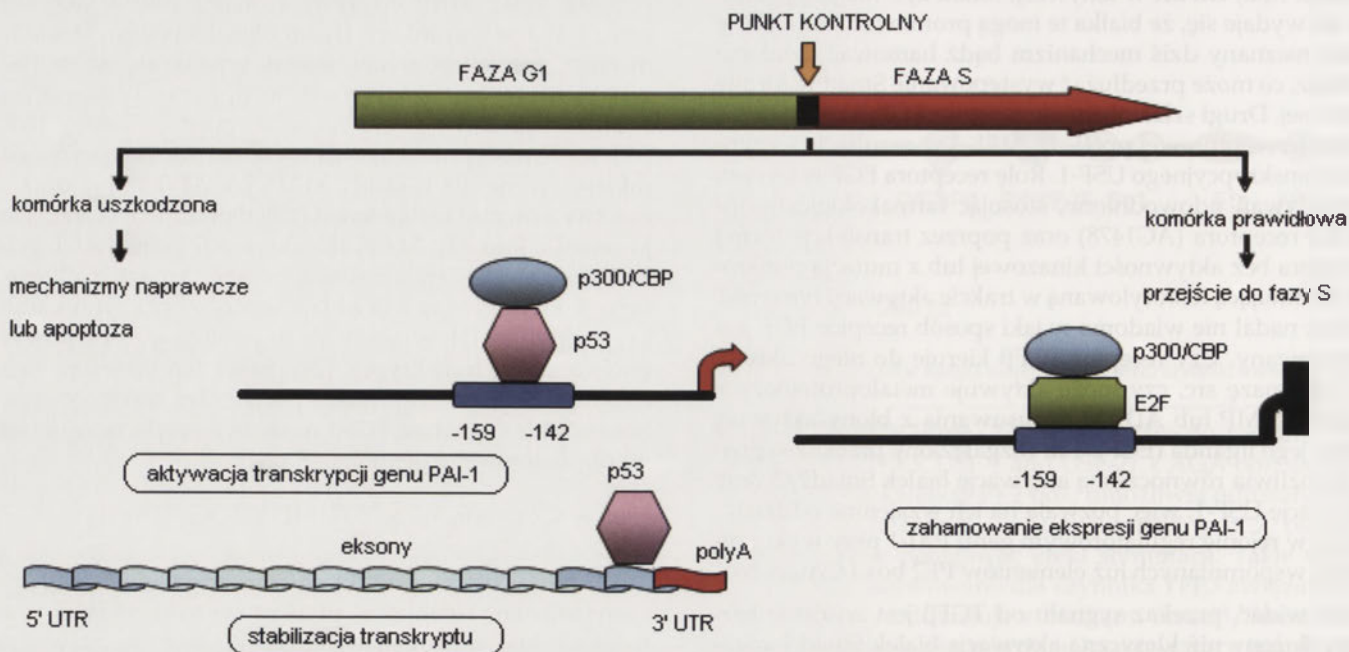
EGF – CZYNNIK WZROSTU NASKÓRKA

Kolejnym czynnikiem wzrostowym stymulującym ekspresję *PAI-1* jest EGF. Równoczesne zwiększenie poziomu *PAI-1* oraz receptora dla EGF jest czynnikiem słabego prognozowania w glejakach [31]. Zidentyfikowano nowy szlak sygnałowy, w którym aktywacja receptora EGF powoduje aktywację c-Src, przeniesienie kinazy białkowej C typu δ oraz SphK1 do błony komórkowej oraz prawdopodobnie aktywację przez fosforylację czynników transkrypcyjnych c-Jun oraz ATF-2. Miejsce wiązania c-Jun/ATF-2 jest powtórzone 17-krotnie i znajduje się ~15kpz powyżej miejsca startu transkrypcji. Wprawdzie eksperymenty z genami reporterowymi nie potwierdzają aktywacji rejonu regulatorowego, jednak, uwzględniając aktywność acetylotransferazową ATF-2, można wysnuć hipotezę, że regulacja ekspresji genu *PAI-1* zachodzi na poziomie epigenetycznym [32].

PAI-1 aktywowany przez cytokiny i czynniki wzrostu należy do genów wczesnej odpowiedzi komórkowej. Jego



Rycina 4. Szlaki sygnałowe aktywowane przez TGFβ, odgrywające rolę w aktywacji ekspresji genu *PAI-1*.



Rycina 5. Mechanizm regulujący zmiany poziomu PAI-1 na granicy faz G1/S cyklu komórkowego. Udatne przejście z fazy G1 do fazy S wiąże się z aktywnością czynnika transkrypcyjnego E2F. Czynniki te hamuje ekspresję PAI-1. Natomiast w komórkach z aktywnym białkiem p53, pełniącym funkcje supresora nowotworu, dochodzi do aktywacji ekspresji PAI-1 oraz do zwiększenia stabilności jego transkryptu.

ekspresja jest również regulowana przez klasyczne geny wczesnej odpowiedzi komórkowej (*c-fos*, *c-jun*, *c-myc*), które aktywowane bardzo szybko i przejściowo umożliwiają komórce dynamiczną reakcję na zewnątrzkomórkowe sygnały w trakcie toczącego się stanu zapalnego. W komórkach astrocytomy w wyniku stymulacji IL-1 oraz OSM dochodzi do wtórnej aktywacji ekspresji PAI-1 przez białka będące produktami genów wczesnej odpowiedzi komórkowej. Rolę odgrywa tutaj motyw, decydujący również o transkrypcji podstawowej, który wiąże czynniki transkrypcyjne AP-1. Motyw ten znajduje się -58/-51 powyżej miejsca startu transkrypcji, w części proksymalnej promotora. Czynniki AP-1 w tym wypadku jest heterodimerem *c-fos/c-jun*, związanym z DNA również w komórkach niestymulowanych [33].

CYTOKINY

TNF α – CZYNNIK MARTWICY NOWOTWORÓW

TNF α jest jedną z głównych cytokin biorących udział w odpowiedzi zapalnej i immunologicznej. Stwierdzona została zależność pomiędzy wzrostem poziomu PAI-1 i TNF α w przewlekłych stanach zapalnych, np. w mukowiscydozie, w przewlekłym obturacyjnym zapaleniu płuc (POChP) czy w astmie [34]. Wydaje się również, że zależność między nimi ma znaczenie w stanach patologicznych związanych z otyłością, takich jak zespół metaboliczny [35]. Pomimo tego, zlokalizowanie miejsca odpowiadającego na stymulację TNF α w rejonie regulatorowym genu PAI-1 okazało się czasochłonne. Badania zakończone niepowodzeniami, dotyczyły proksymalnego fragmentu rejonu regulatorowego (np. fragmentu do 2,5 kbp powyżej miejsca startu transkrypcji [36]. Hou i współaut. [37] po analizie dystalnego fragmentu rejonu regulatorowego, zlokalizowali miejsce wiążące NF κ B, odgrywające istotną rolę w przekazie sygnału od TNF α , aż 15 kbp powyżej miejsca startu transkrypcji (~14709-14680,

5'-TGGAATTTCT-3'). Co ciekawe, Światkowska i współaut. [38] wykazali, że miejsce uczestniczące w szlaku przekazu sygnału od TNF α przy aktywacji reaktywnych form tlenu znajduje się w rejonie -664/-680. Miejsce to obejmuje występujący w rejonie regulatorowym genu PAI-1 polimorfizm 4G/5G. Występowanie polimorfizmu 4G związane jest ze zwiększonym poziomem PAI-1 w osoczu [39] oraz z większą aktywnością rejonu regulatorowego [40]. Do tego rejonu wiąże się czynnik transkrypcyjny NF κ B, co wykazano metodą EMSA. Zastosowanie inhibitora I κ B α , antysensowych oligodeoxynukleotydów do podjednostki p65 NF κ B, oraz przeciwutleniacza NAC (N-acetylocysteina), potwierdza stymulowaną TNF α aktywację reaktywnych form tlenu, oraz udział elementów *cis* właśnie dla NF κ B. W ludzkich hepatocytach, oprócz szlaku sygnałowego NF κ B możliwe jest zaangażowanie kaskady kinaz MAP (poprzez kinazę białkową C oraz kinazy ERK i p38) oraz ścieżki sygnalizacyjnej obejmującej PPAR γ (receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów) [41].

IL-1 β i IL-6

Na wzrost ekspresji PAI-1 mają wpływ również inne, obok TNF α , mediatory stanu zapalnego, takie jak cytokiny IL-1 β oraz IL-6.

Wątroba jako główny producent białek ostrej fazy, syntetyzuje również białko PAI-1. W komórkach HepG2, linii komórkowej ludzkiego wątrobiaka, po stymulacji IL-1 β oraz IL-6 zaobserwowano kilkunastokrotny wzrost ekspresji PAI-1 [42]. Cytokiny te uczestniczą w odmiennych szlakach sygnalizacyjnych, ale ich efektem jest ten sam czynnik transkrypcyjny C/EBP δ , wiążący się z sekwencją -239/-210 pz powyżej miejsca startu transkrypcji w rejonie regulatorowym genu PAI-1. Wiadomo, że w szlaku przekazu sygnału od IL-6 biorą udział kinazy niereceptorowe JAK, natomiast

IL-1 β aktywuje wszystkie trzy rodziny kinaz MAPK (ERK, JNK, p38). Co więcej, udowodniono, że eliminacja kinazy białkowej B zwiększa poziom ekspresji *PAI-1* po stymulacji IL-1 β . Dodatkowo, motywem odpowiadającym na stymulację IL-1 jest sekwencja występująca w obrębie polimorfizmu 4G/5G [43].

HORMONY

INSULINA I ESTROGENY

Na aktywację ekspresji genu *PAI-1* wpływ mają również insulina, glukoza oraz angiotensyna II. Upraszczając, stymulujący wpływ tych czynników na aktywację ekspresji *PAI-1* powoduje, że w stanach patologicznych, takich jak hiperinsulinemia (zwiększony poziom insuliny) czy insulinooporność (zwiększony poziom glukozy) dochodzi do zwiększenia poziomu *PAI-1*. Mechanizm ten powoduje, że *PAI-1* staje się niechlubnym łącznikiem pomiędzy stanami patologicznymi związanymi z metabolizmem glukozy a chorobami sercowo-naczyniowymi, głównie poprzez swoją rolę w hamowaniu fibrynolizy. Te mechanizmy i zależności stały się tematem wielu prac przeglądowych [44].

Co ciekawe, motywem w rejonie regulatorowym genu *PAI-1* skupiającym przekaz sygnału od tych czynników jest miejsce wiążące czynnik transkrypcyjny Sp-1. Motyw ten jest zlokalizowany w części proksymalnej promotora, -93/65 pz powyżej miejsca startu transkrypcji. I tak, Sp-1 uczestniczy w aktywacji ekspresji genu właśnie przez insulinę [45], glukozę (-85/-65) [46] oraz angiotensynę II (-78/-69) [47]. Insulina aktywuje ekspresję genu *PAI-1* poprzez swój receptor, następnie poprzez kinazę białkową C oraz wtórną aktywację kaskady kinaz MAP; podobny mechanizm potwierdzono dla angiotensyny II. Dodatkowo pokazano, że miejsce to bierze również udział w przekazie sygnału od glukozaminy [48]. Czynniki Sp-1 wiąże się również z sekwencją zlokalizowaną -150 pz powyżej miejsca startu transkrypcji. Sp-1 wraz z czynnikiem Ets-1 (związanym z sekwencją zlokalizowaną -115 pz) wspólnie uczestniczą w aktywacji ekspresji *PAI-1* w wyniku działania naprężeń ścinających spowodowanych np. przez przepływającą krew [49].

Na rejon regulatorowy, oprócz insuliny, mają wpływ estrogeny. Hormony te działają poprzez dwa typy receptorów ER α i ER β , które są zależnymi od związania liganda czynnikami transkrypcyjnymi. Mogą również działać pośrednio poprzez oddziaływanie z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, takimi jak AP-1, Sp1 czy CREB. *PAI-1* jest regulowany bezpośrednio przez ER α , który rozpoznaje miejsce ERE (ang. *estrogen response element*) znajdujące się -427/-407 pz powyżej miejsca startu transkrypcji. Natomiast ER α działa, prawdopodobnie, pośrednio i jest negatywnym regulatorem ekspresji genu *PAI-1* [50].

PAI-1 W CYKLU KOMÓRKOWYM

Innym negatywnym regulatorem ekspresji genu *PAI-1*, obok ER α , jest czynnik transkrypcyjny E2F. E2F jest jednym z głównych regulatorów odpowiadających za prawidłowy przebieg cyklu komórkowego, gdyż reguluje geny cyklin, kinaz cyklino-zależnych, niezbędnych do replikacji DNA i

do przejścia komórki z fazy Go/G1 do fazy S. Zwiększona ilość E2F w komórce na granicy faz G1 i S związana jest ze zmniejszoną ilością *PAI-1*. Co więcej, w komórkach z nadprodukcją E2F to właśnie *PAI-1* jest jednym z najbardziej hamowanych transkryptów. Do zahamowania transkrypcji *PAI-1*, E2F potrzebuje swojej domeny wiążącej DNA, co może świadczyć o bezpośrednim wpływie tego czynnika na rejon regulatorowy genu *PAI-1* [51]. Jako najsilnie zależny od hamującego wpływu E2F na ekspresję *PAI-1* wskazano motyw zidentyfikowany wcześniej jako wiążący czynnik transkrypcyjny p53 [52]. Związanie p53 do rejonu regulatorowego genu *PAI-1* powoduje aktywację transkrypcji i zwiększenie ilości *PAI-1*. Zakładając najprostszy mechanizm, *PAI-1* hamując aktywatory uPA i tPA, zapobiega niekontrolowanej przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej, co w prawidłowych komórkach związane jest z funkcją p53 jako supresora nowotworu. Motyw odpowiadający zarówno na p53 i E2F zlokalizowano około 159/-142 pz powyżej miejsca startu transkrypcji. Czynniki te mogą ze sobą współzawodniczyć o miejsce wiązania i o dostępne białko p300/CBP [53], które może promować albo aktywującą funkcję p53, albo hamującą funkcję E2F. Jest to jedyny motyw p53-zależny w rejonie regulatorowym *PAI-1*, ale, co ciekawe, białko p53 pełni niezależną od aktywacji transkrypcji funkcję w stabilizacji mRNA *PAI-1*, wiążąc się do 3'UTR gotowego transkryptu [54].

W przypadku E2F eliminacja miejsca wiązania nadal powoduje E2F-zależne zahamowanie ekspresji *PAI-1*, prawdopodobnie poprzez wykorzystanie innych fragmentów rejonu regulatorowego o mniejszym znaczeniu podstawowym. Ponieważ do swoich hamujących właściwości E2F wymaga również aktywnej domeny transaktywacyjnej, wydaje się prawdopodobny mechanizm, w którym E2F może oddziaływać z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, nie wiążąc się bezpośrednio do DNA, i w ten sposób hamować ekspresję *PAI-1*. Może również rekrutować inne represory transkrypcji.

PODSUMOWANIE

Zaprezentowany powyżej stan wiedzy dotyczący analizy funkcjonalnej rejonu regulatorowego genu *PAI-1* stanowi pierwszy etap poznawania regulacji ekspresji genów. Niezbędne jest powiązanie szlaków sygnalizacyjnych z konkretnymi czynnikami transkrypcyjnymi przez nie aktywowanymi oraz rozpoznanych mechanizmów molekularnych z powodującym je stanem fizjologicznym tkanki czy organizmu. Wiele grup badawczych zajmuje się białkiem *PAI-1* w kontekście wspomnianych schorzeń, mimo to rola *PAI-1* wciąż jest enigmatyczna, a mechanizmy molekularne czekają na wyjaśnienie. Pojawiające się wciąż doniesienia o zaangażowaniu *PAI-1* w kolejnych chorobach oraz coraz dokładniejsza analiza aktywacji jego ekspresji w dalszym ciągu zwiększają ilość pytań dotyczących białka *PAI-1*.

PIŚMIENNICTWO

- Gils A, Pedersen KE, Skottrup P, Christensen A, Naessens D, Deinum J, Enghild JJ, Declerck PJ, Andreasen PA (2003) Biochemical importance of glycosylation of plasminogen activator inhibitor-1. *Thromb Haemost* 90: 206-217
- Nordenhem A, Wiman B (1997) Plasminogen activation inhibitor-1 (*PAI-1*) content in platelets from healthy individuals genotyped for the

- 4G/5G polymorphism in the PAI-1 gene. *Scan J Clin Laboratory Invest* 57: 453-462
3. De Taeve B, Smith LH, Vaughan DE (2005) Plasminogen activator inhibitor-1: a common denominator in obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 5: 149-154
 4. Pannekoek H, Veerman H, Lambers H, Diergaarde P, Verweij CL, van Zonneveld AJ, van Mourik JA (1986) Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): a new member of the Serpin gene family. *EMBO J* 5: 2539-2544
 5. Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH (2000) The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 57: 25-40
 6. Salonen E-M, Vaehri A, Pöllänen J, Stephens R, Andreasen P, Mayer M (1989) Interaction of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) with vitronectin. *J Biol Chem* 264: 6339-6343
 7. Deng G, Royle G, Wang S, Crain K, Loskutoff DJ (1996) Structural and functional analysis of the plasminogen activator inhibitor-1 binding motif in the somatomedin B domain of vitronectin. *J Biol Chem* 271: 12716-12723
 8. Stefansson S, Lawrence DA (1996) The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature* 383: 441-443
 9. Vaughan DE (2005) PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 3: 1879-1883
 10. Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM (2002) Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 51: 1131-1137
 11. Cho SH, Ryu CH, Oh CK (2004) Plasminogen activator inhibitor-1 in the pathogenesis of asthma. *Exp Biol Med* (Maywood) 229: 138-146
 12. Kopeikina LT, Kamper EF, Koutsoukos V, Bassiakos Y, Stavridis I (1997) Imbalance of tissue-type plasminogen activator (t-PA) and its specific inhibitor (PAI-1) in patients with rheumatoid arthritis associated with disease activity. *Clin Rheumatol* 16: 254-260
 13. Nielsen HJ, Christensen IJ, Svendsen MN, Hansen U, Werther K, Brünner N, Petersen LJ, Kristensen JK (2002) Elevated plasma levels of vascular endothelial growth factor and plasminogen activator inhibitor-1 decrease during improvement of psoriasis. *Inflamm Res* 51: 563-567
 14. Lijnen HR (2005) Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost* 3: 35-45
 15. Duffy MJ (2002) Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem* 48: 1194-1197
 16. McMahon GA, Petittler E, Stefansson S, Smith E, Wong MK, Westrick RJ, Ginsburg D, Brooks PC, Lawrence DA (2001) Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *J Biol Chem* 276: 33964-33968
 17. Schmitt M, Wilhelm OG, Reuning U, Krüger A, Harbeck N, Lengyel E, Graeff H, Gansbacher B, Kessler H, Bürgle M, Stürzebecher J, Sperl S, Magdolen V (2000) The urokinase plasminogen activator system as a novel target for tumour therapy. *Fibrinolysis Proteolysis* 14: 114-132
 18. Klinger KW, Winqvist R, Riccio A, Andreasen PA, Sartorio R, Nielsen LS, Stuart N, Stanislovitis P, Watkins P, Douglas R (1987) Plasminogen activator inhibitor type 1 gene is located at region q21.3-q22 of chromosome 7 and genetically linked with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8548-8552
 19. Akiyoshi S, Ishii M, Nemoto N, Kawabata M, Aburatani H, Miyazono K (2001) Targets of transcriptional regulation by transforming growth factor-beta: expression profile analysis using oligonucleotide arrays. *Jpn J Cancer Res* 92: 257-268
 20. Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM (1998) Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 17: 3091-100
 21. Song CZ, Siok TE, Gelehrter TD (1998) Smad4/DPC4 and Smad3 mediate transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling through direct binding to a novel TGF-beta-responsive element in the human plasminogen activator inhibitor-1 promoter. *J Biol Chem* 273: 29287-29290
 22. Hua X, Miller ZA, Wu G, Shi Y, Lodish HF (1999) Specificity in transforming growth factor beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene: interactions of promoter DNA, transcription factor muE3, and Smad proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13130-13135
 23. Grinberg AV, Kerppola T (2003) Both Max and TFE3 cooperate with Smad proteins to bind the plasminogen activator inhibitor-1 promoter, but they have opposite effects on transcriptional activity. *J Biol Chem* 278: 11227-11236
 24. Allen RR, Qi L, Higgins PJ (2005) Upstream stimulatory factor regulates E box-dependent PAI-1 transcription in human epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol* 203: 156-165
 25. Samarakoon R, Higgins SP, Higgins CE, Higgins PJ (2008) TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells requires pp60(c-src)/EGFR(Y845) and Rho/ROCK signaling. *J Mol Cell Cardiol* 44: 527-538
 26. Woodward RN, Finn AV, Dichek DA (2005) Identification of intracellular pathways through which TGF-beta1 upregulates PAI-1 expression in endothelial cells. *Atherosclerosis* 186: 92-100
 27. Vayalil PK, Iles KE, Choi J, Yi AK, Postlethwait EM, Liu RM (2007) Glutathione suppresses TGF-beta-induced PAI-1 expression by inhibiting p38 and JNK MAPK and the binding of AP-1, SP-1, and Smad to the PAI-1 promoter. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L1281-1292
 28. Berg DT, Myers LJ, Richardson MA, Sandusky G, Grinnell BW (2005) Smad6s regulates plasminogen activator inhibitor-1 through a protein kinase C-beta-dependent up-regulation of transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 280: 4943-4947
 29. Imagawa S, Fujii S, Dong J, Furumoto T, Kaneko T, Zaman T, Satoh Y, Tsutsui H, Sobel BE (2006) Hepatocyte growth factor regulates E box-dependent plasminogen activator inhibitor type 1 gene expression in HepG2 liver cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2407-2413
 30. Schoenhard JA, Smith LH, Painter CA, Eren M, Johnson CH, Vaughan DE (2003) Regulation of the PAI-1 promoter by circadian clock components: differential activation by BMAL1 and BMAL2. *J Mol Cell Cardiol* 35: 473-481
 31. Muracciole X, Romain S, Dufour H, Palmari J, Chinot O, Ouafik L, Grisoli F, Branger DF, Martin PM (2002) PAI-1 and EGFR expression in adult glioma tumors: toward a molecular prognostic classification. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52: 592-598
 32. Paugh BS, Paugh SW, Bryan L, Kapitonov D, Wilczynska KM, Gopalan SM, Rokita H, Milstien S, Spiegel S, Kordula T (2008) EGF regulates plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) by a pathway involving c-Src, PKCdelta, and sphingosine kinase 1 in glioblastoma cells. *FASEB J* 22: 455-465
 33. Kasza A, Kiss DL, Gopalan S, Xu W, Rydel RE, Koj A, Kordula T (2002) Mechanism of plasminogen activator inhibitor-1 regulation by oncostatin M and interleukin-1 in human astrocytes. *J Neurochem* 83: 696-703
 34. Xiao W, Hsu YP, Ishizaka A, Kirikae T, Moss RB (2005) Sputum cathelicidin, urokinase plasminogen activation system components, and cytokines discriminate cystic fibrosis, COPD, and asthma inflammation. *Chest* 128: 2316-2326
 35. Loskutoff DJ, Samad F (1998) The adipocyte and hemostatic balance in obesity: studies of PAI-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1-6
 36. Chen YQ, Sloan-Lancaster J, Berg DT, Richardson MA, Grinnell B, Tseng-Crank J (2001) Differential mechanisms of plasminogen activator inhibitor-1 gene activation by transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha in endothelial cells. *Thromb Haemost* 86: 1563-1572
 37. Hou B, Eren M, Painter CA, Covington JW, Dixon JD, Schoenhard JA, Vaughan DE (2004) Tumor necrosis factor alpha activates the human plasminogen activator inhibitor-1 gene through a distal nuclear factor kappaB site. *J Biol Chem* 279: 18127-18136

38. Swiatkowska M, Szymraj J, Cierniewski CS (2005) Induction of PAI-1 expression by tumor necrosis factor alpha in endothelial cells is mediated by its responsive element located in the 4G/5G site. *FEBS J* 272: 5821-5831
39. Dawson S, Hamsten A, Wiman B, Henney A, Humphries S (1991) Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity. *Arterioscler Thromb* 11: 183-190
40. Ma Z, Jhun B, Jung SY, Oh CK (2008) Binding of upstream stimulatory factor 1 to the E-box regulates the 4G/5G polymorphism-dependent plasminogen activator inhibitor 1 expression in mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 121: 1006-1012
41. Takeshita Y, Takamura T, Hamaguchi E, Shimizu A, Ota T, Sakurai M, Kaneko S (2006) Tumor necrosis factor-alpha-induced production of plasminogen activator inhibitor 1 and its regulation by pioglitazone and cerivastatin in a nonmalignant human hepatocyte cell line. *Metabolism* 55: 1464-1472
42. Healy AM, Gelehrter TD (1994) Induction of plasminogen activator inhibitor-1 in HepG2 human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J Biol Chem* 269: 19095-19100
43. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM (1993) The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 268: 10739-10745
44. Huber K (2001) Defective fibrinolytic states as triggers of myocardial infarction: the cardiologist's view. *Ital Heart J* 2: 646-651
45. Banfi C, Eriksson P, Giandomenico G, Mussoni L, Sironi L, Hamsten A, Tremoli E (2001) Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 gene by insulin: insights into the signaling pathway. *Diabetes* 50: 1522-1530
46. Chen YQ, Su M, Walia RR, Hao Q, Covington JW, Vaughan DE (1998) Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273: 8225-8231
47. Motojima M, Ando T, Yoshioka T (2000) Sp1-like activity mediates angiotensin-II-induced plasminogen-activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene expression in mesangial cells. *Biochem J* 49: 435-441
48. Goldberg HJ, Scholey J, Fantus IG (2000) Glucosamine activates the plasminogen activator inhibitor 1 gene promoter through Sp1 DNA binding sites in glomerular mesangial cells. *Diabetes* 49: 863-871
49. Nakatsuka H, Sokabe T, Yamamoto K, Sato Y, Hatakeyama K, Kamiya A, Ando J (2006) Shear stress induces hepatocyte PAI-1 gene expression through cooperative Sp1/Ets-1 activation of transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291: 26-34
50. Smith LH, Coats SR, Qin H, Petrie MS, Covington JW, Su M, Eren M, Vaughan DE (2004) Differential and opposing regulation of PAI-1 promoter activity by estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in endothelial cells. *Circ Res* 95: 269-275
51. Koziczak M, Müller H, Helin K, Nagamine Y (2001) E2F1-mediated transcriptional inhibition of the plasminogen activator inhibitor type 1 gene. *Eur J Biochem* 268: 4969-4978
52. Kunz C, Pebler S, Otte J, von der Ahe D (1995) Differential regulation of plasminogen activator and inhibitor gene transcription by the tumor suppressor p53. *Nucleic Acids Res* 23: 3710-3717
53. Lee CW, Sorensen TS, Shikama N, La Thangue NB (1998) Functional interplay between p53 and E2F through co-activator p300. *Oncogene* 16: 2695-2710
54. Shetty S, Shetty P, Idell S, Velusamy T, Bhandary YP, Shetty RS (2008) Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by tumor suppressor protein p53. *J Biol Chem* 283:19570-19580

Regulation of PAI-1 expression

Paulina Wyrzykowska[✉], Aneta Kasza

Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Department of Cell Biochemistry, Jagiellonian University, 7 Gronostajowa Str., 30-387 Kraków, Poland

[✉]e-mail: paulinawyrzykowska@tlen.pl

Key words: PAI-1, regulation, expression, promoter, migration, tumour cells

ABSTRACT

PAI-1 (plasminogen activator inhibitor - 1) is a member of plasminogen cascade with an inhibitory role in plasmin activation. Plasmin is a protease capable of acting on wide range of substrates and, together with metalloproteinases, is a main proteolytic enzyme. Except its role in plasminogen cascade, PAI-1 has an affinity to vitronectin and uPA/uPAR what involves PAI-1 in cell's motility. PAI-1 gene is regulated in response to cytokines, hormones and many growth factors among which TGFβ is the most important one. The PAI-1 promoter contains SBE, CAGA box, HRE, ERE, NFκB - binding sites, Sp-1, AP-1 and other. Cooperation between transcription factors bound to promoter and cross-talks between kinases and other upstream proteins decide about gene expression. This work describes the present knowledge in this field.

Białka z rodziny MADS – kombinatoryczne regulatory transkrypcji u grzybów, zwierząt i roślin

Łukasz Szafron¹

Tomasz Jagielski²

Agnieszka Dzikowska^{3,4,✉}

¹Zakład Patologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa

²Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

³Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

⁴Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

✉Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa; tel.: (022) 592 22 42, e-mail: adzik@ibb.waw.pl

Artykuł otrzymano 24 listopada 2008 r.
Artykuł zaakceptowano 6 stycznia 2009 r.

Słowa kluczowe: czynniki transkrypcyjne, domena MADS, SRF, MEF2, Mcm1p, rozwój kwiatu

Wykaz skrótów: ARC (ang. *arginine control element*) – sekwencja rozpoznawana przez kompleks białek ArgRp i Mcm1p; CaMK (ang. *calcium / calmodulin dependent protein kinase*) – kinaza białkowa zależna od wapnia i kalmoduliny; HAT (ang. *histone acetyltransferase*) – acetylotransferaza histonów; HDAC (ang. *histone deacetylase*) – deacetylaza histonów; MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*) – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny, kinaza MAP; PRE (ang. *pheromone response element*) – sekwencja rozpoznawana przez Ste12p; SRE (ang. *serum response element*) – sekwencja DNA rozpoznawana przez SRF; SRF (ang. *serum response factor*) – czynnik odpowiedzi na surowicę krwi

STRESZCZENIE

Strukturalne i funkcjonalne zróżnicowanie komórek wynika głównie z kombinatorycznej regulacji ekspresji genów, w której czynniki transkrypcyjne w różny sposób i w odmiennych kombinacjach oddziałują ze sobą w odpowiedzi na sygnały przekazywane przez odpowiednie ścieżki przekazywania sygnałów. Występujące we wszystkich królestwach eukariotycznych czynniki transkrypcyjne z rodziny MADS pełnią kluczową funkcję w przekazywaniu sygnałów do genomu. Białka MADS oddziałują z innymi regulatorami, tworząc kompleksy aktywujące lub hamujące transkrypcję. W wielu przypadkach te dodatkowe białka wpływają na powinowactwo i specyficzność kompleksu w stosunku do sekwencji docelowej, wpływają na strukturę chromatyny oraz decydują o tym, które grupy genów i w jaki sposób podlegają regulacji. Charakterystyczną cechą białek MADS jest obecność zachowanej w ewolucji domeny MADS, niezbędnej do wiązania i zaginania DNA, dimeryzacji oraz oddziaływania z innymi białkami. Zwierzęce białka MADS biorą udział w regulacji procesów wzrostu i różnicowania komórek, morfogenezy i embriogenezy; w komórkach drożdży uczestniczą w kontroli cyklu komórkowego, regulacji ekspresji genów specyficznych dla typu płciowego, metabolizmu argininy, biosyntezy ściany komórkowej i odpowiedzi komórki na stres osmotyczny; u roślin pełnią funkcje homeotypczne, regulując proces rozwoju kwiatów. W niniejszej pracy przedstawiono charakterystykę białek MADS z punktu widzenia ich oddziaływań z innymi białkami oraz mechanizmu ich aktywacji przez różne ścieżki przekazywania sygnału oraz podsumowano teorie dotyczące ewolucji tej rodziny eukariotycznych czynników transkrypcyjnych.

WPROWADZENIE

Białka z rodziny MADS stanowią liczną rodzinę czynników transkrypcyjnych biorących udział w kontroli podstawowych procesów metabolicznych i rozwoju oraz przekazywaniu sygnałów w komórkach eukariotycznych. Białka te są szeroko rozpowszechnione u *Eucaryota*, zidentyfikowano je u grzybów, zwierząt oraz roślin. Domena MADS (ang. *MADS-box*) jest kluczowa dla funkcji białka, a jej sekwencja aminokwasowa jest zachowana w ewolucji [1,2]. W zależności od niewielkich różnic w sekwencji aminokwasowej domeny MADS oraz od obecności dodatkowych domen w białku, czynniki transkrypcyjne z rodziny MADS dzieli się na dwie odrębne klasy. Pierwszą tworzą czynniki MADS typu I (podobne do SRF), do których zalicza się m.in. SRF - czynnik odpowiedzi na surowicę krwi u człowieka, Mcm1p i ArgR1p z *Saccharomyces cerevisiae*, a także niektóre roślinne białka MADS, jak AGL34-like, AGL30, czy AGL33 z rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*). Drugą klasę stanowią czynniki MADS typu II (podobne do MEF2). Należą do niej regulatory MEF2 zwierząt, białka Rlm grzybów, a także większość białek MADS roślin. Niektóre czynniki transkrypcyjne zawierające domenę MADS trudno jest zaklasyfikować do I lub II typu [1,3].

BUDOWA CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH Z RODZINY MADS

Nazwa domeny MADS pochodzi od nazw 4 najwcześniej zidentyfikowanych białek posiadających tę domenę: drożdżowego Mcm1p, roślinnych AGAMOUS i DEFICIENS oraz zwierzęcego SRF [2]. Budowę białek z tej rodziny przedstawiono schematycznie na rycinie 1. Trzeciorzędowa struktura domeny MADS jest dobrze poznana [4-6], a białka ją zawierające wiążą się z DNA jako homolub heterodimery. Domena MADS składa się z 56. konserwowanych aminokwasów odpowiedzialnych za oddziaływanie z DNA i dimeryzację. W jej obrębie można wyróżnić dwa regiony o odmiennych funkcjach (Ryc. 1a). Hydrofilowy N-końcowy region domeny, zawierający stosunkowo dużo aminokwasów zasadowych, ma budowę α -helikalną i odpowiada za specyficzne wiązanie białka z DNA. Natomiast region położony bliżej końca C domeny jest zbudowany z dwóch hydrofobowych struktur β biorących udział w dimeryzacji, między którymi znajduje się pętla β . Domeny MADS w białkach typu I i II nieco różnią się sekwencją najwyższej zgodności i dlatego wyróżnia się domenę MADS typu SRF (w białkach typu I) oraz domenę typu MEF2 (w białkach typu II). Lokaliza-

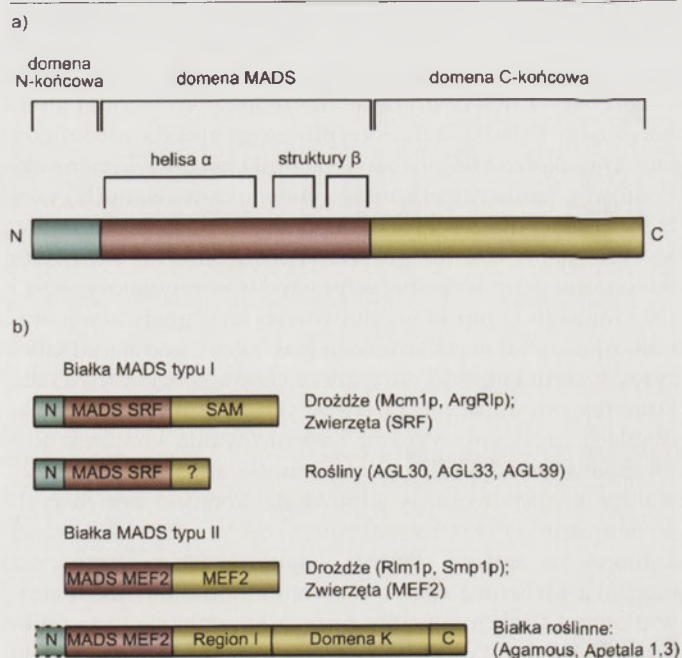
cja domeny MADS w obrębie białka jest zmienna lecz najczęściej znajduje się ona w jego N-końcowym fragmencie [1,2].

Domena znajdująca się na końcu C białek MADS ma zmienną długość, a jej struktura jest inna w różnych grupach tych białek (Ryc. 1b). Jest ona niezbędna do prawidłowego funkcjonowania białka - bierze udział w procesie dimeryzacji i aktywacji transkrypcji. Wykazano, że SRF dimeryzuje z czynnikami ArgR1p i Mcm1p drożdży, tworząc z nimi trwałe kompleksy, co wskazuje na funkcjonalne podobieństwo domen C-końcowych w tych trzech białkach. Dlatego też region położony za domeną MADS w tej grupie białek nazywano domeną SAM (SRF, ArgR1p, Mcm1p) (Ryc. 1b). W białkach podobnych do MEF2 region C-końcowy różni się od domeny SAM i nazywany jest domeną MEF2. Obydwie te domeny zawierają helisę α , niezbędną w procesie dimeryzacji.

Roślinne białka MADS stanowią dużą i bardzo różnorodną grupę czynników transkrypcyjnych. Sekwencjonowanie genomu rzodkiewnika pozwoliło zidentyfikować w genomie tego organizmu 107 genów, kodujących białka z domeną MADS, jednak funkcja przeszło 80% z nich nie jest znana [7]. Najliczniejszą i najlepiej poznaną grupę roślinnych czynników transkrypcyjnych z tej rodziny tworzą białka należące do klasy II z domeną typu MEF2. Oprócz domeny MADS zawierają one również zachowaną w ewolucji domenę K (podobną do keratyny) (Ryc. 1b). Składa się ona z około 80 aminokwasów tworzących trzy α helisy, które najprawdopodobniej wiążą inne białka poprzez tworzenie struktur typu „coiled-coil”, umożliwiających jednoczesne oddziaływanie więcej niż dwóch białek. Domeny MADS i K są rozdzielone krótką, złożoną z 30 reszt aminokwasowych, w niewielkim stopniu zachowaną w ewolucji sekwencją zwaną regionem I, którą wspomaga domenę MADS w procesie dimeryzacji. W białkach MADS tego typu występuje ponadto położony na końcu C region zmienny, który stabilizuje oddziaływanie między białkami i może pełnić funkcję domeny aktywującej [8]. Roślinne czynniki transkrypcyjne posiadające domenę MADS, region I, domenę K i region zmienny C nazwano białkami MIKC.

BIAŁKA Z DOMENĄ MADS WIĄŻĄ SIĘ ZE SPECYFICZNĄ SEKWENCJĄ DNA I MAJĄ ZDOLNOŚĆ ZAGINANIA CZĄSTECZKI DNA

Białka z rodziny MADS rozpoznają sekwencje bogate w AT, nazywane sekwencją CArG. Sekwencja najwyższej zgodności dla miejsc wiązania białek z domeną typu SRF to CC(A/T)₀GG, a dla białek z domeną typu MEF2-CTA(A/T)₄TAG [2]. Zbadanie kryształów białek MADS związanych z DNA [4-6] wykazało, że dimer związany z DNA ma strukturę trójwarstwową. Pierwszą warstwę tworzą oddziałujące ze sobą helisy α domen MADS (po jednej z każdego monomeru), specyficznym oddziałujące z zasadami azotowymi oraz z resztami fosforanowymi w obrębie większej bruzdy helisy DNA. Warstwę środkową tworzy czteroniciowa harmonijka β (po dwie struktury β domen MADS z każdego monomeru), która odpowiada za dimeryzację dwóch domen MADS, a także oddziałuje z resztami fosforanowymi DNA poza sekwencją CArG. Górna warstwa składa się z he-



Rycina 1. Budowa białek z rodziny MADS. a - ogólny schemat budowy białek MADS; b - różnice w budowie dwóch typów białek MADS. MADS SRF – domena MADS typu SRF; MADS MEF2 – domena MADS typu MEF2. „?” – region o zmiennej długości i nie scharakteryzowanej funkcji na końcu C roślinnych białek MADS typu I. Domenę N-końcową roślinnych białek MADS typu II zaznaczono linią przerywaną, ponieważ występuje ona tylko u części białek z tej grupy.

lis α i domen C. W specyficznym oddziaływaniu z sekwencją docelową biorą również udział krótkie sekwencje znajdujące się na końcu N białka, tuż przed domeną MADS. Białka MADS różnią się sposobem oddziaływania tych sekwencji z DNA, co prowadzi do różnic w specyficzności wiązania sekwencji docelowych.

Związanie białka indukuje powstanie w DNA zagięcia. Różne białka MADS zaginają DNA w różnym stopniu. Najsilniej zaginają DNA SRF, Mcm1p i niektóre białka roślinne, natomiast związanie MEF2A i R1mp indukuje tylko minimalne zagięcie w DNA [2]. O zdolności zaginania cząsteczki DNA decydują pojedyncze aminokwasy domeny MADS, a różnice w stopniu zagięcia zależą od aminokwasów w N-końcowej części helisy α i w pętli β tej domeny. W przypadku niektórych białek MADS, jak Mcm1p, stopień zagięcia DNA zależy od sekwencji nukleotydowej miejsca wiązania. Wykazano, że zagięcie DNA przez to białko jest konieczne do jego oddziaływania z innymi białkami regulacyjnymi [9], oraz że stopień zagięcia zależy od tego czy Mcm1p wiąże się z sekwencją docelową samo, czy też w kompleksie z innym białkiem [10]. Zagięcie DNA najprawdopodobniej ułatwia wiązanie białka MADS z sekwencją docelową, wpływa na jego zdolność do aktywacji transkrypcji oraz prowadzi do powstania kompleksu białko – DNA, o strukturze umożliwiającej wiązanie kolejnych białek regulacyjnych lub podstawowych czynników transkrypcyjnych w rejonie promotora lub wzmacniacza.

SRF - CZYNNIK ODPOWIEDZI NA SUROWICĘ KRWI JEST JEDNYM Z NAJLEPIEJ POZNANYCH BIAŁEK MADS

Białko SRF u człowieka jest zbudowane z 508 reszt aminokwasowych. Domena MADS rozpoznaje typową se-

kwencję CARG, nazywaną sekwencją SRE. Przed domeną MADS znajduje się złożona ze 132 reszt aminokwasowych domena N-końcowa obejmująca miejsca fosforylacji. Rejon C-końcowy zawiera domenę aktywującą. W wyniku alternatywnego składania transkryptu mogą powstawać krótsze izoformy białka SRF pozbawione funkcjonalnej domeny aktywującej, hamujące ekspresję genów aktywowanych przez białko pełnej długości [11]. Znanych jest ponad 160 genów, których ekspresja jest regulowana przez SRF [12]. Należą do nich liczne geny wczesnej odpowiedzi – regulatory wzrostu i rozwoju komórki w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe, takie jak surowica krwi; geny kodujące białka cytoszkieletu komórki oraz szereg genów specyficznych dla komórek mięśniowych i nerwowych. SRF bierze udział w regulacji procesów wzrostu i różnicowania komórek; jest niezbędne w odpowiedzi na czynniki stresowe czy aktywatory wirusowe oraz w odpowiedzi komórek nerwowych na neurotrofiny i neurotransmitery; decyduje o wrażliwości komórek na zmiany stężenia wapnia w ich wnętrzu oraz odgrywa kluczową rolę w rozwoju embrionalnym, w prawidłowym funkcjonowaniu mózgu, uczeniu się i zapamiętywaniu [13-18]. W każdym z tych procesów SRF oddziałuje z różnymi białkami specyficznymi dla poszczególnych tkanek lub regulowanymi przez kilka ścieżek przekazywania sygnału.

SRF AKTYWUJE EKSPRESJĘ GENÓW Wczesnej odpowiedzi

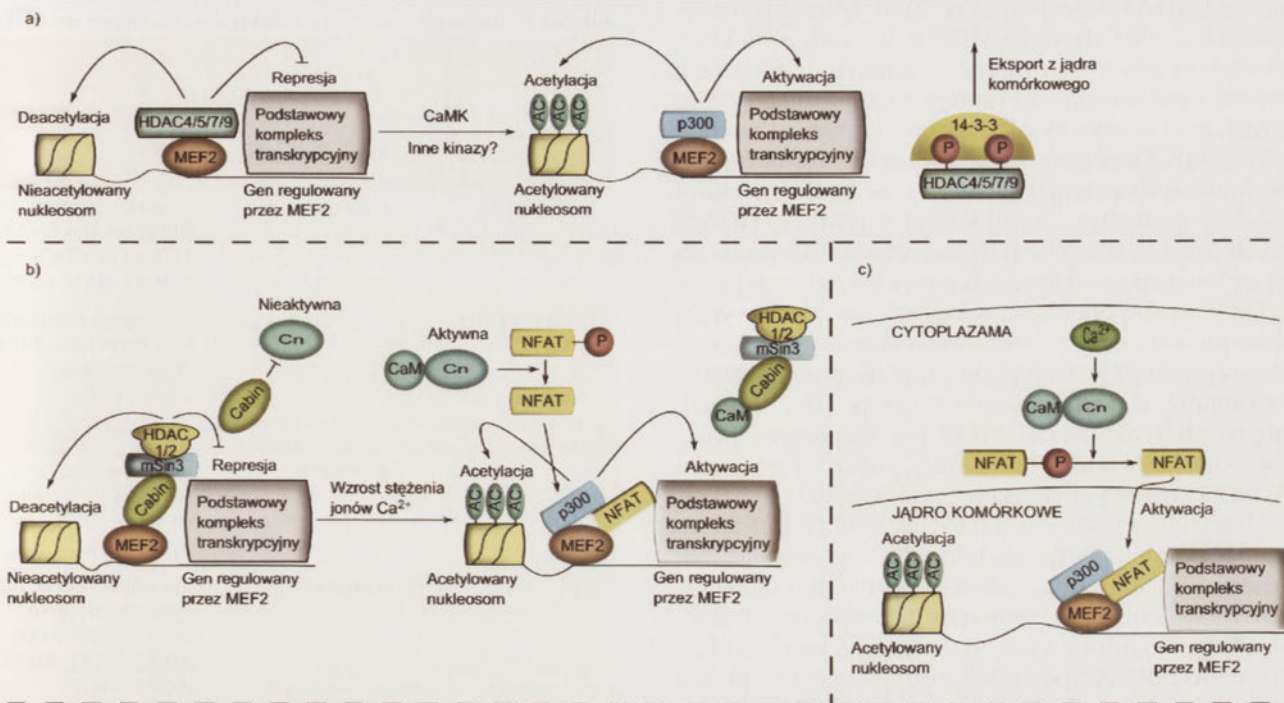
Ekspresja genów wczesnej odpowiedzi, takich jak *c-fos*, *egr1* czy *junB*, jest indukowana natychmiast po zadziałaniu na komórkę sygnału zewnętrznego. Indukcja ta zależy od SRF, które jest aktywowane przez kilka różnych ścieżek przekazywania sygnału. Pierwszym z poznanych czynników aktywujących SRF była surowica krwi, jednak obecnie znamy ich dużo więcej [13]. Najlepiej poznanym sposobem aktywacji SRF jest utworzenie na DNA kompleksu składającego się z dimeru SRF i jednego z białek z podrodziny TCF: Elk1, SAP1 lub net (SAP2) – istotnych w różnicowaniu komórek nerwowych (Elk1), limfocytów T (SAP1) i angiogenezie (net) [19,20]. Białka te zawierają domenę ETS (wariant domeny wiążącej DNA typu uskrzydłona helisa – skręt – helisa), która umożliwia wiązanie specyficznej sekwencji w DNA położonej obok miejsca SRE. Wiązanie Elk1 z DNA jest możliwe tylko po wcześniejszym związaniu SRF (wiązanie kooperatywne). SAP1 może się samo wiązać z DNA, ale obserwuje się również kooperatywne wiązanie z SRF. Białka TCF za pośrednictwem domeny B oddziałują z hydrofobową kieszenią na powierzchni białka SRF – częścią domeny MADS. Obserwuje się również oddziaływanie między domeną ETS i domeną MADS, które zwiększają specyficzność oddziaływania z promotorem [21,22]. Białka TCF zawierają C-końcową domenę aktywującą, która jest fosforylowana przez jedną z kinaz MAP (ERK, JNK lub p38) po aktywacji odpowiedniej ścieżki przekazywania sygnału [23]. Fosforylacja ta prowadzi do zmiany konformacji białka TCF, umożliwiając jego oddziaływanie z DNA i SRF oraz z koaktywatorami, takimi jak acetylotransferazy histonów, czy też ze składnikami kompleksu mediatora, co prowadzi do inicjacji transkrypcji genów wczesnej odpowiedzi. Wynikiem fosforylacji białka TCF może być też rekrutacja korepresora – deacetylazy histonów, czego skutkiem jest

wyciszenie transkrypcji regulowanych genów [24]. Ostatnio wykazano, że Elk1 nie tylko jest fosforylowane przez kinazę ERK, ale również rekrutuje ją do promotora, gdzie może ona brać udział w fosforylacji białek kompleksu preinicjacyjnego [25]. Samo SRF może być również fosforylowane w obrębie domeny N-końcowej przez kaskadę kinaz ERK i p38 [26]. W ten sposób kompleks SRF/TCF reguluje ekspresję genów w odpowiedzi na czynniki wzrostowe, mitogeny, cytokiny i stres. Ekspresja genów wczesnej odpowiedzi jest aktywowana lub hamowana w zależności od sygnałów zewnątrzkomórkowych i rodzaju kompleksów modyfikujących histony rekrutowanych w rejon promotora. Aktywacja ścieżek przekazywania sygnału może również prowadzić do zmiany lokalizacji SRF z jądrowej na cytoplazmatyczną [27].

SRF może również regulować ekspresję genów w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe bez udziału białek TCF, oddziałując z regulatorami MAL(MRTF-A) i MRTF-B, których aktywność jest kontrolowana przez ścieżkę przekazywania sygnału zależną od GTPaz z rodziny Rho i monomeryczną aktynę [16]. MAL i MRTF-B należą do rodziny koaktywatorów podobnych do miokardyny [28]. MAL oddziałuje z tą samą hydrofobową kieszenią na powierzchni SRF, co białka TCF, jednak nie wiąże się specyficznie z DNA. Utworzenie na DNA kompleksu MAL/SRF zależy od zagięcia DNA przez SRF [29]. MAL i MRTF-B występują często w tych samych komórkach co białka TCF. Wybór i ewentualna wymiana koaktywatora oddziałującego z SRF może zależeć od fosforylacji jego domeny MADS, sekwencji konkretnego promotora czy też stężenia tych regulatorów w komórce [16]. MAL przeważnie znajduje się w cytoplazmie i jest transportowane do jądra dopiero w odpowiedzi na sygnały aktywujące geny przez nie regulowane, np. surowicę krwi. Wiadomo, że monomery aktyny G wiążą się z MAL i prawdopodobnie blokują jego transport do jądra. Hamowanie to zostaje zniesione po uruchomieniu ścieżki przekazywania sygnału zależnej od Rho, indukującej proces polimeryzacji aktyny. Następuje akumulacja MAL w jądrze, gdzie może ono oddziaływać z SRF i aktywować ekspresję genów docelowych, m.in. genów kodujących białka cytoszkieletu [18,30]

SRF REGULUJE EKSPRESJĘ GENÓW SPECYFICZNYCH DLA KOMÓREK MIĘŚNIOWYCH

W komórkach mięśni gładkich, szkieletowych i w komórkach mięśnia sercowego SRF reguluje ekspresję genów kodujących specyficzne białka, takie jak miozyna, a także specyficzne dla mięśni cząsteczki mikroRNA [13,14,17]. Specyficznym dla komórek mięśniowych koaktywatorem SRF jest miokardyna (ang. *myocardin*) należąca do tej samej rodziny regulatorów co MAL i MRTF-B [28]. W wyniku alternatywnego składania transkryptu miokardyny powstają dwie izoformy tego białka: dłuższa, wyrażana w mięśniu sercowym, i krótsza, specyficzna dla mięśni gładkich. W przeciwieństwie do MAL i MRTF-B, miokardyna jest konstytutywnie zlokalizowana w jądrze, a jej aktywność nie jest regulowana przez ścieżkę przekazywania sygnałów zależną od Rho. Wykazano, że kompleks SRF/miokardyna oddziałuje z nukleosomami, w których histony mają specyficzne dla komórek mięśniowych modyfikacje, oraz że miokardyna



Rycina 2. Zależne od stężenia jonów Ca²⁺ mechanizmy regulacji ekspresji genów przez MEF2. a – aktywacja MEF2 przez ścieżkę przekazywania sygnału związaną z kinazą CaMK; b – regulacja aktywności MEF2 przez białko Cabin1; c – aktywacja MEF2 przez białko NFAT; CaM – kalmodulina, Cn – kalcineuryna, p300 – acetylaza histonów p300. Pozostałe objaśnienia w tekście. Rycina wg. [33]; przedrukowano za zgodą Elsevier.

na aktywuje transkrypcję poprzez rekrutację acetylotransferazy histonów [31].

Zidentyfikowano również kilka innych czynników transkrypcyjnych współdziałających z SRF, takich jak aktywatory z rodziny GATA z palcem cynkowym typu Cys₃ czy też zawierające homeodomenę aktywatory z rodziny Nkx2-5. Białka te wiążą się ze specyficznymi sekwencjami w DNA, oddziałując również z SRF. Wydaje się jednak możliwe, że te oddziaływania wymagają wcześniejszego powstania kompleksu SRF/TCF lub SRF/białka MRTF [14,16].

REGULATORY MEF2 – RODZINA BIAŁEK MADS TYPU II

Rodzinę białek MEF2 (ang. *Myocyte Enhancer Factor 2*) u człowieka tworzą cztery białka MEF2-A, -B, -C i -D, kodowane przez odrębne geny. Domena MADS znajduje się na samym końcu N. Białka MEF2 tworzą ze sobą homo- i heterodimery, nie tworzą jednak heterodimerów z SRF zawierającym domenę MADS typu I [2]. Białka MEF2 różnią się między sobą sekwencją domeny C-końcowej. Jest ona niezbędna do aktywacji transkrypcji i oddziaływań z innymi białkami, a także zawiera domenę dokującą – region oddziaływania z kinazami MAP. W wyniku alternatywnego składania transkryptów powstają również specyficzne tkanekowo izoformy białek MEF2 [32].

Białka MEF2 regulują ekspresję niektórych genów wczesnej odpowiedzi, takich jak *c-jun* oraz genów specyficznych dla komórek mięśniowych i nerwowych. ME2A i D wyrażane są w różnych tkankach, a profile ekspresji ich genów częściowo się pokrywają. MEF2C wyrażane jest głównie w rozwijających się mięśniach prążkowanych i w mózgu. Białka MEF2 odgrywają kluczową rolę w różnicowaniu, rozwoju i metabolizmie komórek mięśniowych, neuronów

i limfocytów. Podobnie jak SRF, w każdym z tych procesów MEF2 oddziałują z różnymi białkami specyficznymi dla poszczególnych tkanek lub regulowanymi przez kilka ścieżek przekazywania sygnału, w tym przez szlaki zależne od stężenia jonów wapnia [32,33]. MEF2 aktywują ekspresję *c-jun* w odpowiedzi na pobudzenie różnych receptorów, np. receptorów sprzężonych z białkami G czy EGFR, co prowadzi do uruchomienia ścieżek przekazywania sygnału kinaz MAP (ERK lub p38). p38 wiąże się z domeną dokującą MEF2 i fosforyluje jego domenę aktywującą zwiększając zdolność MEF2 do aktywacji transkrypcji [34]. MEF2 mogą być również fosforylowane przez kinazę ERK5, z którą oddziałują poprzez domenę MADS. Ponieważ ERK5 zawiera także domenę aktywującą, przypuszcza się, że białko to może też spełniać funkcję koaktywatora, rekrutując podstawowe czynniki transkrypcyjne [35].

W czasie różnicowania komórek mięśni szkieletowych białka MEF2 wiążą się z promotorami specyficznych genów i aktywują ich ekspresję, współdziałając z głównymi regulatorami – aktywatorami z rodziny MyoD. Zawierają one domenę typu bHLH (zasadowa helisa – pętla – helisa), odpowiedzialną za dimeryzację i wiązanie ze specyficzną sekwencją w DNA. Białka MyoD wiążą się z DNA jako heterodimery z białkami E. W promotorach genów specyficznych dla komórek mięśniowych sekwencje rozpoznawane przez MyoD i MEF2 położone są obok siebie. Białka te oddziałują ze sobą za pośrednictwem domen bHLH i MADS. MEF2 regulują ekspresję nie tylko specyficznych dla mięśni genów struktury, ale także genów kodujących specyficzne czynniki transkrypcyjne, takie jak miogenina, oraz specyficzne cząsteczki mikroRNA [32,36,37].

MEF2 regulują ekspresję genów poprzez rekrutację w rejon promotora kompleksów deacetylaz (HDAC) lub ace-

tylotransferaz (HAT) histonów (Ryc. 2). W komórkach mięśnia sercowego oddziaływanie MEF2 z deacetylazami klasy II prowadzi do zmiany struktury chromatyny na bardziej upakowaną i zahamowania ekspresji regulowanego genu. Stres uruchamia ścieżkę przekazywania sygnału aktywującą kinazy CaMK, które fosforylują deacetylazy histonów. Do ufosforylowanej deacetylazy przyłącza się białko opiekuńcze 14-3-3, co powoduje rozpad kompleksu MEF2/HDAC. W wyniku przyłączenia 14-3-3 do deacetylazy dochodzi do zmiany jej konformacji (ukrycia sekwencji lokalizacji jądrowej (NLS) i wyeksponowania sekwencji eksportu z jądra (NES)), co prowadzi do eksportu deacetylaz do cytoplazmy. Odblokowane MEF2 rekrutują do promotora acetylotransferazę histonów, aktywując ekspresję genów (Ryc. 2a) [37]. W limfocytach T aktywność MEF2 jest hamowana przez białko Cabin1, które oddziałuje z MEF2 poprzez jego domenę MADS. Za pośrednictwem korepresora mSin3 Cabin1 rekrutuje deacetylazy histonów (HDAC) klasy I [38]. Ostatnio wykazano, że Cabin1 bezpośrednio rekrutuje również metylotransferazę histonów, co także prowadzi do kondensacji chromatyny [39]. W zaktywowanych limfocytach T kompleks Ca^{2+} /kalmodulina wiąże się z kompleksem MEF2/Cabin1/mSin3/HDAC, powodując odłączenie kompleksu Cabin1/mSin3/HDAC od związanego z DNA MEF2. Odblokowane MEF2 rekrutuje koaktywatory i aktywuje transkrypcję (Ryc. 2b). MEF2 mogą również współpracować z białkiem NFATc2. Białka z rodziny NFAT w formie ufosforylowanej zlokalizowane są w cytoplazmie. Po defosforylacji przez kalcyneurynę, fosfatazę serynowo-treoninową aktywowaną po przyłączeniu jonów wapnia i kalmoduliny, białka NFAT transportowane są do jądra, gdzie aktywują transkrypcję genów docelowych. NFATc2 tworzy kompleks z MEF2 i rekrutuje koaktywator, acetylazę histonów, aktywując transkrypcję (Ryc. 2c) [33,40]. Opisane powyżej białko Cabin1 jest również inhibitorem kalcyneuryny. Hamując jej aktywność, Cabin1 blokuje transport aktywatorów NFAT do jądra (Ryc. 2b). Kalcyneuryna może także defosforylować samo białko MEF2, co wpływa na inne jego modyfikacje (jak acetylacja i sumoilacja) i modyfikuje zdolność MEF2 do aktywacji transkrypcji [41].

BIAŁKA MADS U GRZYBÓW

U grzybów zidentyfikowano białka MADS należące zarówno do I typu (podobne do SRF), jak o do II typu (podobne do MEF2). U drożdży *S. cerevisiae* występują dwa białka typu I - Mcm1p i ArgR1p oraz dwa białka typu II - Rlm1p i Smp1p. Mcm1p jest białkiem niezbędnym do życia komórki, bierze udział w regulacji cyklu komórkowego, regulacji ekspresji genów specyficznych dla typu płciowego, utrzymywaniu w komórce minichromosomów, rekombinacji, regulacji transkrypcji retrotranspozonu Ty1 oraz regulacji procesów związanych z utrzymaniem struktury ściany komórkowej. Mcm1p i ArgR1p współdziałają w regulacji metabolizmu argininy [42,43]. W każdym z tych procesów Mcm1p oddziałuje z innymi białkami regulacyjnymi, aktywując różne grupy genów w odpowiedzi na różne sygnały (Tab. 1). Rlm1p reguluje ekspresję genów związanych z biosyntezą ściany komórkowej [44], a Smp1p uczestniczy w regulacji odpowiedzi komórki na stres osmotyczny [45].

Tabela 1. Funkcje regulatora Mcm1p z drożdży i oddziałujące z nim białka.

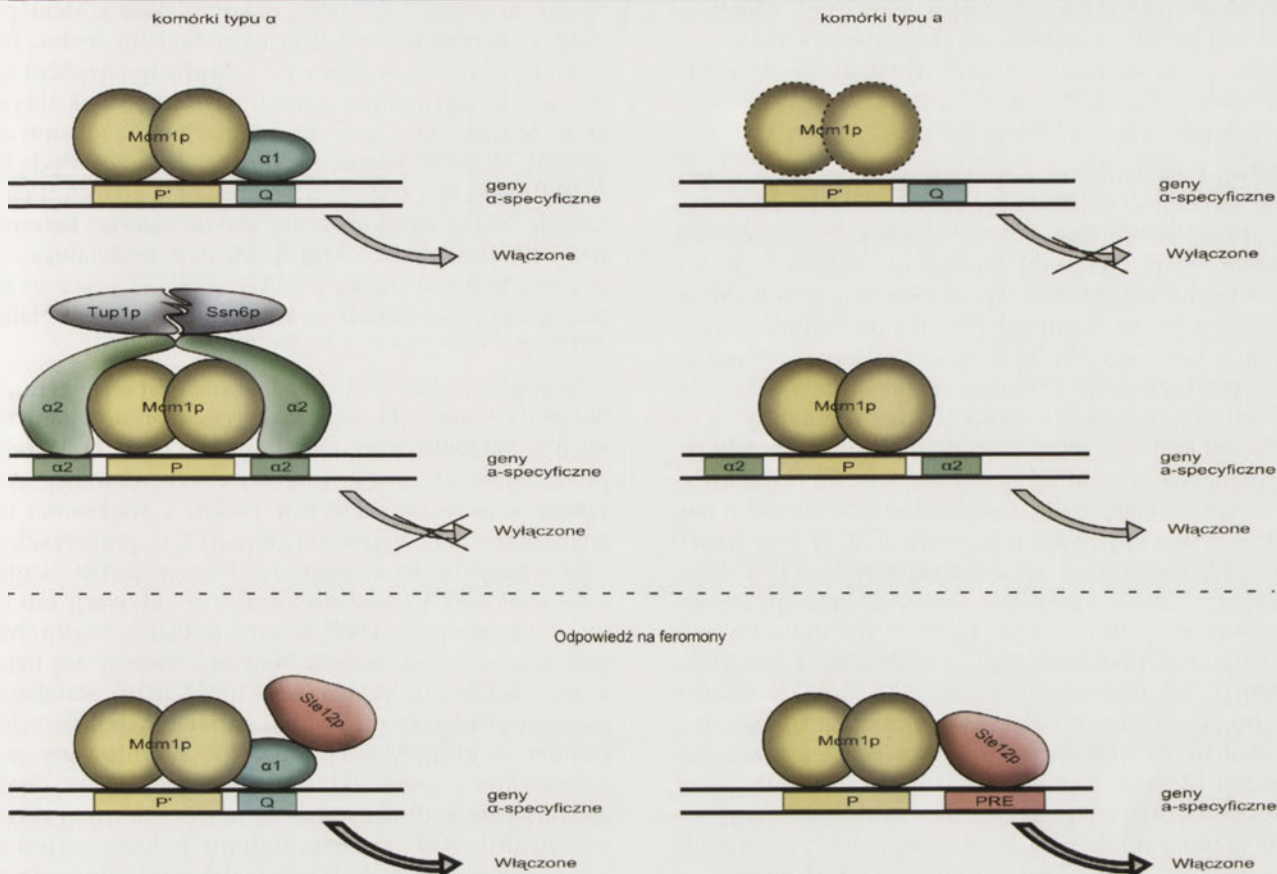
Białka oddziałujące z Mcm1p	Funkcja regulatora oddziałującego z Mcm1p ¹⁾	Regulowane geny
Regulacja cyklu komórkowego		
Yox1, Yhp1	represory	28 genów specyficznych dla przełomu faz M i G1, m.in.: CDC6, CDC47, SWI4, CLN3
Fkh2p, Ndd1p	aktywatory	geny specyficzne dla przełomu faz G2 i M: 26 genów, tzw. klastrer CLB2
Regulacja genów specyficznych dla typu płciowego		
α1	aktywator	geny specyficzne dla typu płciowego α: MFA1, STE3, SAG1, MFA2
α2	represor	geny specyficzne dla typu płciowego α: MFA1, STE2, STE6, MFA2, BARI, AGA1, AGA2, ASG7
Regulacja genów α- i α-specyficznych w odpowiedzi na feromony		
Ste12p	aktywator	geny α- i α-specyficzne
Metabolizm argininy		
ArgR1p (Arg80p) ArgR1p (Arg81p) ArgR11p (Arg82p)	aktywator lub represor	geny anaboliczne: ARG5,6, ARG8, ARG3, ARG1 Geny kataboliczne: CAR1, CAR2

¹⁾ Objaśnienia w tekście

Mcm1p UCZESTNICZY W KONTROLI CYKLU KOMÓRKOWEGO

Mcm1p składa się z 286 aminokwasów. Domenę MADS poprzedza 17-aminokwasowa sekwencja N-końcowa, w obrębie której znajdują się dwa główne miejsca fosforylacji białka. W domenie C-końcowej można wyróżnić region kwaśny oraz region bogaty w glutaminę. Przeważnie Mcm1p wiąże się z DNA jako homodimer, kooperatywnie z innymi białkami regulacyjnymi [2].

Mcm1p bierze udział w kontroli dwóch istotnych etapów cyklu komórkowego: przejścia z fazy M do G1 oraz z G2 do M. W promotorach 28. genów aktywnych w późnej mitozie występuje element ECB (ang. *Early Cell-cycle Box*), zawierający miejsce wiązania Mcm1p [46]. Najwyższy poziom transkrypcji tych genów zaobserwowano na przełomie faz M i G1, a ich produkty uczestniczą w formowaniu kompleksu pre-replikacyjnego i regulują wejście w fazę S. Mimo że Mcm1p jest stale związane z ECB, to ekspresja genów kontrolowanych przez ten element nie jest konstytutywna. Od fazy G1 do M transkrypcja jest hamowana przez dwa represory Yox1p i Yhp1p. Oba białka posiadają homeodomenę i wiążą się do specyficznej sekwencji DNA w pobliżu miejsca wiązania Mcm1p. Yox1p i Yhp1p oddziałują także bezpośrednio z Mcm1p i samo to oddziaływanie wystarczy, by zahamować transkrypcję. Mcm1p może również bezpośrednio regulować replikację DNA przez wiązanie się do miejsc



Rycina 3. Mcm1p reguluje ekspresję genów specyficznych dla typu płciowego, współdziałając z różnymi białkami regulacyjnymi. Regulacja transkrypcji genów α- i a-specyficznych w komórkach α (po lewej) oraz w komórkach a (po prawej). W komórkach a, w których nie ma aktywatora α1 samo Mcm1p słabo wiąże się do sekwencji P' i nie aktywuje transkrypcji (Mcm1p zaznaczono linią przerywaną). Pogrubione strzałki oznaczają podwyższony poziom ekspresji genów w odpowiedzi na działanie feromonów. Pozostałe objaśnienia w tekście. Rycina zmodyfikowana wg. [2]; przedrukowano za zgodą Elsevier.

startu replikacji (sekwencje ori), przypuszczalnie zmieniając lokalnie strukturę chromatyiny i/lub stymulując wiązanie białek kompleksu pre-replikacyjnego [47].

Mcm1p reguluje przejście z fazy G2 do M, wiążąc się z promotorami 26. genów tworzących klaster *CLB2*. Najwyższy poziom transkrypcji tych genów obserwuje się na przełomie tych dwóch faz. Z promotorami genów klasteru *CLB2* wiąże się także Fkh2p, zawierające domenę wiążącą DNA typu uskrzydłona helisa - skręt - helisa. Miejsca wiązania obydwu białek położone są bardzo blisko siebie. Mcm1p i Fkh2p oddziałują ze sobą i wiążą się z DNA w sposób kooperatywny - związanie Fkh2p wymaga wcześniejszego związania Mcm1p. Kompleks Mcm1p/Fkh2p wykazuje podobieństwo do kompleksu SRF/Elk1 u człowieka [48]. Do utworzenia kompleksu Mcm1p/Fkh2p konieczne jest również zagięcie DNA przez Mcm1p [49]. W odpowiedniej fazie cyklu komórkowego do kompleksu Mcm1p/Fkh2p przyłącza się aktywator Ndd1p [50]. Aktywacja transkrypcji przez kompleks Mcm1p/Fkh2p/Ndd1p zależy od fosforylacji Ndd1p [51]. Podobnie jak w przypadku elementu ECB, kompleks Mcm1p/Fkh2p związany jest konstytutywnie z promotorami genów klasteru *CLB2*, tworząc platformę rekrutującą inne białka regulatorowe. Przy braku aktywatora Ndd1p, Fkh2p hamuje ekspresję genów poprzez rekrutację kompleksów remodelujących chromatyinę [52].

Mcm1p BIERZE UDZIAŁ W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW SPECYFICZNYCH DLA TYPU PŁCIOWEGO

Drożdże *S. cerevisiae* mogą występować w formie haploidalnej i diploidalnej. Komórka diploidalna powstaje po fuzji dwóch komórek haploidalnych o różnych typach płciowych (α i a), różniących się receptorami na powierzchni komórki i wydzielanymi feromonami. Mcm1p odgrywa kluczową rolę w regulacji ekspresji genów specyficznych dla obu typów haploidalnych (Tab. 1), jednak w zależności od typu płciowego mechanizm regulacji jest inny i oparty na oddziaływaniu Mcm1p z różnymi białkami regulacyjnymi (Ryc. 3). W komórkach typu α syntetyzowane są dwa białka regulacyjne – aktywator α1 i, zawierający homeodomenę, represor α2. Geny specyficzne dla typu a nie ulegają ekspresji w komórkach α, mimo że Mcm1p wiąże się do specyficznej sekwencji P w promotorach tych genów. Mcm1p nie może jednak aktywować transkrypcji, ponieważ tuż obok przylącza się represor α2. Powstały kompleks Mcm1p/α2 wiąże kompleks represorowy Tup1p/Ssn6p, co prowadzi do zahamowania ekspresji genów α-specyficznych wskutek zmian w strukturze chromatyiny [53,54]. Promotory genów specyficznych dla typu α zawierają sekwencję P' (zdegenerowaną wersję sekwencji P). Mcm1p wiąże się do tej sekwencji kooperatywnie z aktywatorem α1, który rozpoznaje sąsiadującą z nią sekwencję Q. Powstaje kompleks Mcm1p/α1, który aktywuje transkrypcję genów α-specyficznych.

W komórkach haploidalnych typu *a* Mcm1p nie aktywuje transkrypcji genów α -specyficznych, ponieważ samo bardzo słabo wiąże się z sekwencją P' (brak aktywatora $\alpha 1$). Mcm1p może jednak aktywować transkrypcję genów α -specyficznych, gdyż nie jest blokowane przez represor $\alpha 2$.

Obydwa typy komórek haploidalnych syntetyzują specyficzne feromony, oddziałujące na komórki przeciwnego typu poprzez występujące na ich powierzchni receptory. Pojawienie się w otoczeniu feromonów aktywuje w komórkach haploidalnych obu typów ekspresję genów odpowiadających na feromony, kodujących białka niezbędne do fuzji komórek i powstania diploida α/a . Feromony powodują również podwyższenie poziomu ekspresji genów α - i α -specyficznych. Związanie feromonu przez znajdujący się na powierzchni komórki receptor aktywuje ścieżkę przekazywania sygnału kinazy MAP Fus3p, która fosforyluje zawierające homeodomenę białko regulatorowe Ste12p, aktywujące transkrypcję odpowiednich genów [55]. W komórkach typu *a* Ste12p wiąże się do specyficznej sekwencji PRE w genach α -specyficznych - powstaje kompleks Mcm1p/Ste12p. W promotorach genów α -specyficznych nie ma sekwencji PRE i najprawdopodobniej Ste12p oddziałuje z kompleksem Mcm1p/ $\alpha 1$ poprzez aktywator $\alpha 1$ (Ryc. 3) [2]. Wiadomo, że do powstania kompleksów i aktywacji transkrypcji przez Mcm1p/ $\alpha 1$ i Mcm1p/Ste12p konieczne jest zagięcie DNA przez Mcm1p. Badania strukturalne wykazały, że w kompleksie Mcm1p z represorem $\alpha 2$ również obserwuje się zagięcie cząsteczki DNA [5]. Wydaje się jednak, że zagięcie to nie jest tak istotne dla funkcji represora $\alpha 2$ [10,49,56].

ROLA Mcm1p W REGULACJI METABOLIZMU ARGININY

Mcm1p reguluje ekspresję genów metabolizmu argininy, współdziałając z białkami ArgR1p, ArgR2p i ArgR3p. Po pojawieniu się w środowisku argininy białka te aktywują ekspresję genów katabolicznych i hamują ekspresję genów anabolicznych (Tab. 1) [42]. ArgR1p i ArgR2p są specyficznymi regulatorami metabolizmu argininy, natomiast ArgR3p pełni w komórce również inne funkcje. Kompleks białek ArgRp i Mcm1p wiąże się specyficznie do sekwencji ARC, składającej się ze zdegenerowanej sekwencji podobnej do miejsca wiązania Mcm1p i motywu CGR rozpoznawanego przez ArgR2p. Żadne z białek kompleksu nie wiąże się samo do sekwencji ARC *in vitro* [57]. Przypuszcza się, że białka ArgRp oraz Mcm1p mogą ze sobą oddziaływać w jądrze komórkowym w sposób niezależny od obecności argininy.

ArgR1p (Arg80p) jest białkiem MADS typu I, zbudowanym z 177 reszt aminokwasowych. Wiąże się ono z sekwencją docelową w DNA z dużo niższym powinowactwem niż Mcm1p i samo nie może aktywować transkrypcji [60]. Domeny MADS Mcm1p i ArgR1p są bardzo do siebie podobne, jednak nie można ich między sobą zamienić, co świadczy o tym, że różnice w funkcji obu białek wynikają z niewielkich różnic w sekwencji domeny. Wykazano, że aminokwasy decydujące o specyficzności ArgR1p są położone blisko siebie na powierzchni białka w dwóch miejscach i mogą być miejscem oddziaływania z Mcm1p i ArgR2p.

ArgR2p (Arg81p) jest czynnikiem transkrypcyjnym z domeną dwujądrowego palca cynkowego (Zn_2Cys_6). Wiąże się

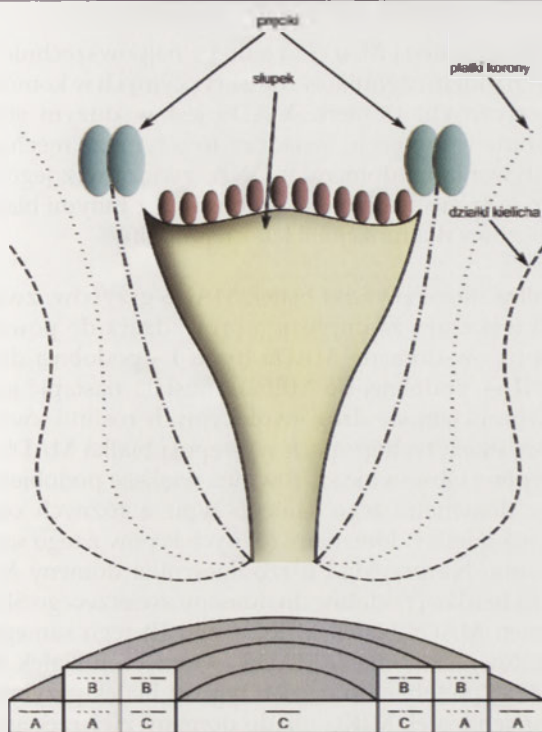
on do sekwencji ARC tylko w kompleksie z Mcm1p i ArgR1p. W kompleksie regulacyjnym ArgR2p spełnia funkcję czujnika (sensora) argininy [57]. ArgR3p (Arg82p) ma aktywność kinazy polifosforanu inozytolu, jednak aktywność ta nie jest istotna w procesie regulacji metabolizmu argininy [58]. W przeciwieństwie do trzech pozostałych białek, ArgR3p nie ma zdolności wiązania się z DNA. Pełni ono funkcję białka opiekuńczego, stabilizującego heterodimer dwóch białek MADS: ArgR1p-Mcm1p, oddziałując z nimi poprzez helisy α domeny MADS [59]. W procesie stabilizacji uczestniczy bogaty w asparaginę fragment białka ArgR3p położony na jego końcu C.

Kompleks Mcm1p-ArgRp hamuje ekspresję genów anabolicznych oraz aktywuje ekspresję genów zaangażowanych w katabolizm tego aminokwasu (Tab. 1). W rejonach promotorowych genów katabolicznych sekwencje ARC są położone powyżej sekwencji TATA, a większości genów anabolicznych (z wyjątkiem genu *ARG1*), poniżej sekwencji TATA. Sugeruje to, że położenie sekwencji ARC względem sekwencji TATA może decydować o aktywacji lub hamowaniu ekspresji genu [42]. Kompleks białek ArgRp/Mcm1p powstaje w kilku etapach. Najpierw tworzy się heterodimer dwóch białek MADS (ArgR1p/Mcm1p), stabilizowany przez ArgR3p. W przypadku genów anabolicznych heterodimer ArgR1p/Mcm1p może być rekrutowany w rejon promotorowy przez aktywator Gcn4p [61]. W obecności argininy, heterodimer wiąże się ze specyficznym aktywatorem ArgR2p. Gdy stężenie argininy w komórce jest wysokie, powstały kompleks trzech białek wiąże się z sekwencjami ARC w rejonach promotorowych odpowiednich genów, aktywując lub reprimując ich ekspresję. W procesie tym istotne jest również zagięcie DNA przez białka MADS [42].

Homologi Mcm1p zidentyfikowano również u innych grzybów, u których biorą one udział w regulacji ekspresji genów specyficznych dla typu płciowego, aktywacji genów odpowiedzi na feromony i regulacji procesów morfogenezy [2], a także w regulacji ekspresji genów, które u drożdży nie są regulowane przez Mcm1p [43]. W przeciwieństwie do drożdży, u większości grzybów występuje tylko jedno białko MADS typu SRF, co wiąże się z podwojeniem genomu w linii *S. cerevisiae* [62]. Również mechanizm działania tych regulatorów często jest inny niż u drożdży. U *Aspergillus nidulans* wykazano, że białko MCMA bierze udział w regulacji ekspresji genów katabolizmu argininy (Macios, Szafron i Dzikowska, dane niepublikowane). U tego grzyba brak homologa ArgR1p, a więc prawdopodobnie MCMA bierze udział w tym procesie jako homodimer, a nie heterodimer.

BIAŁKA MADS TYPU MEF2 BIORĄ UDZIAŁ W PRZEKAZYWANIU SYGNAŁÓW U GRZYBÓW

U *S. cerevisiae* Rlm1p reguluje ekspresję ponad dwudziestu genów związanych z syntezą ściany komórkowej po jej uszkodzeniu. Ich ekspresja jest indukowana w odpowiedzi na liczne sygnały środowiskowe, takie jak stres osmotyczny, wysoka temperatura, obecność feromonów czy związków chemicznych uszkadzających ścianę komórkową [44,63]. Sygnały te aktywują ścieżkę przekazywania sygnału kinazy MAP Mpk1p, która fosforyluje Rlm1p w obrębie domeny MEF2, aktywując transkrypcję genów docelowych. Wykazano, że fosforylacja nie wpływa na jądrową lokalizację



Rycina 4. Regulacja genetyczna morfogenezy kwiatu wg modelu ABC. Schemat budowy kwiatu w przekroju podłużnym (powyżej) oraz rozkład ekspresji genów z klas A, B i C w rozwoju poszczególnych części kwiatu (poniżej). Liniami o takim samym wzorze oznaczono poszczególne elementy kwiatu oraz odpowiadające im strefy ekspresji genów A, B i C.

zając Rlm1p. Ostatnio stwierdzono, że gen *YGPI* kodujący glikoproteinę ściany komórkowej jest regulowany zarówno przez *Mcm1p*, jak i *Rlm1p*, nie ma jednak dowodów na oddziaływanie tych dwóch białek [64]. Większość genów drożdży, których ekspresja jest indukowana w odpowiedzi na stres osmotyczny, jest regulowana przez *Smp1p* - drugie białko MADS typu MEF2. W odpowiedzi na stres białko to jest fosforylowane przez inną kinazę MAP – *Hog1p*. Podobnie jak w przypadku *Rlm1p*, fosforylacja jest niezbędna do aktywacji transkrypcji genów docelowych. W fazie stacjonarnej *Hog1p* jest również niezbędne do jądrowej lokalizacji *Smp1p* [45].

U innych grzybów występuje przeważnie tylko jedno białko MADS typu MEF2. RLMA z *A. nidulans* również kontroluje geny związane z biogenezą ściany komórkowej, jednak jego kontroli podlega znacznie mniej genów niż u *S. cerevisiae* [65]. *MIG1*, homolog *Rlm1p* z patogenu roślin *Magnaporthe grisea* jest niezbędny w procesie zakażenia [66].

ROŚLINNE CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE Z DOMENĄ MADS PEŁNIĄ FUNKCJE HOMEOTYCZNE

Regulatory MADS u roślin należą w większości do grupy MIKC [8]. Oprócz domeny MADS typu II (podobnej do domeny MEF2) zawierają one również drugą silnie zachowawczą ewolucyjnie domenę K, umożliwiającą powstawanie multimerycznych kompleksów. Domena K składa się z trzech regionów (K1, K2, K3), złożonych z powtarzających się siedmioaminokwasowych motywów $(abcdefg)_n$, gdzie w pozycjach a i d występują aminokwasy hydrofobowe pośredniczące w oddziaływaniach między domenami K.

K1, K2 i K3 w niejednakowym stopniu uczestniczą w tworzeniu homo- i heterodimerów między białkami MIKC. U rzodkiewnika i wyżłinu (*Antirrhinum majus*) do powstania zdolnych do wiązania się z DNA heterodimerów białek klasy B (patrz model ABC, opisany poniżej) niezbędny jest region K1 oraz w mniejszym stopniu region K2, a także obszar pomiędzy nimi [67]. Białka MIKC mogą również tworzyć heterodimery, oddziałując ze sobą za pośrednictwem regionów K2 i K3. Ponieważ oba te regiony są silnie zachowawcze ewolucyjnie w obrębie podrodzin, przypuszcza się, że mogą one mieć istotne znaczenie dla oddziaływań między przedstawicielami różnych podrodzin [68]. Do powstania homodimerów niektórych białek klasy B niezbędny jest również region C [69]. Roślinne białka MADS wchodzą w skład kompleksów regulacyjnych powstających i aktywowanych w zależności od sygnałów ze środowiska zewnętrznego i wewnętrznego. Jednak w przeciwieństwie do grzybowych i zwierzęcych, białka roślinne oddziałują głównie między sobą [2].

Roślinne czynniki MADS o znanej funkcji zaangażowane są głównie w regulację kwitnienia, choć biorą też udział w regulacji innych procesów, np. rozwoju owocu czy liści [70]. Trzy główne klasy białek kontrolujących kwitnienie, to regulatory czasu kwitnienia, tożsamości merystemu kwiatowego oraz tożsamości organów kwiatu. Białka MADS występują najliczniej w ostatniej grupie, odpowiadając za morfogenezę kwiatów, są jednak także obecne w dwóch pierwszych klasach, inicjując przejście rośliny z fazy rozwoju wegetatywnego do generatywnego [7]. Na podstawie analizy mutantów homeotycznych rozwoju kwiatów u rzodkiewnika i wyżłinu, w których mutacje powodują przekształcenie jednego organu kwiatu w inny, skonstruowano model genetycznej kontroli morfogenezy kwiatu, zwany modelem ABC. Model ten zakłada, że wykształcenie organów kwiatu zależy od aktywności trzech klas genów: A, B i C. Z komórek wyrażających tylko geny klasy A powstają działki kielicha, z komórek wyrażających geny klasy A i B – płatki korony, z komórek wyrażających geny klasy B i C – pręciki, a z komórek wyrażających tylko geny klasy C – słupek (Ryc. 4). Model ABC wydaje się być wspólny dla rozwoju kwiatu wszystkich roślin okrytozalążkowych, choć u różnych roślin występują pewne odstępstwa [71]. Model ABC rozszerzony o geny regulujące rozwój zalążka (klasa D) oraz geny niezbędne do prawidłowego wykształcenia wszystkich czterech organów kwiatu (klasa E), nazwano modelem ABCDE. U rzodkiewnika do genów klasy A należą *APETALA1 (AP1)* i *APETALA2 (AP2)*; klasy B - *APETALA3 (AP3)* oraz *PISTILLATA (PI)*; klasy C - *AGAMOUS (AG)*; klasy D - *SEED STICK (STK)*, *SHATTER PROOF1 (SHP1)* i -2; i klasy E - *SEPALLATA1 (SEP1)*, -2, -3 i -4. Tylko *AP2* nie jest białkiem z rodziny MADS [8,72].

Oparty na analizie genetycznej model ABCDE przekształcono w model molekularny; model ten tłumaczy kombinatoryczne sieci regulacyjne w rozwoju kwiatu zdolnością białek MADS do tworzenia heterotetramerycznych kompleksów aktywujących lub hamujących ekspresję genów docelowych dla ścieżki rozwojowej każdego organu kwiatu. Zgodnie z tym modelem, tetramery składają się z dwóch dimerów wiążących położone blisko siebie sekwencje CArG i oddziałujących ze sobą dzięki zagięciu DNA [73]. Wyka-

zono, że białka rzodkiewnika AP1/AP3/PI/SEP3 (A+B+E) oraz AP3/PI/AG/SEP3 (B+C+E) oddziałują ze sobą *in vitro*, oraz że tworzą aktywne kompleksy regulacyjne *in vivo* [74]. Multimeryczne, funkcjonalne kompleksy tworzą również białka warunkujące rozwój zarodka: STK, SHP1 lub SHP2 z białkami AG oraz SEP [75]. Powstawanie multimerycznych kompleksów białek MADS potwierdzono również u wyżłinu. Wykazano, że produkty genów klasy B *DEFICIENS* (*DEF*) i *GLOBOSA* (*GLO*) oraz genu klasy A *SQAMOSA* (*SQUA*) oddziałują ze sobą, tworząc kompleks silnie wiążący dwie sąsiadujące ze sobą sekwencje *CArG* [76]. W powstawaniu multimerycznych kompleksów roślinnych białek MADS kluczową rolę odgrywają oddziaływania między ich domenami MADS i I, prowadzące do powstania homo- i heterodimerów, oraz między domenami K oraz C – istotne w powstawaniu kompleksów multimerycznych [8,72]. Stosując drożdżowy system dwuhybrydowy, opracowano mapę oddziaływań wszystkich białek MADS rzodkiewnika, która potwierdza istnienie hierarchicznych sieci regulujących rozwój rośliny w zależności od różnych sygnałów wewnętrznych i zewnętrznych [77].

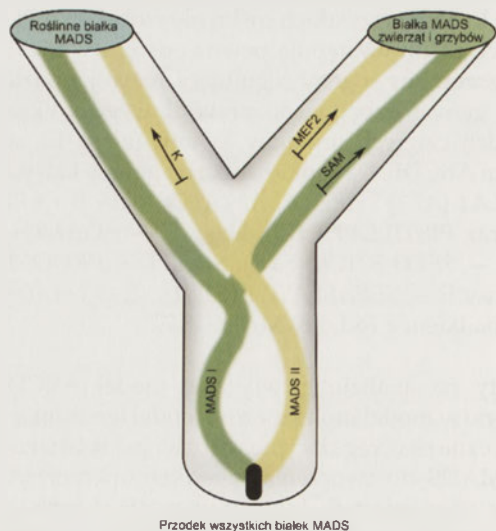
Ostatnio wykazano, że roślinne białka MADS, podobnie jak białka zwierzęce, mogą działać jako aktywatory lub represory w zależności od tego, czy przyłączy się do nich odpowiedni koaktywator lub korepresor. Wykazano, że kompleks białek *LEUNIG* (*LUG*) i *SEUSS* (*SEU*) może oddziaływać z białkami AP1 i SEP3, blokując ich zdolność do aktywacji transkrypcji [78]. *LUG* i *SEU* nie są białkami MADS, a *LUG* wykazuje wysoką homologię do drożdżowego korepresora *Tup1p*. Kompleks *LUG/SEU* hamuje transkrypcję, rekrutując do promotora genu docelowego deacetylazę histonów, podobnie jak drożdżowy kompleks *Tup1p/Ssn6p* blokujący aktywność drożdżowego białka MADS-*Mcm1p*. *LUG* może również hamować transkrypcję poprzez bezpośrednio oddziaływanie z kompleksem mediatora [79].

EWOLUCJA BIAŁEK Z RODZINY MADS

Białka z domeną MADS są jedną z najpowszechniej spotykanych rodzin czynników transkrypcyjnych w komórkach eukariotycznych. Domena MADS jest w dużym stopniu zachowana w ewolucji. Świadczy to o tym, że mechanizm oddziaływania tej domeny z DNA, związany z jego zaginaniem oraz mechanizm oddziaływania z innymi białkami jest kluczowy dla funkcji białek z tej rodziny.

Analiza filogenetyczna białek MADS grzybów, zwierząt i roślin wskazuje, że duplikacja prowadząca do powstania dwóch typów domeny MADS (typu I - podobnej do *SRF* i typu II – podobnej do *MEF2*), musiała nastąpić jeszcze przed rozejściem się dróg ewolucyjnych roślin i zwierząt. We wszystkich tych grupach występują białka MADS obydwu typów. Obserwuje się również większe podobieństwo między domenami tego samego typu z różnych organizmów niż między domenami różnych typów z tego samego organizmu. Na przykład u rzodkiewnika domeny MADS typu I są bardziej podobne do domeny zwierzęcego *SRF* niż do domen MADS białek *MIKC* (typu II) tego samego gatunku. Również domeny MADS zwierzęcych białek *MEF2* są bardziej podobne do domen typu II białek grzybowych i roślinnych białek *MIKC* niż do domeny zwierzęcego *SRF* (Ryc. 5). Najprawdopodobniej dopiero w późniejszym okresie po rozejściu się dróg ewolucyjnych roślin i zwierząt wykształciły się domeny C-końcowe białek MADS (*K*, *SAM* i *MEF*) (Ryc. 1) [1].

W przeciwieństwie do grzybów i zwierząt, u których występuje tylko kilka białek z rodziny MADS, genom roślin koduje ich ponad sto. Można to wytłumaczyć częstymi u roślin duplikacjami całego genomu [80]. Białka *MIKC* zidentyfikowano u przedstawicieli wszystkich roślin lądowych, łącznie z mszakami i paprotnikami, i odegrały one bardzo istotną rolę w ewolucji tych organizmów. Analiza filogenetyczna wskazuje, że białka *MIKC* powstały przed rozejściem się linii ewolucyjnych roślin zarodnikowych i nasiennych. W ich ewolucji niezwykle istotne było przyłączenie do domeny MADS domeny K, umożliwiającej powstawanie multimerycznych kompleksów. Prawdopodobnie nastąpiło to w procesie tasowania domen [3,8,70]. Duplikacje doprowadziły do powstania dużej rodziny genów kodujących białka *MIKC* – roślinne białka homeotyczne, pełniące kluczowe funkcje w procesie morfogenezy kwiatu. Mutacje w obrębie poszczególnych genów *MIKC* oraz zmiany profilu ich ekspresji umożliwiły tworzenie wieloskładnikowych kompleksów o nowych funkcjach. Wynikało to między innymi z tego, że białka w obrębie kompleksu oddziaływały ze sobą, a więc i ewoluowały w sposób od siebie zależny. O ewolucji oddziaływań pomiędzy różnymi białkami *MIKC* świadczy analiza oddziaływań między regulatorami klasy B. U gatunku *Gnetum gnemon* (drzewiasta roślina nagonasienna z rodziny gnetowatych) stwierdzono występowanie wyłącznie homodimerów tych białek. Podobne wyniki uzyskano dla innych roślin nagonasiennych. U okrytonasiennych roślin jednoliściennych (lilia i ryż) zaobserwowano powstawanie zarówno homo-, jak i heterodimerów, natomiast u rzodkiewnika i wyżłinu czynniki te występują jako heterodimery [8]. Ewolucja roślinnych białek *MIKC* jest dobrym przykładem tego w jaki sposób może powstać skomplikowana



Rycina 5. Ewolucja białek MADS. Dwa typy domeny MADS powstały przed wyodrębnieniem się królestw roślin, zwierząt i grzybów. Domeny K, MEF2 oraz SAM wykształciły się w późniejszym okresie. Rycina wg. [1]; przedrukowana za zgodą National Academy of Sciences, USA.

sięć regulacyjna oparta na oddziaływaniach między białkami tworzącymi multimeryczne kompleksy, które ewoluując nabywają nowe funkcje, co prowadzi do wykształcenia zasadniczo nowych cech organizmu.

PODSUMOWANIE

Kombinatoryczna regulacja ekspresji genów jest procesem, w którym, w odpowiedzi na sygnały ze środowiska zewnętrznego i wewnętrznego, stosunkowo niewielka liczba czynników transkrypcyjnych reguluje wiele grup genów dzięki temu, że białka te, oddziałując ze sobą, tworzą wieloskładnikowe kompleksy o różnym składzie, aktywujące lub hamujące transkrypcję. W przeciwieństwie do roślinnych białek MADS, które oddziałują głównie między sobą, grzybowe i zwierzęce białka z tej rodziny oddziałują z czynnikami transkrypcyjnymi różnych typów, takimi jak czynniki zawierające homeodomenę, domenę ETS czy też domenę typu uskrzydłona helisa-skręt-helisa. W wielu przypadkach wykazano, że powstanie kompleksu jest zależne od zagięcia DNA wprowadzanego przez domenę MADS. Zagięcie DNA najprawdopodobniej nie tylko ułatwia związanie białka MADS z sekwencją docelową, ale również prowadzi do powstania kompleksu białko-DNA o strukturze umożliwiającej wiązanie kolejnych białek regulacyjnych. Czynniki transkrypcyjne oddziałujące z białkami MADS najczęściej wiążą się do specyficznych sekwencji docelowych, położonych obok sekwencji CARG. Często jednak obserwuje się wiązanie kooperatywne, wymagające wcześniejszego związania z DNA białka MADS. Regulacja ekspresji genów docelowych w odpowiedzi na sygnały środowiska jest związana z fosforylacją samych białek MADS lub białek z nimi oddziałujących przez kinazy MAP. W wielu przypadkach wykazano, że w wyniku takiej fosforylacji w rejon promotora regulowanego genu rekrutowane są kompleksy zmieniające strukturę chromatyny, np. wprowadzające modyfikacje histonów. Najczęściej są to kompleksy acetylaz i deacetylaz histonów. Często rekrutacja tych kompleksów wymaga wcześniejszego związania odpowiednich koaktywatorów lub korepresorów.

PIŚMIENNICTWO

1. Alvarez-Buylla ER, Pelaz S, Liljegrén SJ, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, Ribas de Pouplana L, Martínez-Castilla L, Yanofsky MF (2000) An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5328-5333
2. Messenguy F, Dubois E (2003) Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* 316: 1-21
3. Johansen B, Pedersen LB, Skipper M, Frederiksen S (2002) MADS-box gene evolution-structure and transcription patterns. *Mol Phylogenet Evol* 23: 458-480
4. Pellegrini L, Tan S, Richmond TJ (1995) Structure of serum response factor core bound to DNA. *Nature* 376: 490-498
5. Tan S, Richmond TJ (1998) Crystal structure of the yeast MAT α 2/MCM1/DNA ternary complex. *Nature* 391: 660-666
6. Santelli E, Richmond TJ (2000) Crystal structure of MEF2A core bound to DNA at 1.5 Å resolution. *J Mol Biol* 297: 437-449
7. Parenicova L, de Folter S, Kieffer M, Horner DS, Favalli C, Busscher J, Cook HE, Ingram RM, Kater MM, Davies B, Angenent GC, Colombo L (2003) Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant Cell* 15: 1538-1551
8. Kaufmann K, Melzer R, Theissen G (2005) MICK-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene* 347: 183-198
9. Acton TB, Mead J, Steiner AM, Vershon AK (2000) Scanning mutagenesis of Mcm1: residues required for DNA binding, DNA bending, and transcriptional activation by a MADS-box protein. *Mol Cell Biol* 20: 1-11
10. Carr EA, Mead J, Vershon AK (2004) Alpha1-induced DNA bending is required for transcriptional activation by the Mcm1-alpha1 complex. *Nucleic Acids Res* 32: 2298-2305
11. Zhang X, Azhar G, Huang C, Cui C, Zhong Y, Huck S, Wei JY (2007) Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay regulate gene expression of serum response factor. *Gene* 400: 131-139
12. Sun Q, Chen G, Streb JW, Long X, Yang Y, Stoekert CJ Jr, Miano JM (2006) Defining the mammalian CARome. *Genome Res* 16: 197-207
13. Chai J, Tarnawski AS (2002) Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol* 53: 147-157
14. Niu Z, Li A, Zhang SX, Schwartz RJ (2007) Serum response factor micro-managing cardiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 19: 618-627
15. Etkin A, Alarcon JM, Weisberg SP, Touzani K, Huang YY, Nordheim A, Kandel ER (2006) A role in learning for SRF: deletion in the adult forebrain disrupts LTD and the formation of an immediate memory of a novel context. *Neuron* 50: 127-143
16. Posern G, Treisman R (2006) Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol* 16: 588-596
17. Miano JM (2003) Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J Mol Cell Cardiol* 35: 577-93
18. Miano JM, Long X, Fujiwara K (2007) Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C70-81
19. Sharrocks AD (2002) Complexities in ETS-domain transcription factor function and regulation: lessons from the TCF (ternary complex factor) subfamily. The Colworth Medal Lecture. *Biochem Soc Trans* 30: 1-9
20. Buchwalter G, Gross C, Wasylyk B (2004) Ets ternary complex transcription factors. *Gene* 324: 1-14
21. Mo Y, Ho W, Johnston K, Marmorstein R (2001) Crystal structure of a ternary SAP-1/SRF/c-fos SRE DNA complex. *J Mol Biol* 314: 495-506
22. Hassler M, Richmond TJ (2001) The B-box dominates SAP-1-SRF interactions in the structure of the ternary complex. *EMBO J* 20: 3018-3028
23. Yang SH, Shore P, Willingham N, Lakey JH, Sharrocks AD (1999) The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J* 18: 5666-5674
24. Yang SH, Vickers E, Brehm A, Kouzarides T, Sharrocks AD (2001) Temporal recruitment of the mSin3A-histone deacetylase corepressor complex to the ETS domain transcription factor Elk-1. *Mol Cell Biol* 21: 2802-2814
25. Zhang HM, Li L, Papadopoulou N, Hodgson G, Evans E, Galbraith M, Dear M, Vougie S, Saxton J, Shaw PE (2008) Mitogen-induced recruitment of ERK and MSK to SRE promoter complexes by ternary complex factor Elk-1. *Nucleic Acids Res* 36: 2594-2607
26. Heidenreich O, Neining A, Schrat G, Zinck R, Cahill MA, Engel K, Kotlyarov A, Kraft R, Kostka S, Gaestel M, Nordheim A (1999) MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 274: 14434-14443
27. Kaplan-Albuquerque N, Garat C, Desseva C, Jones PL, Nemenoff RA (2003) Platelet-derived growth factor-BB-mediated activation of Akt suppresses smooth muscle-specific gene expression through inhibition of mitogen-activated protein kinase and redistribution of serum response factor. *J Biol Chem* 278: 39830-39838
28. Pipes GC, Creemers EE, Olson EN (2006) The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev* 20: 1545-1556
29. Zaromytidou AI, Miralles F, Treisman R (2006) MAL and ternary complex factor use different mechanisms to contact a common surface on

- the serum response factor DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* 26: 4134-4148
30. Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, Treisman R (2003) Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113: 329-342
 31. McDonald OG, Owens GK (2007) Programming smooth muscle plasticity with chromatin dynamics. *Circ Res* 100: 1428-1441
 32. Potthoff MJ, Olson EN (2007) MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* 134: 4131-4440
 33. McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN (2002) MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci* 27: 40-47
 34. Han J, Molkenin JD (2000) Regulation of MEF2 by p38 MAPK and its implication in cardiomyocyte biology. *Trends Cardiovasc Med* 10: 19-22
 35. Barsyte-Lovejoy D, Galanis A, Clancy A, Sharrocks AD (2004) ERK5 is targeted to myocyte enhancer factor 2A (MEF2A) through a MAPK docking motif. *Biochem J* 381: 693-699
 36. Liu N, Williams AH, Kim Y, McAnally J, Bezprozvannaya S, Sutherland LB, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2007) An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20844-20849
 37. McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN (2002) Signaling chromatin to make muscle. *Curr Opin Cell Biol* 14: 763-772
 38. Youn HD, Liu JO (2000) Cabin1 represses MEF2-dependent Nur77 expression and T cell apoptosis by controlling association of histone deacetylases and acetylases with MEF2. *Immunity* 13: 85-94
 39. Jang H, Choi DE, Kim H, Cho EJ, Youn HD (2007) Cabin1 represses MEF2 transcriptional activity by association with a methyltransferase, SUV39H1. *J Biol Chem* 282: 11172-11179
 40. Youn HD, Chatila TA, Liu JO (2000) Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *EMBO J* 19: 4323-4331
 41. Shalizi A, Gaudilliere B, Yuan Z, Stegmuller J, Shirogane T, Ge Q, Tan Y, Schulman B, Harper JW, Bonni A (2006) A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation. *Science* 311: 1012-1017
 42. Messenguy F, Dubois E (2000) Regulation of Arginine Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: a Network of Specific and Pleiotropic Proteins in Response to Multiple Environmental Signals. *Food Technol Biotechnol* 38: 277-285
 43. Tuch BB, Galgoczy DJ, Hernday AD, Li H, Johnson AD (2008) The evolution of combinatorial gene regulation in fungi. *PLoS Biol* 6: e38
 44. Jung US, Sobering AK, Romeo MJ, Levin DE (2002) Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol Microbiol* 46: 781-789
 45. de Nadal E, Casadome L, Posas F (2003) Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 23: 229-237
 46. Pramila T, Miles S, GuhaThakurta D, Jemiolo D, Breeden LL (2002) Conserved homeodomain proteins interact with MADS box protein Mcm1 to restrict ECB-dependent transcription to the M/G1 phase of the cell cycle. *Genes Dev* 16: 3034-3045
 47. Chang VK, Fitch MJ, Donato JJ, Christensen TW, Merchant AM, Tye BK (2003) Mcm1 binds replication origins. *J Biol Chem* 278: 6093-6100
 48. Boros J, Lim FL, Darieva Z, Pic-Taylor A, Harman R, Morgan BA, Sharrocks AD (2003) Molecular determinants of the cell-cycle regulated Mcm1p-Fkh2p transcription factor complex. *Nucleic Acids Res* 31: 2279-2288
 49. Lim FL, Hayes A, West AG, Pic-Taylor A, Darieva Z, Morgan BA, Olivier SG, Sharrocks AD (2003) Mcm1p-induced DNA bending regulates the formation of ternary transcription factor complexes. *Mol Cell Biol* 23: 450-461
 50. Koranda M, Schleiffer A, Endler N, Ammerer G (2000) Forkhead-like transcription factors recruit Ndd1 to the chromatin of G2/M-specific promoters. *Nature* 406: 94-98
 51. Darieva Z, Bulmer R, Pic-Taylor A, Doris KS, Geymonat M, Sedgwick SG, Morgan BA, Sharrocks AD (2006) Polo kinase controls cell-cycle-dependent transcription by targeting a coactivator protein. *Nature* 444: 494-498
 52. Sherriff JA, Kent NA, Mellor J (2007) The Isw2 chromatin-remodeling ATPase cooperates with the Fkh2 transcription factor to repress transcription of the B-type cyclin gene CLB2. *Mol Cell Biol* 27: 2848-2860
 53. Morohashi N, Yamamoto Y, Kuwana S, Morita W, Shindo H, Mitchell AP, Shimizu M (2006) Effect of sequence-directed nucleosome disruption on cell-type-specific repression by alpha2/Mcm1 in the yeast genome. *Eukaryot Cell* 5: 1925-1933
 54. Morohashi N, Nakajima K, Kurihara D, Mukai Y, Mitchell AP, Shimizu M (2007) A nucleosome positioned by alpha2/Mcm1 prevents Hap1 activator binding *in vivo*. *Biochem Biophys Res Com* 364: 583-588
 55. Breitkreutz A, Tyers M (2002) MAPK signaling specificity: it takes two to tango. *Trends Cell Biol* 12: 254-257
 56. Mead J, Bruning AR, Gill MK, Steiner AM, Acton TB, Vershon AK (2002) Interactions of the Mcm1 MADS box protein with cofactors that regulate mating in yeast. *Mol Cell Biol* 22: 4607-4621
 57. Amar N, Messenguy F, El Bakkoury M, Dubois E (2000) ArgR11, a component of the ArgR-Mcm1 complex involved in the control of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, is the sensor of arginine. *Mol Cell Biol* 20: 2087-2097
 58. El Alami M, Messenguy F, Scherens B, Dubois E (2003) Arg82p is a bifunctional protein whose inositol polyphosphate kinase activity is essential for nitrogen and PHO gene expression but not for Mcm1p chaperoning in yeast. *Mol Microbiol* 49: 457-468
 59. El Bakkoury M, Dubois E, Messenguy F (2000) Recruitment of the yeast MADS-box proteins, ArgR1 and Mcm1 by the pleiotropic factor ArgR111 is required for their stability. *Mol Microbiol* 35: 15-31
 60. Jamai A, Dubois E, Vershon AK, Messenguy F (2002) Swapping functional specificity of a MADS box protein: residues required for Arg80 regulation of arginine metabolism. *Mol Cell Biol* 22: 5741-5752
 61. Yoon S, Govind CK, Qiu H, Kim SJ, Dong J, Hinnebusch AG (2004) Recruitment of the ArgR/Mcm1p repressor is stimulated by the activator Gcn4p: a self-checking activation mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11713-11718
 62. Liti G, Louis E J (2005) Yeast evolution and comparative genomics. *Annu Rev Microbiol* 59: 135-153
 63. Garcia R, Bermejo C, Grau C, Perez R, Rodriguez-Pena JM, Francois J, Nombela C, Arroyo J (2004) The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* 279: 15183-15195
 64. Abraham DS, Vershon AK (2005) N-terminal arm of Mcm1 is required for transcription of a subset of genes involved in maintenance of the cell wall. *Eukaryot Cell* 4: 1808-1819
 65. Fujioka T, Mizutani O, Furukawa K, Sato N, Yoshimi A, Yamagata Y, Nakajima T, Abe K (2007) MpkA-Dependent and -independent cell wall integrity signaling in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 6: 1497-1510
 66. Mehrabi R, Ding S, Xu JR (2008) MADS-box transcription factor mig1 is required for infectious growth in *Magnaporthe grisea*. *Eukaryot Cell* 7: 791-799
 67. Yang Y, Fanning L, Jack T (2003) The K domain mediates heterodimerization of the Arabidopsis floral organ identity proteins, APETALA3 and PISTILLATA. *Plant J* 33: 47-59
 68. Yang Y, Jack T (2004) Defining subdomains of the K domain important for protein-protein interactions of plant MADS proteins. *Plant Mol Biol* 55: 45-59
 69. Tzeng TY, Liu HC, Yang CH (2004) The C-terminal sequence of LMADS1 is essential for the formation of homodimers for B function proteins. *J Biol Chem* 279: 10747-10755
 70. Ng M, Yanofsky MF (2001) Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat Rev Genet* 2: 186-195

71. Saedler H, Becker A, Winter KU, Kirchner C, Theissen G (2001) MADS-box genes are involved in floral development and evolution. *Acta Biochim Polon* 48: 351-358
72. Robles P, Pelaz S (2005) Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Dev Biol* 49: 633-643
73. Theissen G, Saedler H (2001) Plant biology. Floral quartets. *Nature* 409: 469-471
74. Honma T, Goto K (2001) Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409: 525-529
75. Favaro R, Pinyopich A, Battaglia R, Kooiker M, Borghi L, Ditta G, Yanofsky MF, Kater MM, Colombo L (2003) MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 2603-2611
76. Egea-Cortines M, Saedler H, Sommer H (1999) Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J* 18: 5370-5379
77. de Folter S, Immink RG, Kieffer M, Parenicova L, Henz SR, Weigel D, Busscher M, Kooiker M, Colombo L, Kater MM, Davies B, Angenent GC (2005) Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS Box transcription factors. *Plant Cell* 17: 1424-1433
78. Sridhar VV, Surendrarao A, Liu Z (2006) APETALA1 and SEPALLA-TA3 interact with SEUSS to mediate transcription repression during flower development. *Development* 133: 3159-3166
79. Gonzalez D, Bowen AJ, Carroll TS, Conlan RS (2007) The transcription corepressor LEUNIG interacts with the histone deacetylase HDA19 and mediator components MED14 (SWP) and CDK8 (HEN3) to repress transcription. *Mol Cell Biol* 27: 5306-5315
80. Rijpkema AS, Gerats T, Vandenbussche M (2007) Evolutionary complexity of MADS complexes. *Curr Opin Plant Biol* 10: 32-38

MADS-box proteins – combinatorial transcriptional regulators in fungi, animals and plants

Łukasz Szafron¹, Tomasz Jagielski² i Agnieszka Dzikowska^{3,4,✉}

¹Molecular Pathology Department, The Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Centre and Institute of Oncology, 5 Roentgena St., 02-781 Warsaw, Poland

²Microbiology Department, National Tuberculosis and Lung Diseases Research Institute, 26 Płocka St., 01-138 Warsaw, Poland

³Institute of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Warsaw, 5A Pawińskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

⁴Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, 5A Pawińskiego St., 02-106 Warszawa, Poland

✉ e-mail: adzik@ibb.waw.pl

Key words: Transcription factors, MADS-box, SRF, MEF2, Mcm1p, flower development

ABSTRACT

Structural and functional diversity of cellular types is mainly the result of combinatorial regulation of gene expression in which transcription factors interact in different ways and different combinations in response to signaling pathways. MADS – box transcription factors are found in all eukaryotic kingdoms and they are of key importance in signal transduction to the genome. MADS – box factors interact with other regulatory proteins in complexes which can activate or repress transcription. In many cases these additional proteins influence the affinity and specificity of the complex for the target sequence. They can change the chromatin structure and decide which group of genes is regulated in a specific way. The MADS domain is a distinctive feature of the MADS – box transcription factors. It is a highly conserved domain of approximately 80 amino acids, responsible for DNA binding and bending, dimerization and interactions with other proteins. In animal cells MADS – box transcription factors participate in regulation of cell growth and differentiation, embryogenesis and morphogenesis. In yeast they are involved in the control of cell cycle progression, regulation of mating type specific genes, control of arginine metabolism, cell wall biosynthesis and osmotic stress response. Plant MADS-box proteins provide different homeotic functions determining floral organ development. This review is aimed at characterizing how MADS-box transcription factors interact with other regulatory proteins and how they are activated by different signal transduction pathways. We also summarize recent theories concerning the evolution of this family of transcriptional regulators.

FHIT – białko supresorowe zaangażowane w indukcję apoptozy i regulację cyklu komórkowego

Róża Pęcherzewska

Barbara Nawrot

Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, Łódź

*Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź; (042) 680 32 49, e-mail: bnawrot@bio.cbmm.lodz.pl

Artykuł otrzymano 27 sierpnia 2008 r.
Artykuł zaakceptowano 9 grudnia 2008 r.

Słowa kluczowe: FHIT, HIT, apoptoza, cykl komórkowy

Wykaz skrótów: ATM – ang. *ataxia telangiectasia mutated kinase*; ATR – ang. *ataxia telangiectasia – Rad5-related kinase*; DR – ang. *death receptor*; EGF – ang. *epithelial growth factor*; FADD – ang. *Fas-associated death domain*; Fdxr – ang. *ferredoxin reductase*; FHIT – ang. *fragile histidine triad protein*; FRA3B – ang. *fragile site 3B*; HEK 293 – ang. *human embryonic kidney 293 cells*; HIT – ang. *histidine triad proteins*; HRR – ang. *homologous recombination repair*; NF- κ B – ang. *nuclear factor kappa B*; NHEJ – ang. *non-homologous end joining*; NSCLC – ang. *non-small cell lung cancer*; PKC – ang. *protein kinase C*; PpIX – ang. *protoporphyrin IX*; RCC – ang. *renal cell carcinoma*

Podziękowanie: Praca powstała w trakcie realizacji projektów: grantu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr 2PO4A07929; grantu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr PBZ-MNiSW-07/1/2007 (2007-2010); „BIO-MAT – Nowoczesne Materiały i Biomateriały. Doktorancki Fundusz Stypendialny dla regionu łódzkiego”

STRESZCZENIE

Białko FHIT (ang. *fragile histidine triad*) jest hydrolazą diadenozynotrifosforanów, należąca do rodziny białek HIT (ang. *histidine triad*). Jest to białko supresorowe, odgrywające ważną rolę w indukcji apoptozy, kontroli cyklu komórkowego i wrażliwości komórek na czynniki powodujące powstawanie uszkodzeń w DNA. Aktywność hydrolazowa nie jest wymagana do pełnienia przez ten enzym funkcji supresorowej. Gen FHIT zlokalizowany jest w miejscu łamliwym trzeciego chromosomu człowieka, w regionie FRA3B (ang. *fragile site in the human genome*), gdzie częstość występowania aberracji chromosomowych jest bardzo wysoka. Utratę ekspresji genu FHIT stwierdzono w wielu typach komórek nowotworowych. Przywrócenie ekspresji FHIT w komórkach nowotworowych człowieka prowadzi do indukcji apoptozy, co stwarza możliwość zastosowania genu FHIT w terapii przeciwnowotworowej.

WPROWADZENIE – ODKRYCIE BIAŁKA FHIT

Transformacja nowotworowa jest procesem złożonym obejmującym zmiany w genomie prowadzące do aktywacji onkogenów i/lub utraty funkcji genów supresorowych [1,2]. Aberracje chromosomowe i związana z tym zmiana ekspresji genów jest często krytyczna dla procesu powstawania i rozwoju nowotworu.

Istnieją określone miejsca w chromosomach człowieka i naczelnych, tzw. miejsca łamliwe, gdzie częstość występowania pęknięć czy delecji jest większa. Ze względu na zwiększoną podatność na uszkodzenia, miejsca takie są uważane za główne obszary rearanżacji chromosomowych w nowotworach.

W przypadku nowotworów złośliwych aberracje chromosomowe występują najczęściej na krótkim ramieniu chromosomu trzeciego. Szczególnie interesujący jest region 3p14.2., który obejmuje zarówno FRA3B, miejsce łamliwe chromosomu związane z występowaniem rodzinnego nowotworu nerek (ang. *familial-kidney-cancer-associated breakpoint*) t(3;8)(p14.2;q24), oraz miejsce scalenia wirusa papilloma (ang. *papilloma virus integration site*) [3].

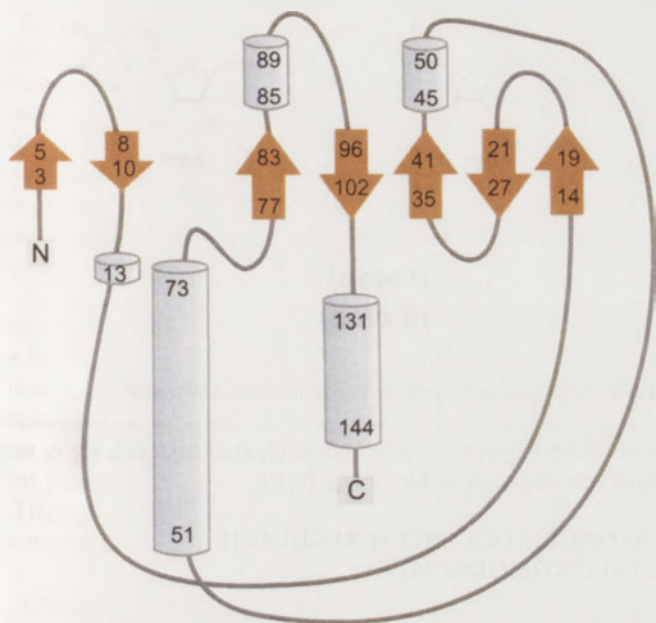
W tkankach wielu typów nowotworów obserwuje się delecję fragmentu chromosomu 3p14.2 o wielkości 200 – 300 kb. W regionie tym znajduje się gen składający się z 10 eksonów, którego produkt ekspresji stanowi, odkryte w 1996 roku, białko o długości 146 aminokwasów i wielkości 16,8 kDa. Ze względu na znaczną homologię w sekwencji aminokwasowej, białko to zakwalifikowano do rodziny białek HIT (ang. *Histidine Triad Proteins*). Badania wykazały, że podobnie jak inne białka z tej rodziny, nowo odkryte białko zawiera w pobliżu C-końca sekwencję His- Φ -His- Φ -His- Φ - Φ , gdzie Φ oznacza aminokwas hydrofobowy [1,4] (Ryc. 1).

Gen kodujący to białko, nazwany genem FHIT (ang. *fragile histidine triad*), wykazuje 69% homologii z genem *aph1* kodującym hydrolazę diadenozyno-P¹,P¹-tetrafosforanów (Ap4A) z *Schizosaccharomyces pombe* [1,5]. Taka homologia w budowie genu sugerowała, że nowo odkryte białko również może wykazywać aktywność hydrolazową. Późniejsze badania potwierdziły te przypuszczenia dowodząc, że białko FHIT *in vitro* posiada aktywność enzymatyczną hydrolazy diadenozynotrifosforanów [6]. Od momentu odkrycia [1] trwają intensywne prace nad poznaniem funkcji i mechanizmu działania białka FHIT.

WEWNĄTRZKOMÓRKOWA LOKALIZACJA FHIT

Początkowe badania przeprowadzone na tkankach szczura sugerowały, że białko Fhit obecne jest jedynie w jądrze komórkowym i błonach cytoplazmatycznych [7]. Później pojawiły się doniesienia o mitochondrialnej lokalizacji FHIT w komórkach nowotworu płuc człowieka [8].

A



B

SFRFGQHLLIKPSVFLKTELSFALVNRKPVVPGHVLCP
 RPVERFHDLRPDEVADLFQTTQRVGTWEKHFHGTSLT
 FSMQDGPAGQTVKHVHVHVLPRKAGDFHRNDSIYEE
 LQKHKEDFPASWRSEEMAAEAALRVYFQ

Rycina 1. Struktura białka FHIT: A – struktura drugorzędowa (zaznaczone są fragmenty o strukturze beta i o strukturze helisy); B – sekwencja aminokwasowa (kolorem czerwonym oznaczono regiony białka zachowane w ewolucji). Na podstawie: www.ebi.ac.uk.

Wprowadzenie egzogenego genu *FHIT* do komórek nowotworowych powoduje kumulowanie się produktu jego ekspresji zarówno w cytoplazmie, jak i mitochondrium [9, 10]. Obniżony poziom lub całkowity zanik białka FHIT obserwuje się w wielu typach komórek nowotworowych. Także niektóre zdrowe komórki wykazują całkowitą lub częściową utratę ekspresji genu *FHIT* [7].

AKTYWNOŚĆ ENZYMATYCZNA

Białko FHIT wykazuje aktywność enzymatyczną typowej hydrolazy dinukleozydo- P^i, P^3 -trifosforanów (EC 3.6.1.29). Jest to pierwsze białko z rodziny HIT, w którym triada histydynowa okazała się krytyczna dla zdolności enzymatycznych. Zamiana poszczególnych reszt histydyny na reszty asparaginy skutkowało obniżeniem aktywności hydrolitycznej enzymu, przy czym histydyna w pozycji 96 okazała się aminokwasem niezbędnym w reakcji hydrolizy substratu katalizowanej przez białko FHIT [6].

Związkami ulegającymi reakcji hydrolizy katalizowanej przez białko FHIT są ApnA (gdzie $n = 3-6$), GpnG ($n = 3-4$) oraz Ap3G i Ap4G, z czego preferowanym substratem jest Ap3A. Jednym z produktów hydrolizy jest, odpowiednio, AMP lub GMP. Jony Mn^{2+} i Mg^{2+} stymulują reakcję hydrolizy, podczas gdy Zn^{2+} powoduje jej zahamowanie (Ryc. 2).

Wraz ze wzrastającą liczbą grup fosforanowych w cząsteczce substratu maleje aktywność hydrolityczna białka

FHIT. Wartość K_m reakcji hydrolizy Ap3A katalizowanej przez białko fuzyjne GST-FHIT wynosi $1,3 \mu M$, podczas gdy dla analogicznej reakcji z Ap4A wartość ta wynosi $4,6 \mu M$ [6].

Odkryto, że zwiększenie wewnątrzkomórkowej ilości jednego z substratów białka FHIT - Ap4A może prowadzić do indukcji apoptozy. W komórkach ulegających apoptozie indukowanej zablokowaniem topoizomerazy DNA II zaobserwowano zmniejszający się poziom Ap3A przy jednoczesnym zwiększaniu się stężenia Ap4A. Ponadto, sam Ap3A nie indukował w badanych komórkach ani apoptozy, ani różnicowania, za to wykazywał silny synergizm do estrów forbolu – aktywatorów białkowej kinazy C (PKC, ang. *protein kinase C*). Stąd postawiono hipotezę, że Ap3A i Ap4A mogą działać jako fizjologiczni antagoniści, przy czym Ap4A indukuje apoptozę, a Ap3A jest koinduktorem różnicowania [11].

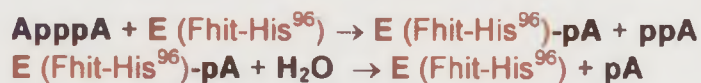
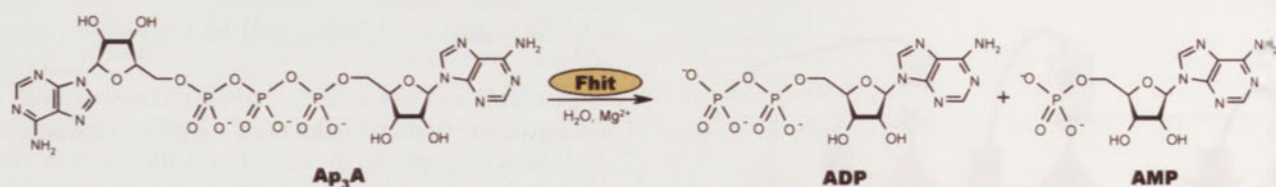
Obecne badania dowodzą, że kluczowym substratem dla indukcji związanego z białkiem FHIT procesu apoptozy, jest Ap3A [12]. W kilku liniach komórek nowotworowych człowieka wykazano ścisłą zależność pomiędzy poziomem ekspresji genu *FHIT* a poziomem Ap3N (w tym także Ap3A). Obecność białka FHIT w komórkach jest związana z bardzo niskim, często poniżej możliwości detekcji, poziomem Ap3A i odwrotnie – wobec braku FHIT poziom Ap3A jest wyższy. To wskazuje, że białko FHIT bierze udział w regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia Ap3A. Podobnych zależności nie obserwuje się w przypadku Ap4A, stąd sądzi się, że ekspresja genu *FHIT* nie jest związana z poziomem Ap4A w komórkach [13]. Takie wyniki wskazują, że chociaż białko FHIT *in vitro* wiąże i hydrolizuje zarówno Ap3A, jak i Ap4A [6], *in vivo* aktywnie metabolizuje jedynie Ap3A, nie hydrolizuje natomiast Ap4A [13].

W komórkach poddanych działaniu czynników indukujących apoptozę, poziom Ap3A zmienia się. Wielkość zmian zależna jest od rodzaju zastosowanego związku i jest ściśle związana z poziomem apoptozy w puli badanych komórek [12].

BIAŁKO FHIT A INDUKCJA APOPTOZY

Aktywność hydrolazowa białka FHIT nie jest wymagana do pełnienia przez nie funkcji supresorowej [2]. Sygnałem do rozpoczęcia kaskady zdarzeń prowadzącej w efekcie do apoptozy jest utworzenie kompleksu białka FHIT z substratem. Formowanie się kompleksu białka FHIT - Ap3A jest kluczowym elementem przekazywania sygnału do indukcji apoptozy przekazywanego dalej do innych partnerów w kaskadzie sygnalizacyjnej [14,15].

Badania krystalograficzne sugerują, że kompleks białka FHIT z substratem ma charakter cząsteczki sygnałowej, zaangażowanej w indukcję apoptozy w komórce [15], ale dokładny przebieg kaskady sygnalizacyjnej prowadzącej w efekcie do śmierci komórki nie został dotychczas poznany. Przypuszcza się, że proapoptotyczna aktywność białka FHIT może polegać na specyficznym łączeniu i aktywowaniu innych białek zaangażowanych w indukcję apoptozy,



(I etap)

(II etap)

Rycina 2. Reakcja enzymatyczna hydrolizy Ap3A katalizowana przez białko Fhit. Reakcja zachodzi dwuetapowo i prowadzi do wydzielienia AMP i ADP.

ale partnerzy, z którymi oddziałuje, nie zostali, jak dotąd, zidentyfikowani.

Obecnie wiadomo, że nadekspresja genu *FHIT* w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc człowieka (NSCLC) prowadzi do zwiększonej ekspresji genów receptorów śmierci (DR) oraz aktywacji kaspaz 3, 8 i 9. Efektem przywrócenia ekspresji genu *FHIT* w komórkach NSCLC jest także naruszenie integralności błon mitochondrialnych. Otrzymane wyniki wskazują, że białko FHIT może indukować apoptozę poprzez bezpośrednią aktywację receptorów śmierci. Taka zależność może wskazywać na udział białka FHIT w szlaku receptorowym apoptozy [16].

Wprowadzenie genu *FHIT* do komórek nowotworu płuc linii H460 skutkuje indukcją apoptozy i znacznym zahamowaniem wzrostu komórek. Obserwuje się zatrzymanie cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G1. Następuje wzrost ilości białek Bak i p21^{waf} przy jednoczesnym braku zmian w poziomie ekspresji genów białek Bcl-2, Bcl-XL, Bax i p53. Brak zmian w poziomie białka p53 sugeruje, iż indukcja apoptozy przez białko FHIT może być niezależna od p53 [17].

Inne badania donoszą o zależności tego mechanizmu od białka adaptorowego FADD (ang. *Fas-associated death domain*). Potwierdzają one hipotezę, że białko FHIT wpływa na aktywację kaspazy-8, jednocześnie wskazując możliwość indukcji apoptozy przez białko FHIT niezależnej od mitochondrium. Jednym z czynników potwierdzających możliwość istnienia niezależnego od mitochondrium mechanizmu indukcji apoptozy przez białko FHIT jest brak hamowania procesu przez białka zaangażowane w kontrolę szlaku mitochondrialnego apoptozy: Bcl-2 i Bcl-XL [18].

Pojawiały się doniesienia o mitochondrialnej lokalizacji białka FHIT w komórkach nowotworu płuc człowieka i jego oddziaływaniu z białkami zaangażowanymi w procesy zachodzące w tych organellach. Wykazano, że białko FHIT oddziałuje z reduktazą ferredoksyny (FDXR, ang. *ferredoxin reductase*), powodującą powstawanie w komórkach reaktywnych form tlenu. Wywołanie, przy użyciu wektora wirusowego, nadekspresji genu *FHIT* powoduje zwiększenie poziomu produkcji reaktywnych form tlenu, co prowadzi

do indukcji apoptozy w komórkach znajdujących się w warunkach stresu oksydacyjnego [9,10].

UDZIAŁ BIAŁKA FHIT W REGULACJI CYKLU KOMÓRKOWEGO

Białko FHIT odgrywa ważną rolę w odpowiedzi komórki na czynniki powodujące powstawanie uszkodzeń DNA i aktywację punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Ekspozycja prawidłowej komórki na czynniki uszkadzające DNA wywołuje aktywację białek zaangażowanych w kontrolę cyklu komórkowego i, w konsekwencji, zatrzymanie cyklu w punkcie kontrolnym, a następnie naprawę DNA. W przypadku komórek nowotworowych obserwuje się nieprawidłową aktywację szlaków indukujących odpowiedź punktów kontrolnych, co w konsekwencji może prowadzić do akumulacji nienaprawionych uszkodzeń w DNA [19]. Porównano przebieg cyklu komórkowego i odporność na warunki stresowe ludzkich komórek nowotworowych zawierających lub pozbawionych białka FHIT oraz mysich komórek Fhit^{+/+} i Fhit^{-/-}. Komórki poddano działaniu czynników uszkadzających DNA (mitomycyna C i promieniowanie UV-C). Zaobserwowano obniżony poziom apoptozy w przypadku komórek Fhit-negatywnych w stosunku do ich odpowiedników zawierających Fhit. Poza tym komórki pozbawione białka Fhit wykazywały wzmożoną aktywność punktów kontrolnych S (10% więcej komórek w tej fazie cyklu) i G2 w stosunku do komórek Fhit^{+/+}. Jednocześnie w fazie G1 cyklu komórkowego znajdowało się 10% mniej komórek pozbawionych białka Fhit w stosunku do liczby ich odpowiedników typu dzikiego [20].

Podjęto próby wyjaśnienia, który ze szlaków regulacji punktu kontrolnego S jest włączany przez komórki pozbawione białka Fhit – szlak zależny od ATM czy od ATR. Stwierdzono, że w przypadku braku białka Fhit w komórce przeważa wolny szlak odpowiedzi punktu kontrolnego S na uszkodzenia DNA, czyli szlak zależny od kinazy ATR. Podstawą do wysnucia takiego wniosku był brak znaczącej różnicy w zahamowaniu syntezy DNA pomiędzy mysimi komórkami zawierającymi białko Fhit, a komórkami pozbawionymi tego białka po 30 minutach od poddania ich działaniu promieniowania jonizującego [10]. Ponadto, wprowadzenie siRNA dla genów *Atr* i *Chk1* zniósło silną

odpowiedź punktów kontrolnych S i G2 w komórkach Fhit^{-/-} poddanych promieniowaniu jonizującemu [22].

Radioodporność komórek zależy od siły odpowiedzi punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Komórki, zarówno człowieka, jak i myszy, pozbawione ekspresji *FHIT* wykazują silniejszą odpowiedź punktów kontrolnych S i G2 niż ich odpowiedniki dzikiego typu [19,21]. Silna odpowiedź punktów kontrolnych jest efektem nadmiernej aktywacji szlaku ATR/CHK1, co potwierdza silniejszy sygnał z ufosforylowanego Chk1 z komórek Fhit^{-/-} w stosunku do mysich komórek Fhit^{+/+} oraz niższy poziom Cdc25 w komórkach poddanych promieniowaniu jonizującemu. Przyczynia się to do nabierania przez komórki pozbawione białka Fhit zdolności tolerowania uszkodzeń DNA i w konsekwencji pozostawiania DNA nie naprawionego lub częściowo naprawionego, co sugeruje związek pomiędzy tym fenotypem a powstawaniem nowotworów. Białko Fhit prawdopodobnie przez modulację aktywności szlaku ATR/CHK1 uwrażliwia komórki na zabijanie indukowane promieniowaniem [21].

Ostatnie badania wskazują, że udział białka Fhit w modulowaniu odpowiedzi punktów kontrolnych cyklu komórkowego może być związany z jego zaangażowaniem w zwiększanie ekspresji *Hus1* i aktywację *Chk1* [23]. Wyciszenie ekspresji genu *FHIT* w komórkach HEK293 przez zastosowanie odpowiednich siRNA spowodowało redukcję poziomu białka *HUS1* oraz *RAD1*, natomiast wywołanie nadekspresji genu *FHIT* w innych komórkach wywołało efekt odwrotny – indukcję ekspresji *HUS1* [19].

Komórki mysie pozbawione białka Fhit, pomimo silnej aktywacji szlaku Atr/Chk1, są odporne na zabijanie indukowane działaniem czynników uszkodzających DNA. Wyciszenie genów *atr* i *chk1* powoduje uwrażliwienie komórek na promieniowanie jonizujące [22].

W komórkach, w których przywrócono ekspresję *FHIT* obserwuje się także zatrzymanie cyklu komórkowego przed wejściem w fazę G1. Przypuszcza się, że może to być efekt indukcji p21^{waf1} [17].

ZWIĄZEK MIĘDZY UTRATĄ EKSPRESJI GENU *FHIT* A NAPRAWĄ DNA

Istnieje zależność pomiędzy poziomem białka *FHIT* i pewnych białek zaangażowanych w naprawę uszkodzeń DNA w komórce. Zależność ta może być dwojakiego rodzaju. Z jednej strony białko *FHIT* może pełnić funkcję regulatorową w stosunku do niektórych białek biorących udział w naprawie uszkodzeń DNA, modulując przez to ich aktywność i tym samym kontrolując wydajność naprawy. Z drugiej jednak – obniżona ekspresja genów kodujących białka naprawcze w efekcie może prowadzić do zmniejszenia wydajności naprawy uszkodzeń DNA, a tym samym – kumulacji uszkodzeń i, w konsekwencji, do braku ekspresji uszkodzonych genów, takich jak *FHIT*. Opisaną zależność obserwuje się między innymi w przypadku CRC (ang. *colorectal carcinoma*), gdzie istnieje zależność między utratą białka *FHIT* a biorącym udział w naprawie błędnie sparowanych zasad białkiem *MSH2*, czy w komórkach nowotwo-

ru piersi, gdzie istnieje zależność między poziomem *FHIT* a *BRCA1* i *BRCA2* [24,25].

Odkrycie zależności między utratą ekspresji *FHIT* i *MSH2* w komórkach CRC sugeruje, że utrata funkcji naprawczych białka *MSH2* może prowadzić do zaburzeń w szlaku naprawy błędnie sparowanych zasad. W konsekwencji, w obrębie genu *FHIT* kumulują się uszkodzenia, dając w efekcie nieaktywny transkrypt. Interesujący jest fakt, że zaburzenia prowadzące w efekcie do zaniku białka *FHIT* zachodzą w obrębie intronów (intron 4 i 5) genu *FHIT* [25].

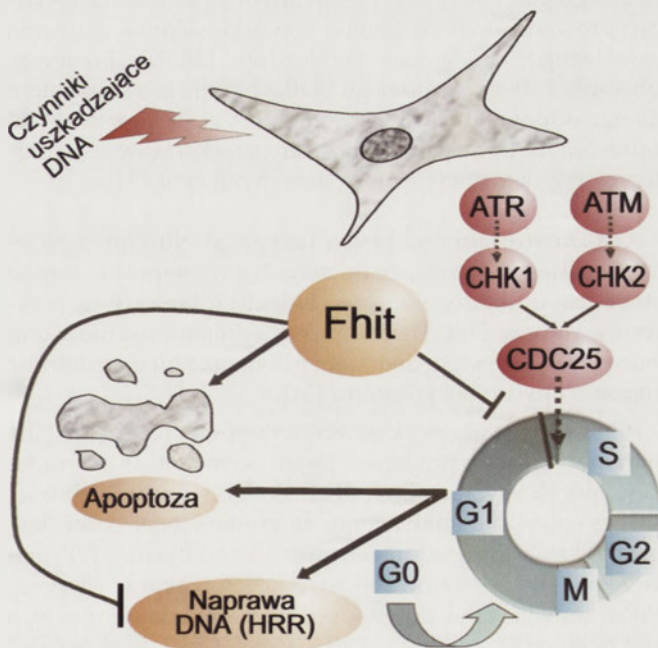
W badaniach przeprowadzonych na komórkach mysich wykazano, że białko Fhit blokuje naprawę DNA przez rekombinację homologiczną. Jest to działanie odwrotne w stosunku do Chk1, który kieruje komórkę na szlak HRR. W komórkach pozbawionych ekspresji *fhit* obserwuje się zwiększenie poziomu naprawy DNA na drodze HRR, natomiast w komórkach, które nie wykazują ekspresji *chk1*, zmniejsza się poziom HRR i jednocześnie zwiększa się śmiertelność komórek spowodowana ekspozycją na promieniowanie. Takie wyniki wskazują, że Fhit i Chk1 mogą mieć przeciwne działanie pod względem kierowania komórki na szlak naprawy uszkodzeń DNA przez rekombinację homologiczną [22] (Ryc. 3).

Nie zaobserwowano zależności pomiędzy białkiem Fhit a szlakiem naprawy DNA przez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ, ang. *non-homologous end joining*) [21].

BIAŁKA ODDZIAŁUJĄCE Z *FHIT*

BIAŁKO Nit

Mechanizm działania białka *FHIT* nie jest znany, dlatego bardzo ważne wydaje się poznanie wszelkich zależności



Rycina 3. Ekspozycja komórki na czynniki uszkodzające DNA wywołuje aktywację białek zaangażowanych w kontrolę cyklu komórkowego i, w konsekwencji, zatrzymanie cyklu komórkowego, a następnie naprawę DNA lub skierowanie komórki na drogę apoptozy. Białko Fhit blokuje naprawę DNA zachodzącą poprzez rekombinację homologiczną oraz, prawdopodobnie, przez modulację aktywności szlaku ATR/CHK1 wzmacnia śmiertelność komórek

między białkiem FHIT a innymi molekułami, z którymi FHIT oddziałuje lub które działają w sposób zależny od białka FHIT. Podczas poszukiwania homologów genu *FHIT* człowieka u *Drosophila melanogaster* i *Caenorhabditis elegans* odkryto białko fuzyjne, którego składnikami były: C-końcowa domena Fhit i domena wykazująca homologię ze spotykaną u roślin i bakterii nitylazą. Nazwano je *Nit-Fhit Rosetta Stone Protein*. Występowanie tego rodzaju połączenia tłumaczy się możliwością zaangażowania obu białek w podobne procesy biologiczne u różnych organizmów [26].

Według hipotezy „Rosetta Stone” zakłada się istnienie w organizmie białka fuzyjnego, którego fragmenty stanowią dwa niezależne białka. Ich geny mogą ulegać ekspresji oddzielnie w różnych organizmach [27,28], zaś składniki białka fuzyjnego, jako pojedyncze polipeptydy, prawdopodobnie biorą udział w tych samych szlakach komórkowych i biochemicznych w różnych organizmach [27-29].

Istnieje znaczny stopień homologii pomiędzy białkami Fhit i Nit. U ludzi i u myszy homologii nitylazы i białko Fhit są kodowane przez odmiennie geny: *FHIT* i *NIT1* zlokalizowane, odpowiednio, na ludzkich chromosomach 3 i 1, a w przypadku myszy (*fhit* i *nit1*) na chromosomach 14 i 1 [26]. W większości zdrowych mysich tkanek obserwuje się ekspresję genu *nit1*. Istnieje częściowa zależność pomiędzy ekspresją *fhit* i *nit1* [29]. W siedmiu na osiem zbadanych tkanek u myszy zaobserwowano zależność pomiędzy poziomem mRNA *nit1* i *fhit* [27].

U *Arabidopsis* białka należące do rodziny białek Nit (Nit 1-3) katalizują reakcję syntezy roślinnego hormonu wzrostu – auksyny, biorącej udział w rozwoju zarodka, formowaniu się liści i korzenia. Przypuszcza się, że u roślin główną funkcją Nit1 jest regulacja poziomu auksyny [29]. Zaobserwowano, że agregacja nitylazы 1 jest jednym z pierwszych wydarzeń prowadzących do śmierci komórki wskutek zranienia wywołanego działaniem herbicydów [29,30]. Ponieważ naturalny substrat roślinnego białka Nit nie jest substratem dla jego odpowiednika zwierzęcego, sądzi się, że u zwierząt białko Nit może mieć inne substraty przekształcane do cząsteczek regulatorowych nie będących auksyną [31].

Analiza strukturalna białka fuzyjnego Nit-Fhit u nicienia *C. elegans* wykazała, że domena Nit występuje w formie tetrameru, do którego na przeciwległych końcach są przyłączone dimery Fhit. Dzięki odpowiedniemu usytuowaniu obu składników względem siebie, domena Fhit ma zdolność wiązania i hydrolizy substratu [31].

Komórki mysie, w których występuje niedobór Nit1 charakteryzują się przyspieszonym wzrostem w stosunku do komórek zawierających Nit1. Podczas próby wyjaśnienia tego zjawiska zauważono, że zmniejszonej ilości Nit1 towarzyszy podwyższona ekspresja genu cykliny D1. Jednocześnie nie obserwowano znaczących zmian w ekspresji genów innych białek związanych z cyklem komórkowym, a więc cykliny B1, cykliny E, Cdk2, Cdk4, Chk1, a także Cdc2 czy Cdc25. Obecność lub brak Nit nie ma także wpływu na poziom ekspresji *fhit* i *p53*. Ponadto, zauważono większą odporność komórek pozbawionych Nit1 w stosunku do zawierających to białko, na ekspozycję na promieniowanie UV-C [29].

Zaobserwowano także, że u ludzi indukcja apoptozy zależnej od kaspazy-3 przez białko FHIT jest efektywniejsza w komórkach wykazujących ekspresję *NIT1* w stosunku do komórek, które tej ekspresji nie wykazują. Wprowadzenie do komórki zarówno FHIT, jak i NIT powoduje indukcję apoptozy w sposób zależny od kaspaz [29]. Dotychczas nieznane są substraty dla nitylazы NIT1 człowieka, stąd nie wiadomo czy aktywność enzymatyczna jest w tym przypadku konieczna dla pełnienia funkcji proapoptotycznej, czy też nie.

Utrata ekspresji *Nit1* promuje wzrost komórki i oporność na śmierć w konsekwencji uszkodzeń DNA. Natomiast nadekspresja *Nit1 in vitro* wywołuje apoptozę zależną od kaspazy-3. Na tej podstawie przypuszcza się, że *Nit1*, podobnie jak *Fhit*, pełni funkcję genu supresorowego. Rezultaty badań wskazują ponadto na możliwość uczestniczenia obu białek Nit1 i Fhit w tym samym szlaku sygnalizacyjnym. Jednym ze wspólnych efektów ekspresji genów białek Nit1 i Fhit jest obniżanie poziomu cykliny D1, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Stąd przypuszczenie, że być może obydwie białka, pośrednio lub bezpośrednio, biorą udział w kontroli stabilności specyficznych białek.

Oddziaływanie pomiędzy Nit1 i Fhit prawdopodobnie nie jest konieczne do pełnienia przez te białka funkcji proapoptotycznej. Przypuszczalnie Nit1 i Fhit niezależnie kontrolują wzrost i śmierć komórki, ale w tym samym szlaku sygnalizacyjnym [29].

KINAZA TYROZYNOWA Src

Badania strukturalne wykazały, że po związaniu cząsteczki Ap3A przez każdą z podjednostek białka FHIT następuje fosforylacja dimeru [15]. Enzymem katalizującym tę reakcję jest kinaza tyrozynowa Src. Fosforylacja białka FHIT przez kinazę Src zachodzi zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Grupa fosforanowa przyłączana jest do tyrozyny w pozycji 114 [32].

Istnieją sprzeczne doniesienia o wpływie kinazy Src na apoptozę. Jedne źródła donoszą o jej funkcji proapoptotycznej w tymocytach i komórkach HEK 293, podczas gdy inne wskazują antyapoptotyczny charakter aktywacji Src w fibroblastach [32]. Nie jest także znana dokładna rola fosforylacji dla funkcjonowania białka FHIT. Jedną z hipotez zakłada, że fosforylacja białka FHIT przez kinazę Src powoduje obniżenie jego aktywności hydrolitycznej, inna natomiast, że fosforylacja powoduje wzmocnienie aktywności proapoptotycznej białka FHIT poprzez przedłużenie czasu półtrwania kompleksu białka FHIT z substratem [32].

Przyłączenie grupy fosforanowej do reszty tyrozyny w pozycji 114 może indukować zmiany konformacyjne białka FHIT, czego skutkiem są odmienne właściwości hydrolityczne form: niefosforylowanej, fosforylowanej w jednej podjednostce dimeru oraz dimeru fosforylowanego na obu podjednostkach. Fosforylacja tylko jednej podjednostki enzymu prowadzi do ponad 50% utraty aktywności hydrolitycznej [33]. Obniżone wartości Km form mono- i difosforylowanej FHIT w stosunku do niefosforylowanego białka sugerują, że obecność grupy fosforanowej może skutkować

zwiększoną aktywnością supresorową [8,32]. Dodatkowo, istnieje możliwość, że białko FHIT w formie fosforylowanej oddziałuje z innymi białkami w sposób niezależny od Ap3A [32].

Kinaza Src, fosforylująca białko FHIT, jest kluczową cytoplazmatyczną kinazą tyrozynową, oddziałującą m.in. z receptorami czynników wzrostu, takimi jak receptor dla czynnika wzrostu naskórka (EGF, ang. *epithelial growth factor*). Nadekspresję EGF obserwuje się w komórkach wielu nowotworów człowieka. Odkryto, że w przypadku aktywacji białek z rodziny EFGR lub nadekspresji genu kinazy Src, białko FHIT ulega degradacji w proteasomie. Dodatkowo zauważono, że degradacji ulega tylko forma fosforylowana białka; forma nie ulegająca fosforylacji przez kinazę Src, nie jest kierowana do proteasomu. Wynik ten sugeruje, że przyłączenie grupy fosforanowej do białka Fhit może być rozpoznawane w komórce jako sygnał do degradacji [34]. Zatem kinaza Src pełni prawdopodobnie funkcję regulatorową w stosunku do białka FHIT. Możliwe, że podczas szlaku sygnalizacyjnego prowadzącego do mitozy, w sytuacji gdy w komórce obecne jest białko FHIT, następuje jego fosforylacja, prowadząca w konsekwencji do degradacji w proteasomie. Dzięki temu poziom białka FHIT w komórce znacznie się obniża, co pozwala na umożliwienie transmisji sygnału do rozpoczęcia podziału komórkowego. Prawdopodobnie później ilość białka FHIT wraca do normy. Taki mechanizm tłumaczyłby w jaki sposób aktywacja receptorów rodziny EGFR prowadzi do proliferacji komórki, nawet jeśli w danym typie komórek istnieje ekspresja genu *FHIT* [34].

Ubc-9

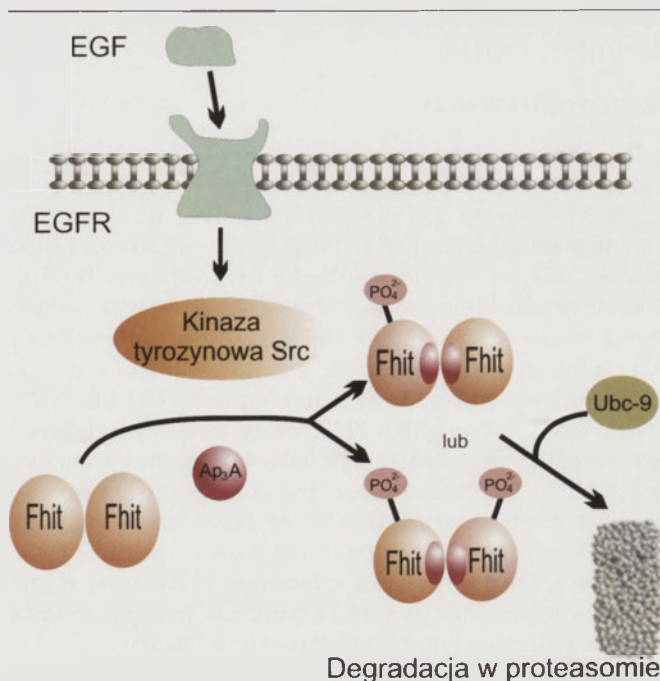
Białko FHIT w bezpośredni sposób oddziałuje z ludzkim UBC9 (ang. *the small ubiquitin-like modifier (SUMO) - conjugating protein*). UBC9 to homolog enzymów klasy E2 skoniugowanych z ubikwityną. Przyłączenie UBC9 powoduje obniżenie aktywności hydrolitycznej białka FHIT, co z kolei może powodować przedłużenie czasu półtrwania kompleksu białka FHIT z substratem i w ten sposób wzmacniać sygnał do indukcji apoptozy. Sądzi się, że UBC9 działa jako inhibitor aktywności hydrolitycznej FHIT, którego przyłączenie do białka FHIT jest możliwe tylko po uprzednim związaniu się enzymu z substratem. Ponadto, oddziaływanie między UBC9 a FHIT jest zależne od Ap3A [35] (Ryc. 4).

Zastosowanie białka SUMO-1, naturalnie oddziałującego z UBC9 człowieka, nie zmienia efektu UBC9 na białko FHIT, ani też nie wpływa na aktywność hydrolazową FHIT. W związku z tym, że białko UBC9 jest zaangażowane w kierowanie białek do jądra komórkowego w sposób niezależny od SUMO-1, możliwe jest, że jądrowa lokalizacja białka FHIT ma także związek z jego oddziaływaniem z UBC9 [35].

Drożdżowe białko Ubc9 jest zaangażowane w regulację cyklin uczestniczących w fazach M i S cyklu komórkowego. To sugeruje, że rola białka Fhit w kontroli cyklu komórkowego może być związana z jego oddziaływaniem z Ubc9.

BIAŁKA Hsp60, Hsp10 i Fdxr

Oddziałujący ze sobą partnerzy Fhit to także białka HSP60/10 i FDXR. Białka HSP60 i HSP10 tworzą kompleks zaangażowany w import pewnych białek do mitochon-



Degradacja w proteasomie

Rycina 4. Oddziaływanie liganda z receptorem naskórkowego czynnika wzrostu prowadzi do aktywacji kinazy Src, która następnie fosforyluje jedną lub obie podjednostki dimeru białka Fhit. Formy mono- lub difosforylowane Fhit są rozpoznawane przez Ubc-9 i kierowane do proteasomu, gdzie ulegają degradacji. Opracowano na podstawie [32,34,35].

drium. Stąd przypuszczenie, że mitochondrialna lokalizacja białka FHIT może być związana z działaniem HSP60/10 [9,10].

Białko FHIT może wzmacniać efekty działania reaktywnych form tlenu podczas chemioterapii. Powstawanie reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworu płuc jest jednym z pierwszych zdarzeń podczas apoptozy indukowanej przez paklitaksel. Także indukcja apoptozy pod wpływem działania cis-platyny jest związana z powstawaniem reaktywnych form tlenu. Po zastosowaniu cis-platyny obserwuje się podwyższony poziom ekspresji genu białka FDXR. Wiadomo, że brak ekspresji *FDXR* skutkuje zmniejszeniem wrażliwości komórek na apoptozę indukowaną 5-fluorouracylem i, odwrotnie, przywrócenie ekspresji *FDXR* wywołuje indukcję apoptozy po zastosowaniu 5-fluorouracylu, H₂O₂ czy doksorubicyny [9].

Prawdopodobnie białko Fhit chroni reduktazę ferredoksyny przed proteosomalną degradacją, wpływając w ten sposób na zwiększenie poziomu *FDXR* w komórce. Fhit nie wpływa na poziom transkrypcji *FDXR*, a jedynie stabilizuje to białko [9]. Prawdopodobnie białka p53 i Fhit wspólnie biorą udział w kontroli poziomu *FDXR* w komórce. Białko p53 działa jako transkrypcyjny, a Fhit – potranskrypcyjny regulator poziomu *Fdxr* [9].

Wywołanie nadekspresji *FHIT* powoduje uwrażliwienie komórek na działanie cis-platyny [9]. Odkrycie oddziaływań pomiędzy Fhit a Hsp60 i Hsp10 wskazuje, że kompleks Hsp60(10) może być istotny dla stabilizacji białka Fhit i jego transportu do mitochondrium w celu aktywacji apoptozy. Ostatnie badania wykazały, że białko FHIT w sposób bezpośredni oddziałuje tylko z jednym ze składników kompleksu – białkiem Hsp60. Oddziaływanie białka Fhit

z Hsp10 ma charakter pośredni i następuje przez wiązanie Hsp10 do Hsp60 [10].

PROTOPORFIRYNA IX

Pojawiły się także doniesienia o bezpośrednim oddziaływaniu białka FHIT z prekursorem hemu – protoporfiryną IX (PpIX). Odkryto, że PpIX działa hamująco na aktywność enzymatyczną białka FHIT. Poza tym zmutowana forma enzymu, nie posiadająca zdolności hydrolitycznych (Fhit-H96N), tworzy kompleksy z PpIX. Na podstawie zwiększonej wrażliwości komórek HeLa na samą protoporfirynę IX i na fotodynamiczną terapię z zastosowaniem PpIX, po uprzednim wywołaniu w nich nadekspresji *FHIT* lub *FHIT-H96N*, sądzi się, że białko FHIT może zwiększać efektywność fotodynamicznej terapii z zastosowaniem prekursora PpIX przez wzmocnienie efektu indukcji apoptozy. Autorzy sugerują, że protoporfiryna IX może działać na białko FHIT jako niekompetycyjny inhibitor, regulujący jego funkcję supresorową. Połączenie PpIX z białkiem FHIT może następować w miejscu aktywnym enzymu i w ten sposób PpIX może stabilizować kompleks FHIT-Ap3A [36,37].

INNE BIAŁKA ODDZIAŁUJĄCE Z FHIT

FHIT hamuje aktywność białka AKT zaangażowanego w szlak sygnalizacyjny, blokując kierowanie komórki na drogę śmierci, powodując w ten sposób inaktywację sygnału przekazywanego na drodze PI3K-AKT-surwiwina i, w konsekwencji, indukcję apoptozy [8].

Białko FHIT hamuje także wzrost komórek poprzez hamowanie sygnału przekazywanego przez jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B (NF- κ B) [38].

Badania *in vitro* wykazały, że białko FHIT oddziałuje z tubuliną, co może wskazywać na związek pomiędzy supresorową funkcją białka FHIT a jego oddziaływaniem z mikro-tubulami. Obecność bezpośrednich oddziaływań między tubuliną a białkiem Fhit, zarówno formą prawidłową, jak i formą zmutowaną H96N (gdzie kluczowa dla aktywności katalitycznej histydyna zastąpiona jest asparaginą), wskazują, że zdolność do hydrolizy substratu nie jest warunkiem koniecznym do oddziaływania Fhit-tubulina [39].

POZIOM BIAŁKA FHIT W KOMÓRKACH A POWSTAWANIE NOWOTORÓW

W tkankach wielu nowotworów obserwuje się częściowy brak lub całkowity zanik ekspresji genu *FHIT*. Tak jest m.in. w komórkach nowotworu płuc [40,41], żołądka [42], trzustki [43], piersi [44,45], okrężnicy, głowy i szyi [46,47], skóry, jajników, w białaczkach [48,49] oraz w raku szyjki macicy [50].

Brak ekspresji genu *FHIT* w komórce może mieć podłoże genetyczne (np. mutacje, delecje, rearanżacje chromosomowe) lub epigenetyczne (np. metylacja wysp CpG w regionie promotorowym genu – 5'CpG). W przypadku wielu nowotworów, gdzie nie obserwuje się ekspresji genu *FHIT*, mechanizm jego inaktywacji nie jest jeszcze znany. W większości nowotworów nerek nie obserwuje się ekspresji genu

białka FHIT, mimo że delecje w DNA lub mRNA zaobserwowano tylko w kilku przypadkach. Wyjaśnieniem tych rozbieżności może być fakt, że niektóre zmiany w DNA znajdują odzwierciedlenie w obrębie dużych intronów i przez to są trudne do wykrycia [24].

Częstą przyczyną utraty ekspresji genu *FHIT* w komórkach nowotworowych jest metylacja wysp CpG w obrębie sekwencji promotorowych prowadząca do zablokowania transkrypcji docelowego genu [24,51-54]. Istnieje odwrotna zależność pomiędzy poziomem ekspresji genu *FHIT* a hipermetylacją wysp 5'CpG w jego obrębie. W przypadku raka jasnokomórkowego nerki (ang. *clear cell renal carcinoma*) metylację wysp 5'CpG odkryto u 12 pacjentów spośród 22 przebadanych (54,5%). Przeprowadzone badania uwiarygodniły także zależność między metylacją 5'CpG a wiekiem pacjentów – częstość metylacji w obrębie genu *FHIT* u pacjentów powyżej 50 roku życia jest znacząco wyższa w stosunku do pacjentów młodszych [52]. Poza tym, zaobserwowano zależność pomiędzy ekspresją genu *FHIT* a przeżywalnością pacjentów dotkniętych jasnokomórkowym rakiem płuc [55].

Inaktywacja *FHIT* występuje bardzo wczesnie podczas rozwoju nowotworu i możliwe, że jest to bezpośredni, jeden z najwcześniejszych efektów poddania komórki działaniu kancerogenów. Powodem inaktywacji genu *FHIT* mogą być w tym przypadku delecje fragmentów genu [24].

Istnieją także obserwacje, że utrata genu *FHIT* może nastąpić wskutek czynników środowiskowych, takich jak palenie papierosów [56], zakażenie *Helicobacter pylori* oraz czynników genetycznych, takich jak obciążenie rodzinnym występowaniem raka żołądka [57]. Zaobserwowano spadek poziomu ekspresji genu białka FHIT u pacjentów z rodzinnym obciążeniem rakiem żołądka, u których nie zdiagnozowano nowotworu [57].

SKUTKI PRZYWRÓCENIA EKSPRESJI GENU FHIT W KOMÓRKACH

W związku z poważnymi konsekwencjami, do jakich prowadzi utrata ekspresji *FHIT*, prowadzone są intensywne próby przywrócenia ekspresji tego genu w komórce, a co za tym idzie – przywrócenia prawidłowego poziomu białka FHIT. W wielu przypadkach przywrócenie ekspresji *FHIT* przy użyciu plazmidów, retrowirusów czy adenowirusów poprzez transfekcję lub transdukcję w komórkach nowotworowych pozbawionych ekspresji genu *FHIT* powoduje zatrzymanie rozwoju nowotworu [2,58,59].

Ostatnie badania dowiodły, że przywrócenie ekspresji genu *FHIT* można osiągnąć także po zastosowaniu odpowiednich miRNA skierowanych na regiony 3'-UTR sekwencji promotorowych genów metylotransferaz DNA – *DNMT3A* (ang. *DNA methyltransferase 3A*) i *DNMT3B* (ang. *DNA methyltransferases 3B*). Zastosowanie tych mikroRNA w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc prowadzi do zwiększenia ekspresji genu *FHIT* nawet do 89%. Poza tym obserwuje się zahamowanie wzrostu i indukcję apoptozy w puli transfekowanych komórek. Podanie cząsteczek

miRNA w testach *in vivo* powoduje zmniejszenie wielkości nowotworu [60].

Odzyskanie ekspresji genu *FHIT* w komórce możliwe jest także poprzez zastosowanie inhibitorów aktywności enzymatycznej DNMT, takich jak np. 5-aza-2'-deoksycytyna. W ten sposób można zablokować proces metylacji wysp 5' CpG w obrębie genu, których obecność, jak wiadomo, skutkuje brakiem transkryptu [51].

Już w 1997 roku odkryto, że wywołanie nadekspresji genu *FHIT* w komórkach nowotworowych płuc, nerek czy żołądka pozbawionych endogennego białka powoduje zahamowanie rozwoju nowotworu w przypadku wszystkich, zbadanych wówczas, linii komórkowych [2]. Przywrócenie ekspresji genu *FHIT* w komórkach nowotworowych prowadzi do ich akumulacji w fazie S cyklu komórkowego i zwiększenia ilości zdarzeń apoptotycznych w puli transfekowanych komórek [17].

Efekt inaktywacji genu *fhit* badano także na myszach pozbawionych jednego lub obu alleli tego genu. Okazało się, że myszy heterozygotyczne pod względem genu *fhit*, bądź też mające profil *fhit*^{-/-} wykazują większą podatność na nowotwory, zarówno spontaniczne, jak i indukowane kancerogenami. Reekspresja genu *fhit* u tych zwierząt skutkowałą zahamowaniem procesu nowotworzenia [61,62].

Zwiększenie poziomu białka FHIT poprzez ekspresję egzogennej *FHIT* wiąże się z indukcją apoptozy i zmniejszeniem intensywności proliferacji komórek [58]. Jednak nie we wszystkich przypadkach osiąga się takie rezultaty. Po stabilnej transfekcji komórek nowotworu nerki RCC wektorem zawierającym gen *FHIT* nie zauważono zmian w morfologii komórek, kinetyce proliferacji, ani w parametrach cyklu komórkowego *in vitro*. Wydaje się, że zdolność do aktywności supresorowej białka FHIT jest zależna albo od linii komórkowej albo specyfiki danego typu komórki. Może to być związane z utratą lub defektem, w danym typie komórek nowotworowych, pewnych elementów działających w tym samym szlaku komórkowym co FHIT i uzależnionych od niego w kaskadzie sygnalizacyjnej. Dlatego kluczowym zadaniem wydaje się poznanie mechanizmów działania białka FHIT i oddziałujących z nim białek, aby móc odpowiednio dobierać typy nowotworów, w których stosowanie terapii genowej z wykorzystaniem *FHIT* może przynieść najlepsze rezultaty [63].

PODSUMOWANIE

Nie jest znany dokładny mechanizm działania białka FHIT. Wiadomo, że enzym ten jest zaangażowany w regulację poziomu Ap3A w komórkach, przy czym jego obecność nie wpływa na wewnątrzkomórkowe stężenie Ap4A [13]. Poza tym białko FHIT odgrywa ważną rolę w odpowiedzi komórki na promieniowanie UV, mitomycynę C i na promieniowanie jonizujące. Jego poziom w komórkach ssaków jest także związany z wydajnością naprawy DNA przez rekombinację homologiczną [23].

Wprowadzenie *FHIT* do myszy pozbawionych ekspresji tego genu poprzez terapię genową powoduje indukcję apoptozy i znaczące zahamowanie rozwoju nowotworu.

Dokładne poznanie mechanizmów uruchamianych po wprowadzeniu genu *FHIT* do komórek człowieka pozbawionych tego białka, a w tym indukcji apoptozy i mechanizmów modulacji cyklu komórkowego, mogłoby mieć ogromne znaczenie dla jego ewentualnego zastosowania terapeutycznego. W związku z efektami jakie w większości przypadków są osiąmane po przywróceniu ekspresji *FHIT* w komórkach, możliwość zastosowania genu *FHIT* w terapii przeciwnowotworowej daje duże nadzieje terapeutyczne.


PIŚMIENICTWO:

- Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG (1996) The human FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal cell carcinoma associated translocation breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 84: 587-597
- Siprashvili Z, Sozzi G, Barnes LD, McCue P, Robinson AK, Eryomin V, Sard L, Tagliabue E, Greco A, Fusetti L (1997) Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13771-13776
- Yunis JJ, Soreng AL (1984) Constitutive fragile sites and cancer. *Science* 252: 1179-1181
- Séraphin B (1992) The HIT protein family: a new family of proteins present in prokaryotes, yeast and mammals. *DNA Sequence* 3: 177-179
- Huang Y, Garrison PN, Barnes LD (1995) Cloning of the *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding diadenosine 5',5'''-P₁,P₁-tetraphosphate (Ap₃A) asymmetrical hydrolase: sequence similarity with the histidine triad (HIT) family. *Biochem J* 312: 925-932
- Barnes LD, Garrison PN, Siprashvili Z, Guranowski A, Robinson AK, Ingram SW, Croce CM, Ohta M, Huebner K (1996) Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5'''-P₁,P₃-triphosphate hydrolase. *Biochemistry* 35: 11529-11535
- Golebiowski F, Kowara R, Pawelczyk T (2001) Distribution of Fhit protein in rat tissue and its intracellular localization. *Mol Cell Biochem* 226: 49-55
- Semba S, Trapasso F, Fabbri M, McCorkell KA, Volinia S, Druck T, Iliopoulos D, Pekarsky Y, Ishii H, Garrison PN, Barnes LD, Croce CM, Huebner K (2006) Fhit modulation of the Akt-survivin pathway in lung cancer cells: Fhit-tyrosine 114 (Y114) is essential. *Oncogene* 25: 2860-2872
- Trapasso F, Pichiorri F, Gaspari M, Palumbo T, Aqeilan RI, Gaudio E, Okumura H, Juliano R, Di Leva G, Fabbri M, Birk DE, Raso C, Green-Church K, Spagnoli LG, Venuta S, Hubner K, Croce CM (2008) Fhit interaction with ferredoxin reductase triggers generation of reactive oxygen species and apoptosis of cancer cells. *J Biol Chem* 283:13736-13744
- Pichiorri F, Okumura H, Nakamura T, Garrison PN, Gasparini P, Suh SS, Druck T, Corkell KAM, Barnes LD, Croce CM, Hubner K (2008) Correlation of fragile histidine triad (Fhit) protein structural features with effector interactions and biological functions. *J Biol Chem* 284: 1040-1049
- Vartanian A, Alexandrov I, Prudowski I, McLennan A, Kisselev L (1999) Ap4A induces apoptosis in human cultured cells. *FEBS Lett* 456: 175-180
- Fisher DI, McLennan A.G. (2007) Correlation of intracellular diadenosine triphosphate (Ap₃A) with apoptosis in Fhit-positive HEK293 cells. *Cancer Lett* 259: 186-191
- Murphy GA, Halliday D, McLennan AG (2000) The Fhit tumor suppressor protein regulates the intracellular concentration of diadenosine triphosphate but not diadenosine tetraphosphate. *Cancer Res* 60: 2342-2344
- Brenner C, Bieganski P, Pace HC, Huebner K (1999) The histidine triad superfamily of nucleotide-binding proteins. *J Cell Physiol* 181: 179-187
- Pace HC, Garrison PN, Robinson AK, Barnes LD, Draganescu A, Rosler A, Blackburn GM, Siprashvili Z, Croce CM, Huebner K, Brenner C (1998) Genetic, biochemical, and crystallographic characterization of

- Fhit-substrate complexes as the active signaling form of Fhit. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5484-5489
16. Deng WG, Nishizaki M, Fang B, Roth JA, Ji L (2007) Induction of apoptosis by tumor suppressor FHIT via death receptor signaling pathway in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 355: 993-999
 17. Sard L, Accornero P, Tornielli S, Delia D, Bunone G, Campiglio M, Colombo MP, Gramegna M, Croce CM, Pierotti MA, Sozzi G (1999) The tumor-suppressor gene is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci* 96: 8489-8492
 18. Roz L, Andriani F, Ferreira CG, Giaccone G, Sozzi G (2004) The apoptotic pathway triggered by the Fhit protein in lung cancer cell lines is not affected by Bcl-2 or Bcl-x(L) overexpression. *Oncogene* 23: 9102-9110
 19. Ishii H, Mimori K, Innoue H, Inageta T, Ishikawa K, Semba S, Druck T, Trapasso F, Tani K, Vecchione A, Croce CM, Mori M, Huebner K (2006) Fhit modulate DNA damage checkpoint response. *Cancer Res* 66: 11287-11292
 20. Ottey M, Han SY, Druck T, Barnoski B, McCorkell KA, Croce CM, Raventos-Suarez C, Fairchild CR, Wang Y, Huebner K (2004) Fhit deficient normal and cancer cells are mitomycin C and UVC resistant. *Brit J Cancer* 91: 1669-1677
 21. Hu B, Han S, Wang X, Ottey M, Dicker A, Huebner K, Wang Y (2005) Involvement of the Fhit gene in the ionizing radiation-activated ATR/CHK1 pathway. *J Cell Physiol* 202: 518-523
 22. Hu B, Wang H, Wang X, Lu HR, Huang C, Powell SN, Huebner K, Wang Y (2005) Fhit and CHK1 have opposing effects on homologous recombination repair. *Cancer Res* 65: 8613-8616
 23. Ishii H, Wang Y, Huebner K (2007) A Fhit-ing role in the DNA damage checkpoint response. *Cell Cycle* 6: 1044-1048
 24. Pekarsky Y, Zanesi N, Palamarchuk A, Huebner K, Croce CM (2002) FHIT: from gene discovery to cancer treatment and prevention. *Lancet Oncol* 3: 748-754
 25. Mori M, Mimori K, Masuda T, Yoshinaga K, Yamashita K, Matsuyama A, Inoue H (2001) Absence of MSH2 protein expression is associated with alteration of the FHIT locus and FHIT protein expression in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 61: 7379-7382
 26. Pekarsky Y, Campiglio M, Sipsrshvili Z, Druck T, Sedkov Y, Tillib S, Draganescu A, Wermuth P, Rothman JH, Huebner K, Buchberg AM, Mazo A, Brenner Ch, Croce CM (1998) Nitrilase and Fhit homologs are encoded as fusion proteins in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8744-8749
 27. Marcotte EM, Pellegrini M, Ng HL, Rice DW, Yeates TO, Eisenberg (1999) Detecting protein function and protein-protein interactions from genome sequences. *Science* 285: 751-753
 28. Enright AJ, Iliopoulos I, Kyrpides NC, Ouzounis CA (1999) Protein interaction maps for complete genomes based on gene fusion events. *Nature* 402: 86-90
 29. Semba S, Han SY, Qin HR, McCorkell KA, Iliopoulos D, Pekarsky Y, Druck T, Trapasso F, Croce CM, Huebner K (2006) Biological functions of mammalian Nit1, the counterpart of the invertebrate NitFhit Rosetta stone protein, a possible tumor suppressor. *J Biol Chem* 281: 28244-28253
 30. Cutler SR, Somerville CR (2005) Imaging plant cell death: GFP-Nit1 aggregation marks an early step of wound and herbicide induced cell death. *BMC Plant Biol* 5: 4
 31. Pace HC, Hodawadkar SC, Draganescu A, Huang J, Bieganowski P, Pekarsky Y, Croce CM, Brenner C (2000) Crystal structure of the worm NitFhit Rosetta Stone protein reveals a Nit tetramer binding two Fhit dimers. *Curr Biol* 10: 907-917
 32. Pekarsky Y, Garrison PN, Palamarchuk A, Zanesi N, Aqeilan RI, Huebner K, Barnes LD, Croce CM (2004) Fhit is a physiological target of the protein kinase Src. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3775-3779
 33. Garrison PN, Robinson AK, Pekarsky Y, Croce CM, Barnes LD (2005) Phosphorylation of the Human Fhit Tumor Suppressor on Tyrosine 114 in *Escherichia coli* and Unexpected Steady State Kinetics of the Phosphorylated Forms. *Biochemistry* 44: 6286-6292
 34. Bianchi F, Magnifico A, Olgiati C, Zanesi N, Pekarsky Y, Tagliabue E, Croce CM, Menard S, Campiglio M (2006) FHIT-proteasome degradation caused by mitogenic stimulation of the EGF receptor family in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 18981-18986
 35. Golebiowski F, Szulc A, Szutowicz A, Pawelczyk T (2004) Ubc9-induced inhibition of diadenosine triphosphate hydrolase activity of the putative tumor suppressor protein Fhit. *Arch Biochem Biophys* 428: 160-164
 36. Zawacka-Pankau J, Kowalska A, Issaeva N, Burcza A, Kwiek P, Bednarsz N, Pramanik A, Banecki B, Podhajska AJ (2007) Tumor suppressor Fhit protein interacts with protoporphyrin IX *in vitro* and enhances the response of HeLa cells to photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B: Biol* 86: 35-42
 37. Zawacka-Pankau J, Podhajska AJ (2007) Expression and simple, one-step purification of fragile histidine triad (Fhit) tumor suppressor mutant forms in *Escherichia coli* and their interaction with protoporphyrin IX. *Biot Lett* 29: 877-883
 38. Nakagawa Y, Akao Y (2006) Fhit protein inhibits cell growth by attenuating the signaling mediated by nuclear factor- κ B in colon cancer cell lines. *Exp Cell Res* 312: 2433-2442
 39. Chaudhuri AR, Khan IA, Prasad V, Robinson AK, Luduena RF, Barnes LD (1999) The tumor suppressor protein Fhit. A novel interaction with tubulin. *J Biol Chem* 274: 24378-24382
 40. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Coticelli MG, Inoue H, Tornielli S, Pilotti S, De Gregorio L, Pastorino U, Pierotti MA, Ohta M, Huebner K, Croce CM (1996) The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 85: 17-26
 41. Fong KM, Biesterveld EJ, Virmani A, Wistuba I, Sekido Y, Bader SA, Ahmadian M, Ong ST, Rassool FV, Zimmerman PV, Giaccone G, Gazdar AF, Minna JD (1997) FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations. *Cancer Res* 57: 2256-2267
 42. Baffa R, Veronese ML, Santoro R (1998) Loss of FHIT expression in gastric carcinoma. *Cancer Res* 58: 4708-4714
 43. Simon B, Bartsch D, Barth P (1998) Frequent abnormalities of the putative tumor suppressor gene FHIT at 3p14.2 in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 58: 1583-1587
 44. Negrini M, Monaco C, Vorechovsky I, Ohta M, Druck T, Baffa R, Huebner K, Croce CM (1996) The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in breast carcinomas. *Cancer Res* 56: 3173-3179
 45. Gatalica Z, Lele SM, Rampy BA, Norris BA (2000) The expression of FHIT protein is related inversely to disease progression in patients with breast carcinoma. *Cancer* 88: 1378-1383
 46. Mao L, Fan Y-H, Lotan R, Hong WK (1996) Frequent abnormalities of FHIT, a candidate tumor suppressor gene, in head and neck cancer cell lines. *Cancer Res* 56: 5128-5131
 47. Virgilio L, Shuster M, Gollin SM, Veronese ML, Ohta M, Huebner K, Croce CM (1996) FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9770-9775
 48. Iwai T, Yokota S, Nakao M, Nakazawa N, Taniwaki M, Kimura T, Sonoda Y, Kaneko H, Okuda T, Azuma H, Oka T, Takeda T, Watanabe A, Kikuta A, Asami K, Sekine I, Matsushita T, Tsuchiya T, Mimaya J, Koizumi S, Ohta S, Miyake M, Takaue Y, Iwai A, Fujimoto T (1998) Frequent aberration of FHIT gene expression in acute leukemias. *Cancer Res* 58: 5182-5187
 49. Sugimoto K, Yamada K, Miyagawa K, Hirai H, Oshimi K (1997) Decreased or altered expression of the FHIT gene in human leukemias. *Stem Cells* 15: 223-228
 50. Greenspan DL, Connolly DC, Wu R (1997) Loss of FHIT expression in cervical carcinoma cell lines and primary tumors. *Cancer Res* 57: 4692-4698
 51. Zochbauer-Muller S, Fong KM, Maitra A (2001) 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res* 61: 3581-3585
 52. Kvasa S, Gordiyuk V, Kondratov A, Ugrny D, Zgonnyk YM, Ryn-ditch AV, Vozianov AF (2008) Hypermethylation of the 5' CpG island of the FHIT gene in clear cell renal carcinomas. *Cancer Lett* 265: 250-257

53. Tanaka H, Shimada Y, Harada H, Shinoda M, Hatooka S, Imamura M, Ishizaki K (1998) Methylation of the 5' island of the FHIT gene is closely associated with transcriptional inactivation in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 58: 3429-3434
54. Yang Y, Takeuchi S, Hofmann WK, Ikezoe T, van Dongen JJ, Szczepanski T, Bartram CR, Yoshino N, Taguchi H, Koeffler HP (2006) Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Res* 30: 98-102
55. Ramp U, Caliskan E, Ebert T, Karagiannidis C, Willers R, Gabbert HE, Gerharz CD (2002) FHIT expression in clear cell renal carcinomas: versatility of protein levels and correlation with survival. *J Pathol* 196: 430-436
56. Stec-Michalska K, Pęczek Ł, Krakowiak A, Klupińska G, Chojnacki J, Michalski B, Nawrot B (2006) Ocena poziomu mRNA białka Fragile Histidine Triad (FHIT) w błonie śluzowej żołądka u pacjentów z objawami dyspepsji niewrzodowej w zależności od nalożu palenia tytoniu i infekcji *Helicobacter pylori*. *Gastroent Pol* 13: 259-263
57. Stec-Michalska K, Antoszczyk S, Klupinska G, Nawrot B (2005) Loss of FHIT expression in gastric mucosa of patients with family histories of gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 11: 17-21
58. Ji L, Fang BL, Yen N, Fong K, Minna JD, Roth JA (1999) Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Res* 59: 3333-3339
59. Roz L, Gramegna M, Ishii H (2002) Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in lung and cervical cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3615-3620
60. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanasi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM (2007) MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15805-15810
61. Dumon KR, Ishii H, Fong LY, Zanasi N, Fidanza V, Mancini R, Vecchione A, Baffa R, Trapasso F, Durning MJ, Huebner K, Croce CM (2001) FHIT gene therapy prevents tumor development in Fhit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3346-3351
62. Zanasi N, Fidanza V, Fong LY, Mancini R, Druck T, Valtieri M, Rüdiger T, McCue PA, Croce CM, Huebner K (2001) The tumor spectrum in FHIT-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10250-10255
63. Werner NS, Siphshvili Z, Fong LY, Marquitan G, Schroder JK, Bardenheuer W, Seeber S, Huebner K, Schutte J, Opalka B (2000) Differential susceptibility of renal carcinoma cell lines to tumor suppression by exogenous FHIT expression. *Cancer Res* 60: 2780-2785

FHIT – tumor suppressor protein involved in induction of apoptosis and cell cycle regulation

Roza Pecherzewska, Barbara Nawrot 

Department of Bioorganic Chemistry, Centre of Molecular and Macromolecular Studies of the Polish Academy of Sciences, 112 Sienkiewicza St., 90-363 Lodz; Poland

e-mail: bnawrot@bio.cbmm.lodz.pl

Key words: Fhit, HIT, apoptosis, cell cycle

ABSTRACT

The fragile histidine triad (Fhit) protein is a diadenosine triphosphate hydrolase belonging to the histidine triad family of nucleotide-binding proteins. Fhit is a tumor suppressor protein which plays an important role in pro-apoptotic signalling, cell cycle control and sensitivity to DNA damaging agents. The Ap_3A – hydrolase activity of Fhit is not required for exertion of its tumor suppressor function. The *FHIT* gene is located in *FRA3B* region – the most common fragile site in the human genome. Loss of FHIT is observed in a variety of tumors and in pre-malignant states. Re-expression of *FHIT* in human cancer cells leads to inhibition of tumorigenicity and restoration of caspase-dependent apoptosis. Viral-mediated *FHIT* gene therapy induces apoptosis and suppresses tumors in preclinical models. Therefore, treatment with the *FHIT* gene may constitute a novel clinical approach for gene therapy of human cancers.

Krzysztof Olszyński¹

Małgorzata Zimowska^{2,✉}

¹Institut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Pracownia Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych, Warszawa

²Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Cytologii, Warszawa

✉ Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Cytologii, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: (022) 554 22 03, e-mail: mzi-mowska@biol.uw.edu.pl

Artykuł otrzymano 22 lipca 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 19 stycznia 2009 r.

Słowa kluczowe: macierz zewnątrzkomórkowa, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej

STRESZCZENIE

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej zaangażowane są w wiele procesów zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych. Poprzez proteolizę strukturalnych składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz receptorów komórka-komórka i komórka-macierz zewnątrzkomórkowa regulują architekturę tkanki. Ich aktywność jest niezbędna w procesach aktywacji i dezaktywacji cząsteczek sygnałowych, w tym czynników wzrostu, chemokin i cytokin. Zaangażowane są również w wiele procesów patologicznych, wśród których najlepiej poznano ich rolę w nowotworzeniu. Odgrywają istotną rolę w odpowiedzi zapalnej, tworząc przestrzeń do migracji dla komórek układu odpornościowego oraz modulując stężenie chemoatraktantów i przekształcając prekursorów defensyn w formy aktywne. Uczestniczą w procesach regeneracyjnych, wpływając na funkcjonalne odtworzenie unaczynienia i unerwienia. Poznanie budowy i roli poszczególnych przedstawicieli rodziny MMP i ich oddziaływań ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej może przyczynić się do zrozumienia specyficznej i zależnej od typu komórek funkcji metaloproteinaz towarzyszącej utrzymaniu homeostazy komórkowej, jak i rozwojowi wielu stanów patologicznych.

BUDOWA I PODZIAŁ METALOPROTEINAZ MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ (MMP)

Macierz zewnątrzkomórkowa, będąca dynamiczną strukturą zbudowaną z różnorodnych składników, warunkuje właściwą architekturę tkanki, nie pełniąc jedynie funkcji strukturalnej, ale wpływając również na adhezję, migrację czy fuzję komórek oraz zapewniając komunikację międzykomórkową. Procesy degradacji i odtwarzania strukturalnych składników macierzy kontrolowane są przez wiele enzymów proteolitycznych. Ze względu na miejsca rozcinania cząsteczki substratu, proteazy te zostały podzielone na dwie grupy. Pierwszą z nich stanowią egzoproteazy, które odcinają pojedyncze aminokwasy na końcach cząsteczki. Drugą - endoproteazy, które trawią cząsteczki białek na większe fragmenty. Endoproteazy ze względu na budowę ich domeny katalitycznej można podzielić na: proteazy serynowe, cysteinowe, asparaginianowe oraz metaloproteazy [1-3].

Metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej stanowią rodzinę białek o podobnej organizacji domenowej, które dla swojej aktywności katalitycznej wymagają jonu Zn^{2+} . Po raz pierwszy odkryte zostały u płazów w procesie przeobrażenia. W obrębie tej grupy wyszczególniono nadrodzinę nazwaną metzincinami. Charakteryzuje się ona zachowaną w ewolucji sekwencją, tzw. zakretem metioninowym (xxMxP), znajdującym się za sekwencją wiążącą jon Zn^{2+} . Cztery grupy enzymów wchodzące w jej skład zawierają charakterystyczną, zachowaną w ewolucji, trzykrotnie powtórzoną sekwencję histydynową (HE-xGHxxGxxHx). Jej ostatni aminokwas charakteryzuje przynależność enzymu do jednej z czterech rodzin: astacyń, serralizyn, adamalizyn/ADAM (enzymy o cechach dezintegryny i metaloproteinazy) /ADAMTS (enzymy o cechach dezintegryny i metaloproteinazy z motywami sekwencyjnymi trombospondyny) oraz metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP). Pierwszą opisaną MMP była kolagenaza-1 (MMP-1). Do dziś opisano 24 metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej u myszy i 23 u człowieka, a obecność tych enzymów została stwierdzona zarówno u zwierząt, jak i u roślin. Obok nazw klasyfikacyjnych w postaci skrótu „MMP” i kolejnego numeru ewidencyjnego, wykorzystywane są również nazwy zwyczajowe (Tab. 1) [4-7].

W oparciu o rodzaj substratów oraz lokalizację, MMP można podzielić na sześć podrodzin: kolagenazy, żelatynazy, stromielizyny, matrylizyny, MMP błonowe oraz inne. Kolagenazy cechuje zdolność degradacji kolagenu w postaci włóknistej, podczas gdy żelatynazy wykazują wysoką aktywność wobec zdenaturowanych form kolagenu. Stromielizyny degradują strukturalne składniki macierzy zewnątrzkomórkowej inne niż kolagen [2,8,9].

Tabela 1. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej

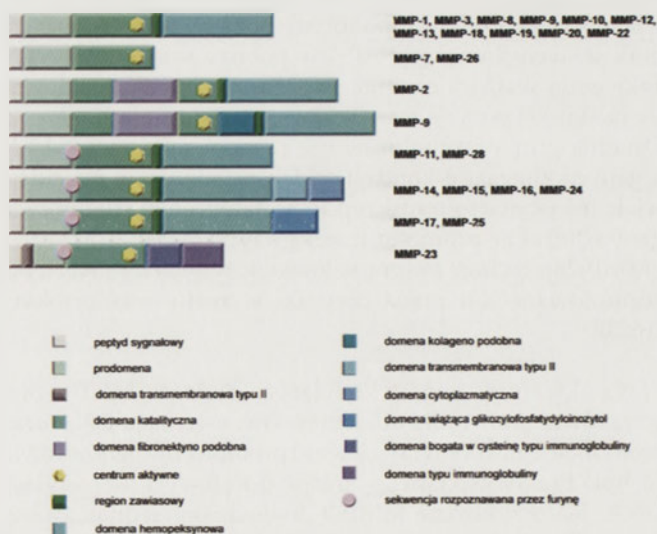
Podrodzina	Nazwa zwyczajowa	Inna nazwa	MMP
Kolagenazy			
	Kolagenaza 1	Kolagenaza interstycjalna, kolagenaza fibroblastowa	MMP-1
	Kolagenaza 2	Kolagenaza neutrofilowa	MMP-8
	Kolagenaza 3	Kolagenaza szczurza	MMP-13
	Kolagenaza 4	Kolagenaza (<i>Xenopus</i>)	MMP-18
Zelatinazy			
	Żelatinaza A	72-kD żelatinaza	MMP-2
	Żelatinaza B	92-kD żelatinaza	MMP-9
Stromielizyny			
	Stromielizyna 1	Tranzyna 1	MMP-3
	Stromielizyna 2	Tranzyna 2	MMP-10
Matrylizyny			
	Matrylizyna 1	Matryna, PUMP-1	MMP-7
	Matrylizyna 2		MMP-26
	Stromielizyna 3		MMP-11
MMP błonowe			
	MT1-MMP	MMP błonowe	MMP-14
(a) transbłonowe	MT2-MMP		MMP-15
	MT3-MMP		MMP-16
	MT5-MMP		MMP-24
(b) związane przez GPI	MT4-MMP		MMP-17
	MT6-MMP	Leukolizyna	MMP-25
Inne			
	Elastaza makrofagowa	Metaloelastaza	MMP-12
	RASI-1		MMP-19
	Enamelizyna		MMP-20
	XMMP (<i>Xenopus</i>)		MMP-21
	CMMP (<i>Gallus</i>)		MMP-22
	CA-MMP		MMP-23
	-		MMP-27
	Epilizyna		MMP-28

Poszczególne podrodziny różnią się od siebie organizacją domenową i homologią sekwencji. Wszystkie metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej są syntezowane jako zymogeny (proMMP), w których budowie wyróżnia się pięć domen: domenę sygnałową, propeptydową, katalityczną, sekwencję zawiasową i domenę hemopeksynową. Sekwencja sygnałowa, która kieruje MMP do pęcherzyków zewnątrzwydzielniczych jest usuwana w trakcie translacji. Propeptyd (prodomena) zazwyczaj zbudowany jest z około 80 aminokwasów i zawiera sekwencję PRCXXPD (wyjątek stanowi MMP-23, w której krytyczna cysteina znajduje się w otoczeniu innej sekwencji). Propeptyd odpowiedzialny jest za zablokowanie aktywności enzymatycznej. Grupa tiolowa cysteiny w obrębie propeptydu oddziałuje z atomem Zn^{2+} w centrum aktywnym, utrzymując proMMP w stanie

nieaktywnym. Domena katalityczna zawiera trzy reszty histydyny w obrębie sekwencji HEXXHXXGXXH, które koordynują aktywny atom Zn^{2+} . Reszta kwasu glutaminianowego w obrębie tej sekwencji aktywuje związaną z Zn^{2+} cząsteczkę H_2O , która jest niezbędna dla aktywności MMP. Oprócz katalitycznego atomu Zn^{2+} , w obrębie domeny katalitycznej znajduje się również dodatkowy atom Zn^{2+} oraz od jednego do czterech atomów Ca^{2+} , pełniących funkcje strukturalne. MMP-2 i MMP-9 w obrębie domeny katalitycznej posiadają dodatkowo trzy powtórzenia fibronektyny II, które odpowiadają za wiązanie się tych enzymów do kolagenu. MMP, za wyjątkiem MMP-7, MMP-23 i MMP-26, posiadają również bogaty w prolinę region zawiasowy oraz domenę hemopeksynową. Znajdująca się na C-końcu domena hemopeksynowa umożliwia oddziaływania z innymi białkami, przyczynia się do właściwego rozpoznania substratu, aktywacji enzymu, jego lokalizacji, internalizacji i degradacji. Błonowe MMP (MT-MMP) posiada dodatkową domenę transmembranową, kotwiczącą enzym w błonie, ulokowaną za domeną hemopeksynową oraz krótki ogon cytoplazmatyczny [4,10-12]. Mimo że nie wszystkie metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej posiadają domeny transbłonowe czy umożliwiające oddziaływania z glikofosfatydyloinozytolem, większość z nich związana jest z powierzchnią błony komórkowej poprzez oddziaływania z innymi białkami. Pozwala to na wytworzenie lokalnego wysokiego stężenia enzymu oraz jego właściwą orientację względem substratu. Wykazano, że białkami dokującymi mogą być np. proteoglikany powierzchniowe dla MMP-7 czy integryna $\alpha\beta 3$ dla MMP-2, CD44 dla MMP-9 [13,14]. Budowę domenową poszczególnych metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej przedstawia rycina 1.

MECHANIZMY KONTROLI SYNTEZY I AKTYWNOŚCI MMP

Funkcjonowanie metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej stanowi obiekt intensywnych badań. Niektóre izoformy enzymu (MMP-19, MMP-28) są obecne w tkankach, będąc włączonymi w procesy homeostazy. Aktywność większości metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej jest jednak bardzo niska lub niewykrywalna. Ich synteza



Rycina 1. Budowa domenowa metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej.

wzrasta w trakcie wzrostu, przebudowy i uszkodzenia tkanek, a także w przebiegu wielu chorób [6,15]. Podobnie jak w przypadku innych enzymów, funkcjonowanie MMP regulowane jest na kilku poziomach: transkrypcji, translacji, wydzielania, lokalizacji, aktywacji, hamowania oraz degradacji [3,10,16,17].

MECHANIZMY KONTROLI EKSPRESJI GENÓW MMP

Transkrypcja genów kodujących cząsteczki MMP jest indukowana przez czynniki wzrostu, hormony, cytokiny i inne [16,18]. Oddziałują one z białkowymi aktywatorami transkrypcji AP-1 (białkowy aktywator transkrypcji 1) oraz PEA3 (aktywator wzmacniający ekspresję genów wirusa polio), które, wiążąc sekwencje *cis* promotorów, umożliwiają start transkrypcji. W obrębie promotorów większości genów MMP obserwujemy obecność jednej lub wielu sekwencji wiążących czynnik AP-1. Sekwencje te uzależniają ekspresję genów MMP od poziomu ekspresji i aktywności wielu czynników *trans*, zarówno działających bezpośrednio, jak i związanych z PEA3. Aktywacja za ich pośrednictwem odbywa się na drodze kaskady fosforylacyjnej zależnej od kinazy białkowej aktywującej mitogen (MAPK), która reguluje ekspresję czynnika AP-1 poprzez wzmocnienie transkrypcji genów *c-jun* i *c-fos*. Jednak pomimo szerokiej wiedzy w zakresie aktywacji, represji czy utrzymywania poziomu transkrypcji genów MMP, do tej pory nie opracowano mechanizmu komórkowo- lub tkankowo-specyficznego ekspresji genów MMP [19,20].

Promotory genów kodujących białka MMP o podobnej specyficy substratowej często znacznie się od siebie różnią, np. MMP-2 i MMP-9 (żelatynazy) oraz MMP-1 i MMP-8 (kolagenazy) znajdują się pod kontrolą promotorów różnych typów. Wyróżnia się trzy typy promotorów genów MMP. Pierwszy typ promotora, występujący w większości ludzkich genów MMP, charakteryzuje się występowaniem kasety TATA w pozycji -30 pz i miejsca wiążącego AP-1 w pozycji -70 pz względem pierwszej transkrybowanej zasady. Większość z nich zawiera również, położoną dalej, sekwencję wiążącą PEA3. Białko PEA3, oddziałując z AP-1, odpowiada za kontrolę transkrypcji. Drugi typ promotora występującego w genach MMP-8, MMP-11 i MMP-21 zawiera kasetę TATA w podobnej pozycji, lecz cechuje go brak sekwencji wiążącej AP-1 w pobliżu sekwencji TATA. Sekwencja wiążąca czynnik AP-1 może jednak znajdować się na dalszej pozycji, stanowiąc miejsce startu transkrypcji. Ostatnia grupa promotorów nie zawiera sekwencji TATA, a geny podlegające kontroli takich promotorów posiadają wiele miejsc startu transkrypcji. Metaloproteinazy, których geny kontroluje promotor trzeciego typu (MMP-2, MMP-14 i MMP-28), cechuje ekspresja konstytutywna, a jej nasilenie kontrolowane jest przez czynniki wzrostu oraz cytokiny [16,20].

Na aktywność genów kodujących niektóre MMP wpływają również czynniki epigenetyczne: metylacja DNA oraz modyfikacje histonów. Większość promotorów genów MMP cechuje brak wysp GpC – miejsc docelowych w metylacji DNA. Na przykładzie MMP-9 dowiedziono jednak związku między metylacją promotora a poziomem aktywności transkrypcyjnej. Czynniki demetylujące wpływają również

na poziom ekspresji genów MMP-3 i MMP-10 w komórkach nowotworowych jelita grubego. Stało się to podstawą przypuszczenia, że komórkowo specyficzna ekspresja genów MMP może zależeć od stopnia metylacji/demetylacji tych genów. Jednak ta hipoteza wymaga weryfikacji, ponieważ demetylacja DNA jest procesem przebiegającym stosunkowo długo, a więc nie ma znaczenia w szybkiej odpowiedzi komórkowej [21,22].

Na poziom ekspresji genów MMP w znaczący sposób wpływa również struktura chromatyny, która modulowana jest przez różnego rodzaju modyfikacje histonów. Czynniki MTA1 (czynnik białkowy związany z metastazą 1), jeden ze składników kompleksu represorów modelowania chromatyny i acetylacji histonów, przyczynia się do sprowadzenia HDAC2 (deacetylaza histonów 2) i enzymu modelującego chromatynę Mi-2 w okolice promotora genu MMP-9. W ten sposób, poprzez zmianę poziomu acetylacji histonów H3/H4, a przez to dostępności DNA, osłabia jego ekspresję [23].

Poziom ekspresji genów MMP kontrolowany jest również przez procesy potranskrypcyjne. Wykazano, że czynnik TGF- β podnosi poziom białka MMP-2 i MMP-9 głównie poprzez wydłużenie okresu półtrwania mRNA tych metaloproteinaz w komórkach nowotworowych prostaty i fibroblastach dziąseł człowieka [24], a sygnały pochodzące od integryny $\alpha 3 \beta 1$ stabilizują MMP-9 mRNA [25]. Podobnie kortyzol wzmacnia stabilność mRNA MMP-13 w osteoblastach szczurzych [26].

MECHANIZMY KONTROLI AKTYWNOŚCI MMP

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej syntetyzowane są w formie nieaktywnej, tzw. zymogenu, w którym prodomena blokuje dostęp substratów do centrum aktywnego enzymu. Aktywacja proMMP wymaga zerwania wiązań między resztami cysteinowymi propeptydu a jodem cynku w miejscu aktywnym, co pociąga za sobą zmiany konformacyjne. Może do tego dojść wskutek modyfikacji grupy tiolowej poprzez czynniki fizjologiczne (związki utleniające czy elektrofilowe) oraz niefizjologiczne (związki alkilujące oraz jony metali ciężkich), bezpośrednio odcięcie prodomeny przez inne proteiny, zaburzenia allosteryczne zymogenu prowadzące do autolitycznego odcięcia prodomeny [12].

W proces aktywacji zaangażowane są różne mechanizmy. Aktywacja proMMP może być związana z bezpośrednim odcięciem prodomeny przez inny enzym. Część metaloproteinaz na końcu prodomeny zawiera sekwencję RXKR lub RRKR rozpoznawaną przez furynę. Furyna, będąca proteazą serynową obecną w aparacie Golgiego, odcina prodomenę, dzięki czemu MMP aktywowane są jeszcze w aparacie Golgiego i uwalniane z komórki w postaci aktywnej [27,28].

Wiele MMP ma zdolność do odcinania prodomeny innych członków rodziny MMP. Najlepiej opisanym tego typu mechanizmem jest aktywacja proMMP-2 przez aktywne MMP-14. Co zaskakujące, w proces ten zaangażowany jest TIMP-2, będący specyficznym inhibitorem metalopro-

teaz. C-końcowy fragment cząsteczki inhibitora TIMP-2 tworzy wiązanie z C-końcowym fragmentem proMMP-2, zbliżając cząsteczkę do N-końcowego fragmentu MMP-14. W tym procesie MMP-14 spełnia funkcję receptora wiążącego za pośrednictwem TIMP-2 cząsteczkę proMMP-2, będąc równocześnie aktywatorem proMMP-2 [29-31].

Badania wskazują, że w proces aktywacji MMP może być również zaangażowany, związany z powierzchnią komórki, system u-PA (zależny od urokinazy aktywator plazminogenu)/plazmina. Plazminogen aktywowany przez u-PA do plazminy odcina prodomeny określonych MMP, czyniąc je aktywnymi. Mechanizm ten może być zaangażowany w aktywację proMMP-3, proMMP-12 i proMMP-13 [32,33].

Inny mechanizm aktywacji proMMP związany jest z redukcją wiązań między resztami cysteinowymi propeptydu a jonem cynku w miejscu aktywnym. Czynniki aktywujące cząsteczki MMP w postaci zymogenu są w tym przypadku oksydanty, jony metali ciężkich czy też cząsteczki z reaktywną grupą -SH. Jednak oksydanty wydzielane przez leukocyty czy inne komórki mogą na tej drodze zarówno aktywować, jak i hamować MMP poprzez modyfikacje aminokwasów w centrum aktywnym enzymu. Badania wskazują, że czynnikiem decydującym o działaniu oksydantu może być jego stężenie. Produkt mieloperoksydazy, produkowany przez neutrofile w niskich koncentracjach aktywuje proMMP-7, podczas gdy wysokie stężenie powoduje inaktywację aktywnej formy enzymu [34,35].

Kontrola aktywności MMP odbywa się również poprzez wiązanie cząsteczek enzymu z ich inhibitorami. Aktywność MMP może być hamowana poprzez obecny w organizmie inhibitor proteaz α 2-makroglobulinę oraz przez specyficzne tkankowe inhibitory metaloproteinaz, zwane TIMP. Białka TIMP stanowią rodzinę 4 glikoprotein: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4, które hamują aktywność MMP poprzez oddziaływanie z ich domeną katalityczną. Oddziałując z cząsteczkami MMP, TIMP powoduje zmiany konformacyjne, polegające na obrocie N-końca względem C-końca o ok. 13°. [11,36,37]. Oprócz funkcji hamowania aktywności MMP, TIMP-2 jest również niezbędny do aktywacji niektórych izoform MMP. Wykazano, że proMMP-2 aktywowana jest jedynie wtedy, kiedy występuje w kompleksie z cząsteczką TIMP-2. Oddziaływanie to ma miejsce pomiędzy domeną hemopeksynową proMMP-2 a domeną C-końcową TIMP-2 [29-31,38].

Zdolność do hamowania aktywności niektórych metaloproteinaz MMP wykazują również liczne białka obecne w macierzy zewnątrzkomórkowej. Istotną funkcję w tym procesie pełnią proteoglikany. Poprzez reszty siarczanu heparanu (HS) lub siarczanu chondroityny (CS) glikozaminoglikany wchodzące w ich skład posiadają zdolność wiązania wielu białek, takich jak chemokiny czy czynniki wzrostu. Na przykładzie proMMP-9 został udowodniony ich udział w kontroli aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. Jednak połączenie z proteoglikanami nie wydaje się być niezbędnym do aktywacji proMMP-9 [39,40].

Także wydzielany do macierzy zewnątrzkomórkowej prekursor białka β -amyloidu posiada zdolności hamowa-

nia aktywności MMP-2 [41]. Supresor angiogenezy, białko RECK, hamuje aktywność MMP-2, MMP-9 i MMP-14 [42]. Mechanizm hamowania z udziałem tych cząsteczek nie został jednak poznany.

FUNKCJE MMP

MMP uczestniczą w wielu procesach fizjologicznych, a ich nadprodukcja związana jest również z wieloma stanami patologicznymi. Rola MMP w tych procesach była jednak trudna do sprecyzowania – wzmożona aktywność towarzyszyła progresji nowotworów, w innych przypadkach zaś była obserwowana także w trakcie regresji. Spostrzeżenia te skłoniły do skupienia się głównie na badaniu patologicznych aspektów aktywności MMP, które, oprócz udziału w rozwoju i progresji nowotworów, okazują się być zaangażowane w takie stany patologiczne, jak zawał mięśnia sercowego, choroba Alzheimera, astma czy choroby płuc [17,36,43,44].

MMP JAKO CZYNNIKI MODELUJĄCE MACIERZ ZEWNĄTRZKOMÓRKOWĄ

Badania nad MMP wykazały, że enzymy te charakteryzują się szerokim spektrum działania, zarówno w zakresie wprowadzania strukturalnych zmian w macierzy zewnątrzkomórkowej, jak i innych procesach. Zdolne są do przekształcania i degradacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej – kolagenów, elastyny, fibronektyny, lamininy czy proteoglikanów. W ten sposób tworzą przestrzeń umożliwiającą komórkom migrację. MMP regulują architekturę tkanki poprzez oddziaływanie na połączenia komórkowe. Rozcinając receptory oddziaływań macierz-komórka oraz komórka-komórka, wprowadzają zmiany w powierzchniach przylegania czy też wytwarzają sygnał do migracji [7,17,45,46].

Poprzez proteolizę składników macierzy zewnątrzkomórkowej przyczyniają się również do powstawania fragmentów peptydów, wiążących specyficznie szeroką gamę czynników wzrostu czy cytokin, modyfikując ścieżki przekazywania sygnałów. Poprzez cięcie składników macierzy związanych z czynnikami wzrostu, metaloproteinazy macierzy bezpośrednio aktywują czynnik transformujący TGF β (MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9), prekursor interleukin (MMP-2, MMP-3, MMP-9) i inne. MMP modulują również stężenie chemokin i cytokin [14,18,47]. MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12 zdolne są do uwalniania czynnika TNF α ze związanego z błoną komórkową prekursora [48,49]. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej zdolne są również do pozytywnej i negatywnej kontroli poziomu interleukiny IL-1 β . Potrafią zarówno proteolitycznie ją aktywować, jak i degradować jej formy aktywne [50,51]. MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8 i MMP-9 dezaktywują chemokiny poprzez odcięcie od ich cząsteczki peptydu, który staje się specyficznym antagonistą. Ten mechanizm dezaktywacji wiąże się z negatywnym sprzężeniem zwrotnym, w wyniku którego obniża się poziom napływu komórek zapalnych [9,52].

MMP zdolne są również do uwalniania czynników wzrostu unieaktywnionych poprzez wiązanie z białkami

nie będącymi składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej. Wśród najważniejszych substratów MMP, które nie stanowią strukturalnych elementów macierzy zewnątrzkomórkowej, wymienić można: białkowe czynniki wzrostu, receptory kinazy tyrozynowej, cząsteczki adhezji komórkowej, cytokiny i chemokiny [8,46]. Identyfikacja substratów MMP jest jednak utrudniona, gdyż w warunkach *in vitro* potrafią one degradować niemalże wszystkie składniki macierzy zewnątrzkomórkowej. Kolejnym utrudnieniem w badaniach jest bardzo powszechne w tej grupie enzymów zjawisko kompensacji, czyli przejmowania roli pokrewnej metaloproteinazy w sytuacji jej braku [45].

UDZIAŁ MMP W PROCESIE ANGIOGENEZY

Wiele czynników angiogenicznych posiada zdolność indukowania ekspresji genu białka MMP w komórkach śródbłonna i zrębu naczyń krwionośnych. Również MMP potrafią zwiększać dostępność i aktywność czynników angiogenicznych, takich jak VEGF, bFGF (zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, ang. *basic fibroblast growth factor*) czy TGF- β . MMP-1, MMP-3, MMP-7 i MMP-13 zdolne są do uwalniania aktywnego VEGF₁₆₅ z jego nieaktywnych kompleksów z CTGF (czynnik wzrostu tkanki łącznej, ang. *connective tissue growth factor*). MMP-1 i MMP-3, degradując perlekan znajdujący się w błonie podstawnej śródbłonna, powodują uwalnianie bFGF. MMP-2, MMP-3 i MMP-7, degradując dekorynę, uwalniają nieaktywną postać TGF-1, którą proteolitycznie aktywować mogą MMP-2 i MMP-9 [60].

Proteoliza macierzy będąca efektem działania różnych MMP, wydaje się być krytycznym elementem angiogenezy, na którą MMP wpływa również poprzez indukowanie migracji komórek. W proces unaczynienia zaangażowane są głównie dwie żelatynazy – żelatynaza A (MMP-2) i żelatynaza B (MMP-9). Istotną rolę w angiogenezie wydaje się odgrywać również MT1-MMP [60]. Zmiany w macierzy zewnątrzkomórkowej, wynikające z aktywności MMP, prowadzić mogą do powstania zaburzeń w formowaniu obwodowych naczyń krwionośnych. Myszy pozbawione aktywności MMP-2 cechowały się m.in. zmniejszoną zdolnością do tworzenia naczyń krwionośnych [53]. Badania prowadzone nad udziałem MMP-9 w procesie angiogenezy wykazały, że metaloproteinaza ta jest niezbędna w migracji i namnażaniu się komórek mięśni gładkich w procesie odbudowy naczyń [54]. Mutanty mysie pozbawione MMP-9 wykazują zaburzoną angiogenezę oraz przebudowę naczyń krwionośnych w postnatalnym rozwoju kości długich [55].

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej mogą również hamować angiogenezę. Negatywny wpływ na proces wzrostu nowych naczyń odbywać się może na drodze proteolitycznego uwalniania endogennych inhibitorów angiogenezy, jak i przez modyfikację receptorów powierzchniowych komórek, które po stracie domen wiążących ligand stają się niewrażliwe na sygnały proangiogenne. Dodatkowo, MMP-7, MMP-9 i MMP-12 mogą blokować angiogenezę poprzez przekształcanie plazminogenu w angiostatynę [60,63].

Wzrost aktywności MMP jest związany również z natężeniem procesu angiogenezy w guzach nowotworowych.

Liczne doniesienia wskazują na podwyższony poziom mRNA kodującego MMP-2, MMP-7, MMP-9 i MMP-11 w guzach rozwijających się i przerzutujących [60].

UDZIAŁ MMP W ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej zaangażowane są również w proces odpowiedzi immunologicznej. Do ich syntezy zdolne są praktycznie wszystkie komórki układu odpornościowego, a podwyższenie poziomu ich syntezy obserwuje się w przebiegu wszystkich chorób, którym towarzyszy rozwój stanu zapalnego. Napływ komórek stanu zapalnego wiąże się z gwałtownym wzrostem aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. Wykazano, że granulocyty oraz niewielka grupa makrofagów przechowuje w cytoplazmatycznych granulach duże ilości zsyntezowanych metaloproteinaz proMMP-8 i proMMP-9. W granulach makrofagów magazynowana jest również proMMP-12. Podczas aktywacji granule te przemieszczają się pod powierzchnię komórki i ich zawartość uwalniana jest na zewnątrz [56]. Badania prowadzone na myszach pozwoliły stwierdzić, że aktywność MMP jest niezbędna w migracji limfocytów z małych naczyń żylnych do węzłów chłonnych, w których obecny jest antygen [57]. Myszy z niedoborem MMP-3 wykazywały natomiast obniżoną migrację neutrofilów do miejsc zapalnych w płucach [58]. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej mogą również regulować rekrutację limfocytów poprzez tworzenie gradientu chemoatraktantów. Wydaje się, że wydzielanie MMP-7 przez komórki nabłonka jest elementem wczesnej odpowiedzi immunologicznej. Myszy z mutacją w genie kodującym MMP-7 cechują się obniżoną migracją neutrofilów. Aktywna MMP-7 uwalnia syndekan-1 z powierzchni komórki, z którym związana jest chemokina KC (CXCL1), dzięki czemu tworzy się jej gradient regulujący napływ neutrofilów do pęcherzyków płucnych, czego nie obserwuje się u mutantów w obrębie genu *MMP-7* [59].

Niektóre metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej wydzielane przez komórki układu odpornościowego różnią się od MMP wydzielanych przez inne typy komórek. Neutrofile, jako jedyne komórki, mają zdolność do magazynowania w granulach MMP-8 i -9 i uwalniają je w momencie aktywacji. MMP-9 uwalniana z granul neutrofilów występuje w formie monomeru, dimeru oraz kompleksu z lipokaliną związaną z żelatynazą B neutrofilów (NGAL). Ponadto, MMP-9 neutrofilów jest mniej podatna na działanie inhibitorów MMP, a MMP-9 związana z powierzchnią neutrofilów jest niewrażliwa na hamowanie ze strony TIMP-1 oraz TIMP-2 [56].

UDZIAŁ MMP W ROZWOJU I PROGRESJI NOWOTWORÓW

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej są czynnikami zaangażowanymi we wszystkie etapy nowotworzenia. Przypuszcza się, że MMP mogą wspierać lub hamować rozwój nowotworów w zależności od wrażliwości tkanki guza na angiostatynę. Badania prowadzone *in vivo* na myszach pozbawionych integryny $\alpha 1$ pokazały, że defekt ten prowadzi do nadprodukcji MMP-7 i MMP-9, a w

efekcie – do wzrostu poziomu angiostatyny, która hamuje neowaskularyzację [62].

Specyficzną rolę MMP-2, MMP-9 i MT1-MMP w nowotworzeniu wykazano w doświadczeniach na myszach, którym dożylnie podano ludzkie komórki nowotworowe płuc, pęcherza moczowego i włókniako-mięsaka. Myszy z podwyższoną aktywnością tych MMP cechowały się znacznie częstszym występowaniem przerzutów [44]. Z drugiej strony wykazano, że myszy pozbawione MMP-9 i MMP-11 wykazują ograniczony rozwój nowotworów nabłonka płaskiego indukowanego kancerogenami i HPV [65]. Natomiast myszy pozbawione MMP-2 i MMP-9 cechuje ograniczony wzrost nowotworu wysp trzustkowych indukowanego przez SV40 [66]. Badania kliniczne wskazują zaś, że słaba ekspresja genu kodującego MMP-9 w guzach nowotworowych trzustki wiąże się z występowaniem łagodnego fenotypu komórek rakowych [61]. Z kolei ekspresja genów MMP-2 i MMP-9 wzrasta wraz z rozwojem nowotworów jelita grubego, żołądka [70] i płuc [71].

Ostatnie odniesienia pokazują, że gen *MMP-1* jest jednym z czterech genów, których nadekspresja bardzo często występuje w guzach raka piersi. Nasiloną ekspresją *MMP-1* zwiększa zdolność raka piersi do tworzenia przerzutów w kościach [72]. Zwiększenie ekspresji *MMP-1* wiąże się również z niekorzystnym rokowaniem w przypadku raka żołądka, przelyku, jelita grubego [73] i czerniaka złośliwego [74].

Na rozwój nowotworu znacząco wpływają również inhibitory TIMP. Wykazano, że wzrost ekspresji genów *TIMP* prowadzi do hamowania wzrostu guza, a także do spadku ilości przerzutów odległych. Natomiast spadek ekspresji tych genów prowadzi do większego złośliwienia komórek nowotworowych [75]. Białka TIMP działają przeciwnowotworowo na drodze degradacji białek zewnątrzkomórkowych, nie będących elementami strukturalnymi macierzy zewnątrzkomórkowej. W ten sposób wpływają na zachowanie komórek, regulując ich wzrost, różnicowanie czy nasilenie apoptozy. TIMP-1 i TIMP-2, hamując migrację i namnażanie się komórek śródbłonka naczyń, prowadzą do spowolnienia angiogenezy [75]. TIMP-3 działa antyangiogenicznie poprzez ograniczenie zdolności do migracji komórek śródbłonka naczyń, a także wzmagając ich apoptozę. Przy nadekspresji *TIMP-1* obserwuje się zmniejszenie stopnia złośliwienia nowotworów trzustki. Prawdopodobnie hamuje on wzrost guzów, ich angiogenezę i przerzutowanie, a także przyczynia się do nasilenia apoptozy komórek nowotworowych. Jednak w niektórych przypadkach podwyższona ekspresja genów białek TIMP wiąże się z rokowaniem niekorzystnym. Dotyczy to nadekspresji *TIMP-1* w raku jelita grubego czy *TIMP-2* w raku pęcherza moczowego i piersi [76].

Obserwowana w wielu przypadkach różnych nowotworów nadekspresja *MMP*, a także przeciwnowotworowe działanie TIMP, doprowadziły do rozpoczęcia badań nad syntetycznymi inhibitorami MMP – MMPi (ang. *MMP inhibitors*). Badania prowadzone były na myszach nastrzykiwanych komórkami różnych nowotworów człowieka, m. in. trzustki, jelita grubego i piersi. Podanie Batimastatu

(homologu kolagenu o szerokim spektrum działania) cztery dni przed iniekcją nowotworowych komórek trzustki znacząco zwiększało przeżywalność myszy – aż 85% pozostało żywych przez 70 dni od nastrzyknięcia, natomiast w grupie kontrolnej 25%. Użycie AG3340 (specyficznego inhibitora zsyntezowanego na podstawie krystalograficznych struktur ludzkich MMP) po dwóch tygodniach od nastrzyknięcia zwierząt linią komórkową wyprowadzoną ze złośliwego glejaka zaowocowało spadkiem masy guza pierwotnego i spadkiem ilości przerzutów do nerek i kości w porównaniu z kontrolą. Podanie BAY12-9566 (specyficznego inhibitora żelatynaz i stromielizyny-1) pięć dni przed iniekcją linii komórkowej wyprowadzonej z raka jelita grubego przelożyło się na znaczne obniżenie tempa wzrostu i tworzenia przerzutów. Jednak największe efekty obserwowano przy podawaniu dwóch różnych MMPi lub MMPi wraz z innymi substancjami. W mysim modelu czerniaka złośliwego podanie AG3340 wraz z karboplatyną obniżało tempo tworzenia przerzutów w płucach o 70%, podczas gdy użycie samego AG3340 tylko o 33%. Podobnie, połączenie AG3340 z paklitaksellem obniżała ilość wtórnych guzów o 83% w porównaniu z 50% spadkiem przy użyciu samego paklitakselu. Najsilniejszy efekt zaobserwowano jednak u myszy z przeszczepionym ludzkim nowotworem jajnika, którym na zmianę podawano Batimastat i cisplatynę – w chwili zakończenia doświadczenia, po 28 tygodniach, wszystkie zwierzęta przeżyły i były wolne od zmian nowotworowych. Jednak zastosowanie MMPi u ludzi było utrudnione ze względu na silne dolegliwości uboczne, a także nie przynosiło podobnych rezultatów. Warto zaznaczyć, że MMPi opóźniają wzrost guza, redukują liczbę i wielkość przerzutów, przedłużają życie chorych zwierząt, jednak nie wywołują regresji dużych guzów pierwotnych [36,44,7].

AKTYWNOŚĆ MMP W IMMUNOPATOLOGIACH

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej mogą przyczyniać się do immunopatologii powiązanych ze stanem zakażenia. Podczas zakażenia HIV zakażone makrofagi zwiększają wydzielanie MMP-2, która degraduje chemokinę CXCL12 (SDF-1) wydzielaną przez astrocyty, zamieniając ją w neurotoksynę [67]. Dodatkowo, zakażone HIV monocyty zwiększają wydzielanie MMP-9, w wyniku czego rośnie przepuszczalność nabłonków jednowarstwowych. Prawdopodobnie stan ten prowadzi do zwiększenia przepuszczalności bariery krew-mózg, które obserwowane jest przy zakażeniach HIV. Wzrost aktywności MMP-9 w płynie mózgowo-rdzeniowym, a zarazem spadek ilości TIMP-1, doprowadza do związanej z zakażeniem HIV demencji [67,68]. Natomiast w przypadku wirusowego zapalenia wątroby typu B, wirusowe białko HBx przyczynia się do zwiększenia produkcji MMP-14 i MMP-9 [69]. Podwyższony poziom enzymów towarzyszy również zakażeniom *Helicobacter pylori* [77] czy *Mycobacterium* [78].

UDZIAŁ MMP W PRZEKSZTAŁCANIU TKANKI MIĘŚNIOWEJ

Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej pełnią funkcje regulatorowe w trakcie wzrostu i rozwoju mięśni szkieletowych, a ekspresja ich genów zwiększa się po uszkodzeniu

mięśnia i w trakcie jego regeneracji. Do syntezy MMP zdolne są mioblasty oraz włókna mięśniowe, a także inne komórki rezydujące w obrębie mięśni szkieletowych, tj. fibroblasty i fibrocyty, makrofagi, komórki śródbłonna, komórki nerwowe, adipocyty, komórki tuczne oraz różnorodne komórki układu odpornościowego [79]. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej, poprzez wpływ na spójność i skład macierzy zewnątrzkomórkowej, odgrywają kluczową rolę w namnażaniu się mioblastów, ich różnicowaniu, naprawie włókien mięśniowych po uszkodzeniu oraz utrzymaniu struktury tkanki łącznej mięśnia. Dane literaturowe wskazują, że dwa enzymy spośród rodziny MMP są zaangażowane w procesy chorobowe mięśni szkieletowych oraz w procesy towarzyszące naprawie tkanki mięśniowej: MMP-2 i MMP-9 [80]. Ich podwyższoną aktywność zaobserwowano w wielu dystrofiach mięśniowych czy stanach zapalnych [81]. Wysoka aktywność MMP-2 i MMP-9 wykrywana jest również przy uszkodzeniu nerwów w obrębie mięśnia [82]. Wykazano, że mięśnie z przewagą włókien wolno- i szybko-kurczących się różnią się syntezą i aktywnością MMP-2 i MMP-9 w trakcie regeneracji, co może rzutować na ich zdolności regeneracyjne [83]. Zmiany poziomu MMP towarzyszące regeneracji mięśni szkieletowych związane są prawdopodobnie z aktywacją komórek satelitowych oraz napływem komórek stanu zapalnego. W warunkach *in vitro* poziom syntezy poszczególnych metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej zmienia się w trakcie różnicowania mioblastów w miotuby. W hodowlach pierwotnych ludzkich mioblastów MMP-9 jest syntetyzowana jedynie przed rozpoczęciem fuzji. MMP-2 jest natomiast syntetyzowana na wszystkich etapach różnicowania mioblastów [84].

PODSUMOWANIE

Udział metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w wielu procesach biologicznych nie budzi wątpliwości. Uczestnicząc w proteolizie strukturalnych składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz receptorów komórka-komórka i komórka-macierz zewnątrzkomórkowa enzymy te wpływają na architekturę tkanek. Ponadto aktywność metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej jest niezbędna do aktywacji lub dezaktywacji różnorodnych cząsteczek sygnałowych, takich jak czynniki wzrostu, chemokiny i cytokiny. Szczególnie ważna z punktu widzenia zdrowia jest rola tych enzymów w nowotworzeniu. Metaloproteinazy uczestniczą także w odpowiedzi zapalnej, tworząc przestrzeń do migracji dla komórek układu odpornościowego oraz wpływając na stężenie chemoatraktantów i przekształcając prekursorów defensyn w formy aktywne. Dodatkowo, enzymy te uczestniczą w procesach regeneracyjnych, wpływając na funkcjonalne odtworzenie unaczynienia i unerwienia.

Z tego punktu widzenia poznanie budowy i funkcji poszczególnych przedstawicieli rodziny MMP i ich oddziaływań ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej może przyczynić się do zrozumienia specyficznej i zależnej od typu komórek roli tych białek enzymatycznych w utrzymaniu homeostazy komórkowej i w rozwoju stanów patologicznych.

PIŚMIENNICTWO

- Larsen M, Artym VV, Green JA, Yamada KM (2006) The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol* 18: 463-471
- Mott JD, Werb Z (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16: 558-564
- Alexander CM, Werb Z (1989) Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr Opin Cell Biol* 1: 974-982
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 207-214
- Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S (1998) Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *Faseb J* 12: 1075-1095
- Nagase H, Woessner JF Jr (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491-21494
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000) Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18: 1135-1149
- McCawley LJ, Matrisian LM (2001) Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 13: 534-540
- McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM (2002) Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties *in vivo*. *Blood* 100: 1160-1167
- Fu X, Parks WC, Heinecke JW (2008) Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Semin Cell Dev Biol* 19: 2-13
- Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69: 562-573
- Ra HJ, Parks WC (2007) Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* 26: 587-596
- Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85: 683-693
- Yu WH, Woessner JF Jr (2000) Heparan sulfate proteoglycans as extracellular docking molecules for matrilysin (matrix metalloproteinase 7). *J Biol Chem* 275: 4183-4191
- Nagase H (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378: 151-160
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253: 269-285
- Lemaitre V, D'Armiento J (2006) Matrix metalloproteinases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78: 1-10
- Allen DL, Teitelbaum DH, Kurachi K (2003) Growth factor stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion *in vitro*. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C805-815
- Benbow U, Brinckerhoff CE (1997) The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol* 15: 519-526
- Yan C, Boyd DD (2007) Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 211: 19-26
- Chicoine E, Esteve PO, Robledo O, Van Themsche C, Potworowski EF, St-Pierre Y (2002) Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 765-772
- Couillard J, Demers M, Lavoie G, St-Pierre Y (2006) The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 1233-1239
- Yan C, Wang H, Aggarwal B, Boyd DD (2004) A novel homologous recombination system to study 92 kDa type IV collagenase transcription demonstrates that the NF-kappaB motif drives the transition from a repressed to an activated state of gene expression. *Faseb J* 18: 540-541
- Overall CM, Wrana JL, Sodek J (1991) Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons

- with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* 266: 14064-14071
25. Iyer V, Pumiglia K, DiPersio CM (2005) Alpha3beta1 integrin regulates MMP-9 mRNA stability in immortalized keratinocytes: a novel mechanism of integrin-mediated MMP gene expression. *J Cell Sci* 118: 1185-1195
 26. Delany AM, Jeffrey JJ, Rydziel S, Canalis E (1995) Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 270: 26607-26612
 27. Kang T, Nagase H, Pei D (2002) Activation of membrane-type matrix metalloproteinase 3 zymogen by the proprotein convertase furin in the trans-Golgi network. *Cancer Res* 62: 675-681
 28. Thomas G (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 753-766
 29. Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, Schade van Westrum S, Crabbe T, Clements J, d'Ortho MP, Murphy G (1998) The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem* 273: 871-880
 30. Kinoshita T, Sato H, Okada A, Ohuchi E, Imai K, Okada Y, Seiki M (1998) TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. *J Biol Chem* 273: 16098-16103
 31. Wang Z, Juttermann R, Soloway PD (2000) TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 *in vivo*. *J Biol Chem* 275: 26411-26415
 32. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaître V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiro S, Lupu F, Collen D (1997) Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet* 17: 439-444
 33. Monea S, Lehti K, Keski-Oja J, Mignatti P (2002) Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 192: 160-170
 34. Fu X, Kao JL, Bergt C, Kassim SY, Huq NP, d'Avignon A, Parks WC, Mecham RP, Heinecke JW (2004) Oxidative cross-linking of tryptophan to glycine restrains matrix metalloproteinase activity: specific structural motifs control protein oxidation. *J Biol Chem* 279: 6209-6212
 35. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW (2003) Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): an oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. *J Biol Chem* 278: 28403-28409
 36. Baker AH, Edwards DR, Murphy G (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 115: 3719-3727
 37. Tsuruda T, Costello-Boerrigter LC, Burnett JC Jr. (2004) Matrix metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail Rev* 9: 53-61
 38. Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR (2006) Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* 25: 99-113
 39. Winberg JO, Berg E, Kolset SO, Uhlin-Hansen L (2003) Calcium-induced activation and truncation of promatrix metalloproteinase-9 linked to the core protein of chondroitin sulfate proteoglycans. *Eur J Biochem* 270: 3996-4007
 40. Winberg JO, Kolset SO, Berg E, Uhlin-Hansen L (2000) Macrophages secrete matrix metalloproteinase 9 covalently linked to the core protein of chondroitin sulphate proteoglycans. *J Mol Biol* 304: 669-680
 41. Higashi S, Miyazaki K (2003) Identification of a region of beta-amyloid precursor protein essential for its gelatinase A inhibitory activity. *J Biol Chem* 278: 14020-14028
 42. Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB, Ide C, Horan TP, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa S, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C, Noda M (2001) The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 107: 789-800
 43. Chambers AF, Matrisian LM (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89: 1260-1270
 44. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295: 2387-2392
 45. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 221-233
 46. Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516
 47. Larrain J, Bachiller D, Lu B, Agius E, Piccolo S, De Robertis EM (2000) BMP-binding modules in chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space. *Development* 127: 821-830
 48. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL (1994) Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 370: 555-557
 49. Price NM, Gilman RH, Uddin J, Recavarren S, Friedland JS (2003) Unopposed matrix metalloproteinase-9 expression in human tuberculous granuloma and the role of TNF-alpha-dependent monocyte networks. *J Immunol* 171: 5579-5586
 50. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y, Mori Y (1996) Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 271: 14657-14660
 51. Schonbeck U, Mach F, Libby P (1998) Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* 161: 3340-3346
 52. McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM (2000) Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289: 1202-1206
 53. Kato T, Kure T, Chang JH, Gabison EE, Itoh T, Itohara S, Azar DT (2001) Diminished corneal angiogenesis in gelatinase A-deficient mice. *FEBS Lett* 508: 187-190
 54. Cho A, Reidy MA (2002) Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circ Res* 91: 845-851
 55. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z (1998) MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93: 411-422
 56. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 4: 617-629
 57. Faveeuw C, Preece G, Ager A (2001) Transendothelial migration of lymphocytes across high endothelial venules into lymph nodes is affected by metalloproteinases. *Blood* 98: 688-695
 58. Warner RL, Beltran L, Younkin EM, Lewis CS, Weiss SJ, Varani J, Johnson KJ (2001) Role of stromelysin 1 and gelatinase B in experimental acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 537-544
 59. Li Q, Park PW, Wilson CL, Parks WC (2002) Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* 111: 635-646
 60. Raffetto JD, Khalil RA (2008) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 75: 346-359
 61. Gurevich LE (2003) Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in determination of invasive potential of pancreatic tumors. *Bull Exp Biol Med* 136: 494-498
 62. Pozzi A, Moberg PE, Miles LA, Wagner S, Soloway P, Gardner HA (2000) Elevated matrix metalloproteinase and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2202-2207
 63. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA, Shapiro SD (1998) Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol* 161: 6845-6852
 64. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D (2000) Matrix metallo-

- proteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2: 737-744
65. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z (2000) MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103: 481-490
 66. Zervos EE, Norman JG, Gower WR, Franz MG, Rosemurgy AS (1997) Matrix metalloproteinase inhibition attenuates human pancreatic cancer growth in vitro and decreases mortality and tumorigenesis *in vivo*. *J Surg Res* 69: 367-371
 67. Zhang K, McQuibban GA, Silva C, Butler GS, Johnston JB, Holden J, Clark-Lewis I, Overall CM, Power C (2003) HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration. *Nat Neurosci* 6: 1064-1071
 68. Suryadevara R, Holter S, Borgmann K, Persidsky R, Labenz-Zink C, Persidsky Y, Gendelman HE, Wu L, Ghorpade A (2003) Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by astrocytes: links to HIV-1 dementia. *Glia* 44: 47-56
 69. Chung TW, Lee YC, Kim CH (2004) Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *Faseb J* 18: 1123-1125
 70. Waas ET, Lomme RM, DeGroot J, Wobbes T, Hendriks T (2002) Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer. *Br J Cancer* 86: 1876-1883
 71. Ylisirnio S, Hoyhtya M, Turpeenniemi-Hujanen T (2000) Serum matrix metalloproteinases-2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2 in lung cancer -TIMP-1 as a prognostic marker. *Anticancer Res* 20: 1311-1316
 72. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordón-Cardo C, Guise TA, Massagué J (2003) A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3: 537-549
 73. Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, Melvin WT, Fothergill JE (1998) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut* 43: 791-797
 74. Nikkola J, Vihinen P, Vuoristo MS, Kellokumpu-Lehtinen P, Kahari VM, Pyyrhonen S (2005) High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 11: 5158-5166
 75. Blavier L, Henriot P, Imren S, Declerck YA (1999) Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer. *Ann NY Acad Sci* 878: 108-119
 76. Chetty C, Lakka SS, Bhoopathi P, Kunigal S, Geiss R, Rao JS (2008) Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 3 suppresses tumor angiogenesis in matrix metalloproteinase 2-down-regulated lung cancer. *Cancer Res* 68: 4736-4745
 77. Bebb JR, Letley DP, Thomas RJ, Aviles F, Collins HM, Watson SA, Hand NM, Zaitoun A, Atherton JC (2003) *Helicobacter pylori* upregulates matrilysin (MMP-7) in epithelial cells *in vivo* and *in vitro* in a Cag dependent manner. *Gut* 52: 1408-1413
 78. Quiding-Jarbrink M, Smith DA, Bancroft GJ (2001) Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection. *Infect Immun* 69: 5661-5670
 79. Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R (2004) Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 29: 191-197
 80. Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier J, Verdier-Sahuque M, Fardeau M, Almeddine H (1999) Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev Biol* 205: 158-170
 81. Kieseier B, Schneider C, Clements J, Gearing A, Gold R, Toyka K, Hartung H (2001) Expression of specific matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies. *Brain* 124: 341-351
 82. Renaud S, Leppert D (2007) Matrix metalloproteinases in neuromuscular disease. *Muscle Nerve* 36: 1-13
 83. Zimowska M, Brzoska E, Swierczynska M, Streminska W, Moraczewski J (2008) Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration *in vivo*. *Int J Dev Biol* 52: 307-314
 84. Guerin C, Holland P (1995) Synthesis and Secretion of Matrix-Degrading Metalloproteases by Human Skeletal Muscle Satellite Cells. *Dev Dynam* 202: 91-99

Structure and function of matrix metalloproteinases

Krzysztof Olszyński¹, Małgorzata Zimowska^{2,✉}

¹M. Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Science, Laboratory of Renal and Body Fluid Physiology, 5 Pawińskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

²University of Warsaw, Faculty of Biology, Department of Cytology, 1 Miecznikowa St., 02-096 Warsaw, Poland

✉ e-mail: mzimowska@biol.uw.edu.pl

Key words: ECM, ECM remodeling, MMP

ABSTRACT:

The ECM remodeling is a finely orchestrated process that involves changes in expression of the ECM genes and the activity of proteinases to clear the previous ECM deposit. Among enzymes involved in ECM remodeling, zinc-dependent proteinases - matrix metalloproteinases (MMPs) are believed to be the ones of major importance. MMPs degrade the ECM components and regulate the bioavailability and/or activity of growth factors by cleavage of both matrix and non-matrix substrates or by mediating receptor turnover. This review introduces the members of the MMP family and discusses their domain structure and function, proenzyme activation and the mechanism of inhibition.

STRESZCZENIE

Istotną zdobyczą nowoczesnej biotechnologii jest możliwość wykorzystania roślinnych systemów ekspresyjnych do produkcji przeciwciał, antygenów szczepionkowych oraz innych białek terapeutycznych. Podstawowymi zaletami bioreaktorów roślinnych są niskie koszty produkcji i eliminacja ryzyka skażenia produktów czynnikami chorobotwórczymi, które stanowią potencjalne zagrożenie dla ludzi w przypadku użycia systemów tradycyjnych. Cytokiny są małymi cząsteczkami, które pośredniczą w przekazywaniu sygnałów między komórkami, indukują wzrost komórek, różnicowanie, chemotaksję, aktywację, wzmagają cytotoksyczność oraz uczestniczą w regulacji odporności. Wiele z nich znalazło zastosowanie w medycynie głównie w leczeniu infekcji wirusowych, hamowaniu rozwoju nowotworów oraz w terapii chorób układu immunologicznego. Produkcja cytokin tradycyjną metodą, na poziomie mogącym pokryć zapotrzebowanie, jest mało opłacalna. W kilku laboratoriach prowadzone są intensywne badania nad wykorzystaniem systemów roślinnych do uzyskania aktywnych biologicznie cytokin ssaczych.

WPROWADZENIE

Rozwój technologii rekombinowanego DNA i transgenezy roślin umożliwił zastosowanie roślin do produkcji licznych białek terapeutycznych. Pierwsze pomysły i wyniki doświadczeń osiągnięte przed dwudziestu laty, a mianowicie uzyskanie ekspresji genu kodującego ludzki hormon wzrostu w komórkach tytoniu (*Nicotiana tabacum*) i słonecznika (*Helianthus annuus*) [1] oraz albuminę w tytoniu (*N. tabacum*) i ziemniaku (*Solanum tuberosum*) [2] dowiodły, że rośliny jako systemy ekspresyjne zdolne są do produkcji aktywnych białek ssaków. Aktualna lista białek o znaczeniu biotechnologicznym lub farmakologicznym wyprodukowanych w roślinach jest bardzo obszerna i obejmuje przeciwciała, antygeny szczepionkowe, substytuty krwi, enzymy, cytokiny oraz inne ważne farmakologicznie substancje wykorzystywane do celów terapeutyczno-komercyjnych. Szczegółowe zestawienia takich białek dostępne są w licznych artykułach przeglądowych (i cytowaniach w nich zawartych) podsumowujących wyniki uzyskane w ciągu ostatniego dwudziestolecia przez szereg grup badawczych rozwijających tę fascynującą dziedzinę badań [3-10]. Produkcję biofarmaceutyków w roślinnych systemach ekspresyjnych często określa się obecnie terminem „rolnictwo molekularne” (ang. *molecular farming*), natomiast terminy PMP (ang. *plant-made pharmaceuticals*) lub wymiennie, PDP (ang. *plant-derived pharmaceutical*) stosuje się w literaturze anglojęzycznej na określenie rekombinowanych białek o znaczeniu farmaceutycznym uzyskanych w systemach roślinnych [8]. W ostatnich latach obserwuje się lawinowy wzrost publikacji opisujących produkcję różnych PMP w wielu gatunkach roślin. Zjawisko to z jednej strony uświadamia środowisku naukowemu i społeczeństwu, że systemy roślinne są niezwykle atrakcyjnymi bioreaktorami do produkcji rekombinowanych białek, z drugiej strony wprowadza konieczność określenia regulacji prawnych dotyczących warunków kultywacji genetycznie modyfikowanych roślin oraz biotechnologicznych zastosowań produktów z nich uzyskanych np. licencjonowania i autoryzacji leków zawierających PMP [11-13].

W związku z licznymi pracami przeglądowymi dotyczącymi tej problematyki, w których wszechstronnie i dogłębnie rozważano wszelkie aspekty rolnictwa molekularnego, w niniejszej pracy jedynie bardzo krótko podkreślamy wady i zalety systemów roślinnych oraz omawiamy możliwość zwiększenia wydajności produkcji rekombinowanych białek w roślinach. W kolejnych częściach pracy wyjaśniamy dlaczego cytokiny są atrakcyjnym kandydatem na PMP. Ostatnią, najobszerniejszą częścią pracy jest krytyczny przegląd wyników uzyskanych przez szereg grup badawczych stawiających sobie za cel wyprodukowanie cytokin ssaków w roślinnych systemach ekspresyjnych.

Anna Góra-Sochacka[✉]

Patrycja Redkiewicz

Bogusława Napiórkowska*

Agnieszka Sirko

Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

*aktualny adres: Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Laboratorium do Badań GMO, ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice

[✉]Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa; tel. (022) 592 34 08, e-mail: annag@ibb.waw.pl

Artykuł otrzymano 12 grudnia 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 27 stycznia 2009 r.

Słowa kluczowe: białka terapeutyczne, cytokiny, molekularne uprawy, roślinne systemy ekspresji

Wykaz skrótów: CaMV (ang. *Cauliflower mosaic virus*) – wirus mozaiki kalafiora; ELP (ang. *elastin-like polypeptide*) – elastyno-podobne (poli)peptydy; ER - siateczka śródplazmatyczna; GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów; G-CSF (ang. *granulocyte colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów; IL – interleukina; KDEL/HDEL – sygnał retencji w ER; PDP (ang. *plant-derived pharmaceutical*) – termin używany zamiennie z PMP; PMP (ang. *plant-made pharmaceutical*) – rekombinowane białko o znaczeniu farmaceutycznym uzyskane w roślinnym systemie ekspresyjnym; TNF (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworów; TSP (ang. *total soluble proteins*) – całkowita pula białek rozpuszczalnych; UTR (ang. *untranslated region*) – region nie ulegający translacji

Podziękowanie: Praca napisana w ramach realizacji projektu badawczego MNiSW nr N302 061 934

ROŚLINNE SYSTEMY EKSPRESYJNE W PORÓWNIANIU Z INNYMI SYSTEMAMI PRODUKCJI REKOMBINOWANYCH BIAŁEK

Do produkcji rekombinowanych białek tradycyjnie wykorzystuje się bakterie, drożdże, komórki owadów i ssaków. Zasadniczą wadą systemów bakteryjnych jest brak zdolności do wprowadzania większości potranslacyjnych modyfikacji koniecznych do aktywności szeregu białek zwierzęcych. Rekombinowane białka wyprodukowane w tym systemie wymagają zwykle kosztownego procesu oczyszczania ze względu na trudne do usunięcia endotoksyny bakteryjne. Ponadto, białka eukariotyczne często tworzą w bakteriach ciała inkluzyjne, co wymaga dodatkowych kosztów oraz nakładów pracy w celu uzyskania natywnej formy białka. Z kolei, hodowla komórek zwierzęcych jest kosztowna, ponieważ wymaga specjalistycznego sprzętu oraz drogich podłoży zawierających m.in. osocze. Bardziej ekonomiczne mogłoby być wykorzystanie zwierząt transgenicznych jako źródła rekombinowanych białek, jednak praktyka ta budzi zazwyczaj wątpliwości natury moralnej i dla wielu osób jest niezgodna z zasadami etyki. Systemy zwierzęce stwarzają ponadto ryzyko zanieczyszczenia produktu wirusami, patogenami i onkogenami niebezpiecznymi dla życia i zdrowia ludzi i zwierząt hodowlanych, którym zaaplikowano rekombinowane białko.

Roślinne systemy ekspresyjne wydają się być atrakcyjną alternatywą do klasycznych systemów ekspresji opartych na komórkach bakterii, drożdży czy zwierząt [14,15]. Po pierwsze, szlaki syntezy i modyfikacji białek w roślinach są zbliżone do ssaczy. Po drugie, produkty uzyskane w systemach roślinnych raczej nie zawierają zwierzęcych patogenów ani bakteryjnych toksyn. Po trzecie, uprawa roślin transgenicznych jest ekonomiczna – wymaga wody, światła i składników mineralnych, co daje możliwość produkcji dużej ilości biomasy według technologii upraw opracowanych dla rolnictwa. Zalety i wady użycia roślin jako bioreaktorów były wielokrotnie i wszechstronnie dyskutowane w licznych pracach przeglądowych, których jedynie niewielka część cytowana jest w niniejszej pracy [16-20].

STRATEGIE ZWIĘKSZANIA WYDAJNOŚCI PRODUKCJI REKOMBINOWANYCH BIAŁEK W SYSTEMACH ROŚLINNYCH

Roślinne systemy ekspresyjne można podzielić na trzy główne kategorie:

- zawiesiny transgenicznych komórek roślinnych oraz hodowle transgenicznych tkanek lub organów (najczęściej korzeni) roślinnych,
- rośliny ze stabilnie wbudowanym transgenem w genom jądrowy (rośliny transgeniczne) lub chloroplastowy (rośliny transplastomiczne),
- systemy oparte na wirusach roślinnych zapewniających przejściowo, tj. w okresie namnażania się zrekombinowanego wirusa, wysoką ekspresję transgenów w zainfekowanych roślinach.

Licznym zaletom roślinnych bioreaktorów towarzyszą także pewne negatywne aspekty i ograniczenia, spośród których najważniejszym jest niski poziom akumulacji rekombinowanych białek. Istnieje kilka możliwości zwiększenia udziału białek rekombinowanych w całkowitej puli białek produkowanych przez rośliny [21]. Spośród najczęściej stosowanych strategii wymienić należy:

- odpowiednią konstrukcją kasy ekspresyjnej – dobrze dobraną do gatunku rośliny zarówno pod względem aktywności promotora (optymalizacja transkrypcji), miejsca w pobliżu inicjacji translacji oraz właściwego doboru kodonów (optymalizacja translacji) czy też zapewnienie sekwencji odpowiedzialnych za stabilizację mRNA;
- zwiększenie liczby kopii transgenów w roślinie poprzez transformowanie chloroplastów lub użycie systemów opartych na wirusach roślinnych (ekspresja przejściowa). Niewątpliwą zaletą chloroplastów jest ich wysoka liczba (10000 cząsteczek chloroplastów na komórkę), zdolność do akumulacji białek na poziomie do 47%, brak zjawiska wyciszenia genów oraz brak niebezpieczeństwa niekontrolowanej „ucieczki” transgenów do środowiska za pomocą ziaren pyłku (chloroplasty dziedziczone są jedynie w linii matecznej). Do podstawowych wad należy brak pewnych modyfikacji potranslacyjnych. Wektory wirusowe zapewniają bardzo wysoki poziom ekspresji transgenów [22], natomiast podstawową wadą tego systemu jest konieczność powtarzania procesu infekowania roślin. W roślinach transplastomicznych uzyskano produkcję ludzkiego hormonu wzrostu na poziomie 7% TSP [23] oraz ludzkiej albuminy na poziomie 11% TSP [24];
- kierowanie białek do przedziałów komórkowych np. ER – zastosowanie sygnału retencji KDEL/HDEL zwiększa poziom akumulacji 2-10-krotnie. Środowisko ER jest ubogie w proteazy a obfite w białka opiekuńcze zapewniające stabilność. Poza tym glikozylacja wymagana do aktywności niektórych białek zachodzi m.in. właśnie w błonach ER [25,26];
- uzyskanie akumulacji rekombinowanych białek w tkankach przystosowanych do gromadzenia materiałów zapasowych, np. w nasionach [27];
- poprawę stabilizacji białek poprzez ich otrzymanie w formie białek fuzyjnych z peptydami stabilizującymi albo razem z innymi białkami, np. czynnikami transkrypcyjnymi, inhibitorami proteaz lub białkami opiekuńczymi. Warte wzmianki są również bardzo interesujące podejścia mające na celu modyfikację gospodarza roślinnego wpływającą na stabilizację oraz zwiększenie poziomu akumulacji rekombinowanych białek np. poprzez hamowanie aktywności proteaz roślinnych [28] lub obniżenie zawartości endogennych białek zapasowych [29].

STRATEGIE OCZYSZCZANIA BIAŁEK ORAZ WYBÓR ROŚLINY

Oczyszczanie jest jednym z kosztowniejszych etapów produkcji rekombinowanych białek. Jednym ze sposobów

obniżenia kosztów jest ekstrakcja białka przebiegająca jednocześnie z procesami technologicznymi, jakim poddawana jest roślina. Na przykład, fuzja z oleozyną umożliwia oczyszczenie rekombinowanego białka w czasie produkcji oleju z rzepaku (*Brassica napus*) [30]. Innym przykładem skutecznego poprawienia wydajności oczyszczania oraz akumulacji rekombinowanych białek w roślinach jest użycie fuzji z elastyno-podobnymi polipeptydami (ELP) zawierającymi powtórzenia pentameru VPGXG [31,32]. Białka zawierające ELP są rozpuszczalne w wodzie poniżej temperatury przejścia fazowego natomiast po podwyższeniu temperatury tworzą w sposób odwracalny agregaty (ang. *inverse transition cycling*).

Decydując się na transformację danej rośliny i jej użycie do „upraw molekularnych” zwraca się uwagę na łatwość transformacji, uzyskiwany plon rośliny z hektara, ilość białka z jednostki masy rośliny, trwałość produktu w czasie przechowywania rośliny oraz miejsce akumulacji białka [9]. Na przykład, jadalne części roślin mogą mieć praktyczne zastosowanie jako szczepionki podawane drogą pokarmową, co może w istotny sposób ograniczyć konieczność oczyszczania rekombinowanych białek. Z drugiej strony, użycie rośliny, która nie jest przeznaczona do jedzenia zmniejsza niebezpieczeństwo niekontrolowanego zanieczyszczenia pokarmu transgenicznym materiałem roślinnym. Najlepiej poznanym i najczęściej wykorzystywanym modelem stosowanym w rolnictwie molekularnym jest tytoń. Do głównych zalet stosowania tytoniu należy dobrze opracowana metoda jego transformacji i regeneracji, uzyskiwanie dużej biomasy (>100 ton/ha), duża liczba wytwarzanych nasion, co pozwala na szybkie zwiększanie skali produkcji. Tytoń zawiera dość duże ilości alkaloidów, jednak do otrzymywania rekombinowanych białek można użyć odmiany o niskiej zawartości tych związków. Drobne nasiona tytoniu nie mogą zapewnić dostatecznie wysokiej akumulacji rekombinowanych białek, natomiast liście są nietrwałe, co powoduje konieczność liofilizacji lub mrożenia tkanki w trakcie przechowywania. Możliwość akumulacji rekombinowanych białek w bardziej stabilnych tkankach, np. organach zapasowych, zapewniają inne często wykorzystywane do transformacji gatunki, na przykład: ziemniak (*S. tuberosum*), soja (*Glycine max*), lucerna (*Medicago sativa*), ryż (*Oryza sativa*) i pszenica (*Triticum vulgare*). Generalnie uważa się, że akumulacja w nasionach mogłaby wyeliminować konieczność stosowania niskich temperatur w czasie transportu oraz długoterminowego przechowywania PMP.

WADY ROŚLIN JAKO SYSTEMÓW DO PRODUKCJI REKOMBINOWANYCH BIAŁEK ORAZ POTENCJALNE RYZYKO UPRAW MOLEKULARNYCH

Wybór specyficznej rośliny oraz rodzaju systemu roślinnego wpływa na swoisty zestaw zalet i wad, które w każdym przypadku trzeba szczegółowo rozważyć. Na przykład, w roślinach transgenicznym istnieje możliwość wystąpienia niekorzystnego zjawiska wyciszania genów i zróżnicowanego (zależnego od miejsca insercji transgeny w genomie) poziomu ekspresji w niezależnie uzyskanych transformantach. Ponadto, istotną wadą jest pracochłonność oraz długotrwałość procesu uzyskiwania linii o ustabilizowanym poziomie ekspresji transgeny. Jedną z poważnych wad roślin

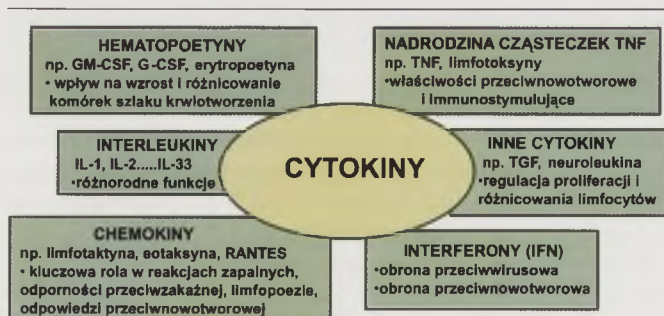
jako systemów ekspresyjnych jest długi okres wegetacyjny, który powoduje, że produkcja białek zostaje rozciągnięta w czasie. W trakcie wzrostu i rozwoju, rośliny podlegają wpływom czynników zewnętrznych, takich jak różnice temperatury i oświetlenia, co w istotny sposób ogranicza przewidywalność poziomu produkcji rekombinowanych białek. Ewentualne patogeny oraz stosowane środki ochrony roślin powodują, że wyizolowane białka mogą być zanieczyszczone pozostałościami toksyn grzybowych czy pestycydów, co niesie ryzyko wystąpienia reakcji alergicznych. Nadwrażliwość układu immunologicznego człowieka (lub ssaka) na PMP może również występować w wyniku różnic, jakie pojawiają się w procesie glikozylacji białka, ponieważ odmienny skład reszty cukrowych może zostać potraktowany przez organizm jako antygen. Możliwe jest, jednak, uzyskanie roślin ze zmodyfikowanym szlakiem glikozylacji białek, co znacznie redukuje wytwarzanie glikoprotein zawierających typowe dla roślin reszty cukrowe [33].

Dokładna analiza ryzyka (ang. *risk assessment*) związanego z rolnictwem molekularnym i masowym wykorzystaniem PMP umożliwia rozważenie możliwych zagrożeń na poszczególnych etapach, począwszy od badań w laboratorium, poprzez uprawy szklarniowe, polowe, badania kliniczne i wprowadzenie produktu na rynek [34,35]. Możliwość niekontrolowanego uwolnienia transgeny, jego produktu oraz transgenicznych roślin lub wirusowych wektorów do środowiska naturalnego i wynikających z tego ewentualnych konsekwencji postrzeganych jako zagrożenie różnorodności gatunków istnieje zarówno na etapie badań laboratoryjnych, upraw szklarniowych i polowych. Z jednej strony budzi to oczywiście pewne kontrowersje społeczne wynikające z braku możliwości dokładnego określenia szkodliwych efektów. Z drugiej jednak strony ryzyko takie jest stosunkowo niewielkie, ponieważ prace prowadzone na tych etapach powinny być kontrolowane przez szczegółowe wytyczne i wykonywane dokładnie według protokołu eliminującego możliwość niekontrolowanego uwolnienia materiału do środowiska. Ponadto, na każdym etapie produkcji roślin istnieje ryzyko wystąpienia odpowiedzi immunologicznej (tolerancji lub alergii) u personelu. Ryzyko to oczywiście ograniczone jest do niewielkiej grupy osób mających kontakt z materiałem roślinnym. Na etapie badań klinicznych najważniejszym ryzykiem wydaje się wspomniana wyżej niestabilność poziomu akumulacji rekombinowanych białek, co może doprowadzić do różnic w poszczególnych dawkach.

Brak odpowiednich regulacji prawnych w istotny sposób może hamować rozwój tej dziedziny badań oraz ograniczać wdrażanie leków zawierających PMP i ich produkcję na skalę przemysłową. Należy również wziąć pod uwagę możliwość ograniczenia powierzchni dostępnej pod uprawę roślin przy rosnącym zapotrzebowaniu i wzajemnej konkurencji o te same zasoby różnych gałęzi przemysłu. W konsekwencji może to doprowadzić do wzrostu cen PMP.

CO TO SĄ CYTOKINY?

Cytokiny są to małe cząsteczki (gliko)proteinowe regulujące bardzo różnorodne procesy takie jak proliferacja, różnicowanie czy ruchliwość komórek biorących udział w



Rycina 1. Podział cytokin ze względu na pełnione funkcje.

odpowiedzi odpornościowej oraz komórek hemopoetycznych. Ze względu na ich wybitną rolę w procesach immunologicznych określa się je często mianem „hormonów” układu odpornościowego. Cytokiny mogą działać zarówno na komórki, które je wydzielają, jak i na komórki znajdujące się w najbliższym sąsiedztwie lub w innych narządach. Inne ważne cechy cytokin to plejotropia, redundacja, możliwość zarówno synergistycznego jak i antagonistycznego działania oraz zdolność do wywoływania kaskad sprzężeń dodatnich i ujemnych [36]. Dotąd zostało opisanych ponad sto kilkadziesiąt cytokin, które zależnie od pełnionej funkcji można podzielić na następujące grupy: interleukiny, hematopoetyny (czynniki krwiotwórcze), interferony, chemokiny, nadrodzina cząsteczek TNF (czynnika martwicy nowotworów; ang. *tumor necrosis factor*) oraz inne (Ryc. 1). Biologiczna rola cytokin, ich właściwości zarówno immunosupresyjne jak i immunostymulujące, stwarzają nadzieję na ich kliniczne zastosowanie w terapii licznych schorzeń. Niektóre z nich są już zarejestrowane jako leki np. IFN- α (preparat Intron A) w leczeniu nowotworów i przewlekłych zapaleń wątroby, IFN- γ (Imukin) w przewlekłej chorobie ziarniniakowej, IL-2 (Proleukine) w leczeniu przerzutów raka nerki oraz czerniaka. Ponadto, wiele innych znajduje się w fazie badań klinicznych (Tab. 1). Warto wspomnieć,

że potencjalnym czynnikiem terapeutycznym może być nie tylko cytokina, ale również białko receptora dla tej cytokiny, antagonistą receptora lub odpowiednie specyficzne przeciwciała [37]. Znaczna liczba cytokin została również przetestowana jako potencjalne adiuwanty odpowiedzi immunologicznej, szczególnie podczas immunizacji stymulującej błony śluzowe np. doustnej, donosowej, dopochwowej itp. [38,39]. Czynnikiem stymulującym wzrost kolonii granulocytów-makrofagów (GM-CSF, ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) wydaje się być jednym z lepszych kandydatów na PMP. Cytokina ta jest stosunkowo stabilna, składa się z jednego rodzaju polipeptydu (kodowana jest przez jeden gen), a zastosowana jako terapeutyk jest dobrze tolerowana przez pacjentów. GM-CSF jest ważną cytokiną, która jest zatwierdzona jako lek Sargramostim[®] w terapii neutropenii, anemii czy redukcji odrzucania przeszczepów szpiku u ludzi. Poza tym, białko to było wielokrotnie testowane na zwierzętach jako adiuwant szczepionkowy. Ostatnie badania kliniczne wskazują na efektywność działania GM-CSF jako adiuwanta autologicznej szczepionki przeciwko czerniakowi, wykazując pozytywne efekty podanych sekwencyjnie GM-CSF i interleukiny 2 (IL-2) łącznie ze szczepionką autologiczną przeciwko czerniakowi [40].

PRODUKCJA CYTOKIN W ROŚLINACH

Poniżej omówione zostaną najważniejsze strategie produkcji wybranych cytokin w roślinach, które w zasadniczy sposób nie różnią się od strategii stosowanych do produkcji w systemach roślinnych innych białek rekombinowanych. W systemach roślinnych produkowane były cytokiny należące do różnych grup funkcjonalnych (Tabela 2). Wielokrotnie, szczególnie w początkowych badaniach, podejmowane były próby produkcji cytokin w zawiesinach kultur komórek transgenicznych roślin. Metoda ta umożliwia wydzielanie cytokin poza środowisko komórki czyli do podłoża hodowlanego. Z jednej strony pozwala to na ominię-

Tabela 1. Obecnie prowadzone badania nad terapeutycznym zastosowaniem cytokin, receptorów cytokin oraz skierowanych przeciwko nim przeciwciał (według [37], zmodyfikowane).

Cytokina	Nazwa generyku	Faza badań klinicznych	Zastosowanie terapeutyczne
IL-1R- α (antagonista receptora)	Anakinra	II	zapalenie kości i stawów
IL-2 (rekombinowane białko)	Aldesleukine	III	HIV
IL-4 (białko sprzężone z egzotoksyną z <i>Pseudomonas</i>)	–	II	złośliwy nowotwór mózgu (<i>Glioma</i>)
IL-5 (przeciwciała monoklonalne anti-IL5)	Mepolizumab	II	astma alergiczna
IL-6 (humanizowane przeciwciała anti-IL6 receptor)	Tocilizumab	III	reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów
IL-8 (ludzkie przeciwciała anti-IL8)	ABX-IL-8	II	RZS, łuszczyca, przewlekła obturacyjna choroba płuc
IL-9 (przeciwciała anti-IL9)	IL-9mAb	I	astma
IL-10 (rekombinowane białko)	Tenovil	II	choroba Crohna
IL-11 (rekombinowane białko)	Neumega	III II	choroba Crohna, RZS, łuszczyca,
IL-12 (humanizowane przeciwciała anti-IL12)	ABT-874	II	choroba Crohna, łuszczyca, stwardnienie rozsiane
IL-15 (humanizowane przeciwciała anti-IL15)	AMG-714	II	RZS
IL-18 (rekombinowane białko wiążące IL-18)	–	II	RZS
IL-21 (rekombinowane białko)	494C10	II	czerniak
IFN- γ (humanizowane przeciwciała anti-IFN- γ)	Fontolizumab	II	choroba Crohna, RZS
TNF- α (fragment Fab humanizowanego przeciwciała anti-TNF- α)	Certolizumab	III	choroba Crohna, RZS

Tabela 2. Produkcja wybranych cytokin w roślinnych systemach ekspresji.

Cytokina [odnośnik lit.]	Materiał roślinny	Elementy kasety ekspresyjnej	Metoda	Poziom produkcji
Erytropoetyna [41]	Zawiesina komórkowa <i>Nicotiana tabacum</i>	promotor 35S CaMV, terminator 35S CaMV	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	0.0026% TSP; 25 µg/l
G-CSF [42]	zawiesina komórkowa <i>N. tabacum</i>	promotor 35S CaMV z podwójnym wzmacniaczem transkrypcji, Ω-wzmacniacz translacji; terminator genu nos	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	105 µg/l
GM-CSF [43]	zawiesina komórkowa <i>N. tabacum</i>	promotor 35S CaMV, sekwencja wzmacniająca translację z wirusa TEV, etykieta His, terminator T7	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	150 µg/l (wewnątrz kom.); 250 µg/l (wydzielane)
GM-CSF [44]	zawiesina komórkowa <i>N. tabacum</i>	promotor 35S CaMV z podwójnym wzmacniaczem transkrypcji, terminator nos	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	180–780 µg/l
GM-CSF [45]	zawiesina komórkowa <i>Oryza sativa</i>	promotor amylazy ryżu, peptyd sygnałowy amylazy ryżu	mikrowstrzeliwanie	129 mg/l
GM-CSF [46]	zawiesina komórkowa <i>O. sativa</i>	promotor amylazy ryżu, peptyd sygnałowy amylazy ryżu, wyciszenie genu kodującego α-amylazę za pomocą RNAi do poziomu 8.2%	mikrowstrzeliwanie	do 280 mg/l
GM-CSF [47]	zawiesina komórkowa <i>O. sativa</i>	promotor amylazy ryżu, peptyd sygnałowy amylazy ryżu, wyciszenie genu kodującego cysteinową proteinazę za pomocą RNAi	mikrowstrzeliwanie	do 290 mg/l
GM-CSF [48]	zawiesina komórkowa <i>O. sativa</i>	promotor amylazy ryżu, peptyd sygnałowy amylazy ryżu; współekspresja genu kodującego syntetyczny inhibitor proteaz (sPI-II)	mikrowstrzeliwanie	do 250 mg/l
GM-CSF [49]	liście <i>Saccharum</i>	promotor MUBi-1 z kukurydzy i SCubi-9 z trzciny cukrowej	mikrowstrzeliwanie	0,02% TSP
GM-CSF [50]	nasiona <i>N. tabacum</i>	promotor gluteiny Gt1, Gt3, peptyd sygnałowy gluteiny, terminator nos	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	0,005–0,03% TSP
GM-CSF [51]	nasiona <i>O. sativa</i>	promotor gluteiny Gt1, peptyd sygnałowy gluteiny, terminator nos	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	1,3% TSP
GM-CSF [52]	nasiona <i>O. sativa</i>	promotor gluteiny Gt13a (specyficzny dla endospermy nasion), peptyd sygnałowy gluteiny, terminator nos, optymalizacja kodonów	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	0,5–14 µg/ nasiono
GM-CSF [53]	liście <i>Nicotiana benthamiana</i>	wektor pochodna PVX: promotor 35S CaMV, etykieta His	wektor wirusowy PVX	0,2–2% TSP
IL-2; IL-4 [54]	zawiesina komórkowa <i>N. tabacum</i>	promotor 35S CaMV, terminator T7	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	0,09 mg/l (IL-2) 0,45 mg/l (IL-4)
IL-10; IL-4 [32]	liście <i>N. tabacum</i>	promotor 35S CaMV z podwójnym wzmacniaczem transkrypcji, t-CUP-wzmacniacz translacji, ELP, KDEL, terminator nos	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	0,27% TSP (IL-10); 0,086% TSP (IL-4)
IL-18 [55]	liście <i>N. tabacum</i>	promotor 35S CaMV z podwójnym wzmacniaczem transkrypcji, Ω-wzmacniacz translacji, terminator nos	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	0,004–0,051% TSP; 351 ng/g
IL-2 [56]	bulwy <i>S. tuberosum</i>	promotor patatyny; terminator nos	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	115 U/mg TSP
IL-10 [57]	liście <i>N. tabacum</i>	1. promotor 35S CaMV, etykieta His, peptyd kierujący do chloroplastów oraz kaset bez etykiety 2. promotor 35S CaMV, etykieta His; peptyd kierujący do mitochondriów	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	1. 7 ng/mg TSP (bez His); 43 ng/mg TSP (z His) 2. brak akumulacji
IL-4 [58]	liście <i>N. tabacum</i> , bulwy <i>S. tuberosum</i>	promotor 35S CaMV, sekwencja KDEL kierująca białka na szlak sekrecyjny	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	0,1% TSP w tytoniu; 0,08% TSP w ziemniaku
TNF-α [59]	<i>Solanum tuberosum</i>	promotor 35S CaMV, Ω-wzmacniacz translacji, sekwencja SEKDEL kierująca białka na szlak sekrecyjny	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	15 µg/g tkanki
IL-12 [60]	liście <i>N. tabacum</i>	promotor 35S CaMV, terminator 35S CaMV	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	40ng/g
IL-12 [61]	liście i owoce <i>Lycopersicon esculentum</i>	promotor 35S CaMV z podwójnym wzmacniaczem, terminator 35S CaMV	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	7,3µg/g liści 4,3µg/g owoców
IL-12 [62]	zawiesina komórkowa <i>N. tabacum</i>	promotor 35S CaMV z podwójnym wzmacniaczem transkrypcji, Ω-wzmacniacz translacji	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	175µg/l
IL-13 [63]	liście <i>N. tabacum</i>	promotor 35S CaMV z podwójnym wzmacniaczem transkrypcji; wzmacniacz translacji z wirusa AMV, KDEL, terminator nos	transformacja <i>A. tumefaciens</i>	0,15% TSP
Kardiotrofina-1 [64]	liście <i>N. tabacum</i> , transformacja chloroplastów	1. promotor rrn (promoter 16S RNA) i wzmacniacz translacji (5'UTR genu 10 faga T7) 2. promotor psbA i wzmacniacz translacji (5'UTR psbA)	mikrowstrzeliwanie	1. 0,14 mg/g 2. do 1,14 mg/g
IFN-α2b [65]	liście <i>N. tabacum</i> , transformacja chloroplastów	kaset ekspresyjna: 5'UTR/HIS/THR/IFNα2b sklonowana w wektorze chloroplastowym pLD-CtV	mikrowstrzeliwanie	3mg/g, 20% TSP

Kolorami oznaczono różne systemy ekspresji (pomarańczowy - zawiesina komórkowa; czerwony - system oparty na wykorzystaniu wektora wirusowego; zielony - rośliny stabilnie transformowane (transgeniczne lub transplastomiczne); terminator *nos* - terminator nopalinyowy, MUBi-1 i Scubi-9 - promotory poliubikwityny).

cie etapu izolacji rekombinowanego białka z tkanki, a tym samym ułatwia proces oczyszczania, ponieważ podłoże do prowadzenia kultur roślinnych składa się tylko z wody, soli mineralnych, cukru i witamin. Z drugiej strony, wydzielenie może zwiększyć degradację rekombinowanego białka jeżeli do podłoża będą też wydzielane znaczne ilości proteaz. Stosunkowo wysoki poziom rekombinowanego białka (GM-CSF) uzyskano stosując system ekspresji przejściowej z wektorem wirusowym PVX (wirus mozaiki X ziemniaka, ang. *Potato virus X*). Najwięcej prac dotyczy zastosowania systemu ekspresji stabilnej, przy czym najczęściej do stabilnej transformacji wybierany był tytoń, ale pozytywne wyniki uzyskano także transformując ryż, trzcinę cukrową lub ziemniaki.

CY TOKINY Z GRUPY HEMATOPOETYNY

Jedną z pierwszych prób wykorzystania kultur komórek roślinnych do produkcji cytokin dotyczyła erytropoetyny [41]. Erytropoetyna jest stosowana przy leczeniu niedokrwistości, która może pojawić się w przebiegu np. niewydolności nerek czy po chemioterapii nowotworów. Do komórek tytoniu (*N. tabacum*) 'Bright Yellow' 2 wprowadzono plazmid zawierający cDNA kodujący erytropoetynę pod kontrolą promotora 35S wirusa mozaiki kalafiora (CaMV). Prowadzono równocześnie kulturę zawiesinową komórek tytoniu i protoplastów. Obecność peptydu sygnałowego na N-końcu powinna zapewnić w efekcie końcowym (po przejściu przez ER i aparat Golgiego) wydzielenie białka poza środowisko komórki na drodze egzocytozy. Było to wyraźnie widoczne w przypadku protoplastów. Natomiast w zawieszynie komórek tytoniu zauważono, że cytokina co prawda przenikała przez błonę komórkową, ale pozostawała wewnątrz komórek związana z ich ścianą. Najprawdopodobniej masa erytropoetyny wynosząca ok. 30 kDa nie pozwalała na jej swobodne przechodzenie przez ścianę komórkową. U zwierząt erytropoetyna występuje w postaci glikoproteiny. W komórkach roślinnych ulegała również glikozylacji, ale wzór i długość N-oligosacharydu różniły się od tych występujących w komórkach zwierzęcych. Wiadomo, że glikozylacja nie jest konieczna dla aktywności erytropoetyny *in vitro*, ale *in vivo* wpływa na jej długość okresu półtrwania w krwiobiegu. W omawianej pracy uzyskano niską wydajność, która wynosiła ok. 0,0026% rekombinowanej cytokiny w stosunku do całej puli rozpuszczalnych białek. Wykazywała ona aktywność *in vitro*, ale niestety nie była aktywna *in vivo*. Prawdopodobnie było to spowodowane różnicą w składzie N-oligosacharydu (brak kwasu sialowego), co w konsekwencji mogło prowadzić do jej usunięcia z krwiobiegu przed dotarciem do komórek krwiotwórczych [41].

Badania dotyczące produkcji GM-CSF człowieka (hGM-CSF) w systemach roślinnych prowadzone są dość intensywnie przez kilka niezależnych grup. Jedną z pierwszych strategii wykorzystanych do produkcji hGM-CSF w roślinach było użycie kultury zawiesinowej komórek tytoniu i ryżu. W przypadku tytoniu przeprowadzone zostały dwa niezależne doświadczenia. James i współpracownicy [43] opublikowali w 2000 roku wyniki ekspresji hGM-CSF w hodowli komórek transgenicznego tytoniu. cDNA kodujące hGM-CSF umieszczono pod kontrolą promotora 35S wirusa CaMV, dodatkowo zastosowano sekwencję poprawiającą

wydajność translacji, pochodzącą z wirusa tytoniu TEV, a na końcu 3' umieszczono etykietę sześciu histydyn. Zastosowanie sekwencji z wirusa TEV zwiększyło ponad 2-krotnie poziom produkcji białka. Białko to zawierało występujący naturalnie w hGM-CSF peptyd sygnałowy i było wydzielane do pożywki. Zwiększenie stężenia soli mineralnych w pożywce, a także dodanie białka BSA zwiększyło poziom hGM-CSF izolowanego z pożywki aż o 50%. Prawdopodobnie oba te czynniki wpływają stabilizująco na cząsteczki GM-CSF, które naturalnie we krwi są otoczone przez inne białka, głównie albuminy. W powyższym doświadczeniu z jednego litra kultury zawiesinowej uzyskano około 150 µg hGM-CSF wewnątrz komórek roślinnych i około 250 µg hGM-CSF wydzielanego do podłoża. Porównując wyniki produkcji przeciwciał (300 µg), IL-4 (180 µg) z produkcją GM-CSF (250 µg) przy zastosowaniu tej samej linii komórkowej *N. tabacum* 'Bright Yellow' 1, tego samego promotora (35S CaMV), takiej samej strategii klonowania i warunków wzrostu komórek, stwierdzono, że czynnikiem limitującym ilość rekombinowanego białka nie są warunki prowadzenia kultur ani charakter produkowanego białka. Zaproponowano, że działanie czynnika limitującego jest prawdopodobnie na etapie transkrypcji, translacji, potranskrypcyjnej lub potranslacyjnej modyfikacji albo procesu sekrecji. Znalezienie tego czynnika (lub tych czynników) może pozwolić na optymalizację produkcji białek terapeutycznych w kulturach zawiesin komórkowych [43]. Lee i współpracownicy w 2002 roku [44] przyjęli, że czynnikiem limitującym poziom wydzielonych do pożywki białek terapeutycznych jest ich proteoliza przez roślinne proteazy wydzielane na zewnątrz komórek. Zaobserwowali oni, że rekombinowane białko hGM-CSF, którego maksymalne stężenie po 4 dniach wynosiło 180 µg/l pożywki, nie było stabilne. Począwszy od 5-tego dnia następowała jego szybka degradacja, skorelowana ze wzrostem aktywności proteaz. W celu zwiększenia stabilności hGM-CSF zastosowano PVP, PEG lub żelatynę jako związki potencjalnie stabilizujące. Okazało się, że tylko żelatyna w stężeniu 5% (w/v) wykazuje widoczne właściwości stabilizujące białko, bowiem stężenie hGM-CSF wzrosło ponad 4-krotnie czyli do poziomu około 780 µg/l. W ciągu 4 pierwszych dni nie zauważono wpływu żelatyny na wzrost hodowli, natomiast później zaobserwowano jej negatywny wpływ na rozwój i wzrost komórek, czego skutkiem był spadek produkcji hGM-CSF. Prawdopodobnie żelatyna zwiększa wydzielanie i aktywność proteaz, szczególnie po 4 dniach prowadzenia kultury zawiesinowej. Zdecydowanie wyższą produkcję hGM-CSF uzyskano w zawieszynie komórkowej ryżu, w przypadku gdy cDNA dla hGM-CSF umieszczono pod kontrolą specyficznego promotora amylazy ryżu – Ramy3D [45]. Brak cukru w pożywce prowadzi do aktywacji promotora Ramy3D, co zwiększa kilkadziesiąt razy poziom transkrypty transgenu. Uzyskano 129 mg biologicznie aktywnego hGM-CSF z jednego litra, co stanowiło do 25% wszystkich wydzielanych do pożywki białek. Należy zaznaczyć, że w tym przypadku uzyskany wysoki poziom akumulacji cytokiny był także wynikiem ograniczenia czasu utrzymania kultury zawiesinowej do fazy, w której do podłoża wydzielane były małe ilości proteaz. System ten był następnie optymalizowany z zastosowaniem trzech strategii mających na celu zmianę właściwości komórek gospodarza: (1) wyciszenie genu kodującego α -amylazę, któ-

ra jest białkiem dominującym wśród białek wydzielanych przez komórki ryżu [46], (2) wyciszenie genu kodującego proteinazę cysteinową (CysP) wydzielaną przez komórki do pożywki [47] oraz (3) współekspresję inhibitora proteaz [48]. W każdym przypadku uzyskano ok. 2-krotne zwiększenie wydajności produkcji hGM-CSF w porównaniu z systemem wyjściowym.

Produkcja białek terapeutycznych w kulturach zawieszin komórek roślinnych jest czasochłonna oraz ograniczona przez konieczność dużych nakładów finansowych na infrastrukturę (m.in. biofermentatory) i wykwalifikowany personel. Alternatywą może być produkcja PMP w całych roślinach lub tylko w wybranych organach, np. liściach, nasionach lub bulwach. W liściach trzciny cukrowej uzyskano produkcję hGM-CSF na poziomie ok. 0,02% TSP [49]. Próby uzyskania nasion zawierających hGM-CSF były nieco bardziej obiecujące. Co prawda, nasiona transgenicznego tytoniu zawierały raczej mało rekombinowanego białka (od 0,0055 do 0,03% TSP) [50], ale w uzyskanych później przez tę samą grupę nasionach transgenicznego ryżu hGM-CSF stanowił 1,3% TSP [51]. Najbardziej wydajną akumulację hGM-CSF (do 2% TSP w liściach tytoniu) zapewniło jednak użycie jako wektora wirusa PVX ze zmodyfikowanym białkiem płaszczka [53]. Jak już wspomniano powyżej, wadą roślinnych systemów ekspresyjnych wykorzystujących wektory wirusowe jest brak integracji wprowadzanych genów z genomem rośliny. W związku z tym gen nie jest dziedziczony i produkcja rekombinowanego białka dotyczy tylko pokolenia infekowanego wektorem wirusowym. W wielu przypadkach biologiczna aktywność rekombinowanego hGM-CSF potwierdzana była *in vitro*. Ponadto w przypadku wydajnej produkcji hGM-CSF w nasionach ryżu stwierdzono, że doustne podanie myszom takich ziaren stymuluje proliferację leukocytów. Doświadczenie to potwierdziło zatem efektywność rekombinowanego hGM-CSF *in vivo* [52].

INTERLEUKINY

W 1998 Magnuson i współpracownicy [54] opublikowali wyniki dotyczące produkcji IL-2 i IL-4 w kulturze zawiesziny komórkowej transgenicznego tytoniu (*N. tabacum*). Zakładano, że obecność N-terminalnych peptydów sygnałowych zapewni wydajne wydzielanie rekombinowanych białek na zewnątrz komórek. Jednak tylko 0,1 µg/ml z 0,9 µg/ml wyprodukowanej IL-2 i 0,18 µg/ml z 0,46 µg/ml wyprodukowanej IL-4 ulegało wydzieleniu do podłoża. Reszta zatrzymywana była w komórkach. Ponadto okazało się, że aktywność biologiczną wykazywały tylko cytokiny wydzielane do podłoża.

Szukanie odpowiedniej strategii do wydajnej produkcji cytokin widać także przy próbach otrzymywania IL-10 w roślinach transgenicznym. W badaniach klinicznych próbuje się ją stosować w leczeniu łuszczycy oraz w hamowaniu odrzucania przeszczepów allogenicznym u ludzi. Jak wiadomo jednym ze sposobów ochrony białka przed proteolizą jest kierowanie go do określonych przedziałów komórkowych. IL-10 kierowano do chloroplastów (stosując peptyd tranzytowy z małej podjednostki białka RbcS) i do mitochondriów (stosując peptyd tranzytowy z dysmutazy

nadtlenkowej). Strategia ta pozwoliła na uzyskanie w przypadku białek kierowanych do chloroplastów ok. 43 ng IL-10 na mg TSP (dla IL-10 z dołączoną etykietą His) i ok. 7 ng IL-10 na mg TSP (dla IL-10 bez etykiety His). Wynik ten pozwala stwierdzić, że w tym doświadczeniu etykieta His stabilizowała IL-10 kierowane do chloroplastów. Nie zaobserwowano natomiast akumulacji tej cytokiny w mitochondriach [57].

Bardziej owocne wyniki uzyskano dla IL-4. W liściach transgenicznego tytoniu, przy kierowaniu rekombinowanego białka do ER (stabilniejsze środowisko - mniejsza ilość proteaz), otrzymano 0,1% IL-4 w stosunku do TSP. Poziom akumulacji w bulwach ziemniaka był niższy, maksymalnie białko IL-4 stanowiło 0,08% TSP [58]. Wydajniejszą strategię wybrano dla ekspresji IL-10 oraz IL-4 w późniejszych badaniach. cDNA cytokin umieszczono pod kontrolą wzmocnionego promotora 35S wirusa CaMV, dodatkowo zastosowano wzmacniacz translacji z rejonu promotora tCUP, na końcu C białka umieszczono poliptyd ELP zwiększający stabilność białka oraz sekwencję KDEL kierującą zwrótnie białko do ER. Zaobserwowano, że zastosowanie poliptydu ELP znacznie poprawiło akumulację rekombinowanych cytokin. Ostatecznie uzyskana IL-10 stanowiła 0,27% TSP natomiast IL-4 ponad 0,08% [32].

Badania dotyczące IL-10 sięgają jeszcze dalej. Ostatnio opublikowano wyniki dotyczące badań nad terapeutycznym efektem IL-10 otrzymanej w tytoniu o niskiej zawartości alkaloidów [66]. Transgeniczny materiał roślinny zawierający rekombinowaną cytokinę podawany był drogą pokarmową myszom z objawami nieswoistego zapalenia jelit. W przebiegu tej choroby istotną rolę odgrywa cytokina prozapalna, TNF- α . Przy zastosowaniu bezpiecznej dawki wynoszącej 2,5-9 µg IL-10 (w materiale roślinnym) na jeden dzień, zauważono znaczny spadek poziomu mRNA dla TNF- α oraz wzrost mRNA dla IL-2 i IL-1 β , które to interleukiny, wraz z IL-10, pobudzają układ immunologiczny do zwalczania stanu zapalnego. Tym samym potwierdzono terapeutyczne właściwości produkowanej w roślinach IL-10.

Ekspresja transgenów w bulwach ziemniaka umożliwia utrzymanie większej stabilności cytokin podczas ich przechowywania. Wykorzystali to w 2002 roku Park i Cheong [56] klonując cDNA dla IL-2 pod kontrolą specyficznego promotora patatyny, co zapewnia produkcję białka głównie w bulwach transgenicznego ziemniaka. W dwutygodniowych bulwach uzyskano ok. 115 jednostek/g materiału, tj. około 2-krotnie więcej niż w przypadku zastosowania promotora 35S wirusa CaMV. Produkcja IL-2 w bulwach ziemniaka wydaje się zatem dobrą strategią.

Śród innych interleukin wyprodukowanych w roślinach należy wymienić interleukinę 12 (IL-12) [60-62,67], interleukinę 13 (IL-13) [63] oraz interleukinę 18 (IL-18) [55]. W ostatnim przypadku użyto „wzmocnionego” promotora 35S wirusa CaMV oraz dodatkowo zastosowano sekwencję 5'UTR z wirusa TMV (TMV Ω) jako czynnik wzmacniający translację w roślinach. Pozwoliło to na uzyskanie biologicznie aktywnej cytokiny w ilości 351 ng/g tkanki co stanowiło ok. 0,05% całej puli rozpuszczalnych białek.

Niedawno ukazała się praca na temat uzyskania wydajnej produkcji w transplastomicznych roślinach tytoniu (5% TSP) cytokiny z grupy IL-6, kardiotropiny-1 (ang. *cardiotrophin-1*). Rekombinowana cytokina wykazywała aktywność biologiczną, która w dużym stopniu hamowana była przez światło, którego nadmiar prawdopodobnie uszkadza prawidłową konformację białka [64].

CZYNNIK MARTWICY NOWOTWORÓW (TNF) ORAZ INTERFERON

W systemach roślinnych produkowano również inne cytokiny. Do produkcji TNF- α , czynnika działającego cytotoksycznie na komórki nowotworowe, wykorzystano ziemniaka (*S. tuberosum*) odmiany 'Waseschiro' [59]. Transformowano ziemniaka dwoma konstruktami: jeden z nich składał się z cDNA dla TNF- α pod kontrolą promotora 35S wirusa CaMV i wzmacniacza translacji (TMV Ω), a drugi dodatkowo zawierał na 5'-końcu sekwencję nukleotydową z genu dla białka leguminy i na końcu 3' sekwencję SEKDEL, co miało zwiększyć stabilność TNF- α w komórkach roślinnych. Zastosowanie powyższej strategii nie przyniosło jednak pożądanego efektu – nie stwierdzono spodziewanego wzrostu akumulacji rekombinowanego białka przy zastosowaniu sekwencji leguminy i SEKDEL. Ogólnie, z jednego grama rośliny ziemniaka uzyskano około 15 μ g aktywnego biologicznie TNF- α . Jednakże, porównując osiągnięty poziom akumulacji ze stosowanymi w medycynie dawkami innych cytokin, w tym również TNF- α , uznano, że jest on wystarczająco wysoki do przeprowadzenia badań mających na celu wykorzystanie terapeutyczne.

Produkcję interferonu (IFN- β) uzyskano w transgenicznym tytoniu już na początku lat 90-tych [68], jednak dopiero użycie roślin transplastomicznych zapewniło akumulację interferonu (IFN- α 2b) na poziomie 20% TSP [65]. Warto zaznaczyć, że tak wysoką akumulację uzyskano w roślinach hodowanych w warunkach polowych oraz, że aktywność biologiczna rekombinowanego białka potwierdzona była zarówno *in vitro* jak *in vivo*. Interesującą próbę produkcji interferonu podjęto również w rzepie (*Brassica rapa*) odmiany 'Just Right' z użyciem wektora wirusowego uzyskując biologicznie aktywny IFN- α D [69]. Produkcję interferonu uzyskano również w transgenicznym ziemniaku [70,71] oraz wykazano, że ekstrakt roślinny zawierający rekombinowane białko chronił myszy przed infekcją Gram (+) bakterią *Listeria monocytogenes* [72].

ZAKOŃCZENIE

W niniejszej pracy skoncentrowano się na wykorzystaniu roślin do produkcji cytokin. W rzeczywistości stanowią one tylko niewielki procent w grupie białek, które mogą być stosowane w medycynie bądź weterynarii. Roślinne systemy ekspresji wydają się być godną uwagi alternatywą do stosowanych powszechnie tradycyjnych systemów bakteryjnych bądź drożdżowych. Przemawiają za tym głównie względy ekonomiczne, uprawa roślin nie wymaga dużych nakładów finansowych umożliwiając jednocześnie produkcję na dużą skalę. Istotną zaletą jest również fakt, że PMP wykazują wysoką aktywność biologiczną. Kilkanaście firm na świecie, głównie w USA i Kanadzie, opracowuje metody pro-

dukacji rekombinowanych białek (w tym cytokin) w różnych systemach roślinnych: w komórkach utrzymywanych w zamkniętych laboratoryjnych warunkach, w systemach ekspresyjnych opartych na wirusowych wektorach roślinnych oraz w roślinach hodowanych w szklarni lub w warunkach polowych (ang. *open-field-cultivated plants*). Należą do nich Large Scale Biology (<http://www.lsb.com>), Ventria Bioscience (<http://www.ventria.com>), Planet Biotechnology (<http://www.planetbiotechnology.com>), Dow Agroscience (<http://www.dowagro.com>) i Agracetus (<http://www.agracetus.com>) w Stanach Zjednoczonych, Medicago (<http://www.medicago.com>), Plantigen (<http://www.lhsc.on.ca/plantigen>) oraz SemBioSys (<http://www.sembiosys.ca>) w Kanadzie, Icon Genetics (<http://www.icongenetics.com>), Novoplant (<http://novoplant.de>), Sungene (<http://www.sungene.de>) i MALTagen (<http://www.maltagen.de>) w Niemczech, Meristem Therapeutics (<http://www.meristem-therapeutics.com>) we Francji oraz ORF Genetics (<http://www.orfgenetics.com>) w Islandii [13,73]. W styczniu 2006 roku zarejestrowano w USA pierwszy PMP jako szczepionkę weterynaryjną. Jest to przeznaczona dla kurcząt szczepionka przeciwko wirusowi rzekomego pomoru drobiu (ang. *Newcastle disease virus*), która jest produkowana przez Dow Agroscience w zawiesinie komórek roślinnych. Z innych zarejestrowanych PMP warto wymienić rekombinowane przeciwciała zapobiegające próchnicy zębów (CaroRx produkowane w transgenicznym tytoniu przez Planet Biotechnology) oraz przeciwciała wykorzystywane do oczyszczania antygeny w trakcie produkcji szczepionki przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (CB-Hep.1 produkowane w CIGB na Kubie). Ponadto, wiele z PMP jest w fazie badań klinicznych i w związku z tym można oczekiwać ich wprowadzenia na rynek w najbliższych latach, np. glukocerebrozydaza produkowana przez Protalix Biotherapeutics, interferon- α produkowany przez Biolex Therapeutics czy insulina produkowana przez SemBioSys [74]. Z pewnością dziedzina ta będzie bardzo intensywnie rozwijana w następnych dziesięcioleciach.

W związku z dużym zainteresowaniem roślinnymi systemami ekspresyjnymi i ich użyciem do produkcji rekombinowanych białek o znaczeniu farmaceutycznym istnieje pilna potrzeba, zwłaszcza w Europie, wprowadzenia dokładnych oraz ujednoliconych reguł produkcji i komercjalizacji produktów PMP. Obowiązujące reguły nie są dostosowane do możliwości wprowadzenia na rynek tego typu produktów biotechnologicznych. W nowych regulacjach prawnych konieczne jest uwzględnienie zarówno wymagań dotyczących upraw genetycznie zmodyfikowanych roślin (w Unii Europejskiej są one pod kontrolą Europejskiego Urzędu Do Spraw Bezpieczeństwa Żywności – EFSA), jak i wymagań dotyczących leków uzyskanych metodami biotechnologicznymi (w Unii Europejskiej są one pod kontrolą Europejskiej Agencji Leków – EMEA).

PIŚMIENNICTWO

1. Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA, Matzke AJM (1986) The expression of a nopaline synthase – human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol Biol* 6: 347-357
2. Sijmons PC, Dekker BM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJ, Hoekema A (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology (N Y)* 8: 217-221

3. Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* 6: 219-226
4. Fischer R, Emans N (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res* 9: 279-299
5. Mason HS, Arntzen CJ (1995) Transgenic plants as vaccine production systems. *Trends Biotechnol* 13: 388-392
6. Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* 7: 152-158
7. Floss DM, Falkenburg D, Conrad U (2007) Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. *Transgenic Res* 16: 315-332
8. Ma JK, Chikwamba R, Sparrow P, Fischer R, Mahoney R, Twyman RM (2005) Plant-derived pharmaceuticals - the road forward. *Trends Plant Sci* 10: 580-585
9. Ma JK, Drake PM, Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 4: 794-805
10. Pujol M, Gavilondo J, Ayala M, Rodriguez M, Gonzalez EM, Perez L (2007) Fighting cancer with plant-expressed pharmaceuticals. *Trends Biotechnol* 25: 455-459
11. Sparrow PA, Irwin JA, Dale PJ, Twyman RM, Ma JK (2007) Pharma-Planta: road testing the developing regulatory guidelines for plant-made pharmaceuticals. *Transgenic Res* 16: 147-161
12. Spok A (2007) Molecular farming on the rise - GMO regulators still walking a tightrope. *Trends Biotechnol* 25: 74-82
13. Spok A, Twyman RM, Fischer R, Ma JK, Sparrow PA (2008) Evolution of a regulatory framework for pharmaceuticals derived from genetically modified plants. *Trends Biotechnol* 26: 506-517
14. Andersen DC, Krummen L (2002) Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol* 13: 117-123
15. Larrick JW, Thomas DW (2001) Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr Opin Biotechnol* 12: 411-418
16. Koprowski H, Yusibov V (2001) The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 19: 2735-2741
17. Maliga P, Graham I (2004) Molecular farming and metabolic engineering promise a new generation of high-tech crops. *Curr Opin Plant Biol* 7: 149-151
18. Saint-Jore-Dupas C, Faye L, Gomord V (2007) From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *Trends Biotechnol* 25: 317-323
19. Schillberg S, Twyman RM, Fischer R (2005) Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants - technology assessment. *Vaccine* 23: 1764-1769
20. Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol* 21: 570-578
21. Streatfield SJ (2007) Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnol J* 5: 2-15
22. Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2005) Magniflection - a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23: 2042-2048
23. Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PT, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L, Ward D, Ye G, Russell DA (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol* 18: 333-338
24. Fernandez-San Millan A, Mingo-Castel A, Miller M, Daniell H (2003) A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnol J* 1: 71-79
25. Gomord V, Faye L (2004) Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol* 7: 171-181
26. Gomord V, Sourrouille C, Fichette AC, Bardor M, Pagny S, Lerouge P, Faye L (2004) Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnol J* 2: 83-100
27. De Jaeger G, Scheffer S, Jacobs A, Zambre M, Zobel O, Goossens A, Depicker A, Angenon G (2002) Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat Biotechnol* 20: 1265-1268
28. Kim TG, Kim HM, Lee HJ, Shin YJ, Kwon TH, Lee NJ, Jang YS, Yang MS (2007) Reduced protease activity in transformed rice cell suspension cultures expressing a proteinase inhibitor. *Protein Expr Purif* 53: 270-274
29. Kim YS, Lee YH, Kim HS, Kim MS, Hahn KW, Ko JH, Joung H, Jeon JH (2008) Development of patatin knockdown potato tubers using RNA interference (RNAi) technology, for the production of human-therapeutic glycoproteins. *BMC Biotechnol* 8: 36
30. Capuano F, Beaudoin F, Napier JA, Shewry PR (2007) Properties and exploitation of oleosins. *Biotechnol Adv* 25: 203-206
31. Lin M, Rose-John S, Grotzinger J, Conrad U, Scheller J (2006) Functional expression of a biologically active fragment of soluble gp130 as an ELP-fusion protein in transgenic plants: purification via inverse transition cycling. *Biochem J* 398: 577-583
32. Patel J, Zhu H, Menassa R, Gyenis L, Richman A, Brandle J (2007) Elastin-like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins in tobacco leaves. *Transgenic Res* 16: 239-249
33. Strasser R, Stadlmann J, Schahs M, Stiegler G, Quendler H, Mach L, Glossl J, Weterings K, Pabst M, Steinkellner H (2008) Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure. *Plant Biotechnol J* 6: 392-402
34. Kirk DD, McIntosh K, Walmsley AM, Peterson RK (2005) Risk analysis for plant-made vaccines. *Transgenic Res* 14: 449-462
35. Warzecha H, Mason HS (2003) Benefits and risks of antibody and vaccine production in transgenic plants. *J Plant Physiol* 160: 755-764
36. Gołab J, Jakóbsiak M, Zagożdżon R, Oblakowski P (2004) Cytokiny, W: Jakóbsiak M, Gołab J, Lasek W (red) *Immunologia*, PWN: Warszawa. str. 198-224
37. Tayal V, Kalra BS (2008) Cytokines and anti-cytokines as therapeutics - an update. *Eur J Pharmacol* 579: 1-12
38. Boyaka PN, McGhee JR (2001) Cytokines as adjuvants for the induction of mucosal immunity. *Adv Drug Deliv Rev* 51: 71-79
39. Toka FN, Pack CD, Rouse BT (2004) Molecular adjuvants for mucosal immunity. *Immunol Rev* 199: 100-112
40. Elias EG, Zapas JL, McCarron EC, Beam SL, Hasskamp JH, Culpepper WJ (2008) Sequential administration of GM-CSF (Sargramostim) and IL-2 +/- autologous vaccine as adjuvant therapy in cutaneous melanoma: an interim report of a phase II clinical trial. *Cancer Biother Radiopharm* 23: 285-291
41. Matsumoto S, Ikura K, Ueda M, Sasaki R (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol Biol* 27: 1163-1172
42. Hong S-Y, Kwon T-H, Lee J-H, Jang Y-S, Yang M-S (2002) Production of biologically active hGM-CSF by transgenic plant cell suspension culture. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 762-767
43. James EA, Wang C, Wang Z, Reeves R, Shin JH, Magnuson NS, Lee JM (2000) Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Protein Expr Purif* 19: 131-138
44. Lee JH, Kim NS, Kwon TH, Jang YS, Yang MS (2002) Increased production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures. *J Biotechnol* 96: 205-211
45. Shin YJ, Hong SY, Kwon TH, Jang YS, Yang MS (2003) High level of expression of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension culture. *Biotechnol Bioeng* 82: 778-783
46. Kim NS, Kim TG, Jang YS, Shin YJ, Kwon TH, Yang MS (2008) Amylase gene silencing by RNA interference improves recombinant hGM-CSF production in rice suspension culture. *Plant Mol Biol* 68: 369-377
47. Kim NS, Kim TG, Kim OH, Ko EM, Jang YS, Jung ES, Kwon TH, Yang MS (2008) Improvement of recombinant hGM-CSF production by suppression of cysteine proteinase gene expression using RNA interference in a transgenic rice culture. *Plant Mol Biol* 68: 263-275

48. Kim TG, Lee HJ, Jang YS, Shin YJ, Kwon TH, Yang MS (2008) Co-expression of proteinase inhibitor enhances recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor production in transgenic rice cell suspension culture. *Protein Expr Purif* 61: 117-121
49. Wang ML, Goldstein C, Su W, Moore PH, Albert HH (2005) Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: a secure biofactory. *Transgenic Res* 14: 167-178
50. Sardana RK, Alli Z, Dudani A, Tackaberry E, Panahi M, Narayanan M, Ganz P, Altosaar I (2002) Biological activity of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor is maintained in a fusion with seed glutelin peptide. *Transgenic Res* 11: 521-531
51. Sardana R, Dudani AK, Tackaberry E, Alli Z, Porter S, Rowlandson K, Ganz P, Altosaar I (2007) Biologically active human GM-CSF produced in the seeds of transgenic rice plants. *Transgenic Res* 16: 713-721
52. Ning T, Xie T, Qiu Q, Yang W, Zhou S, Zhou L, Zheng C, Zhu Y, Yang D (2008) Oral administration of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor expressed in rice endosperm can increase leukocytes in mice. *Biotechnol Lett* 30: 1679-1686
53. Zhou F, Wang ML, Albert HH, Moore PH, Zhu YJ (2006) Efficient transient expression of human GM-CSF protein in *Nicotiana benthamiana* using potato virus X vector. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 756-762
54. Magnuson NS, Linzmaier PM, Reeves R, An G, HayGlass K, Lee JM (1998) Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Expr Purif* 13: 45-52
55. Zhang B, Yang YH, Lin YM, Rao Q, Zheng GG, Wu KF (2003) Expression and production of bioactive human interleukin-18 in transgenic tobacco plants. *Biotechnol Lett* 25: 1629-1635
56. Park Y, Cheong H (2002) Expression and production of recombinant human interleukin-2 in potato plants. *Protein Expr Purif* 25: 160-165
57. Menassa R, Kennette W, Nguyen V, Rymerson R, Jevnikar A, Brandle J (2004) Subcellular targeting of human interleukin-10 in plants. *J Biotechnol* 108: 179-183
58. Ma S, Huang Y, Davis A, Yin Z, Mi Q, Menassa R, Brandle JE, Jevnikar AM (2005) Production of biologically active human interleukin-4 in transgenic tobacco and potato. *Plant Biotechnol J* 3: 309-318
59. Ohya K, Itchoda N, Ohashi K, Onuma M, Sugimoto C, Matsumura T (2002) Expression of biologically active human tumor necrosis factor-alpha in transgenic potato plant. *J Interferon Cytokine Res* 22: 371-378
60. Gutierrez-Ortega A, Avila-Moreno F, Saucedo-Arias LJ, Sanchez-Torres C, Gomez-Lim MA (2004) Expression of a single-chain human interleukin-12 gene in transgenic tobacco plants and functional studies. *Biotechnol Bioeng* 85: 734-740
61. Gutierrez-Ortega A, Sandoval-Montes C, de Olivera-Flores TJ, Santos-Arquemedo L, Gomez-Lim MA (2005) Expression of functional interleukin-12 from mouse in transgenic tomato plants. *Transgenic Res* 14: 877-885
62. Kwon TH, Seo JE, Kim J, Lee JH, Jang YS, Yang MS (2003) Expression and secretion of the heterodimeric protein interleukin-12 in plant cell suspension culture. *Biotechnol Bioeng* 81: 870-875
63. Wang DJ, Brandsma M, Yin Z, Wang A, Jevnikar AM, Ma S (2008) A novel platform for biologically active recombinant human interleukin-13 production. *Plant Biotechnol J* 6: 504-515
64. Farran I, Rio-Manterola F, Iniguez M, Garate S, Prieto J, Mingo-Castel AM (2008) High-density seedling expression system for the production of bioactive human cardiotrophin-1, a potential therapeutic cytokine, in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol J* 6: 516-527
65. Arlen PA, Falconer R, Cherukumilli S, Cole A, Cole AM, Oishi KK, Daniell H (2007) Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b. *Plant Biotechnol J* 5: 511-525
66. Menassa R, Du C, Yin ZQ, Ma S, Poussier P, Brandle J, Jevnikar AM (2007) Therapeutic effectiveness of orally administered transgenic low-alkaloid tobacco expressing human interleukin-10 in a mouse model of colitis. *Plant Biotechnol J* 5: 50-59
67. Liu C, Towler MJ, Medrano G, Cramer CL, Weathers PJ (2009) Production of mouse interleukin-12 is greater in tobacco hairy roots grown in a mist reactor than in an airlift reactor. *Biotechnol Bioeng* 102: 1074-1086
68. Edelbaum O, Stein D, Holland N, Gafni Y, Livneh O, Novick D, Rubinstein M, Sela I (1992) Expression of active human interferon-beta in transgenic plants. *J Interferon Res* 12: 449-453
69. De Zoeten GA, Penswick JR, Horisberger MA, Ahl P, Schultze M, Hohn T (1989) The expression, localization, and effect of a human interferon in plants. *Virology* 172: 213-222
70. Ohya K, Matsumura T, Ohashi K, Onuma M, Sugimoto C (2001) Expression of two subtypes of human IFN-alpha in transgenic potato plants. *J Interferon Cytokine Res* 21: 595-602
71. Sawahel WA (2002) The production of transgenic potato plants expressing human alpha-interferon using lipofectin-mediated transformation. *Cell Mol Biol Lett* 7: 19-29
72. Ohya K, Matsumura T, Itchoda N, Ohashi K, Onuma M, Sugimoto C (2005) Ability of orally administered IFN-alpha-containing transgenic potato extracts to inhibit *Listeria monocytogenes* infection. *J Interferon Cytokine Res* 25: 459-466
73. Boehm R (2007) Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. *Ann N Y Acad Sci* 1102: 121-134
74. Kaiser J (2008) Is the drought over for pharming? *Science* 320: 473-475

Plant-based production of recombinant cytokines

Anna Góra-Sochacka[✉], Patrycja Redkiewicz, Bogusława Napiórkowska*, Agnieszka Sirko

Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Science, ul. Pawlowskiego 5A, 02-106 Warsaw, Poland

*Present address: Research Institute of Pomology and Floriculture, 18 Pomologiczna St., 96-100 Skierniewice, Poland

[✉]e-mail: annag@ibb.waw.pl

Key words: cytokines, pharmaceutical protein, transgenic plants, molecular farming

ABSTRACT

Modern biotechnology has led to increase of interest in producing pharmaceutically important and commercially valuable proteins in plants. Plants can efficiently produce recombinant proteins in large quantities and plant-derived proteins are free of human disease factors. In general, plant systems can now be used to produce a variety of proteins, including antibodies, cytokines, blood substitutes, vaccines and others. Cytokines are small proteins secreted by animal cells. They mediate and regulate immunity, inflammation, and hematopoiesis. Due to their properties many cytokines have medical application, mostly in treatment of virus infections, cancer symptoms and diseases affecting the immune system. However clinical deployment of cytokines is limited by the high production costs. Recently, several research groups reported using various plant-based expression systems for the production of biologically active mammalian cytokines.

Serotypy wirusów związanych z adenowirusami

STRESZCZENIE

Próby kliniczne terapii genowej na świecie dotyczą głównie chorób nowotworowych, mrogenowych i naczyniowo-sercowych. W badaniach wykorzystuje się przede wszystkim wirusowe nośniki genów konstruowane głównie w oparciu o genom dobrze scharakteryzowanych adenowirusów i retrowirusów. Prowadzone są intensywne badania nad konstrukcją wektora, który skutecznie dostarczałby geny do komórek i jednocześnie nie powodował skutków ubocznych. Badania doświadczalne i pierwsze próby kliniczne podkreślają terapeutyczne znaczenie rekombinowanych wirusów związanych z adenowirusami (AAV, ang. *adeno-associated viruses*). Obecność serotypów AAV i możliwość ich namnażania w warunkach *in vitro* sprawiają, iż możliwym staje się prowadzenie prób klinicznych terapii genowej za pomocą preparatów genowych wprowadzających terapeutyczne geny do określonych komórek, tkanek i narządów człowieka. W pracy scharakteryzowano 12 znanych serotypów AAV. Podkreślono ich naturalny, zależny od ekspresji genów białek kapsydowych VP1, VP2 i VP3, tropizm komórkowy i aktywność biologiczną. Badania wskazują, iż wektory AAV najefektywniej infekują komórki mięśni szkieletowych (AAV1,8,9), serca (AAV9), wątroby (AAV8) oraz narządy zmysłów (AAV3,4,5).

WPROWADZENIE

Odkryte w latach 60 ubiegłego stulecia [1] wirusy związane z adenowirusami (AAV, ang. *adeno-associated viruses*) wykorzystywane są obecnie w próbach klinicznych terapii genowej (Ryc. 1). Ostatnio, w pracy Hauswirth i wsp. [2], przedstawiono bardzo obiecujące wyniki badań leczenia za pomocą rekombinowanych wirusów AAV pacjentów cierpiących na nieuleczalną - według klasycznej medycyny - dziedziczną autosomalnie recesywnie - ślepotę (ang. *leber congenital amaurosis*). Choroba spowodowana jest mutacją w genie *RPE65* (ang. *retinal pigment epithelium-specific-65 kDa*). Pacjentom podawano rekombinowane wektory AAV, serotyp 2 (rAAV2) kodujące prawidłowe białko RPE65. Wstępne wyniki wykazały, potwierdzany przez pacjentów, wyraźny wzrost czułości widzenia.

Liczba przeprowadzanych na świecie protokołów klinicznych terapii genowej z użyciem rAAV wzrasta. Obecnie jest ich ponad pięćdziesiąt; dotyczą głównie leczenia chorób nowotworowych, naczyniowo-sercowych. Zainteresowanie rAAV wynika bezpośrednio z ich właściwości biochemiczno-biologicznych. rAAV spełniają cechy dobrego wektora. Znanym jest np., iż efektywnie wnoszą geny do komórek dzielących się i nie dzielących się, a ekspresja wprowadzanych transgenów utrzymuje się długo. rAAV uważa się również za wirusy niechorobotwórcze dla człowieka. Zaletą rAAV jest ich niska w porównaniu z

Agnieszka Lipiec¹

Maciej Małecki^{1,2,✉}

Karolina Hajdukiewicz²

¹Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa

²Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

✉ Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa; Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; tel.: (022) 546 26 20, e-mail: mahan@poczta.wp.pl

Artykuł otrzymano 1 października 2008 r.
Artykuł zaakceptowano 28 stycznia 2009 r.

Słowa kluczowe: wirusy związane z adenowirusami, serotypy, terapia genowa



Rycina 1. Wektory wirusowe w próbach klinicznych terapii genowej na świecie. W badaniach wykorzystuje się rekombinowane wektory wirusowe konstruowane w oparciu o genom znanych wirusów (źródło: www.wiley.co.uk/genmed/vectors).

Tabela 1. rAAV jako nośniki genów w próbach klinicznych terapii genowej.

Choroba	Gen terapeutyczny
Dystrofia mięśniowa Duchenn'a	minidystrofina
Hemofilia typu B	czynnik IX układu krzepnięcia
Mukowiscydoza	transblonowy regulator transportu jonów chlorkowych
Niedobór alpha-1 antytrypsyny	α-1-antytrypsyna
Niedobór lipazy lipoproteinowej	lipaza lipoproteinowa
Niewydolność serca	wapniowa ATPaza siateczki sarkoplazmatycznej
Rak prostaty	czynnik pobudzający kolonie granulocytów i makrofagów
Rak prostaty	kinaza tymidynowa wirusa opryszczki
Zapalenie stawów	receptor immunoglobulinowy czynnika martwicy nowotworów

W prawej kolumnie zamieszczono geny kodujące terapeutyczne białka wprowadzane do chorych za pomocą rekombinowanych wektorów AAV (zaczepnięto z: www.wiley.co.uk/genmed/clinical).

innymi wektorami wirusowymi (np. adenowirusami) immunogenność w stosunku do komórek gospodarza. Mimo iż, z uwagi na mały genom AAV, możliwym jest klonowanie tylko niewielkich genów – do około 2×10^3 par zasad, rekombinowane wektory AAV budzą duże zainteresowanie jako wykorzystywane w próbach terapii genowej nośniki terapeutycznych genów (Tab. 1). AAV posiadają zdolność do miejscowo-specyficjnej integracji własnego DNA z genomem gospodarza [3], kliniczną atrakcyjność rAAV wyznacza jednak głównie obecność w przyrodzie serotypów AAV, które cechuje tropizm do wybranych komórek, tkanek i narządów człowieka. Występowanie serotypów wirusów związanych z adenowirusami wiąże się ze zmiennością składu reszt aminokwasowych w białkach otoczki wirusów (białka kodowane przez wirusowy gen *cap*). Obecnie, dzięki metodom biologii molekularnej i inżynierii genetycznej możliwy jest nie tylko odkrywanie nowych serotypów AAV występujących w przyrodzie, ale również klonowanie rekombinowanych wektorów AAV (serotypów), które pozwalają wnosić terapeutyczne geny do określonych tkanek człowieka.

AAV – STRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI

Wirusy związane z adenowirusami (AAV) należą do rodziny *Parvoviridae*, rodzaju *Dependovirus*, wiriony ich posiadają symetrię ikosahedralną o średnicy około 20 nm, a ich materiałem genetycznym jest jednoliniowy DNA (np. genom AAV2 zbudowany jest z 4680 nukleotydów) [4]. Jednoliniowy DNA AAV ograniczony jest przez 145-nukleotydowe sekwencje końcowe ITR (ang. *inverted terminal repeats*), które przestrzennie tworzą stabilną energetycznie strukturę spinki do włosów. ITR odgrywają istotną rolę w replikacji, składaniu wirusowych cząstek oraz w integracji DNA AAV do genomu komórki gospodarza. Między sekwencjami ITR w genomie AAV znajdują się tylko dwa geny: *rep* oraz *cap* oraz trzy promotory p5, p19 i p40. Dzięki aktywności promotora p5 powstają białka Rep78, Rep68, promotora p19 białka Rep52, Rep40, zaś obecność promotora p40 odpowiada na ekspresję genów białek kapsydowych VP1, VP2 i VP3.

Wskazuje się, iż białka Rep i Cap stanowią około 70% masy wirionu AAV, pozostała część to DNA. AAV jako *dependowirusy* nie posiadają zdolności do samodzielnego namnażania się w komórce gospodarza, a do replikacji swojego materiału genetycznego wymagają obecności wirusa wspomagającego. Wśród najczęściej opisywanych wirusów jednocześnie infekujących wymienia się adenowirusy oraz herpeswirusy. Unikalną cechą AAV jest również, zależna od aktywności białek Rep, ich zdolność do miejscowo-specyficjnej integracji własnego DNA do chromosomu 19 człowieka (19q13.4, miejsce AAVS1) [3]. Proces infekcji komórek przez AAV jest wielostopniowy, obejmuje oddziaływanie AAV z białkami receptorowymi w błonie komórkowej gospodarza (miejsca receptorowe bogate w proteoglikany zawierające siarczan heparanu), internalizację wirusa, transport do jądra komórkowego oraz syntezę dwuniciowego DNA AAV. W nieobecności wirusów wspomagających obserwuje się integrację AAV do genomu gospodarza, zaś ich obecność prowadzi do replikacji genomu AAV i tworzenia aktywnych cząstek infekcyjnych. Szczegółowe informacje dotyczące cyklu życiowego AAV i mechanizmów miejscowo-specyficjnej integracji wirusowego DNA do genomu gospodarza autorzy niniejszej pracy zamieścili we wcześniejszym opracowaniu poświęconym AAV, opublikowanym w *Postęпах Biochemii* [3].

SEROTYPY AAV

Obecnie znanych jest dwanaście serotypów AAV (AAV1-AAV12). Poznawanie właściwości biochemicznych i biologicznych (aktywności infekcyjnej) poszczególnych serotypów pozwala konstruować rekombinowane wektory AAV w laboratorium i wykorzystywać je w terapii genowej u człowieka. W chwili obecnej najdokładniej poznany wydaje się być serotyp drugi AAV (AAV2). Badania charakteryzujące serotypy AAV ujawniają ich aktywność infekcyjną, tropizm i potencjalne aplikacje dla terapii genowej (Tab. 1 i 2).

SEROTYP 1 (AAV1)

Serotyp AAV1 został wyizolowany z preparatu adenowirusów w postaci „zanieczyszczenia” [5]. Do oczyszczenia serotypu 1 wykorzystano metodę opartą na chromatografii jonowymiennej [6]. Struktura kapsydu AAV1 nie jest jeszcze do końca poznana. Najprawdopodobniej, w oddziaływaniu AAV1 z komórkami ważną rolę odgrywa kwas sialowy [7]. Opie i wsp. [8], zidentyfikowali w AAV2 reszty aminokwasowe R585 i R588 zaangażowane w wiązanie heparyny. Jak podają Rabinowitz i wsp. [9] AAV1 nie posiada powyższych reszt, a tym samym nie łączy się z heparyną. Geny kapsydu AAV1 i AAV2 wykazują wysoką homologię. Sekwencja aminokwasowa białka VP1 AAV1 jest w 83 % taka jak VP1 AAV2. Pozostałe reszty aminokwasowe tworzą tzw. klastry, które determinują zarówno właściwości antygenowe jak i tropizm komórkowy [10]. Serotyp 1 wykazuje największy tropizm do mięśni szkieletowych. Jak wskazują badania Hauck i wsp. [10] transdukcja mięśni szkieletowych jest bardziej wydajna przy zastosowaniu wektora AAV1 niż AAV2. Różnice w transdukcji badano tworząc wirusowe hybrydy [10]. Wysoką infekcyjność AAV1 (wyższą niż dla AAV2) zanotowano również w stosunku do komórek

centralnego układu nerwowego u myszy [11-13]. Obiecujące wyniki uzyskano również stosując AAV1 do transdukcji mięśnia sercowego. Wykazano, iż wirusy AAV1 transdukują komórki serca z większą wydajnością niż AAV25 [14]. Su i wsp. [14] stosowali wektory AAV1 i AAV2 zawierające geny *VEGF* (ang. *vascular endothelial growth factor*) i *LacZ* (ang. β -*galactosidase*) ekspresjonowane poprzez promotor *cmv* (ang. *cytomegalovirus*). Do iniekcji mięśnia sercowego świni użyto również wektorów plazmidowych. Uzyskane wyniki pokazały, iż po zastosowaniu AAV uzyskano większą ekspresję genów niż po użyciu wektorów plazmidowych. Ponadto ekspresja *LacZ* AAV1 była na wyższym poziomie niż *LacZ* AAV2. Przewagę serotypu 1 nad serotypami 2-5 wykazali również Du i wsp. [15]. Do badań użyto wektory skonstruowane w oparciu o genom AAV2 pakowane w kapsydy serotypów AAV1-5. Konstrukty testowano na sercach dorosłych myszy *in vivo* (iniekcja bezpośrednia), na kardiomiocytach młodych i dorosłych myszy *in vitro*, jak również na kardiomiocytach człowieka. Najwyższą skuteczność transdukcji otrzymano u dorosłych myszy *in vivo* i *in vitro* stosując rAAV1. Z kolei u noworodków wysoką ekspresję genów uzyskano dzięki AAV2. W kardiomiocytach człowieka po ok. miesiącu od transdukcji, ekspresja genu *GFP* rAAV1 wynosiła 40%, *GFP* rAAV2 25%, a po użyciu pozostałych serotypów mniej niż 3%. Z badań wynika iż wirusy AAV1 wydajniej niż AAV2 transdukują komórki mięśnia sercowego u człowieka i myszy.

SEROTYP 2 (AAV2)

Serotyp AAV2 został wyizolowany jako „zanieczyszczenie” z preparatów adenowirusów [4]. Brak patogenności tego wirusa, jak również szerokie spektrum infekcyjności i zdolności do długiej, stabilnej ekspresji transgenów miało wpływ na wykorzystanie tego serotypu w terapii genowej. Genom wirusa to pojedyncza nić DNA składająca się z 4680 nukleotydów, na końcach której występują 145-nukleotydo- we, palindromowe sekwencje ITR (ang. *inverted terminal repeats*). Sekwencje ITR formują stabilną energetycznie strukturę spinki do włosów; biorą udział w replikacji, składaniu wirusowych cząstek jak również integracji AAV do genomu gospodarza. Genom AAV2 to dwa geny: *rep* i *cap*. W wyniku ekspresji genu *rep* powstają białka będące inicjatorami replikacji wirusa (Rep78, 68, 52, 40), natomiast ekspresja genu *cap* wyraża się syntezą białek kapsydu (VP1, VP2, VP3) [16,17].

Badania wskazują, że wejście wirusów AAV2 do komórek zostaje zapoczątkowane oddziaływaniem wirusów (białek kapsydu), z białkami receptorowymi komórek gospodarza. AAV2 rozpoznaje błonowe proteoglikany bogate w siarczan heparanu (HSPG, ang. *heparan sulfate proteoglycans*) [18]. Na podstawie badań wykorzystujących metodę ukierunkowanej mutagenazy, zidentyfikowano w AAV2 klaster reszt aminokwasowych R585 i R588 odpowiedzialnych za przyłączanie heparyny. Obecność heparyny może powodować zahamowanie transdukcji AAV2 nawet w 75% [19]. Wskazuje się również, że AAV2 mogą oddziaływać z receptorami czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR1, ang. *fibro-*

Tabela 2. Tropizm narządowy serotypów wirusów związanych z adenowirusami (AAV).

SEROTYPY	centralny układ nerwowy	gruczoły ślinowe	mięśnie szkieletowe	nerka	oko (fotoreceptory)	oko (nabłonek pigmentowany siatkówki)	płuco	serce	tkanka limfatyczna	trzustka	ucho (komórki włosowate ślimaka)	wątroba
AAV1	++		+++					++				
AAV2	+		+	+++			+					+
AAV3											+++	
AAV4	++					+++						
AAV5	+++				++	+++						
AAV6								++				
AAV7			++					++				
AAV8			+++					++		++		+++
AAV9			+++				++	+++				
AAV10			+				+		++			+
AAV11			+				+		++			+
AAV12		+	+									

Poprzez stopniowanie znaku „+” wskazano, potwierdzoną eksperymentalnie [1-65], efektywność infekcyjną serotypów AAV w stosunku do wybranych komórek, narządów.

blast growth factor receptor), czynnika wzrostu hepatocytów (HGFR, ang. *hepatocyte growth factor receptor*), jak i receptorami integrynowymi $\alpha V\beta 5$ [20,21]. AAV2 wykazuje tropizm w kierunku tkanek wątroby, mięśni, płuca, centralnego układu nerwowego z różną skutecznością [22]. Podkreśla się zdolność AAV2 do infekowania komórek nerki [22], natomiast wydaje się, iż AAV2 nie są odpowiednimi wektorami np. do transdukcji, np. kardiomiocytów zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [23]. W komórkach serca dorosłych myszy *in vitro* i *in vivo* ekspresja wprowadzanego przez AAV2 genu reporterowego GFP była niższa prawie dwukrotnie po zastosowaniu rAAV2 niż rAAV1 [15], jednak AAV2 efektywniej niż AAV1 infekowały komórki noworodków myszy [15]. W badaniach transdukcji mięśnia sercowego przewagę nad wektorem AAV2 wykazywał również wektor AAV6 [15]. Su i wsp. [25] udowodnili, że komórki mięśnia serca świni efektywniej transdukowane są przez rAAV1 niż rAAV2, przy czym wydajność transdukcji rAAV2 była wyższa niż transfekcji za pomocą wektora plazmidowego.

SEROTYP 3 (AAV3)

Serotyp AAV3, tak jak AAV2 i AAV5 został wykryty w tkankach człowieka [26]. AAV3 wykazuje 83% homologię nukleotydów z AAV1 [27]. Pomimo braku reszt aminokwasowych R585 i R588 biorących udział w przyłączaniu heparyny AAV3 posiada zdolność jej wiązania [9,28]. Rabonowitz i wsp. [29] w oparciu o genom pięciu serotypów (AAV1-AAV5) skonstruowali mozaikowe wirusy AAV. Wykazano, iż połączenie np. wirusa AAV3 i AAV5 powoduje wzmocnienie zdolności wiązania mucyny, jak również heparyny [29]. Wskazuje się na tropizm AAV3 do komórek włosowatych ślimaka ucha wewnętrznego [30].

SEROTYP 4 (AAV4)

Wirusy AAV4 zostały wyizolowane z małp afrykańskich (ang. *african green monkey*), zainfekowanych adenowirusem typu 15 (SV15) [31]. Do jego oczyszczenia użyto metody opartej na chromatografii jonowymiennej, jak również kolumn z mucyną [32,33]. Genom AAV4 zawiera 4767 nukleotydów. Produkty genu *rep* AAV4 wykazują 90% homologię z AAV2 i AAV3. Chiorini i wsp. [34] charakteryzowali sekwencje ITR AAV4. Okazało się, iż region RBS (ang. *Rep binding site*) jest wydłużony o dodatkowe powtórzenie GAGC (u AAV2 występują trzy powtórzenia GAGC). Niemniej jednak, zmiany te nie miały znaczącego wpływu na zdolności formowania charakterystycznej struktury spinki do włosów [34]. Struktura kapsydu AAV4 została zdeteminowana za pomocą kriomikroskopii elektronowej [35]. Receptor komórkowy tego serotypu jest odmienny niż dla AAV2, ponieważ do wiązania się z powierzchniową komórką AAV4 wykorzystuje kwas sialowy, a nie HSPG [36]. AAV4 jest jednym z najbardziej zróżnicowanych antygenowo serotypów. Unikalne regiony białek powierzchniowych determinują tropizm serotypu 4 i sprawiają, iż AAV4 nie ulega reakcji krzyżowej z neutralizującymi przeciwciałami przeciw AAV2 [34]. Zaobserwowano, iż AAV4 wydajnie transdukuje komórki centralnego układu nerwowego, głównie astrocyty, komórki wyściółki układu komorowego mózgu i rdzenia, a także pigmentowany nabłonek siatkówki [37].

Chiorini i wsp. [34] wykazali, iż AAV4 transdukuje komórki człowieka, małpy oraz szczura [38].

SEROTYP 5 (AAV5)

Serotyp AAV5 został wyizolowany z kłykcin kończy-stych narządów płciowych męskich [4]. Analiza biochemiczna i analiza sekwencji nukleotydowej genomu wykazały, iż AAV5 posiada unikalne cechy wśród serotypów AAV [39]. Funkcje wirusa pomocniczego dla tego serotypu może pełnić HSV (ang. *herpes simplex virus*). Receptorem dla AAV5 jest kwas sialowy [35], natomiast ko-receptorem receptor płytkowego czynnika wzrostu (PDGFR- α , ang. *platelet derived growth factor receptor*) [40]. Do oczyszczenia tego serotypu wykorzystano chromatografię jonowymienną lub kolumny z mucyną, która ma właściwości wiążące reszty kwasu sialowego. Struktura kapsydu AAV5 została określona za pomocą kriomikroskopii elektronowej przy rozdzielczości 16 Å oraz krystalografii rentgenowskiej. Wskazuje się, iż AAV5 należy do serotypów najbardziej zróżnicowanych antygenowo, aczkolwiek ulega krzyżowej reakcji z neutralizującymi przeciwciałami przeciwko AAV2 [39]. W badaniach wykazano również, iż rozpuszczalna heparyna nie ma właściwości neutralizujących i nie wpływa na efekt transdukcji komórek za pomocą wektora AAV5 [39]. AAV5 wykazuje tropizm w kierunku komórek centralnego układu nerwowego [12,13], jak również fotoreceptorów [41]. Wydajność transdukcji AAV5 do układu nerwowego jest wyższa niż AAV2 [12,13]. Wewnątrzkomórkowe losy AAV5 są odmienne od charakteryzowanych dla pozostałych serotypów AAV. Zdarzenia wewnątrzkomórkowe dość dokładnie zostały przedstawione w badaniach na komórkach linii HeLa przez Bantel-Schaal i wsp. [42]. O ile najczęściej opisywany proces endocytozy przeważnie przebiega z udziałem pęcherzyków pokrytych klatryną (ang. *clathrin coated vesicles*) [42], to badania Bantel-Schaal i wsp. przyczyniły się do odkrycia nietypowej drogi endocytozy serotypu 5. Wykazano, że cząstki tego serotypu obecne są również w organellach nie opłaszczonych klatryną i są transportowane głównie do aparatu Golgiego poprzez cysterny siateczki Golgiego i związane z nimi pęcherzyki [42]. W celu dokładniejszego poznania biologii AAV5 zespół Chiorini i wsp. [39] sklonował i zsekwencjonował genom AAV5. Stwierdzono, iż pojedyncza nić DNA przypomina długością i układem genów nić serotypu AAV2. Lewa ramka odczytu (*gen rep*) wykazuje homologię z sekwencją AAV2 w 67%. Prawa ramka odczytu, kodująca białka kapsydu VP1-VP3 (*gen cap*) jest identyczna tylko w 56% z genem *cap* AAV2 [39]. Cechy charakterystyczne występują również w sekwencjach ITR. Wskazuje się, iż w ITR serotypu AAV5 brak jest miejsc *trs* (ang. *terminal resolution site*) przy zachowaniu miejsc RBS i zdolności tworzenia charakterystycznej struktury spinki do włosów. Zaobserwowano 58% homologię regionów ITR AAV5 i ITR AAV2 [40]. Badania sekwencji AAV ITR *trs* wykazały, iż w ITR AAV5 występuje odmienne miejsce pęknięcia, którego brak w sekwencjach ITR pozostałych serotypów [42]. Chiorini i wsp. [43] sprawdzili również zdolność białek Rep i Cap do replikacji i pakowania genomu innego serotypu przy użyciu techniki podstawiania (ang. *complementation assay*). Utworzono kilka konstruktyw: 2RepCap+2ITR (każdy element pochodzący z genomu AAV2), 5RepCap+5 ITR (każdy element pochodzący z genomu AAV5), 5RepCap+2

ITR (Rep i Cap z AAV5 pakowane w AAV2 ITR) 2RepCap + 5ITR (Rep i Cap z AAV2 pakowane w AAV5 ITR) i 5RepCap + 2ITR+2Rep (Rep i Cap z AAV5 pakowane w AAV2 ITR + AAV2 Rep). Wektory zawierały gen β -galaktozydazy pod ekspresyjną kontrolą promotora *rsv* (ang. *respiratory syncytial virus*). W pierwszych dwóch przypadkach, jak również ostatnim, zanotowano transdukcję, natomiast w kolejnych dwóch jej brak [39]. Wykazano, iż cząstki wirusa AAV5 ulegają replikacji tylko w przypadku gdy jest obecny gen *rep* AAV2 [17,18]. W związku z tym serotyp 5 jest odmienny od innych serotypów, ponieważ jego białka Rep nie mogą uczestniczyć w tzw. krzyżowym podstawieniu genomu z użyciem AAV2 ITR [39,43]. Naukowcy udowodnili w badaniach *in vitro*, iż obserwowane zjawisko występuje na poziomie replikacji i nie jest związane z etapem pakowania cząstek wirusowych [43].

SEROTYP 6 (AAV6)

Serotyp AAV6 został wyizolowany jako zanieczyszczenie preparatu adenowirusa typu 5. Jest traktowany jako wariant serotypu 1, ponieważ białka kapsydu różnią się tylko sześcioma resztami aminokwasowymi [38]. AAV6 wykazuje 85% homologię z sekwencją kapsydu AAV2 [44,45]. Niektórzy badacze uważają, iż serotyp 6 jest rekombinowaną hybrydą serotypu 1 i 2, gdyż ITR i region promotora *p5* są identyczne u obu serotypów, a reszta genomu wykazuje zdecydowane podobieństwo [46,47]. Receptorami dla AAV6 są proteoglikany bogate w siarczynan heparanu, stąd do oczyszczania AAV6 wykorzystuje się kolumny z heparyną [44,45]. Serotyp AAV6 ma również zdolności wiązania reszt kwasu sialowego [39]. Kapsyd AAV6 nie zawiera reszt aminokwasowych R585 i R588, które są odpowiedzialne za przyłączanie HSPG przez AAV2. Okazało się, iż zawiera on dodatkowo reszty lizyny w pozycji 531, które umożliwiają łączenie się z heparyną [39]. Wirusy serotypu 6 wykazują wysoki tropizm do mięśni szkieletowych [45]. Michael i wsp. [45] udowodnili, iż transdukcja mięśni rekombinowanymi wektorami zawierającymi białka kapsydu serotypu 6 jest ponad 500 razy wydajniejsza niż transdukcja za pomocą rAAV2. Wysoką wydajność infekcji przez AAV6 (większą niż po zastosowaniu AAV2 czy AAV1) zaobserwowano również dla komórek wątroby [48]. Podobne wyniki uzyskali również Raake i wsp. [49] na komórkach mięśnia sercowego świni. Inne badania japońskich naukowców wykazały, iż ekspresja genu *GFP* (ang. *green fluorescent protein*) w mięśniu sercowym gryzoni po zastosowaniu rAAV6 jest niższa w porównaniu z AAV7 lub AAV8 [50,51]. Zobserwowano także wydajną transdukcję rekombinowanego wektora AAV6 w kardiomiocytach szczurów [51].

SEROTYP 7 (AAV7)

Serotyp AAV7 został zidentyfikowany u ssaków naczelnych i wyizolowany z tkanek małpy (ang. *rhesus monkey*) [52]. Do oczyszczenia wykorzystano metodę opartą na chromatografii jonowymiennej [53]. Serotyp 7 nie ulega neutralizacji przez przeciwciała indukowane przez inne serotypy, aczkolwiek bardzo niskie miano przeciwciał przeciw AAV7 znaleziono w surowicy człowieka [52]. AAV7 wykazuje tropizm w kierunku mięśni szkieletowych. Efektywność transdukcji jest bardzo zbliżona do AAV1 [52]. Wang i wsp.

[51] wykazali wysoką ekspresję genu reporterowego *GFP* w mięśniach szkieletowych i sercu. Infekcje przeprowadzono za pomocą AAV7. Taymans i wsp. [54] natomiast porównali tropizm rekombinowanych wektorów: AAV2/7 i AAV2/8 z AAV2/1, AAV2/5 do komórek centralnego układu nerwowego myszy. Badania wykazały, iż serotyp 7 tak samo efektywnie transdukuje prądkowiec i istotę szarą jak pozostałe badane wektory [54]. Denby i wsp. [55] z kolei wykazali, iż serotyp AAV7 wykazuje niską skuteczność transdukcji komórek śródbłonki [55], a wpływ na ten proces mają głównie inhibitory proteasomów. Wykazano także, iż w przypadku komórek mięśni gładkich badane inhibitory nie wpływają na transdukcję AAV [55].

SEROTYP 8 (AAV8)

Występowanie serotypu AAV8 odkryto u ssaków naczelnych; serotyp został wyizolowany z tkanek małpy (ang. *rhesus monkey*) [52]. Do oczyszczenia wykorzystano chromatografię jonowymienną [53]. Struktura kapsydu AAV8 została określona na podstawie wyników uzyskanych dzięki krystalografii rentgenowskiej [56]. Gao i wsp. [52] wykazali, iż sekwencja białka VP1 kapsydu AAV8 jest podobna do VP1 AAV1, AAV2 i AAV3 w ok. 85%, natomiast do serotypu AAV4 tylko w 63%. Serotyp 8 nie ulega neutralizacji przez przeciwciała indukowane przez inne serotypy; niskie miano przeciwciał przeciw AAV8 znaleziono w surowicy człowieka [52]. Serotyp AAV8 wykazuje tropizm w kierunku komórek mięśnia sercowego [51], wątroby [52,57] oraz trzustki [58]. Naukowcy wykazali, iż przy użyciu wektora AAV8 ekspresja transgenów w komórkach wątroby jest od 10-100 razy wyższa niż przy transdukcji innymi serotypami [52]. Obecność AAV8 wykryto także w komórkach mięśni szkieletowych [52,57]. Wang i wsp. [51] przeprowadzili doświadczenia na noworodkach i dorosłych osobnikach myszy, a także chomikach z wykorzystaniem wektorów różnych serotypów AAV; badano również serotyp AAV8. Wektory podawano zwierzętom dootrzewnowo i dożylnie. Najwyższą ekspresję wprowadzanych transgenów po podaniu AAV8 obserwowano w mięśniach prądkowych.

SEROTYP 9 (AAV9)

Serotyp AAV 9 został wyizolowany z tkanek człowieka [5]. Obecność wirusa AAV9 zaobserwowano w wątrobie, płucach i mięśniach [57]. Struktura kapsydu tego serotypu nie jest jeszcze do końca poznana. Wiadomo jednak, że jest to serotyp, który z największą skutecznością transdukuje komórki serca [59]. Miyagi i wsp. [59] wykazali wysoką infekcyjność wektora AAV9 (AAV9-*cmv-lacZ*) w stosunku do komórek serca szczurów; autorzy opisują 72% wydajność transdukcji kardiomiocytów. Zaobserwowano korelację między dawką wektora, a skutecznością transdukcji komórek. Wektory AAV9 podawano zwierzętom również dożylnie. Ekspresję reporterowego genu *lacZ* wykazano głównie w wątrobie, nerkach i mięśniach szkieletowych. Stwierdzono również brak znaczących różnic w ekspresji genów w sercu po zastosowaniu perfuzji *ex vivo* i iniekcji dożylniej. Badania wykazały długotrwałą transdukcję komórek serca po zastosowaniu wektora AAV9. Ekspresja transgenów utrzymywała się na zbliżonym poziomie począwszy od 10 dnia do 3 miesiąca po transplantacji [59]. Sprawdzano rów-

niez infekcyjność AAV2/9 w stosunku do komórek mięśnia sercowego myszy, po zastosowaniu iniekcji dożylniej. Wykazano, iż wirusy transdukują komórki serca do 200 razy skuteczniej niż AAV2/1 [60]. Inne badania również wykazały wysoką (80%) skuteczność transdukcji komórek serca przy użyciu AAV9. Udowodniono, iż AAV9 transdukuje komórki serca 5–10 razy wydajniej niż AAV8 [61].

SEROTYP 10 (AAV10)

Serotyp AAV10 został wyizolowany z tkanek małp (ang. *cynomolgus monkey*). Sekwencje AAV10 zidentyfikowano w komórkach wątroby i serca [62]. Wysoki poziom wirusów odnotowano w tkankach limfatycznych [62]. Poznano sekwencję całego kodującego wirusowego DNA [63]. Udowodniono, iż kapsyd serotypu AAV10 wykazują 84% homologię aminokwasową z serotypem AAV2 [63]. Ponadto wykazano, iż serotyp AAV10 nie ulega krzyżowej reakcji z przeciwciałami przeciw białku VP2 AAV2, stąd może być stosowany w infekcji, mimo wysokiego miana przeciwciał anti-AAV2 w surowicy. Analiza filogenetyczna pokazała, iż serotyp 10 jest bardzo podobny do AAV8 [63]. Okazuje się również, iż brak jest neutralizacji AAV8 przez przeciwciała anti-AAV10. Mori i wsp. [63] udowodnili, iż rekombinowane wektory AAV2/10 wykazują u myszy odmienny tropizm komórkowy od wektorów AAV2. Wektory AAV2/10 skuteczniej transdukują mysie mioblastyczne komórki różnicujące się, niż nie różnicujące. W przypadku wektora AAV2 zaobserwowano odwrotne zjawisko.

SEROTYP 11 (AAV11)

Serotyp AAV11 został, podobnie jak AAV10, wyizolowany z tkanek małp (ang. *cynomolgus monkey*). Sekwencje AAV11 zidentyfikowano w komórkach wątroby, wykazano, iż kapsyd serotypu AAV11 wykazują 65% homologię aminokwasową z serotypem AAV2 [63]. Znanym jest również, iż serotyp AAV11 nie ulega krzyżowej reakcji z przeciwciałami przeciw białku VP2 AAV2, stąd może być wykorzystywany w terapii genowej, mimo wysokiego miana przeciwciał anti-AAV2 w surowicy. Na podstawie analizy filogenetycznej opisywane jest podobieństwo serotypu 11 do AAV4 [63]. Mori i wsp. [63] udowodnili, iż rekombinowane wektory AAV2/10 i AAV2/11 wykazują u myszy odmienny tropizm komórkowy od wektorów AAV2. Wskazuje się, iż wektory AAV2/11, jak również AAV2/10 w przeciwieństwie do AAV2 skuteczniej transdukują mysie mioblastyczne komórki różnicujące się, niż nie różnicujące.

SEROTYP 12 (AAV12)

Serotyp AAV12 został wyizolowany z preparatu małych adenowirusów [19]. Sekwencja genomowego DNA tego serotypu wykazuje wysoką homologię do serotypu AAV 11 (83%) i AAV4 (81%), natomiast najmniejszą w stosunku do AAV5 (63%) [19]. Sekwencja aminokwasowa białka Rep 78 jest homologiczna w 89% z białkiem Rep serotypu AAV4 i 88% serotypu AAV 11 [19]. Również wysokie podobieństwo aminokwasowe wykazuje białko VP1 AAV12 w stosunku do VP1 serotypu AAV11 (84%), natomiast 78% w stosunku do VP1 AAV4. Najniższą homologię VP1 AAV12 wykazano w stosunku do serotypu AAV5 (53%) [19]. Schmidt i wsp.

[19] wykazali w swoich badaniach, iż serotyp AAV12 posiada unikalne właściwości zarówno biologiczne, jak i immunologiczne. Autorzy podkreślają, iż AAV12 transdukuje komórki niezależnie od obecności HSPG i kwasu sialowego, które są niezbędne dla innych serotypów. Komórki linii komórkowej Cos transdukowano wektorami rAAV12 w obecności heparyny (analogu siarczanu heparanu), powodującej hamowanie transdukcji AAV. Wykazano, iż transdukcja komórek przez rAAV12 nie została zahamowana nawet przy dawce heparyny 1mg/ml, podczas gdy dla rAAV2 obserwowano drastyczny spadek transdukcji przy dawce nawet 80 razy mniejszej. W celu sprawdzenia czy transdukcja wektora rAAV12 jest zależna od kwasu sialowego, będącego receptorem dla AAV4, AAV5, AAV6 [7,36,64,65], badane komórki Cos traktowano neuraminidazą. W przypadku serotypów AAV4 i AAV5 transfer genu został zahamowany w 99 i 97%, natomiast w przypadku AAV12 nie zanotowano zmian [19]. Schmidt i wsp. [19] badali także zależność transdukcji rAAV12 od obecności proteaz. Udowodnili, iż receptory AAV zawierają białkowe komponenty, które są niezbędne do procesu transdukcji. Wykazano również, iż glikolipidy nie biorą udziału w tym procesie. Wskazuje się także, iż serotyp 12 jest odporny na neutralizujące przeciwciała anti-AAV krążące w surowicy człowieka [4]. Udowodniono również, iż rAAV12 efektywnie transdukuje komórki mięśni oraz gruczołów ślinowych [19].

PODSUMOWANIE

Dotychczas zidentyfikowano 12 serotypów AAV. Tropizm serotypów AAV wynika z budowy kapsydu wirusa. Białka kapsydu (VP1, VP2, VP3) pełnią zasadniczą funkcję w wiązaniu AAV do receptorów komórkowych, jak i w transporcie cząsteczek do jądra. Zgodnie z definicją, nowy serotyp identyfikuje się wówczas, jeśli nie ulega on reakcji krzyżowej z przeciwciałami przeciwko scharakteryzowanemu już wcześniej serotypom. AAV1-5 i AAV7-9 można zaliczyć do prawdziwych serotypów, natomiast np. AAV6 nie spełnia wymogów definicji. AAV6 reprezentuje hybrydę serotypu AAV1 i AAV2. Duże zainteresowanie budzą ostatnio badania transdukcji (infekcji) komórek mięśni szkieletowych, również serca, przy użyciu serotypów AAV. Podkreśla się użyteczność rekombinowanych AAV w terapii genowej dystrofii mięśniowej czy choroby niedokrwiennej serca. Badania wskazują, iż do komórek mięśni szkieletowych geny najskuteczniej wprowadzane są przez serotypy AAV1,8,9 zaś do mięśnia sercowego przez serotyp AAV9. Dalsze badania biologii wirusów związanych z adenowirusami, ich serotypów pozwolą na pełne wykorzystanie wektorów rAAV w terapii genowej u człowieka.

PIŚMIENNICTWO

1. Hoggan MD, Blacklow NR, Rowe WP (1966) Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 55: 1467-1474
2. Hauswirth W, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, Conlon T, Boye SL, Flotte TR, Byrne B, Jacobson SG (2008) Phase I Trial of Leber Congenital Amaurosis due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results. *Hum Gene Ther*, w druku
3. Małecki M, Woźniak A, Janik P (2008) Wirusy związane z adenowirusami. *Postepy Biochem* 54: 57-63

4. Bantel-Schall U, zur Hausen H (1984) Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from genital site. *Virology* 134: 52-63
5. Atchison RW, Casto BC, Hammon WM (1965) Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 149: 754-756
6. Zolotukhin S, Potter M, Zolotukhin I, Sakai Y, Loiler S, Fraites TJ Jr, Chiodo VA, Phillipsberg T, Muzyczka N, Hauswirth WW, Flotte TR, Byrne BJ, Snyder RO (2002) Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. *Methods* 28: 158-167
7. Wu Z, Miller E, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ (2006) Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6. *J Virol* 80: 9093-9103
8. Opie SR, Warrington KH Jr, Agbandje-McKenna M, Zolotukhin S, Muzyczka N (2003) Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. *J Virol* 77: 6995-7006
9. Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X, Samulski RJ (2002) Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 76: 791-801
10. Hauck B, Xiao W (2003) Characterization of tissue tropism determinants of adeno-associated virus type 1. *J Virol* 77: 2768-2774
11. Wang C, Wang CM, Clark KR, Sferra TJ (2003) Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain. *Gene Ther* 10: 1528-1534
12. Alisky JM, Hughes SM, Sauter SL, Jolly D, Dubensky TW Jr, Staber PD, Chiorini JA, Davidson BL (2000) Transduction of murine cerebellar neurons with recombinant FIV and AAV5 vectors. *Neuroreport* 21: 2669-2673
13. Burger C, Gorbatyuk OS, Velardo MJ, Peden CS, Williams P, Zolotukhin S, Reier PJ, Mandel RJ, Muzyczka N (2004) Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther* 10: 302-317
14. Su H, Yeghiazarians Y, Lee A, Huang Y, Arakawa-Hoyt J, Ye J, Orcino G, Grossman W, Kan YW (2008) AAV serotype 1 mediates more efficient gene transfer to pig myocardium than AAV serotype 2 and plasmid. *J Gene Med* 10: 33-41
15. Du L, Kido M, Lee DV, Rabinowitz JE, Samulski RJ, Jamieson SW, Weitzman MD, Thistlethwaite PA (2004) Differential myocardial gene delivery by recombinant serotype-specific adeno-associated viral vectors. *Mol Ther* 10: 604-608
16. Le Bec C, Douar AM (2006) Gene therapy progress and prospects - vectorology: design and production of expression cassettes in AAV vectors. *Gene Ther* 13: 805-813
17. Lai CM, Lai YK, Rakoczy PE (2002) Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA. Cell Biol* 21: 895-913
18. Summerford C, Samulski RJ (1998) Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72: 1438-1445
19. Schmidt M, Voutetakis A, Afione S, Zheng C, Mandikian D, Chiorini JA (2008) Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *J Virol* 82: 1399-1406
20. Kashiwakura Y, Tamayose K, Iwabuchi K, Hirai Y, Shimada T, Matsumoto K, Nakamura T, Watanabe M, Oshimi K, Daida H (2005) Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 79: 609-614
21. Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ (1999) AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 5: 78-82
22. Peden CS, Burger C, Muzyczka N, Mandel RJ (2004) Circulating anti-wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV2) antibodies inhibit recombinant AAV2 (rAAV2)-mediated, but not rAAV5-mediated, gene transfer in the brain. *J Virol* 78: 6344-6359
23. Vassalli G, Büeler H, Dudler J, von Segesser LK, Kappenberger L (2003) Adeno-associated virus (AAV) vectors achieve prolonged transgene expression in mouse myocardium and arteries *in vivo*: a comparative study with adenovirus vectors. *Int J Cardiol* 90: 229-238
24. Kawamoto S, Shi Q, Nitta Y, Miyazaki J, Allen MD (2005) Widespread and early myocardial gene expression by adeno-associated virus vector type 6 with a beta actin hybrid promoter. *Mol Ther* 11: 980-985
25. Su H, Yeghiazarians Y, Lee A, Huang Y, Arakawa-Hoyt J, Ye J, Orcino G, Grossman W, Kan YW (2008) AAV serotype 1 mediates more efficient gene transfer to pig myocardium than AAV serotype 2 and plasmid. *J Gene Med* 10: 33-41
26. Yates VJ, Dawson GJ, Pronovost AD (1981) Serologic evidence of avian adeno-associated virus infection in an unselected human population and among poultry workers. *Am J Epidemiol* 113: 542-545
27. Muramatsu S, Mizukami H, Young NS, Brown KE (1996) Nucleotide sequencing and generation of an infectious clone of adeno-associated virus 3. *Virology* 221: 208-217
28. Handa A, Muramatsu S, Qiu J, Mizukami H, Brown KE (2000) Adeno-associated virus (AAV)-3-based vectors transduce haematopoietic cells not susceptible to transduction with AAV-2-based vectors. *J Gen Virol* 81: 2077-2084
29. Rabinowitz JE, Bowles DE, Faust SM, Ledford JG, Cunningham SE, Samulski RJ (2004) Cross-dressing the virion: the transcapsidation of adeno-associated virus serotypes functionally defines subgroups. *J Virol* 78: 4421-4432
30. Liu Y, Okada T, Sheykhleslami K, Shimazaki K, Nomoto T, Muramatsu S, Kanazawa T, Takeuchi K, Ajalli R, Mizukami H, Kume A, Ichimura K, Ozawa K (2005) Specific and efficient transduction of Cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol Ther* 12: 725-733
31. Parks WP, Melnick JL, Rongey R, Mayor HD (1967) Physical assay and growth cycle studies of a defective adeno-satellite virus. *J Virol* 1: 171-180
32. Kaludov N, Handelman B, Chiorini JA (2002) Scalable purification of adeno-associated virus type 2, 4, or 5 using ion-exchange chromatography. *Hum Gene Ther* 1: 1235-1243
33. Auricchio A, O'Connor E, Hildinger M, Wilson JM (2001) A single-step affinity column for purification of serotype-5 based adeno-associated viral vectors. *Mol Ther* 4: 372-374
34. Chiorini JA, Yang L, Liu Y, Safer B, Kotin RM (1997) Cloning of adeno-associated virus type 4 (AAV4) and generation of recombinant AAV4 particles. *J Virol* 71: 6823-6833
35. Padron E, Bowman V, Kaludov N, Govindasamy L, Levy H, Nick P, McKenna R, Muzyczka N, Chiorini JA, Baker TS, Agbandje-McKenna M (2005) Structure of adeno-associated virus type 4. *J Virol* 79: 5047-5058
36. Kaludov N, Brown KE, Walters RW, Zabner J, Chiorini JA (2001) Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J Virol* 75: 6884-6893
37. Weber M, Rabinowitz J, Provost N, Conrath H, Folliot S, Briot D, Chérel Y, Chenuaud P, Samulski J, Moullier P, Rolling F (2003) Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther* 7: 774-781
38. Choi VW, McCarty DM, Samulski RJ (2005) AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther* 5: 299-310
39. Chiorini JA, Kim F, Yang L, Kotin RM (1999) Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5. *J Virol* 73: 1309-1319
40. Di Pasquale G, Davidson BL, Stein CS, Martins I, Scudiero D, Monks A, Chiorini JA (2003) Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med* 9: 1306-1312
41. Wu Z, Asokan A, Samulski RJ (2006) Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14: 316-327
42. Bantel-Schaal U, Hub B, Kartenbeck J (2002) Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment. *J Virol* 76: 2340-2349

43. Chiorini JA, Afione S, Kotin RM (1999) Adeno-associated virus (AAV) type 5 Rep protein cleaves a unique terminal resolution site compared with other AAV serotypes. *J Virol* 73: 4293-4298
44. Halbert CL, Allen JM, Miller AD (2001) Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. *J Virol* 75: 6615-6624
45. Blankinship MJ, Gregorevic P, Allen JM, Harper SQ, Harper H, Halbert CL, Miller DA, Chamberlain JS (2004) Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther* 10: 671-678
46. Rutledge EA, Halbert CL, Russell DW (1998) Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J Virol* 72: 309-319
47. Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G, Wilson JM (1999) Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* 73: 3994-4003
48. Grimm D, Zhou S, Nakai H, Thomas CE, Storm TA, Fuess S, Matsushita T, Allen J, Surosky R, Lochrie M, Meuse L, McClelland A, Colosi P, Kay MA (2003) Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy. *Blood* 102: 2412-2419
49. Raake PW, Hinkel R, Müller S, Delker S, Kreuzpointner R, Kupatt C, Katus HA, Kleinschmidt JA, Boekstegers P, Müller OJ (2008) Cardio-specific long-term gene expression in a porcine model after selective pressure-regulated retroinfusion of adeno-associated viral (AAV) vectors. *Gene Ther* 15: 12-17
50. Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, Crawford RW, Meuse L, Miller DG, Russell DW, Chamberlain JS (2004) Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 10: 828-834
51. Wang Z, Zhu T, Qiao C, Zhou L, Wang B, Zhang J, Chen C, Li J, Xiao X (2005) Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol* 23: 321-328
52. Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM (2002) Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11854-11859
53. Davidoff AM, Ng CY, Sleep S, Gray J, Azam S, Zhao Y, McIntosh JH, Karimipour M, Nathwani AC (2004) Purification of recombinant adeno-associated virus type 8 vectors by ion exchange chromatography generates clinical grade vector stock. *J Virol Methods* 121: 209-215
54. Taymans JM, Vandenberghe LH, Haute CV, Thiry I, Deroose CM, Mortelmans L, Wilson JM, Debysers Z, Baekelandt V (2007) Comparative analysis of AAV viral Vector serotypes 1,2,5,7 and 8 in Mouse brain. *Hum Gene Ther* 18: 195-206
55. Denby L, Nicklin SA, Baker AH (2005) Adeno-associated virus (AAV)-7 and -8 poorly transduce vascular endothelial cells and are sensitive to proteasomal degradation. *Gene Ther* 12: 1534-1538
56. Quesada O, Gurda B, Govindasamy L, McKenna R, Kohlbrenner E, Aslanidi G, Zolotukhin S, Muzyczka N, Agbandje-McKenna M (2007) Production, purification and preliminary X-ray crystallographic studies of adeno-associated virus serotype 7. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63: 1073-1076
57. Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM (2004) Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 78: 6381-6388
58. Wang AY, Peng PD, Ehrhardt A, Storm TA, Kay MA (2004) Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery *in vivo*. *Hum Gene Ther* 15: 405-413
59. Miyagi N, Rao VP, Ricci D, Du Z, Byrne GW, Bailey KR, Nakai H, Russell SJ, McGregor CG (2008) Efficient and durable gene transfer to transplanted heart using adeno-associated virus 9 vector. *J Heart Lung Transplant* 27: 554-560
60. Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, Conlon TJ, Lewis MA, Cloutier DE, Zolotukhin I, Tarantal AF, Byrne BJ (2006) Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction *in vivo*. *Circ Res* 99: e3-9
61. Inagaki K, Fuess S, Storm TA, Gibson GA, Mctiernan CF, Kay MA, Nakai H (2006) Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther* 14: 45-53
62. Mori S, Takeuchi T, Enomoto Y, Kondo K, Sato K, Ono F, Sata T, Kanda T (2008) Tissue distribution of cynomolgus adeno-associated viruses AAV10, AAV11, and AAVcy.7 in naturally infected monkeys. *Arch Virol* 153: 375-380
63. Mori S, Wang L, Takeuchi T, Kanda T (2004) Two novel Adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterisation of capsid protein. *Virology* 330: 375-383
64. Schmidt M, Grot E, Cervenka P, Wainer S, Buck C, Chiorini JA (2006) Identification and characterization of novel adeno-associated virus isolates in ATCC virus stocks. *J Virol* 80: 5082-5085
65. Walters RW, Yi SM, Keshavjee S, Brown KE, Welsh MJ, Chiorini JA, Zabner J (2001) Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *J Biol Chem* 276: 20610-20616

Serotypes of adeno-associated viruses

Agnieszka Lipiec¹, Maciej Małecki^{1,2,✉}, Karolina Hajdukiewicz²

¹Department of Cell Biology, Centre of Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute, 5 Roentgena St., 02-781 Warsaw, Poland

²Department of Biochemistry and Clinical Chemistry, Medical University of Warsaw, 1 Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland

✉ e-mail: mahan@poczta.wp.pl

Key words: adeno-associated viruses, serotypes, gene therapy

ABSTRACT

Cancer, monogenic and cardiovascular diseases are the main targets of clinical gene therapy. For the most part, the research is making use of virus gene carriers based on genome of well characterized adenoviruses and retroviruses. There is an intensive research being done on cloning vectors that would successfully deliver the therapeutic genes into the cells of interest without causing side effects. Experimental research and first clinical trials emphasize therapeutic significance of recombinant adeno-associated viruses (AAV). The presence of AAV serotypes and possibility of their cloning *in vitro* allow conducting clinical trials of gene therapy using gene products introducing therapeutic genes into targeted cells, tissues, organs. In the work twelve known serotypes of AAV are described. The cell tropism as well as biological activity were discussed. Research shows that AAV vectors mostly are able to infect skeletal muscles (AAV1,8,9), heart (AAV9), liver (AAV8) and sense organs (AAV3,4,5).

Prace przeznaczone do publikacji w „Postęпах Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych, krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach oraz listów do Redakcji. Redakcja nie ogranicza objętości manuskryptów, jakkolwiek w każdym przypadku zalecana jest zwięzłość stylu, bez utraty jasności przekazu.

Autorzy odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel i rycin (wykresy, schematy, reakcje, wzory chemiczne, fotografie), w uzasadnionych przypadkach kolorowych. W przypadku, gdy Autorzy zamierzają włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów cytowanych prac oryginalnych, do czego Redakcja zachęca, należy uzyskać i przekazać nam zgodę na przedruk, zarówno od autorów, jak i z wydawnictwa. Niemniej konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa jest również mile widziane. Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była publikowana ani nie została zgłoszona do publikacji w innym czasopiśmie, natomiast jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”, jej publikacja w całości lub we fragmentach w innym czasopiśmie wymagać będzie uprzedniej zgody Redakcji.

Redaktor Naczelny lub Redaktor Prowadzący pracę podejmuje decyzję o przyjęciu lub odrzuceniu manuskryptu na podstawie własnej opinii i opinii dwóch niezależnych recenzentów, w ciągu 6 tygodni od momentu otrzymania artykułu. W przypadku, kiedy praca wymaga poprawek od autorskich, Autorzy otrzymują drogą elektroniczną opinię recenzentów i proszeni są o przygotowanie poprawionej wersji manuskryptu i odesłanie go do Redakcji w ciągu 8 tygodni. Ostateczną decyzję o przyjęciu pracy podejmuje Redaktor Naczelny w ciągu 2 tygodni od otrzymania poprawionej wersji manuskryptu.

Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty autorskiej i poinformowania Redakcji o koniecznych zmianach, pocztą elektroniczną lub faksem, w ciągu 3 dni od chwili otrzymania.

Każdy z Autorów otrzymuje jeden egzemplarz numeru „Postępów Biochemii”, w którym ukazał się jego artykuł.

WSKAZÓWKI SZCZEGÓLWE:

Przed przystąpieniem do napisania artykułu Autorzy są proszeni o zapoznanie się z najnowszym numerem „Postępów Biochemii”, aby przygotować pracę pod względem edytorskim, językowym oraz jakości materiału ilustracyjnego, które będą odpowiadały aktualnym wymogom Redakcji. Artykuły powinny być pisane językiem naukowym, lecz zrozumiałym dla niespecjalistów. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy winni unikać składin obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie skrótów nawet, jeśli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z prac nadesłanych do Redakcji podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonania skrócenia tekstu i wprowadzenia koniecznych zmian, również w materiale ilustracyjnym.

PRZYGOTOWANIE MANUSKRYPTU:

Prosimy o nadsyłanie prac pocztą elektroniczną. W wyjątkowych przypadkach dopuszcza się przysyłanie prac na dyskietce lub płycie CD. Tekst winien być zapisany jako *.doc w formacie IBM PC, a pliki zawierające ryciny jako: *.tif, *.cdr, *.psd lub *.eps. Tekst powinien być napisany z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami, z użyciem czcionki Times New Roman 12 lub Arial 12. Symbole i znaki specjalne prosimy wstawiać komendą „insert”. W tekście prosimy wskazać miejsce umieszczenia figur i tabel.

ORGANIZACJA MANUSKRYPTU:

Wskazany jest podział artykułu na nienumerowane rozdziały i podrozdziały.

Strona 1 (tytułowa) zawiera tytuł artykułu, imiona i nazwiska Autorów (ze wskazaniem autora korespondującego), tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym, numerem

telefonu i adresem poczty elektronicznej, słowa kluczowe (do 6), wykaz stosowanych skrótów (do 10) w porządku alfabetycznym (ograniczony do niezbędnego minimum) oraz skrócony tytuł pracy (do 25 znaków).

Kolejno numerowane strony obejmują streszczenie (do 150 wyrazów), tekst pracy i piśmiennictwo. Na kolejnych stronach winny być umieszczone tabele oraz tytuły i objaśnienia rycin. Ostatnia strona winna zawierać następujące informacje w języku angielskim: tytuł artykułu, imiona i nazwiska Autorów oraz miejsca pracy, słowa kluczowe (do 6) i krótkie streszczenie artykułu (do 150 wyrazów).

Piśmiennictwo: Należy unikać nadmiernej liczby cytowań oryginalnych prac, odsyłając czytelników w miarę możliwości do artykułów przeglądowych. Redakcja zaleca zacytowanie co najwyżej 70 publikacji, w większości pochodzących z ostatnich 10 lat. Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania. W tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9-26]. Sposób cytowania prac oryginalnych (1) i przeglądowych (2), książek (3), rozdziałów z książek jednotomowych (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady:

- Jiang QX, Wang ON, MacKinnon R (2004) Electron microscopic analysis of Kv AP voltage-dependent K⁺ channels in an open conformation. *Nature* 430: 806-810
- Toyoshima C, Inesi G (2004) Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73: 269-292
- Dołowy K, Szewczyk A, Pikula S (2003) *Biony biologiczne*, Wydawnictwo Naukowe Ślask, Katowice, Warszawa
- Michalak M, Nakamura K, Papp S, Opas M (2000) Calreticulin and dynamics of the endoplasmic reticulum lumenal environment, W: Pochet R (red) *Calcium: the molecular basis of calcium action in biology and medicine*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, str. 191-205
- Darzynkiewicz E, Jankowska-Anyszka M (2000) *Struktura i funkcja końca 5' (KAPU) mRNA i U snRNA*, W: Koroniak H, Barciszewski J (red) *Na pograniczu chemii i biologii, t. IV*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, str. 143-179

Tabele winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami umieszczonymi pod tabelą. Wielkość tabel powinna być dostosowana do szerokości jednego łamu (8,5 cm) lub strony (18 cm).

Ilustracje: ryciny winny być zapisane jako: *.tif, *.cdr, *.psd, lub *.eps. Ryciny powinny być wykonane w skali 1:1. Wielkość ryciny powinna być dostosowana do szerokości jednego łamu (8,5 cm) lub strony (18 cm). Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Opisy na rysunkach powinny być wykonane czcionką Arial 8 p. Ilustracje i tabele prosimy przysyłać w osobnych plikach. Bitmapy (pliki tif, psd) powinny mieć minimalną rozdzielczość 300 dpi dla obrazów kolorowych i skali szarości (zdjęcia czarno białe) oraz 600 dpi dla ilustracji czarno-białych (schematy, wzory strukturalne zawierające tylko czerni i biel).

Prace w formie elektronicznej prosimy przysyłać na adres: postepy@nencki.gov.pl

W przypadkach uzasadnionych, np. brakiem odpowiedniego oprogramowania, prosimy o przysyłanie pracy na dyskietce lub płycie CD; zabezpieczonej przed uszkodzeniem w czasie transportu, na adres:

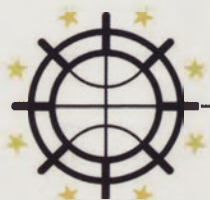
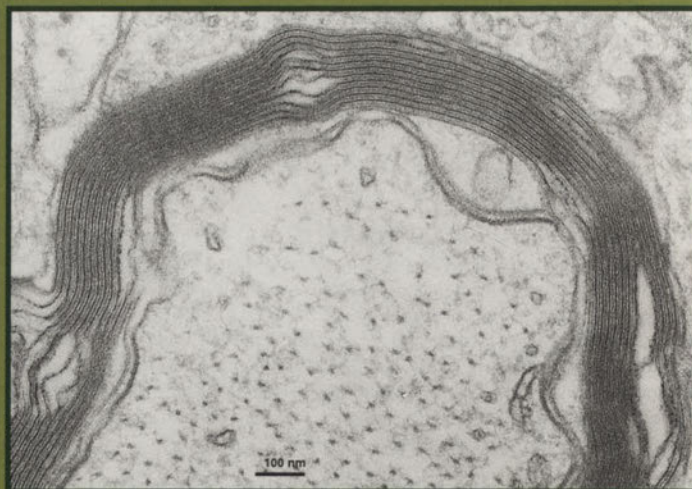
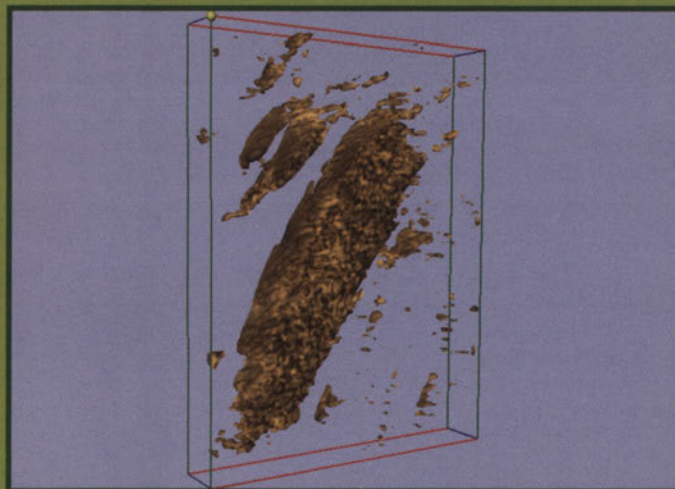
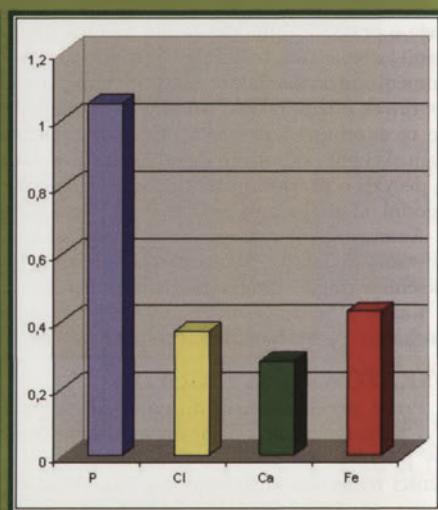
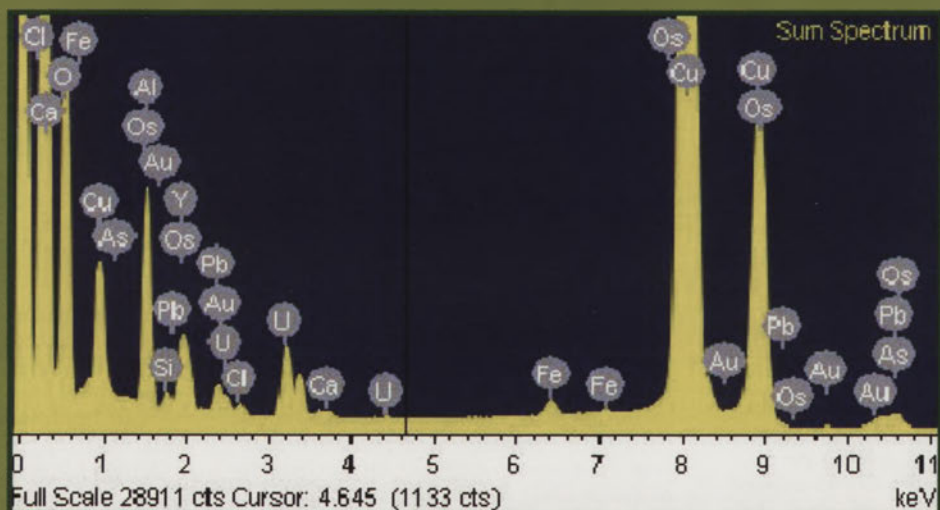
Ślawomir Pikula
redaktor naczelny kwartalnika „Postępy Biochemii”
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Oplata za druk: Zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, od 1 stycznia 2006 roku, Towarzystwo pobiera od Autorów opłatę, pokrywającą częściowo koszt druku artykułu. Oplata za wydrukowanie jednej strony artykułu wynosi 150 zł. Szczegółowe informacje zamieściliśmy pod adresem:

www.postepybiochemii.pl/oplaty.htm

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

W ramach tego projektu do Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Instytutu Nenckiego zakupiono wysokorozdzielczy (0,2 nm) elektronowy mikroskop transmisyjny JEM 1400 (JEOL Co., Japonia 2008). Ten elektronowy mikroskop cyfrowy jest sterowany z platformy Windows XP i jest wyposażony w mikroanalizator rentgenowski (EDS INCA Energy TEM, Oxford Instruments) oraz system do tomografii i kamerę CCD MORADA (SiS-Olympus). Przy pomocy tego zestawu aparaturowego wykonać można pełnozakresową mikroanalizę rentgenowską, zarówno jakościową, jak i ilościową, umożliwiającą obrazowanie rozkładu pierwiastków w preparacie biologicznym oraz odwzorowanie tomograficzne 3D. Jest to unikalny w Polsce mikroskop elektronowy dający takie możliwości badawcze i jeden z pierwszych na świecie.



UNIA DLA PRZEDSIĘBIORCZYCH

PROGRAM KONKURENCYJNOŚĆ

<http://rcin.org.pl>



Projekt współfinansowany przez
UNIĘ EUROPEJSKĄ
ze środków
Europejskiego Funduszu
Rozwoju Regionalnego

bim
CZT
KAMPUS - OCHOTA

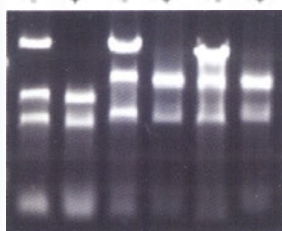
AquaRNA™ RNA Purification Kit

AquaRNA™ jest wielofunkcyjnym wodnym roztworem do izolacji DNA, RNA oraz białek. Po uprzedniej lizie i inaktywacji RNaz, DNA i RNA są gotowe do odzyskania z lizatu poprzez precypitację izopropanolem. Białka pozostają w roztworze i w każdej chwili mogą być odzyskane poprzez precypitację acetonem. Dzięki temu można jednocześnie izolować DNA, RNA oraz białka z tych samych próbek oszczędzając czas i pracę.

Charakterystyka:

- o Innowacyjny - jedyny w swoim rodzaju roztwór nieodwracalnie inaktywujący RNazy.
- o Wielofunkcyjny - jednoczesna izolacja DNA, RNA i białek.
- o Prosty w użyciu.
- o Nie wymaga stosowania szkodliwych substancji organicznych takich jak fenol, chloroform, butanol saturowany, bromek etydyny, chlorek cezu, 2-mekraptoetanol.
Uwaga: zawiera tiocyjanian guanidyny.
- o Czysty – oczyszczone RNA jest stabilne i nie jest zagrożone endogennymi RNazami.
- o Jeden zestaw można zastosować w różnych skalach: mini, midi, maxi i HTP.
- o Wysoka wydajność – do 100 µg DNA, 50 µg RNA oraz 2000 µg białek z 5 mln komórek lub 50 mg tkanki zwierzęcej.
- o Ekonomiczny – niski koszt pojedynczej reakcji.

Bacteria Hu Cells Rat Liver
DNase I DNase I DNase I



Porównanie całkowitego RNA wyizolowanego z różnych źródeł przy użyciu AquaRNA™.
Do doświadczenia użyto 0,5 ml zawiesiny bakteryjnej, 500 000 komórek ludzkich oraz tkanki z wątroby szczura. Końcowy osad z DNA/RNA został rozpuszczony w 100 µl wody DEPC. 5 µl niektórych próbek poddano działaniu DNazy I, a następnie przeprowadzono elektroforezę nienaturującą w 0,5 % żelu agarozowym uwidaczniającą prążki DNA oraz 28S (23S), 18S (16S) i 5S RNA.

Zastosowanie:

Komórki eukariotyczne, drobnoustrojów, tkanka zwierzęca, roślinna, krew, krew wysuszona, małe fragmenty DNA.

Informacje do zamówienia:

Nr kat.	Produkt	Wielkość opakowania	Ilość reakcji
5001MT	AquaRNA™ RNA Purification Kit Small	1 ml	ok. 10
5003MT	AquaRNA™ RNA Purification Kit Large	30 ml	ok. 300

Z tej samej serii dostępne są również zestawy do izolacji plazmidowego DNA- AquaPlasmid™ oraz AquaGenomic do izolacji DNA.

Więcej informacji:

www.mobitec.de

Czy firma Merck może poprawić
proces zatężania próbek?

U-Tube™ koncentratory

poprawiają odzysk białek,
koncentrację, szybkość otrzymania wyników,
oraz redukują ryzyko wysuszenia próbek.

That's what's in it for you. Merck Chemicals

Cechy i korzyści:

- Membrana polieterosulfonowa (PES) lub Hydrosart® (typ „Ultra-low protein binding”)
- Niewielka podatność do wiązania białek i wysoki wskaźnik odzysku
- Wysoki przepływ umożliwia szybką koncentrację próbek
- Ustalony punkt końcowy zapobiega wysychaniu próbek
- Różne pojemności koncentratorów - od 0,5 ml do 20 ml
- Różne wartości punktu odcięcia - od 3 kDa do 30 kDa
- Łatwe i wygodne w użyciu

Zapraszamy do sklepu internetowego
<https://mecommm.merck.pl>

