

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2010
TOM 56
NUMER 4

Toksyny bakterii a nowotwory

Zapalenie wątroby typu C

Białka otoczki jądrowej

Rozwój chloroplastów

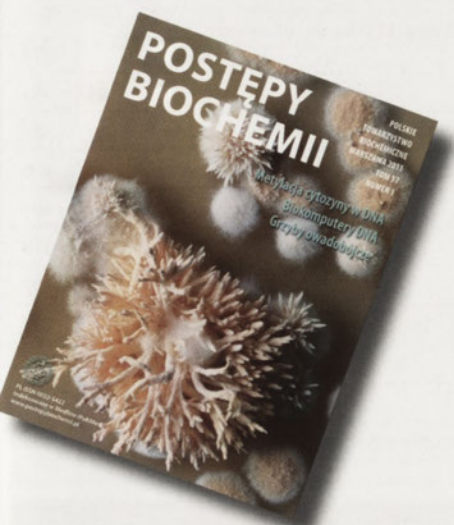


PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

www.postepybiochemii.pl

<http://rcin.org.pl>



W NASTĘPNYM NUMERZE:

Metylacja cytozyny w DNA i jej znaczenie w terapii przeciwnowotworowej

Beata Plitta,
Małgorzata Giel-Pietraszuk,
Wojciech T. Markiewicz,
Jan Barciszewski

Komputery DNA

Janusz Błasiak,
Tadeusz Krasieński,
Tomasz Popławski,
Sebastian Sakowski

Zewnątrzkomórkowe enzymy hydrolityczne wytwarzane przez grzyby owadobójcze – rola w procesie infekcji

Emilia Włóka

XLV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Wiśle Ewa Birkner	351
Rozstrzygnięcie konkursu Doktoraty 2009 Roman Józef Szczęsny	353
Wiadomości krajowe Teresa Wesołowska	356
XVI Europejska Konferencja Bioenergetyczna Lech Wojtczak	359

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Białka szkieletu jądrowego i otoczki jądrowej w regulacji ekspresji genów i przebiegu cyklu komórkowego – znane białka w nowych rolach Magda Dubińska-Magiera, Magdalena Zaremba-Czogalla, Ryszard Rzepecki	362
Analiza czynników wpływających na rozwój steroidooporności w etiopatogenezie astmy oskrzelowej o ciężkim przebiegu Michał Panek, Tadeusz Pietras, Izabela Kupryś-Lipińska, Paweł Górski, Piotr Kuna, Janusz Szemraj	373
Przewlekłe zapalenie wątroby i infekcja utajona w przebiegu zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C Arleta Kowala-Piaskowska, Iwona Mozer-Lisewska, Tram N.Q. Pham, Tomasz I. Michalak	383
Wpływ toksyn bakteryjnych na proces nowotworzenia Anna M. Stachowicz, Paweł Łaniewski, Elżbieta K. Jagusztyn-Krynicka	389
Mechanizmy transportu nieorganicznych związków arsenu do komórek prokariotycznych i eukariotycznych Paweł Lis, Ireneusz Litwin, Ewa Maciaszczyk-Dziubińska	400
Roślinne cykazy nukleotydów purynowych Adriana Szmidt-Jaworska	409
Indukowana światłem redukcja protochlorofilidu u okrytonasiennych a rozwój chloroplastów Beata Myśliwa-Kurdziel, Kazimierz Strzałka	418
Aktywność chinolityczna bakterii Elżbieta Saks, Urszula Jankiewicz	427
Metabolizm heterocyklicznych amin aromatycznych – mutagenów/ kancerogenów izolowanych z żywności Anna Woźniwodzka, Marta Tarasewicz, Jacek Piosik	435
Spór o źródła mocy katalitycznej enzymów Jan Hutny	447
Fulereny w radiobiologii Jacek Grębowski, Anita Krokosz	456

ARTYKUŁ SPONSOROWANY

Wydajna ekstrakcja białek transbłonowych z zastosowaniem zestawu <i>ProteoExtract® Transmembrane Protein Extraction Kit</i> Karina Błachnio	463
---	-----

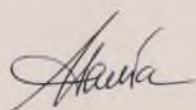
Rysunek na okładce:

Lotos orzechodajny (*Nelumbo nucifera*),
fot. J. Bandorowicz-Pikuła (zdjęcie na okładce wykorzystano za zgodą autorki)

Events/Opinions/Comments	351
REVIEWS	
Karyoskeletal and nuclear envelope proteins in cell cycle progression – known proteins in new functions	362
The analysis of the factors influencing the development of glucocorticoid resistance in the <i>etiopathogenesis</i> of severe bronchial asthma	373
Chronic hepatitis and occult HCV infection	383
The influence of bacterial toxins on the carcinogenesis	389
Pathways of arsenic uptake in prokaryotic and eukaryotic cells	400
Plant purine nucleotide cyclases	409
Light-induced reduction of protochlorophyllide in angiosperms and chloroplast development	418
Chitinolytic activity of bacteria	427
Heterocyclic aromatic amines, food-derived mutagens: metabolism and relevance to cancer susceptibility	435
Dispute on the source of enzymes' catalytic power	447
Fullerenes in radiobiology	456
Efficient extraction of transmembrane proteins using ProteoExtract® Transmembrane Protein Extraction Kit	463

Szanowni Czytelnicy, Autorzy i Redaktorzy Postępów Biochemii

Niech Nowy 2011 Rok przyniesie Państwu radość,
miłość, pomyślność i spełnienie wszystkich marzeń,
a gdy się te marzenia już spełnią,
niech dorzuci garść Nowych marzeń,
bo tylko one nadają życiu sens!



Sławomir Pikula
Redaktor Naczelny

PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII

OLYMPUS
Your Vision, Our Future

MERCK

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

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

Redaktor działu krajowego: Teresa Wesolowska, e-mail: 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 Hulanicka, Andrzej Jerzmanowski, Andrzej Kasprzak, Wanda Kłopocka, Paweł Pomorski, Aleksander F. Sikorski, Anna Szakiel, Adam Szewczyk, Tomasz Twardowski, Marek Zembala, Krzysztof Zablocki, Alicja Żylicz

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

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

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

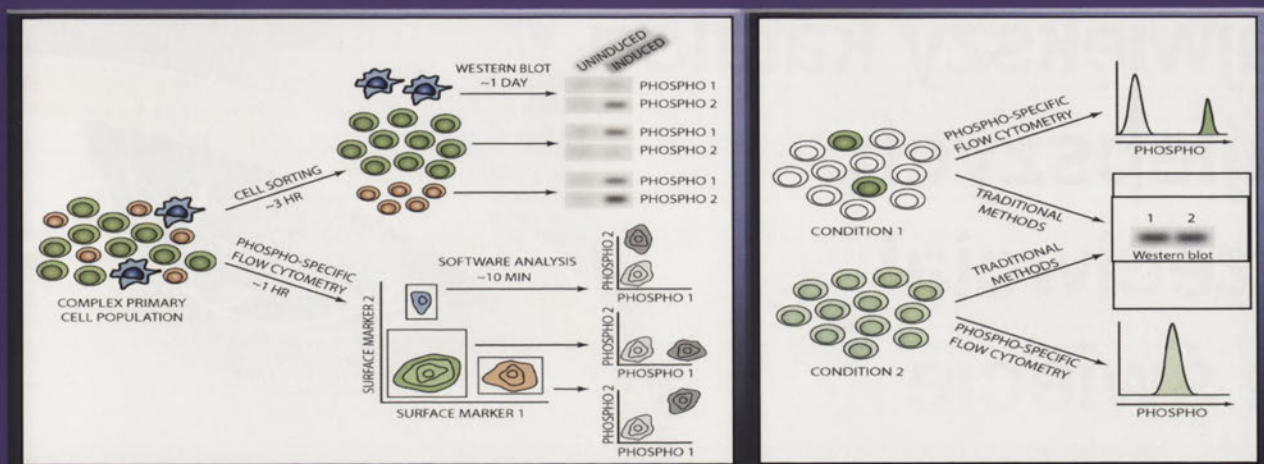
Kwartalnik „Postępy Biochemii” jest wydawany z pomocą finansową Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wzwyższego

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

BD Phosflow™

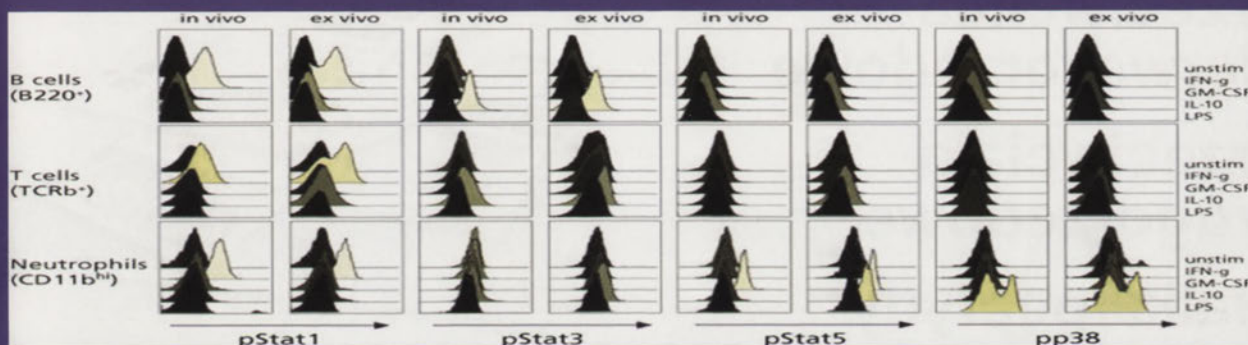
Odczynniki do Cytometrycznej, Wieloparametrowej Analizy Transdukcji Sygnału

Phosflow™ a Western Blot



Wieloparametrowa Analiza Danych

Wynik z Pojedynczej Komórki



Wiele ufosforylowanych białek w różnych typach komórek badanych z użyciem BD Phosflow™ (oprogramowanie Cytobank)



Helping all people live healthy lives

ZALETY BD Phosflow™:

- Pomiar ufosforylowanych białek z jednoczesnym określeniem fenotypu komórki
- Szybkość i mniejsza ilość próbki niż w Western Blot
- Gotowe zestawy lub pojedyncze odczynniki
- Prosta analiza z bezpłatnym oprogramowaniem

Jeżeli chesz dowiedzieć się więcej, odwiedź naszą stronę:

<http://www.bdbiosciences.com/research/phosflow/>

BD Biosciences
ul. Królowej Marysieńki 90
02-954 Warszawa
tel.: +48 /22/ 651 62 52
fax.: +48 /22/ 651 75 89
www.bdbiosciences.com
amelia_niewodzka@europe.bd.com



Największy katalog najlepszych przeciwciał na świecie

- Przeciwciała pierwszorzędowe
- Przeciwciała drugorzędowe
- Białka/peptydy
- Kity
- Lizaty
- Skrawki tkankowe
- Matryce przeciwciał na zamówienie



Katalog online www.abcam.com

Zapytania i
zamówienia
(w j. angielskim) orders@abcam.com
tel. +44 1223 696000
fax +44 1223 771600

XLV ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA BOCHEMICZNEGO WISŁA, 20-23 WRZEŚNIA 2010 R.

W dniach 20-23 września 2010 roku odbył się XLV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Obrady w całości odbyły się w Hotelu Gołębiowski w Wiśle. Honorowy Patronat nad Zjazdem objęła Prezydent Miasta Zabrze, pani Małgorzata Mańka-Szulik. W Zjeździe wzięli udział Honorowi Członkowie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego: prof. Jolanta Barańska, prof. Janina Kwiatkowska-Korczak, prof. Andrzej Dżugaj (Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego), prof. Edward Bańkowski, prof. Jerzy Chmielowski oraz prof. Mieczysław Choraży.

W XLV Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego uczestniczyło ponad 560 osób; wśród nich goście ze Stanów Zjednoczonych, Kanady, Niemiec, Francji oraz, jak co roku, liczna grupa zaprzyjaźnionych biochemików z Białorusi. Wśród uczestników Zjazdu przewagę stanowili młodzi naukowcy, studenci i doktoranci.

Uroczystość inauguracji poprzedzona została posiedzeniem Zarządu Głównego Towarzystwa, któremu przewodniczył Prezes PTBioch prof. Andrzej Dżugaj. W czasie spotkania m.in. powołano członków komisji, która podczas Zjazdu miała dokonać oceny prac zgłoszonych do nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego. W czasie posiedzenia przedstawiono także przebieg prac związanych z przygotowaniem do przyszłorocznego Zjazdu, który odbędzie się w Krakowie.

Organizatorem tegorocznego Zjazdu był Katowicki Oddział PTBioch. Pracom Komitetu Organizacyjnego przewodniczyła prof. Ewa Birkner. Członkami Komitetu byli pracownicy Katedry Biochemii Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrzu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

Komitet Naukowy, któremu przewodniczyła prof. Krystyna Olczyk

zgrupował organizatorów poszczególnych sesji zjazdowych, wśród których znaleźli się: prof. Stanisław Bielecki (Łódź), prof. Mieczysław Choraży (Gliwice), prof. Piotr Widłak (Gliwice), prof. Maria Jolanta Rędownicz (Warszawa), prof. Jerzy Pałka (Białystok), prof. Czesław Cierniewski (Łódź), prof. Hanna Jańska (Wrocław), prof. Joanna Bendorowicz-Pikuła (Warszawa), prof. Adam Szewczyk (Warszawa), prof. Aleksander Sieroń (Katowice), prof.

Grzegorz Bartosz (Łódź), prof. Hubert Krotkiewski (Wrocław), prof. Leszek Kaczmarek (Warszawa), prof. Julian Świerczyński (Gdańsk) i prof. Andrzej Szutowicz (Gdańsk).

Inauguracja Zjazdu odbyła się 20 września 2010 r. w Sali Kongresowej Hotelu Gołębiowski. Uroczystość poprowadzili Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego prof. Ewa Birkner i jej współpracownik dr hab. Sławomir Kasperczyk (Fot. 1). Uczestników Zjazdu powitała w imieniu Władz Uczelni prof. Krystyna Olczyk, Prorektor ds. Kształcenia Podyplomowego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego oraz dr Daniel Mikłasiński, Przewodniczący Rady Miejskiej w Sosnowcu.

Otwarcia Zjazdu dokonał Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego prof. Andrzej Dżugaj (Fot. 2), który przedstawił Laureatów Nagrody im. Jakuba

Karola Parnasa (sponsorem nagrody jest Firma Molecular Research Center, Inc, Ohio, Cincinnati, USA) za najlepszą pracę doświadczalną wykonaną w Polsce i opublikowaną w 2009 roku. Nagrodę otrzymali Dawid Walerych, Maciej B. Olszewski, Małgorzata

Gutkowska, Aleksandra Helwak, Maciej Żylicz i Alicja Żylicz za pracę pt.: Hsp 70 molecular chaperones are required to support p53 tumor suppressor activity under stress conditions. *Oncogene*. 2009;

28: 4284-4294. W imieniu Laureatów Wykład Inauguracyjny zatytułowany Who guards a guardian of the genome? p53 as the molecular chaperone substrate, przedstawił dr Dawid Walerych (Fot. 3).

Następnie prof. Dżugaj wręczył nagrody Laureatom konkursów PTBioch. Za najlepszą pracę doktorską w 2009 roku (ufundowaną przez Firmę Merck) Komisja w składzie: prof. Anna Filipek (przewodnicząca), prof. Barbara Nawrot, prof. Lilla Hryniewiecka, prof. Zbigniew Madeja i prof. Michał Woźniak, powołana przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i zaakceptowana przez przedstawiciela firmy „MERCK” (dr Karolina Błachnio), wśród 16 zgłoszonych na konkurs prac doktorskich za najlepszą uznała rozprawę dr Romana Józefa Szczęsn-



Fot. 1. Powitanie gości przez prof. Ewę Birkner i dr hab. Sławomira Kasperczyka.



Fot. 2. Ceremonia otwarcia Zjazdu - prof. Andrzej Dżugaj, Prezes Towarzystwa.

go pt.: Badanie funkcji ludzkiej helikazy hSuv3p. Praca została wykonana w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie pod kierunkiem prof. Ewy Bartnik.

Nagrodę im. prof. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł opublikowany w Postęпах Biochemii w roku 2009 otrzymały mgr Marta Olchowik i dr hab. Marta Miączyńska z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej za pracę przeglądową pt.: Białka efektorowe GTPazy Rab5 w regulacji endocytozy i przekazywania sygnałów.

Nagrodę Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (ufundowaną przez Firmę Sigma-Aldrich Polska) za najlepszą pracę doświadczalną lub teoretyczną z zakresu Chemii i Biochemii Kwasów Nukleinowych przyznano prof. Wojciechowi Stecowi za całokształt pracy.

Stypendia im. Janiny Opieńskiej-Blauth za najlepszą pracę wykonaną i prezentowaną przez autora studenta uzyskali Tomasz Wrzesiński, student IV roku Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu za pracę: Regulation of CYP11A1 gene expression by mitotane in mouse and human adrenocortical cells oraz Marek Adamowicz z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego i Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie za pracę pt.: The role of autophagy in human colon cancer cells HCT 116 induced to senescence via curcumin treatment.

W dalszej części uroczystości prof. Ewa Luchter-Wasylewska, przewodnicząca komitetu organizacyjnego przyszłorocznego Zjazdu zaprosiła wszystkich uczestników na XLVI Zjazd PTBioch, który zostanie zorganizowany wspólnie z Polskim Towarzystwem Biologii Komórki jako II Kongres Polskiej Biochemii i Biologii Komórki w Krakowie. Na zakończenie odbyła się część artystyczna, w której wystąpił kwartet smyczkowy The Strings z Warszawy.

Program naukowy Zjazdu otworzył wykład plenarny pt.: How myosin motors work: insight from ato-

mic resolution structures, wygłoszony przez prof. Annę Houdusse, FEBS National Lecturer. Poszczególne sesje



Fot. 3. Dr Dawid Walerych wygłasza wykład inauguracyjny.

naukowe poświęcone były następującym tematom:

Biochemia Techniczna
Molekularne metody we współczesnej diagnostyce i terapii nowotworów
Cytoskielet i mięśnie
Biochemia Farmaceutyczna
Molekularne mechanizmy progresji nowotworów
Biochemia roślin
Molekularne podłoża chorób
Mitochondria – od biochemii do medycyny
Biochemia macierzy pozakomórkowej
Biochemia przeciwutleniaczy
Cukry a informacja biologiczna
Neurobiologia molekularna
Dydaktyka biochemii
Biochemia kliniczna

Dużym zainteresowaniem cieszyły się wykłady i warsztaty zorganizowane przez firmy: Biocentrum, Perkin-Elmer i Merck.

W czasie trwania Zjazdu komisja powołana przez Zarząd Główny wybrała laureatów do nagrody im. Włodzimierza

Mozołowskiego. W konkursie mogli uczestniczyć autorzy doniesień ust-

nych lub plakatowych, którzy do czasu zamknięcia Zjazdu nie ukończyli 35 lat. Przewodniczącym komisji został prof. Krzysztof Sobolewski, a w jej skład weszli: prof. Maria Rybczyńska, prof. Elżbieta Rębas i dr Jolanta Zalejska-Fiolka.

Komisja przyznała nagrodę mgr Tomaszowi Wysockiemu z Zakładu Biofizyki Molekularnej i Medycznej UM w Łodzi za pracę pt.: Downregulation of MMP-7 by siRNA effects tumor growth and formation of New blood vessels, both *in vitro* and *in vivo* oraz dwa wyróżnienia: mgr Natalii Nowak z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ

w Krakowie za pracę: Involvement of thiamine (vitamin B1) in the response of *Arabidopsis thaliana* seedlings to the environmental stress oraz mgr Monice Litwin z Zakładu Patologii Komórki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego za pracę: Gelsolin-driven podosome formation in human colon cancer cells.

W tym roku po raz pierwszy plakaty zjazdowe były przedstawiane w formie elektronicznej i każdy z uczestników miał możliwość zagłosowania na najlepszą prezentację plakatową. Za najlepszą uznano prezentację pt.: Identification of factors and signaling pathways involved in glioma associated transformation of microglia into tumour-supporting cells autorstwa A. Ellert-Miklaszewskiej, P. Wiśniewskiego, P. Przanowskiego, M. Kijewskiej, B. Kazy, M. Śliwy i B. Kamińskiej. Wyróżnione zostały dwie prezentacje: I.



Fot. 4. Spotkanie towarzyskie.

Papiewska-Pająk, R. Bednarek, Czesław S. Cierniewski, Degradation of fibryn gels by colon adenocarcinoma cells enhanced by vascular endothelial growth factor and thymosin β 4 oraz A. J. Pietrzyk, A. Bujacz, M.

Łochtyńska, M. Jaskólski, G. Bujacz, Isolation, purification and preliminary

crystallographic studies of two major proteins from mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) hemolymph.

Streszczenia wszystkich wystąpień i doniesień wydrukowane zostały dzięki wsparciu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, w Acta Biochimica Polonica (suplement 4).

Uczestnicy Zjazdu, oprócz bardzo aktywnego udziału w obradach, mieli również okazję do spotkań towarzyskich. W pierwszym dniu po zakończeniu uroczystości inau-

guracji odbył się bankiet w Hotelu Gołębiewski, w czasie którego przy lampce wina i smacznej kolacji można było prowadzić dyskusje do późnych godzin. Natomiast w drugim dniu bawiono się przy dźwiękach góralskiej kapeli (Fot. 4). Przez cały okres trwania Zjazdu dopisywała piękna pogoda.

Na zakończenie sprawozdania chciałabym serdecznie podziękować Zarządowi Głównemu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego oraz Redakcji Acta Biochimica Polonica za pomoc i współpracę. Pragnę

także podziękować organizatorom Sesji Naukowych, członkom Komisji ds. Nagród, członkom Komitetów Naukowego i Organizacyjnego za trud włożony w organizację Zjazdu. Szczególnie serdecznie dziękuję również firmie „Galop”, organizatorowi konferencji i kongresów. Bez ich pomocy nie byłoby możliwe tak perfekcyjne zorganizowanie naszego przedsięwzięcia.

Prof. Ewa Birkner
Przewodnicząca Komitetu
Organizacyjnego Zjazdu

ROZSTRZYGNIĘCIE KONKURSU POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO I FIRMY MERCK SP. Z O.O. ZA NAJLEPSZĄ PRACĘ DOKTORSKĄ Z BIOCHEMII W 2009 ROKU

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, na podstawie opinii komisji w składzie: prof. Lilla Hryniewiecka, prof. Barbara Nawrot, dr Karina Błachnio (Merck), prof. Zbigniew Madeja, prof. Michał Woźniak i prof. Anna Filipek (przewodnicząca), ogłasza, że wśród zgłoszonych na konkurs prac doktorskich nagrodę w wysokości 4 500 zł otrzymał **Pan dr Roman Józef Szczęsny** za pracę doktorską p.t. „Badanie funkcji ludzkiej helikazy hSuv3p”. Praca została wykonana w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Bartnik. Wręczenie nagrody odbyło się 20.09.2010 r. podczas uroczystości inauguracji XLV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Wiśle.

SYLWETKA NAUKOWA DR ROMANA J. SZCZĘSNEGO

Roman J. Szczęsny ukończył studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego uzyskując kolejno dwa dyplomy z wyróżnieniem, za pracę licencjacką (2002) oraz magisterską (2004). Promotorem obu prac była prof. dr hab. Ewa Bartnik, a bezpośrednim opiekunem dr Janusz Piechota. Podczas studiów Roman Szczęsny uzyskał Stypendium Ministra Edukacji Narodowej i Sportu, a także odbył 6-miesięczny staż na Uni-



wersytecie w Manchesterze w ramach programu Socrates-Erasmus.

W 2004 roku został przyjęty na studia doktoranckie w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, gdzie wykonywał pracę pod kierunkiem prof. E. Bartnik, przy ścisłej współpracy z prof. Piotrem P. Stępnem i Instytutem Genetyki i Biotechnologii UW. W latach 2005–2008 odbył 3 kilkumiesięczne staże naukowe w wiodących laboratoriach we Francji i Finlandii. W trakcie studiów doktorskich Roman Szczęsny opiekował się studentami wykonującymi zarówno pracę magisterską jak i pracę licencjacką, prowadził ćwiczenia z genetyki i genetyki człowieka na Wydziale Biologii UW, oraz przygotowywał i prowadził zajęcia w Szkole Festiwalu

Nauki. Na swoje badania dotyczące białka hSuv3p dr Szczęsny otrzymał grant promotorski z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, dwa granty wewnętrzne IBB PAN oraz dwa stypendia wyjazdowe – Polonium i FEBS. Był również wykonawcą dwóch grantów prof. P.P. Stępnia.

Roman J. Szczęsny jest współautorem ośmiu publikacji, m.in. w takich czasopismach jak *Nucleic Acids Research*, *EMBO Journal*, *Biology of the Cell*, *Mechanism of Ageing and Development*. Jest laureatem programu START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej „Stypendia krajowe dla młodych uczonych” (edycja 2010), a także zespołowej nagrody Rektora Uniwersytetu Warszawskiego za osiągnięcia naukowe.

Obrona pracy doktorskiej p. Szczęsnego „Badanie funkcji ludzkiej helikazy hSuv3p” odbyła się 1 grudnia 2009 r. Na wniosek obu recenzentów – prof. Krzysztofa Staronia i prof. Janusza Siedleckiego praca doktorska została wyróżniona przez Radę Naukową IBB PAN. Ponadto, dr Szczęsny otrzymał Nagrodę Dyrektora IBB PAN za najlepszą rozprawę doktorską obronioną w 2009 r.

Obecnie dr Szczęsny jest zatrudniony na stanowisku asystenta w Instytucie Genetyki i Biotechnologii UW w grupie kierowanej przez

doc. dr hab. Andrzeja Dziembowskiego. Prowadzi badania dotyczące analizy funkcjonalnej kompleksu egzozozomu oraz degradacji i kontroli jakości RNA u człowieka.

BADANIE FUNKCJI LUDZKIEJ HELIKAZY hSuv3p

STRESZCZENIE PRACY

Roman J. Szczęsny

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN; Instytut Genetyki i Biotechnologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa; e-mail: rszczesny@ibb.waw.pl

Mitochondria są półautonomicznymi organellami występującymi w cytoplazmie prawie wszystkich komórek eukariotycznych. Jedną z głównych funkcji mitochondriów jest przeprowadzanie procesu fosforylacji oksydacyjnej, a powstały w tym procesie trifosforan adenozyne jest źródłem energii użytecznej biologicznie. Poza tym, że mitochondria stanowią centrum energetyczne komórek uczestniczą również w innych procesach metabolicznych niezbędnych do funkcjonowania komórki, np. biosyntezie porfiryn i cyklu mocznikowym.

Od momentu odkrycia mitochondriów, opisanych po raz pierwszy w XIX wieku, nasza wiedza o ich roli i funkcjonowaniu w komórce ciągle się poszerza. Obecnie mitochondria

nie są postrzegane jedynie jako centra energetyczne komórek eukariotycznych. Udział mitochondriów w apoptozie, ich związek ze starzeniem się oraz procesem nowotworzenia, a przede wszystkim odkrycie chorób mitochondrialnych przyczyniło się do jeszcze intensywniejszych badań nad funkcjonowaniem mitochondriów.

Pomimo, że od kilku dekad wiadomo, że mitochondria człowieka posiadają własny system genetyczny, funkcjonowanie tego układu nie zostało w pełni poznane. Chociaż znane są podstawowe procesy umożliwiające realizację mitochondrialnej informacji genetycznej (Ryc. 1) to nie są one w pełni scharakteryzowane na poziomie molekularnym. Co więcej, badania ostatnich lat nad replikacją genomu mitochondrialnego kręgowców [1], w tym człowieka, oraz nad obróbką mitochondrialnego tRNA [2] wskazują, że badanie funkcjonowania mitochondriów jest dziedziną nauki, która nadal kryje wiele tajemnic.

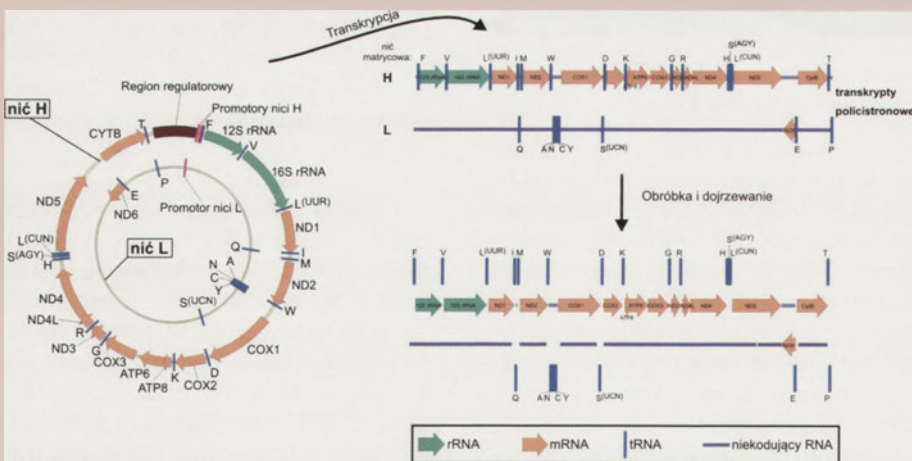
W przypadku człowieka, genom mitochondrialny zawiera jedynie ~0,1% wszystkich genów zawartych w ludzkim DNA, ale każdy z mitochondrialnych genów jest niezbędny do życia organizmu. Szczegółowe poznanie biologii mitochondriów ma nie tylko charakter czysto poznawczy, ale może przybliżyć nas do zrozumienia patogenyzy chorób powodowanych zaburzeniami funkcjonowania mito-

chondriów. Wiedza taka mogłaby pomóc w opracowaniu odpowiednich terapii.

W ramach rozprawy doktorskiej podjęto się próby ustalenia roli helikazy hSuv3p w komórce człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem jej potencjalnej funkcji w mitochondriach. Z wcześniejszych badań wiadomo było, że białko Suv3 drożdży pełni kluczową rolę w metabolizmie mitochondrialnego RNA u *Saccharomyces cerevisiae*. Biorąc pod uwagę rolę helikaz w metabolizmie kwasów nukleinowych, wydawało się logiczne, że poznanie funkcji białka hSuv3p mogłoby przybliżyć nas do zrozumienia biologii mitochondriów. Zadanie to było tym ciekawsze, że rola ta nie musiała być tą jaką pełni jego ortolog w mitochondriach *S. cerevisiae*. Wiadomo bowiem było, że oba białka mają różną preferencję co do rozwijanego substratu, a ekspresja genu *hSUV3* człowieka w komórkach drożdży nie komplementuje delekcji jego drożdżowego ortologa.

W trakcie prowadzonych badań ustalono, że obniżenie ekspresji genu *hSUV3* w komórkach HeLa prowadzi do apoptozy zależnej zarówno od aktywności kaspaz jak i białka AIF (ang. *apoptosis inducing factor*). Przeprowadzone badania z użyciem barwienia immunofluorescencyjnego pozwoliły stwierdzić, że w przypadku niektórych typów komórek helikaza hSuv3p jest białkiem zlokalizowanym zarówno w mitochondriach jak i jądrze komórkowym [3]. Jednak jej podstawową, występującą we wszystkich dotychczas zbadanych komórkach, jest lokalizacja mitochondrialna.

W celu poznania potencjalnych partnerów białkowych helikazy hSuv3p otrzymano stabilne linie komórkowe syntetyzujące białko hSuv3p, lub jego N-końcowy fragment jako kontrolę, w fuzji ze znacznikiem TAP (ang. *tandem affinity purification*). Wykorzystując tandemową chromatografię powinowactwa i mitochondrialne ekstrakty białkowe wykazano, że helikaza hSuv3p współoczyszcza się z białkiem p32 oraz mitochondrialną fosforylazą polinukleotydową (PNPazą), o której wiadomo, że jest rybonukleazą. Oddziaływanie z białkiem p32 potwierdzono m. in.



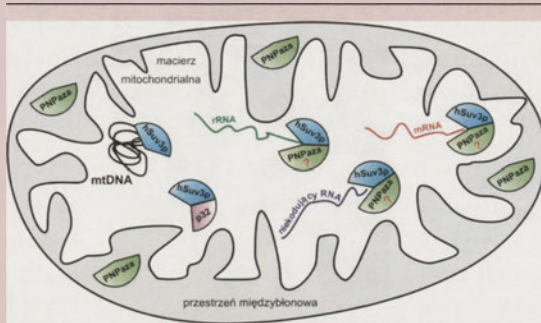
Rycina 1. Mapa i podstawowe etapy ekspresji genomu mitochondrialnego człowieka. Genom mitochondrialny człowieka jest kolistą, dwuniciową cząsteczką DNA (16569 pz) kodującą 37 genów. W przypadku większości genów nicią matrycową jest tak zwana nić H. Transkrypcja mitochondrialnego DNA prowadzi do powstania długich policistronowych transkryptów, których pierwszym etapem obróbki jest wycięcie tRNA, co prowadzi do powstania pierwotnych cząsteczek mRNA, tRNA, rRNA podlegających dalszym etapom dojrzewania oraz niekodującego RNA. Pojedyncze litery oznaczają rodzaj tRNA kodowanego przez dany gen. Zaznaczono geny kodujące białka kompleksów fosforylacji oksydacyjnej oraz rRNA. W regionie regulatorowym znajduje się większość elementów *cis* związanych z regulacją transkrypcji. Dla uproszczenia schematu pominięto transkrypcję obejmującą tylko geny od tRNA^F do tRNA^{L(UUR)}.

oczyszczając oba białka po heterologicznej nadprodukcji w komórkach *Escherichia coli*, a następnie przeprowadzając doświadczenie typu „dot blot”. Wykazanie współocyszczania się helikazy hSuv3p oraz PNPazy pozwoliło zasugerować możliwość istnienia w mitochondriach kompleksu hSuv3p-PNPaza [4], który mógłby uczestniczyć w metabolizmie RNA mitochondrialnego, będąc odpowiednikiem degradosomu bakteryjnego. Wiadomo bowiem, że u *E. coli* helikaza RhlB wraz z PNPazą wchodzi w skład degradosomu, kompleksu odpowiedzialnego za degradację RNA. Informacja taka jest tym ważniejsza, że dotychczas nie wiadomo jaki enzym odpowiada za degradację RNA w mitochondriach człowieka.

Aby zbadać mitochondrialną funkcję helikazy hSuv3p opracowano odpowiedni model komórkowy [4]. Jego

podstawowym założeniem było przypuszczenie, że pojawienie się w mitochondriach białka hSuv3p, które nie posiada ani aktywności ATPazy ani helikazy, mogłoby zaburzać funkcjonowanie białka endogennego. Zbadanie zmian w metabolizmie mitochondrialnych kwasów nukleinowych powodowanych takim zaburzeniem mogłoby pozwolić na określenie funkcji pełnionej przez hSuv3p. Otrzymany model składa się z pięciu stabilnych linii komórkowych. Dwie z nich w regulowany sposób wyrażają wprowadzony do ich genomu jądrowego gen kodujący aktywną lub pozbawioną aktywności helikazowej formę białka hSuv3p. Pozostałe linie komórkowe, służące jako kontrole, to komórki z wstawionym pustym wektorem lub genem kodującym aktywną (lub nieaktywną) katalitycznie formę helikazy hSuv3p pozbawioną sekwencji kierującej to białko do mitochondriów. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że nad-

produkcja katalitycznie nieaktywnej formy hSuv3p pełnej długości powoduje zaburzenie funkcjonowania mitochondriów. Wykazano, że nie wynika to ani z obecności w pożywce induktora wprowadzonych genów, ani z pojawienia się w mitochondriach dużej ilości białka mitochondrialnego. Udowodniono, że obserwowany efekt jest zależny od mitochondrialnej funkcji hSuv3p. Co więcej, doświadczenia z obniżeniem poziomu białka hSuv3p za pomocą siRNA pozwoliły wykazać, że zaburzenie funkcji pełnionej przez hSuv3p przez nadpro-



Rycina 2. Udział helikazy hSuv3p w metabolizmie mitochondrialnych kwasów nukleinowych. Helikaza hSuv3p uczestniczy w degradacji mRNA i rRNA, a także jest niezbędna do usuwania produktów ubocznych obróbki mitochondrialnego RNA i niekodującego RNA. Procesy te odbywają się z udziałem rybonukleazy PNPazy lub innego niezidentyfikowanego białka o aktywności nukleolitycznej. Funkcja pełniona przez hSuv3p jest niezbędna do utrzymania właściwego poziomu mitochondrialnego DNA. Białko to oddziałuje z białkiem p32, przy czym rola tego oddziaływania nie jest obecnie znana.

kach obojętnych wykazano, że funkcja pełniona przez białko hSuv3p jest niezbędna do prawidłowej replikacji DNA mitochondrialnego, przebiegającej według mechanizmu, w którym nic opóźniona początkowo syntetyzowana jest jako RNA (RITOLS, ang. *ribonucleotide incorporation throughout the lagging-strand*). Uzyskane wyniki wskazują, że pozbawienie komórki funkcji pełnionej przez hSuv3p powoduje zatrzymanie tego typu replikacji już na wczesnym etapie inicjacji.

Przy użyciu uzyskanego modelu komórkowego oraz techniki siRNA udowodniono, że helikaza hSuv3p jest niezbędna do degradacji RNA mitochondrialnego oraz produktów ubocznych jego obróbki. Tym samym, białko to jest elementem systemu kontrolującego RNA w mitochondriach i pełni jedną z kluczowych ról w metabolizmie mitochondrialnych kwasów nukleinowych [4]. W mitochondriach człowieka znaczącą częścią transkry-

bowanego DNA są fragmenty międzygenowe. RNA powstały w wyniku ich transkrypcji jest bardzo szybko usuwany. Chociaż fakt ten był znany już od ponad 30 lat [5] to dopiero niniejsze badania pozwoliły opisać ten proces na poziomie molekularnym i wskazać, że jest on zależny od aktywności helikazy hSuv3p.

Spowolnienie degradacji RNA mitochondrialnego przez zaburzenie funkcji hSuv3p pozwala na badanie cząsteczek RNA o bardzo krótkim czasie półtrwania. Taki układ doświadczalny pozwolił na wykrycie w mitochondriach człowieka grupy transkryptów nazwanych RNA lustrzanym [4]. Transkrypty te mają bardzo podobną długość do mRNA kodowanych przez genom mitochondrialny, ale powstają w wyniku transkrypcji nici sensownej i tym samym są komplementarne do odpowiadającego im mRNA. Dalsze badania pozwoliły rozstrzygnąć czy lustrzane RNA pełnią funkcję w regulacji ekspresji lub/i replikacji genomu mitochondrialnego. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na identyfikację helikazy hSuv3p jako białka uczestniczącego w degradacji kodującego i niekodującego mitochondrialnego RNA (Ryc. 2). Według dostępnych danych literaturowych jest to pierwsze białko o takiej funkcji zidentyfikowane u kręgowców.

Stosując ten model oraz technikę dwukierunkowej elektroforezy DNA w warunkach

PIŚMIENNICTWO

- Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT (2000) Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 100: 515-524
- Holzmann J, Frank P, Löffler E, Bennett KL, Gerner C, Rossmannith W (2008) RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* 135: 462-474
- Szczesny RJ, Obriot H, Paczkowska A, Jędrzejczak R, Dmochowska A, Bartnik E, Formstecher P, Polakowska R, Stepien PP (2007) Down-regulation of human RNA/DNA helicase SUV3 induces apoptosis by a caspase- and AIF-dependent pathway. *Biol Cell* 99: 323-332
- Szczesny RJ, Borowski LS, Brzezniak LK, Dmochowska A, Gewartowski K, Bartnik E, Stepien PP (2010) Human mitochondrial RNA turnover caught *in flagranti*: involvement of hSuv3p helicase in RNA surveillance. *Nucleic Acids Res* 38: 279-298
- Aloni Y, Attardi G (1971) Symmetrical in vivo transcription of mitochondrial DNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 1757-1761

Prezydent Bronisław Komorowski podpisał nowelizację przepisów reformujących system nauki. Nowelizacja jest związana z pakietem pięciu rządowych ustaw reformujących polską naukę przyjętych przez Sejm w marcu bieżącego roku, a podpisanych w maju przez Bronisława Komorowskiego, wykonującego obowiązki prezydenta RP. Są to ustawy: o zasadach finansowania nauki, o Narodowym Centrum Badań i Rozwoju, o Narodowym Centrum Nauki, o instytutach badawczych, o Polskiej Akademii Nauk oraz poselskiej ustawy wprowadzającej przepisy przejściowe. Zakładają one m. in. decentralizację finansowania nauki i związane z jej z sektorem gospodarczym, powołanie Narodowego Centrum Nauki i likwidację najgorzej ocenianych jednostek naukowych. Narodowe Centrum Nauki ma być instytucją, która w otwartych konkursach przyznawać będzie pieniądze na realizację przez naukowców najambitniejszych projektów w dziedzinie badań podstawowych. O granty na badania (w tym także zakup niezbędnej aparatury) będą się mogły ubiegać instytuty naukowe, zespoły badawcze i naukowcy prowadzący indywidualne projekty. Narodowe Centrum Nauki działa od roku akademickiego 2010/11. 24-osobowa Rada złożona z wybitnych uczonych tworzyć będzie najważniejszy organ NCN. Rada przygotuje konkurs na dyrektora zarządzającego Centrum, i z nim będzie decydować o dyscyplinach, w których ogłaszane będą konkursy. Rada będzie wyłoniona do końca 2010 roku. Podpisana nowelizacja rozszerza w ustawie lustracyjnej katalog osób pełniących funkcje publiczne, wprowadzając do niego dyrektora Narodowego Centrum Nauki, jego zastępców oraz zastępców dyrektora Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, co oznacza, że osoby te będą musiały składać oświadczenia lustracyjne, a w przypadku stwierdzenia ich niezgodności z prawdą zostaną pozbawione pełnionych przez nie funkcji publicznych (PAP).

Instytucje naukowe, które otrzymały najniższe oceny Ministerstwa

Nauki i Szkolnictwa Wyższego dostaną w 2011 roku o połowę mniej pieniędzy na działalność. Resort zapowiada, że zaoszczędzone pieniądze zostaną rozdzielone w konkursach na badania. Informacje o ocenie instytucji naukowych resort nauki opublikował w końcu września b.r. na swojej stronie internetowej, wykazując w ocenie parametrycznej w skali od 1 do 5 potencjał naukowy jednostek badawczo-rozwojowych, instytutów PAN, jednostek organizacyjnych uczelni i innych podmiotów prowadzących działalność naukową (np. firm lub fundacji). Na tej podstawie resort nauki przydzieli fundusze w ramach tzw. dotacji na działalność statutową, czyli utrzymanie samej instytucji oraz niektóre badania i konserwację sprzętu. Ekspertzy z różnych dziedzin ocenili blisko tysiąc instytucji, biorąc pod uwagę m.in. liczbę i stopnie naukowe pracowników, osiągnięcia naukowe placówki i wyposażenie. Instytucje należące do czwartej i piątej kategorii (najniższe) w 2011 roku będą mogły liczyć na dotację statutową tylko na sześć miesięcy, a w tym czasie będą musiały przeprowadzić restrukturyzację, zmianę sposobu działania lub starania o przyłączenie do silniejszej placówki. Wśród jednostek kategorii 4 i 5 nie ma instytutów PAN. Po upływie roku jednostki będą mogły wystąpić o ponowne oceny; przyznanie placówce wyższej kategorii da jej możliwość uzyskania wyższych dotacji na działalność statutową (PAP).

Kobiety naukowcy ze stopniem doktora wychowujące małe dzieci otrzymały od Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (FNP) dofinansowanie o łącznej wartości ponad 5,5 mln złotych, w ramach programu „Pomost”. Program umożli-

liwia najlepszym naukowcom wychowującym małe dzieci lub oczekującym urodzenia dziecka, powrót do zaawansowanej pracy naukowej. Laureatki otrzymały granty o średniej wartości 553 tys. zł na realizację projektów badawczych z udziałem studentów i doktorantów. Laureatkami I edycji programu „Pomost” zostały:

dr Magdalena Banach-Orłowska (Fot. 1) z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie; **dr Anna Kicińska** z Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; **dr Barbara Michalec** z Instytutu Fizyki Jądrowej PAN; **dr hab. Katarzyna Pernal** z Instytutu Fizyki Politechniki Łódzkiej; **dr Dorota Pierścińska** z Instytutu Technologii Elektronowej; **dr Izabela Szafraniak-Wiza** z Wy-

działu Budowy Maszyn i Zarządzania Politechniki Poznańskiej, **dr Barbara Piętka** z Wydziału Fizyki i **dr Aneta Suwińska** (Fot. 2) z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, **dr Aneta Kasza** (Fot. 3) z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii oraz **dr hab. Joanna Łojewska** (Fot. 4) z Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Do udziału w I edycji programu zgłosiło się 79 kandydatek. Wnioski mogli składać również mężczyźni, którzy korzystali z urlopów lub przerw w pracy związanych z posiadaniem dziecka, trwających nieprzerwanie przez co najmniej 6 miesięcy. Formuła programu opiera się na możliwości prowadzenia badań w niepełnym wymiarze czasu pracy i wsparciu ze strony młodych naukowców w realizacji badań. Ma stworzyć komfortowe warunki pracy, sprzyjające efektywnemu godzeniu roli mamy z pracą naukowca. Nowy program FNP sprzyja utalentowanym naukowcom



Fot. 1. Dr Magdalena Banach-Orłowska



Fot. 2. Dr Aneta Suwińska

zmierzającym do godzenia kariery naukowej z rodzicielstwem. Warunki programu mogą pomóc ograniczyć odchodzenie z nauki najzdolniejszych kobiet. Wcześniej w ramach programu „Pomost” FNP nagrodziła już kobiety pracujące naukowo w trakcie ciąży. Do końca 2015 roku Fundacja przeznaczy ponad 25 mln złotych na granty dla matek i ojców, którzy po przerwie związanej z opieką nad dzieckiem, chcą wrócić do pracy badawczej. Naukowcy zainteresowani udziałem w II edycji programu i uzyskaniem dofinansowania, mogli składać swoje wnioski do 15 października br. Program jest współfinansowany ze środków Unii Europejskiej z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

Prezes PAN prof. Michał Kleiber, przy okazji nagród Ig Nobli za dokonania, które najpierw prowokują do śmiechu, a później do zastanowienia, uznał, iż projekty badawcze, których tytuły brzmią śmiesznie mogą w przyszłości stać się poważnym odkryciem. Profesor upatruje w zabawnym przedstawieniu nauki sposób na przyciągnięcie zainteresowania do projektów zawierających poważne wnioski.

Polscy biolodzy – Łukasz Sokołowski (Fot. 5) i Justyna Słowiak (Fot. 6) – zostali zdobywcami pierwszej i drugiej nagrody w 22. unijnym konkursie dla młodych naukowców w Lizbonie. Praca Łukasza Sokołowskiego p.t. „W jaki sposób żerują mrówki *Formica cincta*” została przez niego przygotowana, gdy był uczniem XXI LO im. Bolesława Prusa w Łodzi; aktualnie jest studentem Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Pierwszą nagrodę przyznano także pracom autorów z Czech i Węgier. Justyna Słowiak zdobyła

jedną z trzech drugich nagród za pracę „Bioróżnorodność, paleoekologia

i pozycja taksonomiczna kręgowców środkowotriasowego systemu morskiego Śląska”. Laureatka jest absolwentką I LO im. Mikołaja Kopernika w Opolu, a obecnie studiuje w

Kolegium MISMaP na Uniwersytecie Warszawskim. W 2009 roku Justyna Słowiak znalazła się wśród laureatów Międzynarodowego Konkursu Ilustracji Dinozaurów 2009; Jej pasją są dinozaury. Pod Tarnawskimi Górami znalazła dolną szczękę ichtiozaura, a jest to jedno z trzech znalezisk dokonanych na świecie. Polskę reprezentowała również Marta Ubik, absolwentka II LO im. Jana III Sobieskiego w Krakowie, studiująca na II roku Wydziału Matematyki i Informatyki UJ z pracą „Oszacowanie sumy długości przekątnych”. Polacy od 1995 roku zdobyli już 19 nagród głównych i wiele nagród specjalnych. Konkurs Prac Młodych Naukowców Unii Europejskiej, zapoczątkowany staraniem Komisji Euro-

pejskiej, ma usprawniać współpracę i wymianę myśli. Celem konkursu jest zachęcenie młodych ludzi do rozwijania zainteresowań naukowych oraz podjęcia kariery naukowej. W tegorocznej edycji konkursu 125 uczestników, reprezentujących 37 krajów z całej Europy oraz z Kanady, Stanów Zjednoczonych, Chin i Brazylii 85 projektów. Projekty te wcześniej zdobyły pierwsze nagrody w krajowych eliminacjach konkursu, a ich tematyka dotyczy biologii, chemii, informatyki lub nauk społecznych. Strona internetowa ze szczegółowymi informacjami na temat zwycięzców i wszystkich projektów uczestniczących w konkursie: http://ec.europa.eu/research/youngscientists/index_en.cfm.

Nową, prostą metodę analizy równowagi reakcji chemicznych zachodzących w roztworach opracowano w Instytucie Chemii Fizycznej PAN. Może ona znaleźć zastosowanie np. w chemii, biologii molekularnej, farmacji i w medycynie. Nowa technika pozwala w tani i pewny sposób określić trwałość kompleksów powstających w wyniku reakcji zachodzących między związkami chemicznymi w roztworach. Metoda została zgłoszona do opatentowania. Metoda pozwala w krótkim czasie (30 min) na ustalenie jak i w jakim stopniu lek jest wiązany we krwi pacjenta, a dzięki temu możliwe będzie ustalenie optymalnego leczenia, jeszcze przed rozpoczęciem kuracji. W metodzie wykorzystane jest zjawisko dyfuzji między warstwami cieczy płynących z różnymi prędkościami, a o trwałości kompleksów decydują współczynniki dyfuzji i stała trwałości kompleksu. W Instytucie zostało opracowane urządzenie pozwalające na zbadanie trwałości kompleksów chemicznych. Powodzenie wdrożenia metody zależy obecnie od aktywności przemysłu (wg Nauka w Polsce).

Wmurowanie kamienia węgielnego pod Centrum Badań Przedklinicznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, w którym prowadzone

będą badania nad chorobami cywilizacyjnymi, odbyło się 23 września b.r. na Kampusie Ochota przy ul. Księcia Trojdena w Warszawie. Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii (CePT) jest wspólną inicjatywą Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Uniwersytetu Warszawskiego, Politechniki Warszawskiej oraz siedmiu instytutów PAN. Centrum jest główną inwestycją w ramach ca-



Fot. 3. Dr Aneta Kasza



Fot. 4. Dr hab. Joanna Łojewska

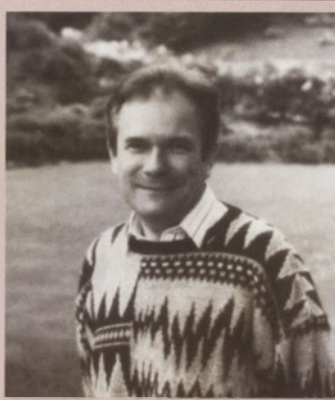


Fot. 5. Łukasz Sokołowski



Fot. 6. Justyna Słowiak

łego Projektu CePT – największego przedsięwzięcia biomedycznego i biotechnologicznego w Europie Środkowo-Wschodniej. Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego finansuje CePT (360 mln złotych) ze środków unijnego Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. W Centrum Badań Przedklinicznych WUM będą prowadzone badania nad chorobami układu krążenia, układu nerwowego, nowotworami i problemami związanymi ze starzeniem się. Pracownicy Centrum będą przyjazne dla projektów instytucji założycielskich i współpracujących. Docelowo w budynku pracować będzie blisko 300 osób – fizjologów, farmakologów, patologów, biochemików, mikrobiologów. Zaplanowano zwiększenie i strefy wypoczynku. Przewidywany termin oddania do użytku – grudzień 2012 r. (wg Nauka w Polsce).



Fot. 7. Prof. dr hab. Jacek Krelowski

Dr Wojciech Gutowski, lider zespołu australijskich naukowców, odkrył pierwszą na świecie technologię pokrywania farbą plastików, która nie emituje zanieczyszczeń. Technologia ta ma szansę zrewolucjonizować przemysł samochodowy. Za swoje odkrycie dr Gutowski otrzymał 50 tys. dol., a jego zespół otrzymał prestiżową australijską nagrodę „Victoria Prize”. Dr Gutowski rozwinął technologię pokrywania powierzchni przy użyciu sproszkowanej żywicy nie zawierającej rozpuszczalnika. Umożliwia ona farbom proszkowym, farbom i barwnikom przywieranie do plastiku. Dzięki odkryciu i zastosowaniu farb metalowe części samochodów i budynków będą mogły być zastąpione lżejszymi i tańszymi częściami z plastiku i materiałów kompozytowych. Nagrody zostały wręczone 13 września b.r. w siedzibie australijskiego rządu. Jak wyjaśniają organizatorzy Victoria Prize w filmie poświęconym wynalazkowi dr Gutowskiego (<http://www.youtube.com>) podczas pokrywania metali farbą proszkową, materiałom nadawany jest przeciwny ładunek elektryczny niż farbie. Dzięki temu materiały przyciągają się i

proszek przywiera do materiału. Natomiast plastik nie przewodzi prądu, więc farba od niego odpada. Wojciech Gutowski studiował na wydziale inżynierii mechanicznej na Politechnice Szczecińskiej, gdzie zrobił doktorat. Do Australii wyjechał w 1981 r. Obecnie pracuje w CSIRO, australijskiej organizacji naukowo-badawczej, gdzie jest liderem zespołu badawczego zajmującego się naukami materiałowymi (wg Nauka w Polsce).

W międzygwiazdnych obłokach o ekstremalnie małej gęstości naukowcy, m.in. Polacy, znaleźli cząsteczkę chemiczną o nieoczekiwanej złożonej strukturze. Odkrycie zmienia sposób myślenia o procesach chemicznych zachodzących w pozornie pustych obszarach Galaktyki. Badania z użyciem 8-metrowego teleskopu w Paranal Obserwatorium w Chile przeprowadził zespół naukowców z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika (UMK) w Toruniu, Europejskiego Obserwatorium Południowego (ESO), Instytutu Chemii Fizycznej PAN (IChF PAN) w Warszawie oraz Uniwersytetu w Seulu. Grupą kieruje prof. dr hab. Jacek Krelowski (Fot. 7) z Centrum Astronomii UMK. W przezroczystych obłokach materii międzygwiazdnej wykryto kation dwuacetyleny, cząsteczkę zbudowaną z dwóch atomów wodoru i czterech atomów węgla (wg Nauka w Polsce). Large Hadron Collider (LHC) – gigantyczny akcelerator do badania najmniejszych cząstek materii – działa już z połową zaplanowanej energii. Large Hadron Collider (Wielki Zderzacz Hadronów), znajdujący się w ośrodku badawczym Europejskiej Organizacji Badań Jądrowych (CERN)

pod Genewą, został po raz pierwszy uruchomiony we wrześniu 2008 r. Po początkowych trudnościach, w tym poważnej awarii, która wstrzymała pracę akceleratora na kilka miesięcy, ostatecznie aparatura zaczęła działać w marcu tego roku i od tej pory regularnie dochodzi w nim do zderzeń cząstek. Za bezkolizyjną pracę zderzacza odpowiada zespół dr Siemko. Pod koniec sierpnia intensywność wiązki została podwojona, w kolejnych miesiącach będzie zwiększana, aż do końca 2011 roku, i fizycy mają nadzieję osiągnąć blisko połowę maksymalnej zaplanowanej intensywności wiązki. W tym czasie ma też wzrosnąć energia LHC; maszyna jest zaprojektowana do rozpędzania protonów do energii 7 TeV. Po tym czasie akcelerator zostanie wyłączony, aby, kilkunastu miesiącach uruchomić go z maksymalną energią (wiosna 2013 roku). LHC znajduje się 100 metrów pod ziemią w specjalnym kolistym tunelu o średnicy ok. 9 km i o obwodzie 27 km. Został zaprojektowany do poszukiwania nie odkrytych do tej pory cząstek elementarnych (wśród nich cząstki Higgosa, która miałaby wpływać na masę wszystkich innych cząstek) oraz do symulacji w mikroskali zjawisk podobnych do tych, jakie mogły zachodzić w pierwszych sekundach po Wielkim Wybuchu. Wszystko po to, aby lepiej poznać zasady, rządzące otaczającym nas światem (wg Nauka w Polsce).



Fot. 8. Prof. Marcin Opałło

Naukowcy z Instytutu Chemii Fizycznej PAN w Warszawie pracują nad elektrodami o powierzchniach pokrytych warstwami nanocząstek węgla i enzymami. Elektrody te będzie można wykorzystać do produkcji nowoczesnych czujników i źródeł prądu, w tym bioogniw paliwowych, instalowanych wewnątrz ciała człowieka i zasilanych substancjami zawartymi we krwi. Obecnie wymiana zasilania w rozrusznikach serca wymaga metod inwazyjnych. Na świecie od kilku lat trwają prace nad zbudowaniem bioogniwa, co wymaga znalezienia podłoża umożliwiającego trwałe osadzenie enzymu, w taki

sposób, aby wymieniał elektrony bezpośrednio z elektrodą. Udało się to w IChF PAN dzięki naniesieniu na elektrodę nanocząstek węgla. Elektrody pracują w roztworach o składzie zbliżonym do osocza krwi. Nanocząstki węgla w doświadczeniach prowadzonych w IChF PAN mają rozmiary poniżej 10 nanometrów, a grubość gotowych warstw węglowych sięga nieco ponad 100 nanometrów. Naukowcy IChF PAN, pod kierownictwem prof. **Marcina Opallo** (Fot. 8) pracują nad wydajnością elektrod oraz nad ich zastosowaniem w czujnikach elektrochemicznych.

Wszechnica Żywniowa Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, działa od 1994 roku. Jej zadaniem jest upowszechnianie wiedzy o prawidłowym żywieniu człowieka. Prelekcje odbywają się 9 razy w roku. Przeznaczone są dla społeczeństwa Warszawy i okolic. Tematyka wykładów jest zróżnicowana, dostosowana do zainteresowań słuchaczy i uwzględniająca

aktualne problemy żywieniowe naszego społeczeństwa oraz najnowsze osiągnięcia nauki. W tym roku akademickim Wszechnica proponuje wykłady otwarte w każdą третią środę miesiąca, godz. 17:15 na Wydziale Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW. Zaplanowane w kolejnej edycji spotkania proponują wykłady o produktach kiszonych, o związku chorób oczu z żywieniem, o wegetarianizmie, etc. Prelekcje prowadzą specjaliści z zakresu tematycznego. Więcej szczegółów oraz prezentacje z poprzednich lat na stronie: http://wszechnica_zywniowa.sggw.pl/.

Prof. dr Andrzej Bylicki, chemik, autor wielu publikacji i patentów zmarł w wieku 94 lat w Warszawie – poinformowała rodzina naukowca. Prof. Bylicki był bliskim współpracownikiem prof. Wojciecha Świętosławskiego, wybitnego polskiego fizykochemika; prezesem Fundacji im. Wojciecha Świętosławskiego na Rzecz Wspierania Nauki

i Rozwoju Potencjału Naukowego w Polsce. Przez kilkadziesiąt lat pełnił wiodącą rolę kierując w Polskiej Akademii Nauk polską szkołą badań nad węglem; kierował m.in. Centralnym Programem Badań Podstawowych „Struktura i własności węgla i podstawy metod ich przetworstwa”. Przez wiele lat (1980–1990) był przedstawicielem Polski w Międzynarodowym Komitecie Unii Naukowych CODATA. Prof. Bylicki był organizatorem sesji Zgromadzenia Ogólnego CODATA w Warszawie, co było szczególnie istotne, ponieważ zgromadzenie to odbywało się podczas stanu wojennego. Był członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego i American Chemical Society. Jest autorem ponad 100 publikacji i 16 patentów, wychował wiele pokoleń chemików, kilkunastu doktorów. Został odznaczony Krzyżem Komandorskim Orderu Odrodzenia Polski. Prof. Bylicki zmarł 24 września.

pod redakcją Teresy Wesołowskiej

XVI EUROPEJSKA KONFERENCJA BIOENERGETYCZNA (EBEC) WARSZAWA 17-22 LIPCA 2010 R.

W dniach 17–22 lipca odbyła się w Warszawie w Starej Bibliotece Uniwersyteckiej 16-ta Europejska Konferencja Bioenergetyczna. Idea organizowania w Europie konferencji bioenergetycznych, na wzór podobnych konferencji („gordonowskich”) odbywających się w Stanach Zjednoczonych, nurtowała naukowców Starego Kontynentu od dawna. Wprawdzie począwszy od 1965 r. odbywały się coroczne konferencje o tematyce bioenergetycznej organizowane przez prof. Ernesto Quagliariello na Uniwersytecie w Bari (Włochy), jednakże była to w pewnym sensie osobista inicjatywa tego wpływowego włoskiego uczonego. Dlatego na Zjeździe FEBS w Dreźnie w 1978 r. zawiązała się grupa inicjatywna europejskich bioenergetyków celem przygotowania gruntu pod regularne konferencje bioenergetyczne na kontynencie europejskim. Grupie tej przewodzili między innymi profesorowie Lars Ernster (Sztokholm) i G.F.

Azzone (Padwa). Ze strony polskiej brał w niej udział prof. Lech Wojtczak (Warszawa). Postanowiono, że konferencje o nazwie European Bioenergetics Conferences (w skrócie EBEC)

rencjami gordonowskimi. W rezultacie pierwszy EBEC odbył się w 1980 r. w Urbino (Włochy). Szesnasty EBEC w Warszawie w 2010 r. przypada więc w trzydziestą rocznicę tej konferencji.



Fot. 1. Przerwa w obradach. W tle budynek Starej Biblioteki Uniwersytetu Warszawskiego (Krakowskie Przedmieście 26/28). Autor zdjęcia: Anna Mirgos.

organizowane będą w różnych krajach europejskich co dwa lata, na przemian z odbywającymi się w Ameryce również co dwa lata bioenergetycznymi konfe-

W tegorocznej, warszawskiej konferencji wzięło udział ponad 530 naukowców z prawie wszystkich krajów europejskich, w tym najwięcej z Niemiec (87 osób). Spoza Europy licznie reprezentowane były Stany Zjednoczone (43 uczestników) i Japonia (26), lecz przybyli również, choć nieliczni, bioenergetycy z Korei Południowej, Brazylii, Izraela, Meksyku, Singapuru, Australii i Nowej Zelandii. Zarejestrowanych uczestników z Polski było 76. W Konferencji brała udział również liczna grupa doktorantów, głównie z placówek naukowych stolicy, którzy jako wolontariusze pomagali przy obsłudze obrad, a jednocześnie mogli w nich uczestniczyć.



Fot. 2. Otwarcie konferencji. Za stołem prezydalnym od lewej: prof. Jerzy Duszyński i prof. Lech Wojtczak. Przy mównicy prof. Adam Szewczyk. Autor zdjęcia: S. Skrzeczyński/beCreative.pl.

Głównym organizatorem Konferencji był Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN w Warszawie, a współorganizatorami Sekcja Bioenergetyki Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Polska Sieć Mitochondrialna. Konferencję wsparło finansowo Ministerstwo Nauki i



Fot. 3. W trakcie obrad. W pierwszym rzędzie siedzą (od lewej): sir John E. Walker, laureat Nagrody Nobla, i prof. Jerzy Duszyński. Autor zdjęcia: S. Skrzeczyński/beCreative.pl.

Szkolnictwa Wyższego (dotacja na wydawnictwa konferencyjne), a także Polska Sieć Mitochondrialna, International Union of Biochemistry and Molecular Biology oraz firmy biotechnologiczne. Umożliwiło to między innymi przyznanie 23 stypendiów dla młodych naukowców spoza Polski.

Powierzenie Polsce organizacji szesnastej Konferencji EBEC było wyrazem uznania przez Międzynarodowy Komitet Doradczy EBEC wkładu naszego kraju w badania w tej dziedzinie. Ofertę goszczenia Konferencji w naszym kraju złożył cztery lata temu polski delegat

do Komitetu Doradczego, prof. Adam Szewczyk. On też stał się głównym motorem trwających dwa lata przygotowań do tej imprezy. Prof. Adam Szewczyk oraz prof. Jerzy Duszyński (obaj z Instytutu im. Nenckiego) zostali współprzewodniczącymi Konferencji. Honorowym przewodniczącym był prof. Lech Wojtczak (Instytut im. Nenckiego), sekretarzem Komitetu Organizacyjnego prof. Barbara Zabłocka

(Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN), skarbnikiem zaś dr hab. Joanna Szczepanowska (Instytut im. Nenckiego). W pracach Komitetu Organizacyjnego uczestniczyły także prof. Hanna Jańska (Uniwersytet Wrocławski) i prof. Wiesława Jarmuszkiewicz (Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu), które były odpowiedzialne za przeprowadzenie konkursu na stypendia dla młodych naukowców. Zakwaterowanie uczestników, organizację wyżywienia i imprez towarzyszących powierzono firmie Global Wings (Warszawa).

Tematyka konferencji obejmowała główne nurty badawcze z obszaru bioenergetyki zgrupowane w osiemnastu sesjach tematycznych:

1. Łańcuch oddechowy i fotosystemy
2. Syntazy ATP i ATPazy
3. Transportery błonowe
4. Medycyna mitochondrialna
5. Mitochondria, reaktywne formy tlenu i starzenie
6. Poryna mitochondrialna (VDAC)
7. Proteomika mitochondriów
8. Mitochondria w neurodegeneracji
9. Mitochondria jako cel terapeutyczny
10. Białka rozprzegające (*uncoupling proteins*)
11. Oksydazy końcowe
12. Ekspresja genomu mitochondrialnego
13. Biogeneza mitochondriów
14. Bioenergetyka organizmów prokariotycznych
15. Udział mitochondriów w fizjologii komórki, apoptozie i przekazywaniu sygnałów



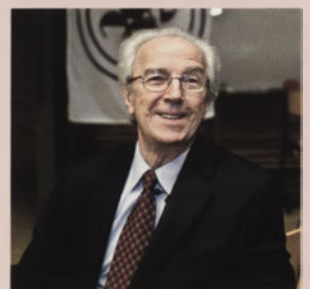
Fot. 4. Prof. Dieter Oesterhelt, laureat Medalu Petera Mitchella. Autor zdjęcia: S. Skrzeczyński/beCreative.pl.



Fot. 5. Prof. Martin Klingenberg, autor Specjalnego Wykładu Wieczornego. Prezentuje album poświęcony Fryderykowi Chopinowi, który na pamiątkę wystąpienia otrzymali wszyscy trzej autorzy wieczornych wykładów specjalnych. Autor zdjęcia: S. Skrzeczyński/beCreative.pl.

16. Mitochondrialne kanały jonowe
17. Bioenergetyka systemowa
18. Struktura i dynamika mitochondriów

W sumie wygłoszono 17 wykładów plenarnych, 98 wykładów sesyjnych oraz 3 specjalne wykłady wieczorne. Ponadto przedstawiono 28 krótkich ustnych prezentacji wybranych posterów oraz 8 wykładów naukowo-metodycznych. Wśród autorów referatów plenarnych było dwóch laureatów Nagrody Nobla: Hartmut Michel (Frankfurt, Niemcy) i sir John E. Walker (Cambridge, Wielka Brytania). Ponad-



Fot. 6. Prof. Ernesto Carafoli, autor Specjalnego Wykładu Wieczornego. Autor zdjęcia: S. Skrzeczyński/beCreative.pl.

to wykład plenarny wygłosił Dieter Oesterhelt (Martinsried, Niemcy), laureat medalu Petera Mitchella, specjalnego wyróżnienia przyznawanego z okazji każdej konferencji EBEC. Warto również wspomnieć, że jeden z referatów plenarnych został wygłoszony przez wybitnego badacza fotosyntezy, Pierre'a Joliota (Paryż, Francja), wnuka Marii Skłodowskiej-Curie. Nowością na warszawskiej konferencji EBEC było zorganizowanie specjalnych Sesji Wieczornych dla trzech wybitnych specjalistów w dziedzinie bioenergetyki: Martina Klingenberga (Monachium), Ernesto Carafoli'ego (Padwa) i Vladimira P. Skulacheva (Moskwa).



Fot. 7. Prof. Vladimir P. Skulachev, autor Specjalnego Wykładu Wieczornego, w trakcie dyskusji. Autor zdjęcia: Anna Mirgos.

W trakcie konferencji Ernesto Carafoli otrzymał nagrodę im. Marcelego Nenckiego za dorobek naukowy oraz za kilkudziesięcioletnią współpracę naukową z polskimi ośrodkami nauki, a szczególnie z Instytutem Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego.

Program uzupełniły dwie sesje dyskusyjne związane z tematyką konferencji (*hot topic discussions*), w których wzięło udział kilkadziesiąt osób. Dużym zainteresowaniem cieszyły się również trzy sesje metodyczne poświęcone: (1) obrazowaniu mitochondriów, (2) pomiarom oddychania i potencjału elektrycznego na wewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz (3) analizie mitochondrialnych kanałów jonowych. W ich trakcie swoje metodyczne uwagi przedstawili nie tylko naukowcy, ale także przedstawiciele firm produkujących aparaturę wykorzystywaną w badaniach. Tego typu prezentacje były po raz pierwszy zorganizowane na konferencji EBEC.

Sesje plakatowe zgromadziły ponad 250 plakatowych doniesień konferencyjnych, z których 28 zostało, jak wspomniano wyżej, przedstawione również w formie krótkich, dziesięciominutowych, doniesień ustnych. Dwoje młodych autorów tych doniesień zostało wyróżnionych nagrodami. Nagrodę pieniężną ufundowaną przez firmę wydawniczą Elsevier otrzymał Michael Zick (Monachium, Niemcy), a wyróżnienie ufundowane przez organizatorów – Joanna Rorbach (Cambridge, Wielka Brytania).



Fot. 8. Joanna Rorbach i Michael Zick, laureaci konkursu na najlepsze ustne wystąpienia młodych uczestników konferencji. Autor zdjęcia: Anna Mirgos.

Pełne teksty większości referatów ukazały się w zeszycie specjalnym *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* (tom 1797, nr 6–7), którego redaktorami byli Lech Wojtczak i Krzysztof Zabłocki. Ponadto z okazji konferencji ukazał się zeszyc specjalny *FEBS Letters* (tom 584, nr 10) pod redakcją Adama Szewczyka i Wilhelma Justa pod tytułem „Intracellular Ion Channels”.

Barbara Zabłocka
Joanna Szczepanowska
Lech Wojtczak

VI edycja konkursu na najlepszą pracę doktorską z biochemii w 2010 roku

Polskie Towarzystwo Biochemiczne i firma Merck Sp. z o.o. ogłaszają szóstą 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 2010 roku. Nagroda obejmuje premię pieniężną dla autora w wysokości 4 500 zł, ufundowaną przez firmę Merck, oraz opublikowanie tej pracy w 4 numerze kwartalnika „Postępy Biochemii” w 2011 roku. Nagrodę przyznaje Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w porozumieniu z firmą Merck. Zgłoszenia kandydatów do Nagrody mogą dokonywać pracownicy naukowcy ze stopniem doktora habilitowanego lub tytułem profesora.

Zgłoszenia w formie listu przewodniego, zawierającego informacje o wyniku głosowania właściwej komisji i rady naukowej lub rady wydziału, wraz z pracą doktorską i kopiami recenzji w formacie pdf należy przesać w nieprzekraczalnym terminie do 1 marca 2011 roku tylko drogą elektroniczną na adres:

j.redowicz@nencki.gov.pl

Rozstrzygnięcie konkursu nastąpi do 31 sierpnia 2011 roku, a uroczyste wręczenie Nagrody odbędzie się na dorocznym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego we wrześniu 2011 roku.

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

M. Jolanta Rędownicz

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

Białka szkieletu jądrowego i otoczki jądrowej w przebiegu cyklu komórkowego – znane białka w nowych rolach

Magda Dubińska-Magiera

Magdalena Zaremba-Czogalla

Ryszard Rzepecki

Pracownia Białek Jądrowych, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

Pracownia Białek Jądrowych, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; tel. (71) 375 63 08, e-mail: rzepecki@ibmb.uni.wroc.pl

Artykuł otrzymano 13 października 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 7 marca 2010 r.

Słowa kluczowe: otoczka jądrowa, szkielet jądrowy, blaszka jądrowa, laminy, cytoszkielet, mitoza

Wykaz skrótów: ER (ang. *endoplasmic reticulum*) – siateczka śródplazmatyczna; INM (ang. *inner nuclear membrane*) – wewnętrzna błona jądrowa; LAP (ang. *lamina associated polypeptide*) – polipeptyd związany z blaszką jądrową; NE (ang. *nuclear envelope*) – otoczka jądrowa; NEB(D) (ang. *nuclear envelope breakdown*) – rozpad otoczki jądrowej; NL (ang. *nuclear lamina*) – blaszka jądrowa; NPC (ang. *nuclear pore complex*) – jądrowy kompleks porowy; ONM (ang. *outer nuclear membrane*) – zewnętrzna błona jądrowa

Podziękowanie: Praca dotowana ze środków Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ w ramach realizacji projektu „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne” – Bio-Med (POIG.01.01.02-02-003/08) finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Poddziałanie 1.1.2).

STRESZCZENIE

Jądro komórkowe w komórkach organizmów eukariotycznych jest oddzielone od cytoplazmy za pomocą otoczki jądrowej, którą tworzą: blaszka jądrowa oraz zewnętrzna i wewnętrzna błona jądrowa połączone ze sobą w miejscach, w których usytuowane są jądrowe kompleksy porowe. Blaszką jądrową jest strukturą złożoną głównie z lamin typu A i B, białek należących do rodziny filamentów pośrednich. Otoczka jądrowa, odpowiada m.in. za połączenie szkieletu jądrowego z siecią filamentów laminowych, chromatyną, cytoszkieletem, utrzymywanie kształtu jądra komórkowego, rozmieszczenie kompleksów porowych, organizację chromatyny, replikację DNA, regulację syntezy i funkcji czynników transkrypcyjnych. Podczas mitozy otoczka jądrowa podlega procesom depolimeryzacji i reasocjacji. W trakcie tego procesu ulega demontażowi i powtórnemu składaniu struktura szkieletu jądrowego oraz jego połączenia z cytoszkieletem i chromatyną. Wyniki eksperymentów uzyskane w ostatnich latach pozwalają przypuszczać, że białka budujące otoczkę jądrową biorą aktywny udział w przebiegu cyklu komórkowego, w tym również mitozy. Są one niezbędne zarówno w procesie dezintegracji struktury szkieletu jądrowego, organizacji wrzeciona mitotycznego, jak i w ponownym odtwarzaniu skomplikowanych oddziaływań pomiędzy otoczką jądrową, chromatyną i cytoszkieletem w komórkach potomnych.

WPROWADZENIE

Na przestrzeni lat wyobrażenia na temat otoczki jądrowej ulegały wielu istotnym przemianom. Początkowo była ona postrzegana jako statyczna podpora jądra komórkowego stanowiąca stosunkowo stabilne rusztowanie dla otaczającej go błony jądrowej oraz miejsce zakotwiczenia chromatyny. Postęp, jaki dokonał się dzięki badaniom prowadzonym przez laboratoria z całego świata pozwolił na zmianę w sposobie postrzegania otoczki. Utraciła ona swój „stateczny charakter” na rzecz bardziej dynamicznego. Do wzrostu zainteresowania otoczką jądrową przyczynił się również fakt, że mutacje w genach kodujących jej komponenty, takie jak laminy czy emeryna, okazały się przyczyną powstawania chorób degeneracyjnych z grupy laminopatii. Zarzucono także model szkieletu jądrowego oparty o definicje preparatywne, w którym szkielet jądrowy utożsamiany był z macierzą (matriks) jądrową. Macierz jądrowa była tworem resztkowym izolowanego jądra komórkowego, poddanego zwykle procesowi tzw. stabilizacji (indukcji szoku termicznego) a następnie procesowi trawienia DNA i kolejnych ekstrakcji buforami o niskiej sile jonowej z detergentem niejonowym (1% Triton X-100) oraz buforem o wysokiej sile jonowej.

Kolejnym krokiem w poznaniu otoczki jądrowej było zrozumienie, że rola wielu z jej składników nie ogranicza się jedynie do funkcji strukturalnej. Białka otoczki posiadają funkcjonalne domeny enzymatyczne, w sposób pośredni lub bezpośredni uczestniczą w regulacji ekspresji genów i organizacji chromatyny. Badania dokonane w ciągu ostatniej dekady przyniosły nowe odkrycia dotyczące otoczki. Zainteresowania naukowców wykroczyły poza analizowaną dotychczas, interfazową strukturę i aktywność otoczki jądrowej, co ujawniło jej kolejną, nieoczekiwaną cechę. Otoczka, a właściwie tworzące ją komponenty okazały się istotnymi elementami w przebiegu kluczowego dla życia procesu, jakim jest mitoza. Niedawno opublikowane dane wskazują na udział laminy B, jednego z istotnych elementów otoczki, w budowie szkieletu wrzeciona podziałowego, dzięki czemu może ona odpowiadać za jego formowanie regulując dostępność różnych czynników mających kluczowe znaczenie dla procesu formowania wrzeciona (SAF, ang. *spindle assembly factors*) lub wpływać na organizację przestrzenną skondensowanych chromosomów [1]. Ponadto w ostatnich latach udowodniono, że jeden z kluczowych partnerów białek otoczki jądrowej – białko BAF jest zaangażowane w proces segregacji chromosomów i odtwarzania otoczki jądrowej [2]. Nie bez znaczenia wydają się również doniesienia literaturowe, z których wynika, że emeryna – bardzo ważne integralne białko błony jądrowej, biorące udział w utrzymaniu prawidłowo funkcjonującego jądra komórkowe-

30–50 nm oraz blaszki jądrowej (NL, ang. *nuclear lamina*). Zewnętrzna błona jądrowa zachowuje ciągłość z siateczką śródplazmatyczną (ER, ang. *endoplasmatic reticulum*), z którą jest funkcjonalnie spokrewniona. Przestrzeń perinuklearna stanowi swoiste przedłużenie przestrzeni utworzonej przez błony siateczki [4].

W jądrze znajdują się różne przedziały (ciałka jądrowe) utworzone, w przeciwieństwie do cytoplazmy, bez wykorzystania granic w postaci błon. Rejony te są obszarami, gdzie zachodzą wyspecjalizowane procesy. Przykładowo: cały złożony proces produkcji podjednostek rybosomalnych ma miejsce w jąderku, w splajzosomach (ang. *spliceosome*) zachodzą procesy dojrzewania, obróbki i składania mRNA, a ciała Cajala (ang. *Cajal bodies*) odpowiadają za większość procesów dojrzewania jądrowych i jądrowych małych rybonukleoprotein (snoRNPs, ang. *small nucleolar ribonucleoproteins*; snRNPs, ang. *small nuclear ribonucleoproteins*) [5].

W jądrze komórkowym znajduje się chromatyna w charakterystycznej dla danego typu komórek i fazy cyklu komórkowego organizacji przestrzennej i stopniu upakowania. Chromatyna występuje w dwóch postaciach: „otwartej” (zdekondensowanej, euchromatyna) i „zamkniętej” (skondensowanej, heterochromatyna) Różnią się od siebie zwykle lokalizacją względem otoczki jądrowej, a z pewnością składem białkowym, modyfikacjami potranslacyjnymi histonów, poziomem metylacji DNA czy dostępem do czynników jądrowych, takich jak regulatory transkrypcji i składniki maszynarii replikacyjnej [5]. Procesy odpowiedzialne za utrzymywanie chromatyny w jednej z tych form spełniają w jądrze znaczące funkcje regulatorowe.

OTOCZKA JĄDROWA I JĄDROWE KOMPLEKSY POROWE

Otoczka jądrowa to struktura, która tworzy obszar styku pomiędzy nukleoplazmą a cytoplazmą (Ryc. 1). Jest ona niezbędna do utrzymania biochemicznej tożsamości każdego z tych przedziałów. Otoczka składa się ze wspomnianych już błon jądrowych, z którymi oddziałuje szereg białek. Obie błony jądrowe łączą się ze sobą tworząc wraz z jądrowymi kompleksami porowymi (NPC, ang. *nuclear pore complex*) pierścieniowate, wodne kanały zapewniające kontakt pomiędzy nukleoplazmą a cytoplazmą. Jądrowe kompleksy porowe regulują transport makromolekuł w poprzek błony jądrowej. U kręgowców w pojedynczym jądrze kompleksy porowe występują w liczbie kilku tysięcy. Transport jądrowy jest procesem skomplikowanym, w którym uczestniczy liczna rodzina receptorów nazywanych, w przypadku drożdży karioferynami, a w przypadku ssaków importynami i eksportynami [6]. Schemat budowy kompleksów porowych jest zachowany w ewolucji, mimo, że u różnych gatunków mogą występować znaczne różnice w ich rozmiarach. U ssaków masa kompleksu porowego wynosi około 60–125 MDa, u drożdży około 40–60 MDa. Każdy kompleks złożony jest z ponad 30 różnych białek nazywanych nukleoporynami (nup). Cząsteczki globularne o masie powyżej 40 kDa są transportowane poprzez kompleksy w sposób aktywny. Kanał centralny poru wypełniony jest nukleoporynami bogatymi w powtórzenia fenyloalaninowo-glicynowe (ang. *FG repeats*), które tworzą niesfałdowane

domeny biorące udział w transporcie wraz z receptorami transportowymi [7]. Po podziale komórkowym jądrowe kompleksy porowe są odtwarzane. Proces składania rozpoczyna się od asocjacji nukleoporyn stanowiących główny zręb całego kompleksu (Nup107-Nup160) z chromatyną, po której następuje rekrutacja pozostałych składników, w pierwszej kolejności Nup153 i Nup50. W ten sposób powstaje struktura nazywana pre-porem, która stanowi platformę dla pozostałych nukleoporyn [8]. Zachowana w ewolucji glikoproteina gp 210, transbłonowy składnik NPC, wykrywana jest na peryferiach jądra w późnej telofazie/G1. Badania z zastosowaniem organizmów modelowych *Xenopus laevis* i *C. elegans* oraz komórek HeLa wskazują, że jest ona niezbędna do formowania kompleksu porowego [9]. Jednak ze względu na zróżnicowaną ekspresję zależną od typu komórek, nie musi to być regułą dla wszystkich kręgowców. Rozpad kompleksów porowych przebiega szybciej niż proces składania i nie w sposób polegający na prostym odwróceniu kolejności poszczególnych etapów. Nukleoporyny, które wiążą się z chromatyną jako pierwsze podczas odtwarzania (Nup107-Nup160), są uwalniane z kompleksu przed nukleoporynami, których wcielanie do pora następuje później (Nup153) [10].

CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK TWORZĄCYCH OTOCZKĘ JĄDROWĄ ORAZ ICH POWIĄZAŃ

LAMINY

Istotnym składnikiem otoczki jądrowej jest blaszka jądrowa, struktura o grubości 20–50 nm zasocjowana z wewnętrzną błoną jądrową i chromatyną, w głównej mierze utworzona z lamin typu A i B. Jądro komórkowe, a w szczególności otoczka i blaszka jądrowa wraz z oddziałującymi z nimi białkami, odgrywają rolę w utrzymywaniu odporności komórki na stres mechaniczny. Przemawia za tym fakt, że mutacje w genach kodujących białka szkieletu jądrowego takie jak laminy typu A i B, emeryna, LAP2, MAN1, powodują choroby określane wspólnym mianem enwelopatii objawiające się m.in. obniżeniem sprężystości niezbędnej do prawidłowej reakcji komórki na stres mechaniczny, zmianami na drogach przekazywania sygnału i regulacji genów [11]. Blaszką jądrową odgrywa również istotną rolę w utrzymywaniu kształtu oraz rozmiaru jądra.

Laminy to białka zaliczane do V grupy filamentów pośrednich. Laminy oddziałują z licznymi białkami wewnętrznej błony jądrowej oraz z chromatyną [12]. Laminy zbudowane są według wspólnego schematu: z usytuowaną centralnie domeną helikalną wyposażoną w segmenty 1A, 1B, 2A i 2B przedzielone odcinkami łącznikowymi, sąsiadują dwie domeny globularne – zlokalizowaną na N-końcu białka domeną głowową oraz znajdującą się w części C-końcowej, zaopatrzoną w tzw. sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) domeną ogonową. W odróżnieniu od filamentów pośrednich innych grup, charakterystycznych dla cytoplazmy, laminy posiadają nieco krótszą N-końcową domenę głowową oraz dodatkowe 42 reszty aminokwasowe w segmencie 1B. W komórkach eukariotycznych wyróżniamy dwa typy lamin, laminy typu A/C oraz laminy typu B. Laminy typu A są syntetyzowane w komórkach różnicujących się, pod-

czas gdy laminy typu B występują we wszystkich typach komórek zarówno u organizmów dorosłych, jak i w rozwoju zarodkowym [4].

Laminy A i B we fragmencie C-końcowym mają motyw CaaX, (gdzie C jest resztą cysteiny, a to reszta aminokwasu alifatycznego, zaś X to reszta dowolnego aminokwasu hydrofobowego) funkcjonujący jako akceptor farnezylowy. Modyfikacja ta jest przeprowadzana przez transferazę farnezylową, zachodzi na reszcie cysteiny i dotyczy nowo zsintetyzowanych lamin. Farnezylacja jest wymagana do wbudowywania w interfazową blaszkę jądrową nowo zsintetyzowanych lamin. U lamin typu B modyfikacja ta jest stała, natomiast laminy typu A tracą farnezylowy ogon w wyniku proteolizy przeprowadzanej przez, zintegrowaną z błoną jądrową proteinazę ZmpSte24/FACE1, której podlega ich C-koniec. Laminy C nie są farnezylowane [4].

Laminy tworzą struktury wyższego rzędu. Pierwszym etapem jest powstanie dimeru złożonego z oplecionych wokół siebie podjednostek. Rejon odpowiedzialny za dimeryzację znajduje się w centralnej, α -helikalnej części białka. Dimery łączą się ze sobą za pomocą połączeń typu „głowad-ogona” tworząc polarny protofilament. Kolejnym krokiem polimeryzacji jest równoległa agregacja podjednostek laminowych w grube filamenty, które tworzą sieć parakrystaliczną [12].

W komórkach ssaków występują dwa podstawowe typy lamin A – lamina A i C kodowane przez jeden gen *LMNA*. Somatyczne komórki ssaków zawierają także dwa typy lamin B – laminy B1 i laminy B2, kodowane przez geny *LMNB1* i *LMNB2*, odpowiednio. U *Drosophila melanogaster* zidentyfikowano dwa geny kodujące laminy: Dm i C, które mogą być uznane za funkcjonalne homologi odpowiednio lamin typu B i A u kręgowców. Potranslacyjnie modyfikowane formy laminy Dm są u *Drosophila* głównym komponentem blaszki jądrowej i mają zdolność bezpośredniego wiązania chromatyny *in vivo*. Lamina C nie posiada tej zdolności [13]. Ponadto dobrze również poznano laminy u żaby szponiastej (*Xenopus laevis*). Lamina B3 jest najpowszechniej występującą laminą w jądrach oocytów *Xenopus* i ulega stałej syntezie podczas oogenezy. Charakterystyczne dla komórek somatycznych laminy B1 i B2 spotykane są w oocytach i na wczesnych etapach embriogenezy jedynie w ilościach śladowych [14]. Laminy typu B ulegają stałej syntezie, co sugeruje konieczność ich występowania w komórce. Gen kodujący laminy B1 u myszy jest niezbędny do rozwoju prawidłowych embrionów [15]. Laminy typu A są syntetyzowane w dorosłych, różnicujących się komórkach, nie występują na wczesnych etapach embriogenezy.

Laminy typu A wiążą się z wieloma regulatorami transkrypcji, pośród których wymienić można białko retinoblastoma (Rb), białko wiążące sterolowy element regulacyjny 1 (SREBP1), c-Fos, MOK2, BAF. Dzięki temu laminy A są zaangażowane w wiele procesów wpływających na aktywację, hamowanie i przebieg transkrypcji [16].

Sieć utworzona z lamin zapewnia jądro komórkowemu sztywność m.in. dzięki oddziaływaniom z kilkoma białkami, takimi jak emeryna i aktyna jądrowa. Białka te odgrywają rolę stabilizującą laminowe rusztowanie i uczestniczą

w odpowiedzi na stres mechaniczny wywołany kurczeniem komórki [17]. Połączenie aktyny i białka 4.1 (którego funkcją jest łączenie mikrofilamentów i krótkich filamentów aktynowych z błoną) z laminami typu A/C i B oraz z emeryną sugeruje możliwość udziału aktyny jądrowej w organizacji nukleoszkieletu [18].

Laminy występują także w nukleoplazmie, ciałkach jądrowych i tubularnych inwaginacjach otoczki jądrowej, gdzie mogą odgrywać rolę regulatorową w replikacji i transkrypcji DNA oraz spełniać funkcje strukturalne [16]. Laminy towarzyszą też strukturalnym tubularnym inwaginacjom błon otoczki jądrowej do wnętrza jądra komórkowego określanych przez niektórych autorów nazwą NER (ang. *nuclear envelope/endoplasmic reticulum*). Nadprodukcja lamin typu B oraz ich fragmentów C-końcowych (podlegających farnezytacji), jak również niektórych białek integralnych INM, prowadzi do formowania się dużej liczby znacznie rozbudowanych struktur tego typu [19].

INTEGRALNE BIAŁKA OTOCZKI JĄDROWEJ ORAZ ICH PARTNERZY

Liczną grupę białek związanych z otoczką i blaszką jądrową stanowią białka z domeną LEM. Pierwszymi zidentyfikowanymi białkami posiadającymi domenę LEM były integralne białka wewnętrznej błony otoczki jądrowej w komórkach człowieka: LAP2, Emeryna i MAN1. Stąd też nazwa tej domeny. Domena LEM jest odpowiedzialna za oddziaływanie typu białko – białko. Oddziałuje z białkiem BAF (ang. *barrier-to-autointegration factor*), które wiążąc się z nagim DNA formuje struktury wyższego rzędu. Pomimo sporych rozbieżności w sekwencjach reszt aminokwasowych domen LEM różnych białek, ich struktura trzeciorzędowa jest identyczna [20].

BAF jest ważnym, zachowanym w ewolucji i małym białkiem o masie około 10 kDa, występującym u wszystkich tkankowców. Wiąże się bezpośrednio z dwuniciowym DNA, jądrowymi białkami posiadającymi domenę LEM, laminami typu A i aktywatorami transkrypcji, takimi jak Crx. BAF wzmacnia oddziaływanie pomiędzy emeryną i laminą A [21]. Przypuszcza się, że BAF odgrywa strukturalną rolę w procesie składania jądra komórkowego i organizacji chromatyny oraz bierze udział w hamowaniu ekspresji genów [22]. Doświadczenia polegające na wyciszeniu białka BAF u *Caenorhabditis elegans* za pomocą siRNA dowiodły, że jest ono zaangażowane w proces segregacji chromosomów i odtwarzania otoczki jądrowej [23]. W telofazie, podczas odtwarzania otoczki jądrowej, kiedy błony jądrowe łączą się z powierzchnią chromosomów, BAF, emeryna oraz LAP2 α lokalizują się w tzw. rejonie rdzeniowym (ang. *core region*) telofazowych chromosomów. Rejon ten pełni nieznaną funkcję. Przypuszcza się jednak, że jest on miejscem oddziaływania pomiędzy telomerami i odtwarzającą się otoczką jądrową. Mutacja białka BAF pozbawiająca je zdolności wiązania DNA lub białek z domeną LEM jest letalna, podczas mitozy blokuje rekrutację emeryny, LAP2 β , laminy A oraz otoczki jądrowej do rejonu korowego. Nie wpływa natomiast na składanie lamin B [24].

LAP (ang. *lamina associated polypeptide*) to grupa integralnych białek błonowych. Białka LAP1 posiadają pojedynczą

domenę transbłonową usytuowaną w pobliżu C-końca. Trzy izoformy białka LAP1: A, B i C, są produktami tego samego genu. Potwierdzono oddziaływania *in vitro* pomiędzy LAP1A i LAP1B a laminami A, C i B1 [25]. Obecność białek z rodziny LAP2 odnotowano dotychczas tylko u kręgowców. U człowieka opisano trzy izoformy: α (75 kDa), β (51 kDa) i γ (39 kDa). U ssaków występuje co najmniej sześć izoform: α , β , γ , δ , ϵ i ζ . Większość izoform białka LAP2 ma podobny schemat budowy, w którym można wyróżnić N-końcową domenę nukleoplazmatyczną (o zmiennej wielkości), sygnał lokalizacji jądrowej, domenę transbłonową (wyjątek stanowią izoformy α i ζ) i krótki odcinek C-końcowy usytuowany w przestrzeni periplazmatycznej. We fragmencie N-końcowym wszystkich białek LAP występuje odpowiedzialna za wiązanie z białkiem BAF domena LEM, którą tworzą reszty aminokwasowe od 111 do 152 oraz domena LEM podobna (ang. *LEM-like*), usytuowana pomiędzy resztami aminokwasowymi 1-85, biorąca udział w asocjacji z DNA i chromosomami w sposób bezpośredni. Trzy izoformy ϵ , δ i γ są bardzo podobne, pod względem strukturalnym do największej izoformy β . Pozbawione są jedynie krótkich, nukleoplazmatycznych odcinków o długości odpowiednio 40, 72 i 109 reszt aminokwasowych. Izoforma ζ ma 219 reszt aminokwasowych domeny N-końcowej podobnie jak więksi członkowie rodziny (β , ϵ , δ i γ), a także posiada 5 dodatkowych reszt aminokwasowych w części C-końcowej. Analiza sekwencji poszczególnych izoform pozwala przypuszczać, że LAP2 ϵ i LAP2 δ , które mają zachowaną w ewolucji rejon odpowiedzialny za oddziaływanie z laminami, są w stanie łączyć się stabilnie z blaszką jądrową, podczas gdy LAP2 γ i LAP2 ζ , u których rejon ten jest niekompletny lub nie występuje wcale, nie mają takiej możliwości [26].

LAP2 α różni się pod względem budowy i funkcji od pozostałych białek z rodziny LAP. Posiada unikatowy rejon C-końcowy złożony z 506 reszt aminokwasowych. Rejon ten nie ma domeny transbłonowej, czego konsekwencją jest nukleoplazmatyczna lokalizacja białka LAP2 α . Z pozostałymi izoformami dzieli wspólny, zbudowany z 187 reszt aminokwasowych N-końców [26]. LAP2 α wiąże się z chromosomami za pośrednictwem α -specyficznej domeny ulokowanej w rejonie C-końcowym białka. Wiązanie z chromosomami podlega regulacji w sposób zależny od fosforylacji [27]. LAP2 α oddziałuje rejonem C-końcowym z C-końcem lamin typu A/C tworząc stabilne kompleksy. Mutacje w genie kodującym laminę A/C prowadzące do tworzenia przez nie agregatów sprawiają, że dystrybucja LAP2 α ulega zmianie [28]. LAP2 α wraz z laminami typu A/C odpowiada za lokalizację i fosforylację białka retinoblastoma (Rb) oraz utrzymywanie komórek w stanie proliferującym. Kompleksy złożone z lamin A/C i białka LAP2 α są wymagane do zatrzymania Rb w nukleoplazmie, co z kolei ma prowadzić do prawidłowej regulacji jego funkcji przez fosfatazy i kinazy zależne od cyklin [29]. We wczesnej fazie cyklu komórkowego (G_1) ufosforylowane białko Rb lokalizuje się w jądrze komórkowym, gdzie wiąże czynnik transkrypcyjny E2F-1, który jest aktywatorem ekspresji genów odpowiedzialnych za przejście do fazy S. W późnej fazie G_1 ufosforylowana w obszarze tzw. kieszeni C forma Rb uwalnia E2F-1, który aktywuje między innymi transkrypcję genów polimeraz replikacyjnych, co powoduje przejście komórki do fazy S cyklu.

W przeciwieństwie do asocjacji LAP2 α z laminami A, oddziaływanie z chromatyną jest regulowane przez mitotycznie specyficzną fosforylację miejsc zgrupowanych w rejonie C-końcowym białka. Fosforylacja jest niezbędna do oddysocjowania białka LAP2 α od chromosomów podczas mitozy [27]. Wcześniejsze badania wykazały, że LAP2 α podczas metafazy lokalizuje się w cytoplazmie, podczas gdy jego asocjacja z chromosomami następuje tuż przed procesem odtwarzania błony jądrowej [30]. Przypuszcza się, że wczesne wiązanie LAP2 α do chromosomów za pomocą domeny występującej w części C-końcowej białka może mieć znaczenie dla przebiegu odtwarzania jądra komórkowego i może ułatwić kontakt białka BAF, które wiąże się z N-końcową domeną LAP2 α , z powierzchnią chromosomów. LAP2 α formuje *in vivo* stabilne struktury wyższego rzędu złożone z trzech cząsteczek białka. Homotrimery powstają dzięki oddziaływaniom pomiędzy rejonami usytuowanymi w części C-końcowej białka.

Doświadczenia polegające na stabilnej syntezie specyficznej dla izoformy α C-końcowej domeny obejmującej reszty aminokwasowe od 188 do 693 w komórkach HeLa, pozwoliły na identyfikację kolejnych partnerów LAP2 α , którymi okazały się białka należące do rodziny białek szoku cieplnego: Hsp70 i Hsc70. LAP2 α oddziałuje z tymi partnerami w formie oligomerycznej. Ze względu na aktywność Hsp70 jako białka opiekuńczego, sugeruje się jego udział w naprzemiennym formowaniu i rozpadzie kompleksów białkowych złożonych z LAP2 α , lamin A i Rb. Przypuszcza się, że oddziaływania pomiędzy LAP2 α i Hsp70 mogą być efektem mechanizmu odpowiadającego na stres, polegającego na regulowaniu aktywności enzymatycznej przez Hsp70, który zapobiega zmianom w oligomerach LAP2 α , które z kolei mogłyby powodować defekty w strukturze chromatyny [31]. Białko LAP2 β oddziałuje z laminami typu B oraz z chromatyną za pomocą rejonu usytuowanego w części C-końcowej. LAP2 β poza dwoma rejonami wiążącymi DNA i chromosomy, wspólnymi dla wszystkich izoform LAP2 – LEM i LEM-like, posiada również dodatkowy odcinek oddziałujący z chromatyną, ulokowany w części specyficznej dla tej izoformy [26]. Stwierdzono również, że izoforma ta oddziałuje z zachowanym w ewolucji represorem transkrypcji GCL (ang. *Germ-Cell-less*). GCL występujący w komórkach ssaków wiąże z kolei heterodimer utworzony z czynnika E2F-DP3, co powoduje zahamowanie jego aktywności. LAP2 β wywiera efekt represorowy na różne czynniki transkrypcyjne, m.in. p53, NF- κ B i członków rodziny E2F-DP. Ponadto oddziałuje i współwystępuje z deacetylazą HDAC3 (ang. *histone deacetylase 3*), enzymem modyfikującym histony, którego aktywność regulowana jest dzięki oddziaływaniu ze zbudowanym z wielu podjednostek kompleksem represorowym. Nadprodukcja białka LAP2 β powoduje deacetylację histonu H4. Przypuszcza się, że zależność pomiędzy HDAC3 a LAP2 β może doprowadzić do wyjaśnienia zjawiska polegającego na transkrypcyjnej bierności heterochromatyny ulokowanej na peryferiach jądra komórkowego, w pobliżu otoczki jądrowej [32].

Wydaje się, że białko LAP2 β jest bezpośrednio zaangażowane w dynamikę otoczki jądrowej. Stwierdzono, że oddziaływanie pomiędzy nim a blaszką jądrową są wymaga-

ne do wzrostu objętości jądra podczas odtwarzania otoczki pod koniec mitozy. Doświadczenia z zastosowaniem techniki odtwarzania jąder komórkowych *in vitro* wykazały, że N-końcowy, zachowany w ewolucji rejon LAP2 β oraz białko BAF są niezbędne do zakotwiczenia chromatyny w błonie jądrowej i odtwarzania blaszki [33].

U dorosłych osobników *Xenopus laevis* syntetyzowana jest tylko jedna izoforma białka XLAP2 – izoforma β , która wykazuje silne podobieństwo do swojego odpowiednika występującego u ssaków. Dotychczas udało się sklonować i potwierdzić występowanie trzech wariantów XLAP2. Poza wspomnianym polipeptydem o masie 66 kDa (XLAP2 β), dwa białka o masach 86 kDa (XLAP2 ω) i 40 kDa (XLAP2 γ) odnaleziono w oocytach i jajach oraz na wczesnych etapach embriogenezy [34]. XLAP2 oddziałuje również z czynnikiem TPX2, który jest zaangażowany w formowanie wrzeciona mitotycznego. TPX2 oddziałuje z mikrotubulami. Podczas interfazy zlokalizowany jest w jądrze komórkowym, a w mitozie występuje głównie na biegunach wrzeciona podziałowego. Usunięcie czynnika TPX2 z modelowego ekstraktu uzyskanego z jaj *Xenopus laevis* koniecznego do odtwarzania jądra *in vitro* powodowało, że nowo formowane jądra, w porównaniu z kontrolnymi, miały znacznie mniejsze rozmiary (osiągały zaledwie jedną piątą normalnej wielkości). Usunięcie TPX nie miało wpływu na transport jądrowy, selektywną przepuszczalność jądra i replikację DNA. W jądrach pozbawionych TPX2 odnotowano nieprawidłową lokalizację białka XLAP2 przejawiającą się obniżeniem jego zawartości w otoczce jądrowej. Wyniki tych badań sugerują, że oddziaływanie XLAP2-TPX2 odgrywa ważną rolę w procesie odtwarzania otoczki jądrowej [35].

LAP2 ζ jest najmniejszą izoformą białek z rodziny LAP2 u ssaków i jako jedyna izoforma występuje zarówno na terenie jądra, jak i w cytoplazmie. Po raz pierwszy została sklonowana u myszy. LAP2 ζ jest skróconą wersją białka LAP2 β . Mają one wspólny, N-końcowy odcinek zawierający domenę LEM, jednak w LAP2 ζ domena LEM nie zawiera miejsca oddziaływania z laminami i sygnału lokalizacji jądrowej. Badania przeprowadzone w ostatnich latach dowiodły, że białko LAP2 ζ człowieka oddziałuje z białkiem BAF, wskazując tym samym dotychczas jedyne zidentyfikowane cytoplazmatyczne partnera dla tego ostatniego [36]. Nadprodukcja LAP2 ζ prowadzi do zmniejszenia puli jądrowego BAF i niewielkiego wzrostu aktywności transkrypcyjnej różnych czynników transkrypcyjnych. Natomiast jednoczesna synteza LAP2 ζ z izoformą LAP2 β lub jej partnerem deacetylazą histonową HDAC3 prowadzi do zahamowania hamującej aktywności tych dwóch białek. Wyniki tych doświadczeń sugerują udział izoformy ζ w regulacji transkrypcji polegający na hamowaniu represyjnej aktywności LAP2 β , prawdopodobnie w wyniku manipulacji lokalizacją białka BAF [36].

Emeryna jest integralnym białkiem błonowym o masie 34 kDa i posiada zdolność wiązania wszystkich lamin typu A/C. Podobnie jak każdy przedstawiciel rodziny białek z domeną LEM, emeryna oddziałuje z białkiem BAF. Domena LEM wydaje się być jedynym rejonem emeryny, który charakteryzuje się stabilną, globularną strukturą. Wy tłumaczeniem tego faktu może być hipoteza, według której, emeryna

jest strukturalnie bardzo elastycznym białkiem i dopiero oddziaływanie z konkretnymi partnerami wymusza na niej przyjęcie określonej konfiguracji przestrzennej [37]. Emeryna pomaga w utrzymaniu mechanicznej integralności jądra komórkowego i oddziałuje z Lmo7 (ang. *Lim-domain only 7*), który jest regulatorem transkrypcji wielu genów ulegających specyficznej ekspresji w tkankach mięśniowych. Zarówno kontrola syntezy emeryny jak i Lmo7 są ze sobą powiązane na zasadzie ścisłego sprzężenia zwrotnego. Lmo7 kontroluje ekspresję genu emeryny, która z kolei osłabia jego aktywność [38].

Innym partnerem emeryny jest białko Btf, które funkcjonuje jako represor transkrypcji i może indukować śmierć komórki poprzez hamowanie syntezy antyapoptotycznych białek z rodziny bcl-2 [39]. Najnowsze odkrycia dowodzą, że emeryna oddziałuje z ważnym białkiem będącym koaktywatorem transkrypcji – β -kateniną. Oddziaływania zachodzą dzięki zachowanej w ewolucji domenie podobnej do APC (ang. *adenomatous polyposis coli-like domain*). Mutanty emeryny pozbawione tej domeny nie są w stanie powstrzymać napływu β -kateniny do jądra komórkowego, co prowadzi do nadmiernej proliferacji komórek. Zjawisko to może pomóc w wyjaśnieniu przyczyny powstawania zwłóknień w tkankach mięśni szkieletowych i sercowych u pacjentów z dystrofią mięśniową Emery'ego-Dreifussa, u których zaobserwowano nadmierną akumulację β -kateniny w jądrach fibroblastów [40]. Podobnie emeryna w kompleksie z laminą A wpływa poprzez szlak sygnalizacyjny Wnt/ β -katenina na różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w kierunku adipocytów [41]. Myszy pozbawione emeryny wykazują zaburzenia sygnalizacji zachodzącej przy udziale Rb1, E2F oraz Myo-D w czasie różnicowania tkanki mięśniowej, a także charakteryzują się nadmierną ekspresją genów zależnych od wcześniej wymienionych czynników [42].

Emeryna oraz laminy oddziałują z LUMA, zachowanym w ewolucji białkiem, rozciągającym się w poprzek otoczki jądrowej od nukleoplazmy do cytoplazmy. Białko to posiada 4 domeny transbłonowe, duży obszar hydrofilowy w obszarze perinuklearnym błony. Może ono pełnić funkcje w pozycjonowaniu emeryny względem otoczki jądrowej i cytoszkieletu oraz stanowić dodatkowy łącznik pomiędzy szkieletem jądrowym a cytoszkieletem [43]. Emeryna wiąże się także z tubuliną. Wiązanie to jest niezbędne w kotwiczeniu centrosomu w pobliżu zewnętrznej błony jądrowej. Miejsce oddziaływania z tubuliną usytuowane jest w rejonie N-końcowym białka, pomiędzy resztami aminokwasowymi 1 a 176. Emeryna odpowiedzialna za kotwiczenie centrosomu do błony zewnętrznej sama jest w niej zakotwiczona [3].

Emeryna wiąże się z innym białkiem integralnym błony jądrowej – nespryną-1a, która tworzy homodimery oddziałujące również z laminą A. Nespryna-1a asocjuje z emeryną najsilniej spośród jej wszystkich znanych partnerów, co może świadczyć o jej udziale w kotwiczeniu emeryny w błonie jądrowej [44]. Kolejnym z licznych partnerów emeryny jest aktyna. Badania przeprowadzone na mioblastach sugerują, że oddziaływania pomiędzy aktyną i emeryną są regulowane poprzez fosforylację, którą kieruje kom-

pleks utworzony z kinazy A, białka kotwiczącego kinazę A (AKAP149) i fosfatazy 1 (PP1) [45].

W ostatnich latach potwierdzono również występowanie emeryny u *Xenopus laevis*. Dotychczas zostały zidentyfikowane dwa homologii emeryny ssaków: Xemeryna1 i Xemeryna2, które dzielą z nią N-końcową domenę LEM i C-końcową domenę transbłonową. Obydwa homologii mają masę około 24 kDa, różnią się natomiast wartościami punktu izoelektrycznego. Nie odnotowano obecności żadnego z nowo odkrytych białek w oocytach oraz na wczesnych etapach embriogenezy. Synteza Xemeryny rozpoczyna się dopiero na etapie stadium 43 i utrzymuje się w dorosłych komórkach somatycznych [46]. W oocytach, embrionach oraz linii komórkowej wyprowadzonej ze stadium kijanki (XTC) występuje białko integralne INM o masie cząsteczkowej 36 kDa rozpoznawane przeciwciałami skierowanemu przeciwko domenie LEM i LEM-podobną LAP2 ssaków. W wyniku zastosowania metody frakcjonowania białko znajdowane jest we frakcji zawierającej pęcherzyki mitotyczne błony jądrowej NEP-B, a analiza metodą spektroskopii masowej wskazuje na podobieństwo Xemeryny do emeryny człowieka (Rzepecki i Hutchison, dane nieopublikowane) [47].

MAN1 jest białkiem niezbędnym na wczesnych etapach rozwoju, oddziałującym z laminami w sposób podobny do emeryny. MAN1 człowieka został zidentyfikowany jako jeden z trzech antygenów rozpoznawanych przez przeciwciała uzyskane od pacjentów z chorobą naczyń krwionośnych związaną z kolagenem. Białko MAN1 człowieka charakteryzuje się masą około 80 kDa, a jego domena nukleoplazmatyczna zbudowana jest z 470 reszt aminokwasowych. MAN1 poza usytuowaną w części N-końcowej domeną LEM posiada również dwie domeny transbłonowe. Badania polegające na wyciszeniu genu kodującego białko Ce-MAN1 (ontologu białka MAN1 u *C. elegans*) wykazały, że wraz z emeryną jest ono niezbędne w segregacji chromosomów i podziale komórki [48]. MAN1 odgrywa istotną rolę w angiogenezie działając jako ułożony w wewnętrznej błonie jądrowej „punkt kontrolny” modulujący aktywność ścieżki przekazywania sygnału TGF β poprzez oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny Smad [49]. Białko dMAN1 występuje także u *Drosophila melanogaster*. Jego struktura i topologia jest taka sama jak u jego odpowiedników pochodzących z kręgowców. dMAN1 oddziałuje z odpowiednikami lamin typu A i B oraz czynnikami z rodziny R-Smad. Wyciszenie genu kodującego białko dMAN1 powoduje efekt letalny na wczesnych etapach embriogenezy. Udowodniono również, że dMAN1 nie jest białkiem niezbędnym do zachowania kształtu i organizacji jądra oraz prawidłowego przebiegu replikacji [50].

Badania prowadzone nad białkiem XMAN1 z *Xenopus laevis* wykazały jego zdolność do oddziaływania z czynnikiem transkrypcyjnym Smad1 i zasugerowały możliwość udziału w formowaniu układu nerwowego poprzez antagonizowanie ścieżki przekazywania sygnału białek BMP (ang. *bone morphogenetic protein*) [51]. Ponieważ białko MAN1 człowieka wiąże czynniki transkrypcyjne z rodziny Smad, (Smad1, Smad2 i Smad3), przypuszcza się, że pełni ono podobną funkcję regulatorową na drodze przekazywania sygnału BMP [52].

Innym specyficznym białkiem wewnętrznej błony jądrowej jest p58, znane także jako LBR (ang. *lamin B receptor*). Białko LBR zostało po raz pierwszy zidentyfikowane u kręgowców, a ostatnio potwierdzono jego występowanie u *Drosophila melanogaster*. W przeciwieństwie do LBR pochodzącego z kręgowców, dLBR w części nukleoplazmatycznej nie zawiera dwóch domen globularnych [53]. LBR jest białkiem oddziałującym z laminami typu B i w formie oligomerycznej odpowiada za kotwiczenie heterochromatyny do błony jądrowej. Tworzy także oddzielne mikrodomeny na terenie otoczki jądrowej. Białko to jest niezbędne w rozwoju płodowym, posiada osiem domen transbłonowych oraz pełni funkcję enzymatyczną reduktazy sterolu, która ma znaczenie w metabolizmie cholesterolu [54]. Wiązanie LBR w czasie cyklu komórkowego podlega regulacji poprzez fosforylację [55]. Asocjacja z chromatyną następuje za pośrednictwem białka HP1. Ponadto przypuszcza się, że wiązanie do HP1 pośredniczy w rekrutacji pęcherzyków mitotycznych, w których znajduje się LBR, do chromosomów [56].

SZKIELET JĄDROWY A CYTOSZKIELET

U zwierząt tkankowych integralne białka zewnętrznej błony jądrowej posiadające domenę KASH (np. nespryny) łączą otoczkę jądrową z różnymi elementami cytoszkieletu, centrami organizacji mikrotubuli (MTOC, ang. *microtubule organizing center*) i centrosomami. Z kolei w przestrzeni pomiędzy błonami jądrowymi białka z domeną KASH oddziałują z białkami wewnętrznej błony jądrowej zawierającymi domenę SUN, które łączą się z elementami tworzącymi blaszkę jądrową [58]. Oddziaływania pomiędzy białkami z domenami KASH i SUN zapewniające kontakt z cytoszkieletem, są istotne dla utrzymania struktury jądra komórkowego. Rozbicie tych oddziaływań prowadzi do przerostu przestrzeni perinuklearnej [57].

Nespryny są białkami o dużej masie cząsteczkowej oddziałującymi z błoną jądrową. Dotychczas poznano trzy typy nespryn: Syne-1/Myne-1/Nespryna-1/Enaptyna, Syne-2/Myne-2/Nespryna-2/NANCE i Nespryna-3 [58]. W oddziaływaniach nespryn z błoną jądrową pośredniczy ułożona w części C-końcowej domena KASH (ang. *Klar-sicht/ANC-1/Syne-1 homology*). Domena KASH zawiera rejon transbłonowy niezbędny do zakotwiczenia nespryn w błonie oraz mały, złożony z nie więcej niż 35 reszt aminokwasowych rejon usytuowany w przestrzeni międzybłonowej [59]. Niektóre izoformy nespryn mogą się przemieszczać pomiędzy wewnętrzną i zewnętrzną błoną jądrową poprzez jądrowe kompleksy porowe. Izoformy nespryny-1 i nespryny-2 są zbyt duże, co wyklucza ich migrację, w związku z tym występują jedynie na zewnętrznej błonie jądrowej [60]. Nespryny ułożone po zewnętrznej stronie jądra komórkowego mają wyeksponowany do cytoplazmy rejon N-końcowy za pośrednictwem, którego oddziałują z mikrofilamentami i filamentami pośrednimi. Oddziaływania te są istotne dla migracji i prawidłowego zakotwiczenia jądra wewnątrz komórki. W oddziaływaniach filamentów pośrednich z różnymi elementami cytoszkieletu oraz z błoną jądrową, dzięki pośrednictwu nespryn, udział bierze także plektyna [61]. Nespryny usytuowane po wewnętrznej stronie błony jądrowej wiążą się do lamin typu A/C oraz

emeryny za pośrednictwem tzw. powtórzeń spektrynowych usytuowanych w rejonie C-końcowym, dzięki czemu są ściśle połączone z blaszką jądrową [45].

Poza nesprynami w skład kompleksu wiążącego jądro komórkowe z cytoszkieletem wchodzi, wiążące się bezpośrednio z laminami typu A/C, białka z grupy SUN. Białka z tej grupy są zasocjowane z białkami wewnętrznej błony jądrowej za pomocą rejonu C-końcowego od strony przestrzni perinuklearnej i za pomocą rejonu N-końcowego od strony jądra. Rejon C-końcowy wysoakożony jest w domenie SUN (ang. *Sad1/UNC-84 homologue*) [61]. W komórkach człowieka domena SUN nie odgrywa istotnej roli w wiązaniu domeny KASH występującej w nesprynach. Oddziaływanie pomiędzy tymi białkami jest zapewnione dzięki domenie SD2 białek SUN1. Białka SUN odpowiadają za prawidłową lokalizację nespryn w otoczce jądrowej. Kompleksy formowane przez białka SUN i nespryny są określane mianem kompleksów LINC (ang. *linker of the nucleoskeleton and the cytoskeleton*) [58].

REGULACJA SZKIELETU JĄDROWEGO I PROCESÓW JĄDROWYCH W CYKLU KOMÓRKOWYM

Cykl komórkowy może być podzielony na dwa zasadnicze etapy: interfazę oraz mitozę. W interfazie można wyróżnić trzy fazy: G1 (ang. *gap/growth 1*), S (ang. *synthesis*) oraz G2 (ang. *gap/growth 2*). Faza G1 trwa od zakończenia mitozy do początku fazy S, charakteryzuje się wzrostem wielkości jądra oraz wzmożoną syntezą enzymów potrzebnych do przeprowadzenia replikacji DNA. Podczas fazy S następuje podwojenie liczby chromosomów. Faza G2 bezpośrednio poprzedza mitozę i charakteryzuje się wzmożoną syntezą mikrotubul koniecznych do uformowania wrzeciona podziałowego.

Mitoza złożona jest z czterech głównych etapów: profazy, metafazy, anafazy i telofazy (Ryc. 2). Podczas profazy w przestrzeni jądra komórkowego rozpoczyna się formowanie wrzeciona mitotycznego. Ponadto następuje wówczas kondensacja chromosomów, formowanie w ich części cen-

trimerowej kompleksu białek – kinetochoru, oraz rozpad otoczki jądrowej. W metafazie mamy do czynienia z przylączeniem mikrotubul do kinetochoru i ustawieniem chromosomów w płaszczyźnie równikowej komórki – utworzenie tzw. płytki metafazowej. W momencie, w którym następuje rozzerwanie połączeń pomiędzy chromatydami siostrzanymi rozpoczyna się kolejna faza mitozy – anafaza. Przypuszcza się, że za generowanie sił niezbędnych do przemieszczania chromatyd w stronę przeciwległych centrosomów odpowiedzialne są zjawiska skracania mikrotubul kinetochorowych oraz wydłużania mikrotubul łączących centrosomy. Ostatnim etapem mitozy jest telofaza, w której następuje kompletne odtworzenie otoczek jądrowych wokół chromosomów oraz ich dekondensacja. Proces powstawania komórek potomnych kończy cytokineza, podczas której następuje podział cytoplazmy i jej struktur pomiędzy nowopowstałe komórki [62].

Centrosomy w czasie cyklu komórkowego podlegają zmianom, które są regulowane przez fosforylację i proteolizę. Zmiany te można podzielić na cztery zasadnicze etapy: duplikacja – mająca miejsce na przełomie faz G1/S, dojrzewanie, odbywające się w fazie G2, rozdzielanie, zachodzące na przełomie faz G2/mitoza oraz dezorientacja, do której dochodzi po skończonym podziale, przy przejściu do fazy G1. Doświadczenia przeprowadzone w ostatnich latach pozwoliły na identyfikację nowej funkcji jednego z białek otoczki jądrowej – emeryny. Frakcja emeryny zlokalizowana na zewnątrz jądra, dzięki bezpośredniemu oddziaływaniu z tubuliną, jest zaangażowana w kotwiczenie centrosomów do zewnętrznej powierzchni jądra. Wyciszenie ekspresji genu emeryny w komórkach człowieka powodowało błędną lokalizację centrosomów, których położenie ulegało znacznemu przesunięciu w stosunku do powierzchni jądra [4].

Oddziaływania pomiędzy cytoszkieletem a otoczką jądrową odgrywają istotną rolę w przebiegu mitoz. W mitozie typu otwartego otoczek jądrowa musi ulec rozpadowi, który regulowany jest poprzez fosforylację wielu jej składników. Rozpad otoczki umożliwia dostęp mikrotubuli



Rycina 2. DNA, pericentryna i mikrotubule w kolejnych stadiach mitozy. Komórki HeLa barwiono na DNA (DAPI, niebieski) pericentrynę (zielony) oraz β -tubulinę (czerwony). Zdjęcia wykonano przy pomocy mikroskopu konfokalnego (Zeiss LSM 510 Meta). Profaza: rozpoczyna się kondensacja chromosomów (przyłączenie do ich części centromerowej kompleksu białek – kinetochoru), formowanie wrzeciona kariokinetycznego i rozpad otoczki jądrowej (NEBD). Wiele białek, w tym laminy, ulega fosforylacji, która zaburza oddziaływania pomiędzy nimi. Prometafaza: chromosomy łączą się z mikrotubulami wrzeciona kariokinetycznego i są przemieszczane do płaszczyzny równikowej komórki. Metafaza: chromosomy układają się w płaszczyźnie równikowej i tworzą tzw. płytkę metafazową. Po dysocjacji otoczki jądrowej, mikrotubule kinetochorowe oddziałują z centromerami chromosomów, łącząc je obustronnie do wrzeciona podziałowego. Błony otoczki jądrowej ulegają wcieleniu do siateczki śródluzmatycznej. Rozpuszczalne białka otoczki i blaszki jądrowej są rozmieszczone głównie w cytoplazmie. Anafaza: następuje rozdzielanie chromatyd siostrzanych, powstają chromosomy potomne, które wędrują do przeciwległych biegunów komórki. Ich ruch jest powodowany prawdopodobnie skracaniem się mikrotubul kinetochorowych, a także oddalaniem się biegunów od siebie. Składniki kompleksów porów jądrowych i siateczki śródluzmatycznej są kierowane do rozdzielonych chromosomów, prawdopodobnie za sprawą defosforylacji białek zaangażowanych w ten proces. Telofaza: na przeciwległych biegunach dekondensują chromosomy potomne, odtwarza się wokół nich otoczka jądrowa, zachodzi cytokineza. Powstają dwie komórki potomne; błony odtwarzają otoczkę wokół chromosomów, kończy się proces formowania kompleksów porowych.

wrzeciona podziałowego do chromosomów. Po zakończeniu segregacji następuje odtwarzanie otoczki jądrowej wokół chromatyd siostrzanych. Rozpad błony jądrowej jest jednym z elementów procesu określanego mianem demontażu otoczki jądrowej (NEBD, ang. *nuclear envelope breakdown*). Przypuszcza się, że w komórkach somatycznych kręgowców składniki błony jądrowej ulegają mniej lub bardziej specyficznemu rozproszeniu w siateczce śródplazmatycznej (ER) [63]. Rozpad błony jądrowej jest wspomagany przez mikrotubule astralne i związaną z zewnętrzną błoną jądrową cytoplazmatyczną dyneinę [64].

Badania przeprowadzone m.in. na embrionach *Drosophila melanogaster* sugerują, że rozpad jądrowych kompleksów porowych jest początkowym etapem NEB. Zdjęcia jąder w gwałtownie dzielących się syncytiach *Drosophila melanogaster* uzyskane dzięki technice mikroskopii elektronowej pokazują utratę włókien cytoplazmatycznych kompleksów porowych już w profazie, podczas której cała otoczka jądrowa jest jeszcze nietknięta [65].

Niektóre badania sugerują, że elementy składowe błony jądrowej w czasie mitozy tworzą odrębne przedziały lub domeny w obrębie ER (komórki somatyczne) lub pozostają oddzielone od błon ER przybierając formę pęcherzyków mitotycznych (komórki rozrodcze). Ostatnie doniesienia sugerują, że w rozpad otoczki jądrowej mogą być zaangażowane składniki kompleksu COPI, które biorą udział w formowaniu pęcherzyków uczestniczących w transporcie komórkowym [66].

Proces odtwarzania otoczki jądrowej był przedmiotem wielu badań przeprowadzonych zarówno na liniach komórkowych ssaków, jak i na ekstraktach z jaj płazów. Dotychczas funkcjonowały dwie hipotezy opisujące odtwarzanie otoczki. Według pierwszej z nich warunkiem koniecznym do wiązania pęcherzyków błonowych lub elementów ER biorących udział w odtwarzaniu błon jądrowych jest wcześniejsza asocjacja z chromatyną białek periferycznych takich jak lamininy, czy składniki kompleksów porowych [67]. Drugi model zakłada, że kierowanie pęcherzyków mitotycznych lub elementów ER do chromosomów jest niezależne od lamin, a odtwarzanie porów jądrowych i blaszki następuje w drugiej kolejności [68].

W oparciu o ostatnie dane literaturowe można zaproponować nowy model odtwarzania struktury jądra komórkowego po mitozie. Model ten może być szerzej zaakceptowany, gdyż zakłada wielotorowość i współzależność elementów tego procesu. Odtwarzanie otoczki jądrowej na dekondującą się chromatynie zależy od co najmniej dwóch kompleksów białkowych związanych z białkami integralnymi INM. Jeden kompleks jest połączony z białkiem LBR, laminami typu B oraz białkami HP1-HP3. Drugi, bardziej heterogenny kompleks jest oparty głównie o błonowe białka z domeną LEM: emerynę i izoformy białka LAP2, lamininy typu A oraz białko BAF. Potwierdzeniem tego modelu mogą być wyniki opublikowane w pracy o wpływie wyciszenia i nadekspresji genów kodujących białka szkieletu jądrowego na odtwarzanie otoczki jądrowej [69]. Lamininy typu B mogłyby stanowić trzeci główny szlak odtwarzania jądra komórkowego asocjując

bezpośrednio z dekondującą chromatyną i następnie rekrutując białka z nimi oddziałujące. Podczas mitozy zarówno lamininy typu A jak i typu B podlegają specyficznemu fosforylacji, która umożliwia depolimeryzację polimerów lamininowych, a cząsteczki laminin zostają rozproszone w komórce. Lamininy typu A występują w formie rozpuszczalnej, z kolei lamininy typu B, ze względu na obecność ogona farnezylowego, pozostają częściowo zintegrowane z błonami ER (pęcherzykami mitotycznymi). Frakcja „błonowa” laminin typu B mogłaby również uczestniczyć w odtwarzaniu błony jądrowej na powierzchni chromatyny. Po zmianie wzoru fosforylacji i/lub uwolnieniu z kompleksu z importynami α (przez RanGTP) w pobliżu centrosomu frakcja rozpuszczalnych laminin mogłaby asocjować z chromatyną, gdzie podlegałyby polimeryzacji. Tak uformowana sieć lamininowa powodowałaby unieruchomienie kolejnych białek błonowych takich jak LBR, LAP2, emeryna, MAN1, LEM2, LUMA, nespryny, białka z domeną SUN i KASH. Niezbędnym elementem modelu jest także zestaw kompleksów białkowych modyfikujących stan chromatyny i białek szkieletu jądrowego po mitozie, w tym fosfatazy PP1 α .

Ważną rolę w tym modelu ogrywałaby struktura macierzy wrzeciona podziałowego formowana przez lamininy typu B przy udziale niektórych tzw. białek - „pasażerów” chromosomów (ang. *chromosomal passenger proteins*). Laminina B będąc strukturalnym składnikiem macierzy wrzeciona mitotycznego może odpowiadać za jego formowanie regulując dostępność różnych czynników mających kluczowe znaczenie dla tego procesu lub wpływając na organizację przestrzenną skondensowanych chromosomów [1]. Także składniki jądrowych kompleksów porowych są zaangażowane w przebieg mitozy. Nup358 jest składnikiem krótkich filamentów wchodzących w skład cytoplazmatycznej części kompleksów porowych, podczas rozpadu otoczki jądrowej przemieszcza się do kinetochoru. Jego brak powoduje błędy podczas formowania kinetochoru i segregacji chromatyd. Ostatnie badania wykazały, że niewielkie frakcje nukleoporyny Nup358 występują w cytoplazmie, gdzie oddziałują z interfazowymi mikrotubulami oraz regulują ich dynamikę, co wskazuje na ich udział w organizacji cytoszkieletu [70].

Badania przeprowadzone ostatnio nad rolą BAF w procesie mitozy pozwoliły stwierdzić, że jego zależność od mikrotubul akumulacja w rdzeniowych rejonach chromosomów telofazowych ułatwia odtwarzanie jądra po podziale mitotycznym. Wyciszenie BAF prowadziło do zablokowania akumulacji lamininy A i emeryny w rdzennym rejonie chromosomów, co powodowało ich nieprawidłową cytoplazmatyczną akumulację, a w konsekwencji znaczne opóźnienie procesu odtwarzania otoczki jądrowej [2].

Rosnąca liczba danych na temat udziału różnych składników otoczki jądrowej i białek oddziałujących z nimi w przebiegu mitozy pozwala na formułowanie przypuszczeń dotyczących istotnego znaczenia zarówno na poziomie strukturalnym (jako składniki macierzy wrzeciona - laminina B lub elementy pozycjonujące centrosomy - emeryna), jak i funkcjonalnym (Nup358) w regulacji tego skomplikowanego procesu, jakim jest podział jądra komórkowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Tsai MY, Wang S, Heidinger JM, Shumaker DK, Adam SA, Goldman RD, Zheng Y (2006) A mitotic lamin B matrix induced by RanGTP required for spindle assembly. *Science* 311: 1887-1893
2. Haraguchi T, Kojidani T, Koujin T, Shimi T, Osakada H, Mori C, Yamamoto A, Hiraoka Y (2008) Live cell imaging and electron microscopy reveal dynamic processes of BAF-directed nuclear envelope assembly. *J Cell Sci* 121: 2540-2554
3. Salpingidou G, Smertenko A, Hausmanowa-Petrucewicz I, Hussey PJ, Hutchison CJ (2007) A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane. *J Cell Biol* 178: 897-904
4. Rzepecki R (2002) The nuclear lamins and nuclear envelope. *Cell Mol Biol Lett* 7: 1019-1035
5. Swedlow JR, Lamond AI (2001) Nuclear dynamics: where genes are and how they got there. *Genome Biol* 2: 21-27
6. Terry LJ, Shows EB, Wentz SR (2007) Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* 318: 1412-1416
7. D'Angelo MA, Hetzer MW (2008) Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol* 18: 456-466
8. Dultz E, Zanin E, Wurzenberger C, Braun M, Rabut G, Sironi L, Ellenberg J (2008) Systematic kinetic analysis of mitotic dis- and reassembly of the nuclear pore in living cells. *J Cell Biol* 180: 857-865
9. Cohen M, Feinstein N, Wilson KL, Gruenbaum Y (2003) Nuclear pore protein gp210 is essential for viability in HeLa cells and *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 14: 4230-4237
10. Dultz E, Ellenberg J (2007) Nuclear envelope. *Curr Biol* 17: R154-6
11. Houben F, Ramaekers FC, Snoeckx LH, Broers JL (2007) Role of nuclear lamina-cytoskeleton interactions in the maintenance of cellular strength. *Biochim Biophys Acta* 1773: 675-686
12. Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK, Wilson KL (2005) The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 21-31
13. Rzepecki R, Bogachev SS, Kokoza E, Stuurman N, Fisher PA (1998) *In vivo* association of lamins with nucleic acids in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci* 111: 121-129
14. Lourim D, Kempf A, Krohne G (1996) Characterization and quantitation of three B-type lamins in *Xenopus oocytes* and eggs: increase of lamin I α protein synthesis during meiotic maturation. *J Cell Sci* 109: 1775-1785
15. Vergnes L, Peterfy M, Bergo MO, Young SG, Reue K (2004) Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10428-10433
16. Vlcek S, Foisner R (2007) Lamins and lamin-associated proteins in aging and disease. *Curr Opin Cell Biol* 19: 298-304
17. Holaska JM, Kowalski AK, Wilson KL (2004) Emerin caps the pointed end of actin filaments: evidence for an actin cortical network at the nuclear inner membrane. *PLoS Biol* 2: E231
18. Krauss SW, Chen C, Penman S, Heald R (2003) Nuclear actin and protein 4.1: essential interactions during nuclear assembly *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10752-10757
19. Gehrig K, Cornell RB, Ridgway ND (2008) Expansion of the nucleoplasmic reticulum requires the coordinated activity of lamins and CTP: phosphocholine cytidylyltransferase α . *Mol Biol Cell* 19: 237-247
20. Laguri C, Gilquin B, Wolff N, Romi-Lebrun R, Courchay K, Callebaut I, Worman HJ, Zinn-Justin S (2001) Structural characterization of the LEM motif common to three human inner nuclear membrane proteins. *Structure* 9: 503-511
21. Bengtsson L, Wilson KL (2006) BAF phosphorylation on ser-4 regulates emerin binding to lamin A *in vitro* and emerin localization *in vivo*. *Mol Biol Cell* 17: 1154-1163
22. Segura-Totten M, Wilson KL (2004) BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol* 14: 261-266
23. Margalit A, Segura-Totten M, Gruenbaum Y, Wilson KL (2005) Barrier-to-autointegration factor is required to segregate and enclose chromosomes within the nuclear envelope and assemble the nuclear lamina. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3290-3295
24. Haraguchi T, Koujin T, Segura-Totten M, Lee KK, Matsuoka Y, Yoneda Y, Wilson KL, Hiraoka Y (2001) BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. *J Cell Sci* 114: 4575-4585
25. Foisner R, Gerace L (1993) Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* 73: 1267-1279
26. Dechat T, Vlcek S, Foisner R (2000) Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J Struct Biol* 129: 335-345
27. Vlcek S, Just H, Dechat T, Foisner R (1999) Functional diversity of LAP2 α and LAP2 β in postmitotic chromosome association in caused by an alpha-specific nuclear targeting domain. *EMBO J* 18: 6370-6384
28. Dechat T, Korbei B, Vaughan OA, Vlcek S, Hutchison CJ, Foisner R (2000) Lamina-associated polypeptide 2 α binds intranuclear A-type Lamins. *J Cell Sci* 113: 3473-3484
29. Pekovic V, Harborth J, Broers JLV, Ramaekers FCS, van Engelen B, Lammens M, von Zglinicki T, Foisner R, Hutchison C, Markiewicz E (2007) Nucleoplasmic LAP2 α -lamin A complexes are required to maintain a proliferative state in human fibroblasts. *J Cell Biol* 176: 163-172
30. Gajewski A, Csaszar E, Foisner R (2004) A phosphorylation cluster in the chromatin-binding region regulates chromosome association of LAP2 α . *J Biol Chem* 279: 35813-35821
31. Snyers L, Schoefer C (2008) Lamina-associated polypeptide 2a forms complexes with heat shock proteins Hsp70 and Hsc70 *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 368: 767-771
32. Somech R, Shaklai S, Geller O, Amariglio N, Simon AJ, Rechavi G, Gal-Yam EN (2005) The nuclear-envelope protein and transcriptional repressor LAP2 β interacts with HDAC3 at the nuclear periphery, and induces histone H4 deacetylation. *J Cell Sci* 118: 4017-4025
33. Segura-Totten M, Kowalski AK, Craigie R, Wilson KL (2002) Barrier-to-autointegration factor: major roles in chromatin decondensation and nuclear assembly. *J Cell Biol* 158: 475-485
34. Lang C, Paulin-Levasseur M, Gajewski A, Alsheimer M, Benavente R, Krohne G (1999). Molecular characterization and developmentally regulated expression of *Xenopus* lamina-associated polypeptide 2 (XLAP2). *J Cell Sci* 112: 749-759
35. O'Brien LL, Wiese C (2006) TPX is required for postmitotic nuclear assembly in cell-free *Xenopus laevis* egg extracts. *J Cell Biol* 173: 685-694
36. Shaklai S, Somech R, Gal-Yam EN, Deshet-Unger N, Moshitch-Moshkovitz S, Hirschberg K, Amariglio N, Simona AJ, Rechavia G (2008) LAP2 ζ binds BAF and suppresses LAP2 β -mediated transcriptional repression. *Eur J Cell Biol* 87: 267-278
37. Bengtsson L, Wilson KL (2004) Multiple and surprising new functions for emerin, a nuclear membrane protein. *Curr Opin Cell Biol* 16: 73-79
38. Holaska JM, Rais-Bahrami S, Wilson KL (2006) Lmo7 is an emerin binding protein that regulates the transcription of emerin and many other muscle-relevant genes. *Hum Mol Genet* 15: 3459-3472
39. Kasof GM, Goyal L, White E (1999) Btf, a novel death-promoting transcriptional repressor that interacts with Bcl-2 related proteins. *Mol Cell Biol* 19: 4390-4404
40. Markiewicz E, Tilgner K, Barker N, van de Wetering M, Clevers H, Dorobek M, Hausmanowa-Petrusewicz I, Ramaekers FC, Broers JL, Blankesteyn WM i inni (2006) The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus. *EMBO J* 25: 3275-3285
41. Tilgner K, Atkinson SP, Golebiewska A, Stojkovic M, Lako M, Armstrong L (2008) Isolation of primordial germ cells from differentiating human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26: 3075-3085
42. Melcon G, Kozlov S, Cutler DA, Sullivan T, Hernandez L, Zhao P, Mitchell S, Nader G, Bakay M, Rottman JN, Hoffman EP, Stewart CL (2006) Loss of emerin at the nuclear envelope disrupts the Rb1/E2F and MyoD pathways during muscle regeneration. *Hum Mol Genet* 15: 637-51

43. Bengtsson L, Otto H (2008) LUMA interacts with emerin and influences its distribution at the inner nuclear membrane. *J Cell Sci* 121: 536-548
44. Mislow JM, Holaska JM, Kim MS, Lee KK, Segura-Totten M, Wilson KL, McNally EM (2002b) Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A *in vitro*. *FEBS Lett* 525: 135-140
45. Mattioli E, Cenni V, Capanni C, Columbaro M, Ognibene A, Squarzone S, Maraldi NM, Lattanzi G (2004) Nuclear AKAPs in muscle differentiation: redistribution of PKA in myotubes and regulation of AKAP149 expression by MAPK/ERK pathway. *FEBS Lett* 582: 190-196
46. Gareiss M, Eberhardt K, Kruger E, Kandert S, Bohm C, Zentgraf H, Muller CR, Dabauvalle MC (2005) Emerin expression in early development of *Xenopus laevis*. *Eur J Cell Biol* 84: 295-309
47. Salpingidou G, Rzepecki R, Kiseleva E, Lyon C, Lane B, Fusiek K, Golebiewska A, Drummond S, Allen T, Ellis JA, Smythe C, Goldberg MW, Hutchison CJ (2008) NEP-A and NEP-B both contribute to nuclear pore formation in *Xenopus* eggs and oocytes. NEP-A and NEP-B both contribute to nuclear pore formation in *Xenopus* eggs and oocytes. *J Cell Sci* 121: 706-16
48. Liu J, Lee KK, Segura-Totten M, Neufeld E, Wilson KL, Gruenbaum Y (2003a) MAN1 and emerin have overlapping function(s) essential for chromosome segregation and cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4598-4603
49. Ishimura A, Ng JK, Taira M, Young SG, Osada S (2006) Man1, an inner nuclear membrane protein, regulates vascular remodeling by modulating transforming growth factor beta signaling. *Development* 133: 3919-28
50. Pinto BS, Wilmington SR, Hornick EE, Wallrath LL, Geyer PK (2008) Tissue-Specific Defects Are Caused by Loss of the *Drosophila* MAN1 LEM Domain Protein. *Genetics* 180: 133-145
51. Osada SI, Ohmori SY, Taira M (2003) XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad1 in *Xenopus* embryos. *Development* 130: 1783-1794
52. Lin F, Morrison JM, Wu W, Worman HJ (2005) MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signaling. *Hum Mol Genet* 14: 437-445
53. Wagner N, Weber D, Seitz S, Krohne G (2004) The lamin B receptor of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci* 117: 2015-2028
54. Makatsori D, Kourmouli N, Polioudaki H, Shultz LD, McLean K, Theodoropoulos PA, Singh PB, Georgatos SD (2004) The inner nuclear membrane protein lamin B receptor forms distinct microdomains and links epigenetically marked chromatin to the nuclear envelope. *J Biol Chem* 279: 25567-25573
55. Takano M, Takeuchi M, Ito H, Furukawa K, Sugimoto K, Omata S, Horigome T (2002) The binding of lamin B receptor to chromatin is regulated by phosphorylation in the RS region. *Eur J Biochemistry* 269: 943-953
56. Foisner R (2003) Cell cycle dynamics of the nuclear envelope. *Scientific World J* 17: 1-20
57. Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B, Stahl PD, Hodzic D (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol* 172: 41-53
58. Warren DT, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM (2005) Nesprins: intracellular scaffolds that maintain cell architecture and coordinate cell function? *Expert Rev Mol Med* 7: 1-15
59. Starr DA, Fischer JA (2005) KASH 'n Karry: The KASH domain family of cargo-specific cytoskeletal adaptor proteins. *Bioessays* 27: 1136-1146
60. Wilhelmssen K, Litjens SH, Kuikman I, Tshimbalanga N, Janssen H, van den Bout I, Raymond K, Sonnenberg A (2005) Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol* 171: 799-810
61. Hodzic DM, Yeater DB, Bengtsson L, Otto H, Stahl PD (2004) Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J Biol Chem* 279: 25805-25812
62. Walczak CE, Heald R (2008) Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *Int Rev Cytol* 265: 111-58
63. Puhka M, Vihinen H, Joensuu M, Jokitalo E (2007) Endoplasmic reticulum remains continuous and undergoes sheet-to-tubule transformation during cell division in mammalian cells. *J Cell Biol* 179: 895-909
64. Salina D, Bodoor K, Eckley DM, Schroer TA, Rattner JB, Burke B (2002) Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown. *Cell* 108: 97-107
65. Kiseleva E, Rutherford S, Cotter LM, Allen TD, Goldberg MW (2001) Steps of nuclear pore complex disassembly and reassembly during mitosis in early *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* 114: 3607-3618
66. Liu J, Prunuske AJ, Fager AM, Ullman KS (2003) The COPI complex functions in nuclear envelope breakdown and is recruited by the nucleoporin Nup153. *Dev Cell* 5: 487-498
67. Ulitzur N, Harel A, Feinstein N, Gruenbaum Y (1992) Lamin activity is essential for nuclear envelope assembly in a *Drosophila* embryo cell-free extract. *J Cell Biol* 119: 17-25
68. Newport JW, Wilson KL, Dunphy WG (1990). A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J Cell Biol* 111: 2247-2259
69. Anderson DJ, Vargas JD, Hsiao JP, Hetzer MW (2009) Recruitment of functionally distinct membrane proteins to chromatin mediates nuclear envelope formation *in vivo*. *J Cell Biol* 186: 183-91
70. Joseph J, Dasso M (2008) The nucleoporin Nup358 associates with and regulates interphase microtubules. *FEBS Lett* 582: 190-196

Karyoskeletal and nuclear envelope proteins in cell cycle progression – known proteins in new functions

Magda Dubińska-Magiera, Magdalena Zaremba-Czogalla, Ryszard Rzepecki

Laboratory of Nuclear Proteins, University of Wrocław, 63/77 Przybyszewskiego St., 51-148 Wrocław, Poland

✉e-mail: rzepecki@ibmb.uni.wroc.pl

Key words: nuclear envelope, nuclear lamina, nucleoskeleton, mitosis

ABSTRACT

The cell nucleus is separated from a cytoplasm by a nuclear envelope (NE) composed of nuclear lamina (NL), outer (ONM) and inner nuclear membrane (INM), connected in the region of nuclear pore complexes (NPC), which are sites for macromolecular transport between the nucleus and the cytoplasm. The nuclear lamina is an essential structure mainly composed of type V intermediate filament proteins, A- and B-type lamins, located between the inner nuclear membrane and the peripheral chromatin. Nuclear envelope, which is composed of integral membrane proteins of the INM (LAP1, LAP2, emerin, MAN1, LBR), has many functions including: connection of nucleoskeleton with cytoskeleton, nuclear lamina meshwork and chromatin. This structure plays a role in maintenance of nuclear shape, spacing of nuclear pore complexes, organization of heterochromatin, DNA replication, and regulation of transcription factors. During cell division NE undergoes depolymerization and reassociation. Latest data suggests, that proteins creating nuclear envelope take part in mitosis.

Analiza czynników wpływających na rozwój steroidooporności w etiopatogenezie astmy oskrzelowej o ciężkim przebiegu

STRESZCZENIE

Astma oskrzelowa jest chorobą o wieloczynnikowej etiologii. Współczesne badania potwierdzają istotną rolę wielu genów w etiopatogenezie astmy. Glikokortykosteroidy są wysoce skutecznymi lekami stosowanymi w kontroli wielu chorób zapalnych, m.in. astmy oskrzelowej. W astmie oskrzelowej występują dwa główne typy oporności na glikokortykosteroidy stosowane wziewnie i doustnie: typ-1 indukowany przez cytokiny lub wrodzony oraz typ-2 obejmujący uogólnioną, pierwotną oporność na kortyzol, która dotyczy wszystkich tkanek i jest związana z mutacją genu dla receptora glikokortykosteroidowego *h-GR/NR3C1* lub genów modulujących jego funkcję. Istnieją przekonujące dowody naukowe, że polimorfizmy genu receptora dla glikokortykosteroidów *h-GR/NR3C1* mogą wpływać na działanie, wrażliwość i odpowiedź na GKS. Praca jest holistyczną analizą roli czynników determinujących rozwój steroidooporności w ciężkiej astmie oskrzelowej ze szczególnym uwzględnieniem wpływu polimorfizmów genu receptora dla glikokortykosteroidów *h-GCR/NR3C1* na powstawanie oporności na GKS.

WPROWADZENIE

Astma oskrzelowa jest poważnym problemem zdrowotnym, społecznym i ekonomicznym. Liczbę chorych w skali świata szacuje się na ponad 300 milionów [1,2]. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) do roku 2025 zachoruje kolejne 100 mln osób [3]. Zapadalność na astmę w zależności od szerokości geograficznej waha od 1% do 18%. Najwyższe wskaźniki zapadalności na astmę i choroby alergiczne stwierdza się w krajach wysokorozwiniętych, takich jak Wielka Brytania, Szwecja, Finlandia, Australia, Nowa Zelandia, Kanada [4]. Liczba zgonów wśród chorych na astmę na świecie wynosi 250 000 rocznie [1,2]. Jeden na 250 wszystkich zgonów na świecie spowodowany jest astmą. Warto podkreślić, że zapadalność wydaje się nie korelować ze śmiertelnością [1,2]. W Europie na astmę choruje około 30 milionów ludzi, a w niektórych populacjach nawet do 40% osób [5]. W Europie z powodu astmy co godzinę umiera człowiek. WHO szacuje, że co roku 15 milionów tzw. lat w zdrowiu (DALYs, ang. *Disability Adjusted Life Years*) jest traconych z powodu astmy, co stanowi 1% obciążeń spowodowanych chorobami [1].

Silnym czynnikiem ryzyka rozwoju astmy i innych chorób alergicznych jest atopia. Zmiany genetyczne nie mogą być jednak przyczyną epidemicznego wzrostu występowania astmy na świecie. Ilościowe i jakościowe zmiany genomu, które wpływają na fenotyp całych populacji zachodzą powoli, z pokolenia na pokolenie, podczas gdy gwałtowny wzrost występowania astmy dotyczy ostatnich 30 lat. Decydującą rolę w wyjaśnieniu tego fenomenu przypisuje się szybko zmieniającym się warunkom środowiska i stylowi życia. Wśród czynników odpowiedzialnych za wzrost częstości występowania astmy najczęściej wymienia się procesy urbanizacji i industrializacji, wzrost emisji zanieczyszczeń powietrza, zmiany klimatyczne, jak również zmianę warunków i stylu życia oraz wzrost higieny [6].

Astma oskrzelowa rozwija się pod wpływem czynników, które zgodnie z Raportem Światowej Strategii Rozpoznawania, Leczenia i Prewencji Astmy (GINA, ang. *The Global Initiative For Asthma*), można podzielić na powodujące rozwój astmy i wyzwalające jej objawy kliniczne. Do pierwszej kategorii należą czynniki osobnicze (głównie genetyczne), a do drugiej czynniki środowiskowe, takie jak: alergeny, czynniki narażenia zawodowego o działaniu alergizującym, dym tytoniowy, zanieczyszczenie powietrza i dieta [7].

Składowa dziedziczna astmy oskrzelowej uwarunkowana jest poligenowo [8,9]. W etiopatogenezę choroby zaangażowane są geny warunkujące zwiększone wytwarzanie alergenowo swoistych przeciwciał klasy IgE (atopia), nadreaktywność oskrzeli, produkcję mediatorów reakcji zapalnej i wielkości

Michał Panek¹

Tadeusz Pietras²

Izabela Kupryś-Lipińska¹

Paweł Górski²

Piotr Kuna¹

Janusz Szemraj^{3,✉}

¹Klinika Chorób Wewnętrznych, Astmy i Alergii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź

²Klinika Pneumonologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź

³Zakład Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź

✉Zakład Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; tel.: (42) 678 06 20, (42) 678 24 65, e-mail: jszemraj@csk.am.lodz.pl

Artykuł otrzymano 26 listopada 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 2 lutego 2010 r.

Słowa kluczowe: polimorfizm genu receptora dla glikokortykosteroidów *h-GCR/NR3C1*, ciężka steroidooporna astma oskrzelowa, zapalenie, steroidooporność

Wykaz skrótów: AP-1 (ang. *activator protein-1*) – białko aktywatorowe 1; DALYs – lata w zdrowiu; GKR – receptor dla glikokortykosteroidów; GKS – glikokortykosteroidy; GRC – receptor dla glikokortykosteroidów; GRE – elementy oddziałujące na glikokortykosteroidy; *h-GCR/NR3C1* – gen receptora dla glikokortykosteroidów; Hsp – białko szoku cieplnego; NF-κB – czynnik jądrowy κB; RFLP – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych; SNP – polimorfizm pojedynczych podstawień

Podziękowanie: Autorzy pracy składają podziękowanie Panu Grzegorzowi Urazińskiemu za pomoc w przygotowaniu rycin.

populacji limfocytów Th1 i Th2 [10]. Należy podkreślić, że dotychczasowe wyniki poszukiwania genu lub genów predyspozycji wystąpienia atopii lub astmy oskrzelowej nie są spójne, a badania naukowe nadal trwają [7].

Oprócz genów predysponujących do rozwoju astmy oskrzelowej istnieją geny warunkujące odpowiedź choroby na leczenie. Występowanie wariantów genów (polimorfizm) kodujących receptor adrenergiczny – β_2 [11], receptor dla glikokortykosteroidów (*h-GCR/NR3C1*) [12] i modyfikujących odpowiedź na terapię przeciwleukotrienowe [13] stanowi ważny czynnik ryzyka w etiopatogenezie astmy oraz odpowiedzi na leczenie [11,13-16]. Zdecydowanie cięższy przebieg choroby jest wiązany z polimorfizmem genu dla β_2 -adrenoreceptorów, szczególnie z obecnością reszty glicyny w pozycji 16 (Gly-16). Homozygoty dla Gly-16 wykazują odwrażliwienie i zmniejszenie gęstości β_2 -receptorów (ang. *downregulation*) [16,17]. Wśród czynników genetycznych mogących mieć związek z ciężkim przebiegiem choroby wymieniane są także geny dla: TNF- α , TGF- β i białka aktywującego 5-lipooxygenazę (FLAP). Ostatnio wykazano, że obecność alleli C i G w genie kodującym IL-4R α wiąże się z ciężkim zaostrzeniem choroby [17].

CIĘŻKA STEROIDOPORNA ASTMA OSKRZELOWA

Astma oskrzelowa jest chorobą współcześnie definiowaną w oparciu o kryteria kliniczne, fizjologiczne i patologiczne. Fenotyp tej jednostki nie został dokładnie określony. Według Raportu GINA astma oskrzelowa to choroba zapalna dróg oddechowych z nagłym lecz odwracalnym zwężeniem oskrzeli [7,17]. Współcześnie nie wypracowano jednego terminu dla określenia różnorodnych form klinicznych astmy z uporczywymi objawami oraz wysokim ryzykiem powikłań zdrowotnych okresowo zagrażających zdrowiu i życiu pacjentów. Około 5% chorych na astmę stanowią ci, u których optymalne, nawet wieloskładnikowe leczenie, nie jest skuteczne. Tych chorych kwalifikujemy do grupy cierpiących na astmę ciężką i trudną. Często wymagają oni szczególnej opieki, wielu dodatkowych badań diagnostycznych, skomplikowanych procedur medycznych, wyjątkowego nadzoru [17]. American Thoracic Society (ATS) celem uporządkowania historycznej terminologii astmy ciężkiej oraz klasyfikacji istniejącego nazewnictwa wprowadziła ogólny termin „astma oporna” (ang. *refraktory asthma*) [17,18]. Obejmuje on następujące określenia: przewlekła ciężka astma (ang. *severe persistent asthma*), astma chwiejna (ang. *brittle asthma*), astma zagrażająca życiu (ang. *fatal asthma*), astma z zaburzeniami świadomości i zatrzymaniem oddechu, astma nieodwracalna (ang. *irreversible asthma*) i astma steroidooporna (ang. *glucocorticoid – resistant asthma*) [17-19].

Jako pierwsi oporność na glikokortykosteroidy opisali Schwartz i wsp. w niewielkiej grupie chorych na astmę oskrzelową, która była źle kontrolowana [20]. Badacze stwierdzili odwracalność obturacji oskrzeli po podaniu β -mimetyków oraz brak wpływu dużych dawek glikokortykosteroidów na nasilenie skurczu oskrzeli. Astmę oporną na glikokortykosteroidy zaczęto początkowo

rozpoznawać, jeżeli po 14 dniach doustnego stosowania prednizolonu w dawce 40 mg/24 h nie obserwowano zwiększenia wyjściowej wartości natężonej objętości wydechowej pierwszo-sekundowej (FEV1) o więcej niż 15% przy założeniu, że wziewne podanie β -mimetyku krótko działającego powodowało wzrost FEV1 o więcej niż 15% [12]. Jeżeli przyrost FEV1 wynosił co najmniej 30% stwierdzano astmę wrażliwą na glikokortykosteroidy [12]. Obecnie, zgodnie ze Stanowiskiem Komisji Chorób Układu Oddechowego Komitetu Patofizjologii Klinicznej Polskiej Akademii Nauk z 2009 roku, astmę oskrzelową steroidooporną definiujemy jako przewlekłą ciężką astmę, oporną na leczenie wysokimi dawkami wziewnych i systemowych glikokortykosteroidów. Jest to postać astmy, w której po zastosowaniu prednizolonu w dawce 20 mg przez pierwszy tydzień oraz 40 mg przez następny nie uzyskuje się wzrostu FEV1 powyżej 15% w stosunku do wartości wyjściowej [21]. Częstość astmy odpornej na glikokortykosteroidy nie jest dokładnie znana [22,23]. Całkowita oporność występuje bardzo rzadko. Szacuje się, że dotyczy mniej niż 1:1000 chorych na astmę oskrzelową [22,23]. Należy jednak podkreślić, że oporność na glikokortykosteroidy obserwuje się u około 50% chorych na astmę ciężką i trudną [21].

Istnieją dwie postaci oporności na glikokortykosteroidy. Typ 1 – oporność indukowana przez cytokiny i typ 2 – oporność związana z mutacją albo polimorfizmem genu dla receptora glikokortykosteroidowego (*h-GCR/NR3C1*) [24-30]. Typ 1 ma charakter nabyty i związany jest z odwracalnym zmniejszeniem zdolności przyłączania glikokortykosteroidów przez limfocyty T. Towarzyszy mu wzrost wytwarzania IL-2, IL-4, IL-5 i IL-13 oraz czynników transkrypcyjnych [12,21,31]. Ian i wsp. wykazali, że nadprodukcja niektórych interleukin, szczególnie IL-2, IL-4 i IL-13, może odpowiadać za zmniejszenie powinowactwa receptorów glikokortykosteroidowych do glikokortykosteroidów u chorych z steroidooporną astmą oskrzelową [31]. Typ 2 dotyczy wszystkich komórek. Związany jest z pierwotną opornością na kortyzol oraz defektem genetycznym – mutacją albo polimorfizmem genu dla receptora glikokortykosteroidowego lub genów modulujących funkcję receptora. Typ 2 ma charakter nieodwracalny. Ito i wsp. zaobserwowali, że w przeciwieństwie do chorych z rodzinną opornością na glikokortykosteroidy, u których stwierdza się mutacje receptora glikokortykosteroidowego i zmianę stężenia kortyzolu w surowicy, wartość podstawowego stężenia kortyzolu we krwi u chorych z opornością na glikokortykosteroidy jest prawidłowa, nie wykazują oni również typowych cech choroby Addisona [12,31].

BUDOWA I MECHANIZM DZIAŁANIA RECEPTORA DLA GLIKOKORTYKOSTEROIDÓW, A ROZWÓJ STEROIDOPORNOŚCI W ASTMIE OSKRZELOWEJ

Gen dla receptora glikokortykosteroidowego *h-GCR/NR3C1* zlokalizowany jest na chromosomie 5q31-q32 i złożony jest z 9 eksonów [12,24,32]. Kodujące rejony DNA, z których transkrypty ostatecznie pojawiają się w cytoplazmie jako pojedyncze cząsteczki mRNA, są zwykle przerywane dużymi fragmentami sekwencji nie-

kodującego DNA [33]. W procesie składania genu (ang. *splicing*) z pierwotnego transkryptu DNA – hn RNA są usuwane introny (sekwencje niekodujące), a eksony – łączone. Transkrypt mRNA białka genu *h-GCR/NR3C1* ulega procesowi składania, co prowadzi do powstania trzech izoform mRNA: GKR α , GKR β i GKR γ [32,34-36]. Rivers i wsp. stwierdzili, że w procesie składania dochodzi do łączenia ze sobą eksonów 9 α i 9 β z pre-mRNA na różne sposoby, czego wyrazem jest obecność w komórce dwóch izoform mRNA: GKR α i GKR β [36]. W ten sposób z genu *h-GCR/NR3C1* powstają dwie cząsteczki mRNA, co jest źródłem zmienności białka h-GCR/NR3C1. Ponieważ warianty mRNA dotyczą sekwencji kodujących (ekson 9 α i 9 β), powstałe na matrycy tych mRNA białka różnią się między sobą sekwencją reszt aminokwasowych, co może powodować zróżnicowanie ich funkcji lub lokalizacji w komórce [36]. Izoforma GKR γ powstaje z połączenia wariantów składania mRNA eksonów 3 i 4. Powstałe na matrycy takiego mRNA białko h-GCR/NR3C1 ma odmienną sekwencję reszt aminokwasowych. Może to prowadzić do upośledzenia translokacji jądrowej receptora i wpływać na zmniejszenie powinowactwa receptorów glikokortykosteroidowych w komórkach stanu zapalnego [36].

Receptor dla glikokortykosteroidów (GKR, ang. *GR*, *GCR*) jest białkiem, zbudowanym z jednego łańcucha polipeptydowego, składającym się z 777 reszt aminokwasowych. Pierwszorzędowa struktura białka receptora została poznana przez klonowanie właściwego komplementarnego DNA (cDNA, ang. *complementary DNA*) [37-40]. W obrębie GKR zidentyfikowano trzy główne obszary – domeny: A, B i C [37]. Pomiędzy resztami aminokwasowymi 1-421, stanowiącymi ponad połowę wielkości cząsteczki receptora zlokalizowana jest domena C, która jest nośnikiem immunogenności i innych cech biologicznych. Obszar centralny GKR (pomiędzy resztami aminokwasowymi 421-486) odpowiedzialny jest za wiązanie DNA (domena B). W jego skład wchodzi reszty cysteinowe, które tworzą kompleksy z cynkiem ułatwiające wiązanie z DNA i warunkujące jego trzeciorzędową strukturę. W końcowym odcinku cząsteczki receptora znajduje się odcinek (domena A) kontrolujący przyłączanie cząsteczki hormonu – glikokortykosteroidu (GKS) [37].

Izoformy GKR α i GKR β zbudowane są z 9 eksonów. Różnią się między sobą wariantami składania 9 eksonu. Odpowiednio ekson 9 α warunkuje postać GKR α , ekson 9 β – GKR β . Izoformy te tworzą heterodimery [12]. Wykazano, że synteza dominującej, nieaktywnej izoformy receptora glikokortykosteroidowego – GKR β może mieć istotny wpływ na funkcję GR α w komórkach oskrzelowo – płucnych [31,41]. GKR γ jest kolejną, dominującą, nieaktywną izoformą GKR [12,42]. Ray i wsp. wykazali, że GKR γ ma dużo mniejszą aktywność transkrypcyjną w porównaniu z izoformą GKR α oraz, tak jak, GKR β może wpływać na tworzenie kompleksów heterodimerów GKR α /GKR β [12,42].

Nieaktywny GKR jest połączony w komórce z dwoma monomerami białka szoku cieplnego Hsp90 (ang. *heat shock protein*), które pokrywają miejsce wiążące DNA w

obszarze domeny B. Zdolność do wiązania Hsp90 wykazuje także domena A. Białko szoku cieplnego determinuje prawidłową konformację GKR, warunkuje powinowactwo receptora do GKS oraz zapobiega jego wiązaniu z DNA [37-39].

Miesfeld i wsp. wykazali wyraźne podobieństwo w ogólnym planie budowy i sekwencji reszt aminokwasowych receptorów dla hormonów steroidowych (mineralokortykosteroidy, androgeny, progesteron, estrogeny), jak również między GKR, a receptorami dla innych hydrofobowych związków o budowie pierścieniowej, jak witamina D, kwas retinojowy lub hormony tarczycy [37,39]. Homologia budowy pierwszorzędowej tych związków w obrębie domeny B dotyczy 50-90% reszt aminokwasowych. Istotne implikacje kliniczne wynikają także z 57% podobieństwa sekwencji reszt aminokwasowych domeny A, warunkującej rozpoznawanie hormonu zdolnego do aktywacji czynnika regulującego transkrypcję genów [37]. Największą zmiennością wśród grupy receptorów dla steroidów charakteryzuje się domena C GKR, w której homologia reszt aminokwasowych nie przekracza 15%. Grzanka i wsp. postulują stwierdzenie istnienia jednej, wielkiej „rodziny receptorów dla hydrofobowych związków pierścieniowych” [37]. Według Autorów wiąże się to z możliwością zajmowania danego receptora steroidowego przez inny hormon steroidowy i agonistycznego lub antagonistycznego działania odpowiednich hormonów.

Glikokortykosteroidy działają po połączeniu się ze swoistymi cytoplazmatycznymi receptorami GKR. Związanie białka receptorowego ze swoistym agonistą powoduje zmianę konformacji przestrzennej GKR w skutek odłączenia Hsp90 [31,37]. Kompleks glikokortykosteroidy/receptor glikokortykosteroidowy (GKS/GKR) ulega fosforylacji, prawdopodobnie koniecznej do jego pełnej aktywacji, i przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie reguluje ekspresję genów [12,31]. Aktywowany kompleks GKS/GKR przyłącza się do sekwencji regulatorowych DNA, nazywanych elementami oddziaływanymi na glikokortykosteroidy (GRE, ang. *glucocorticoid response elements*) [12,37]. Sekwencje GRE zawarte są w promotorowych i regulatorowych częściach genów kodujących białka syntetyzowane w odpowiedzi komórek na działanie GKS. Efektem oddziaływania GKS/GKR z GRE może być wybiórcza represja swoistych genów zapalenia wywołana pleotropowym oddziaływaniem na promotorowe fragmenty swoiste genów dla czynnika jądrowego κ B (NF- κ B) oraz kompleks aktywacyjny białka aktywatorowego (AP-1, ang. *activator protein-1*) [12]. Działania tego typu mają przede wszystkim charakter hamujący [12]. Molekularne oddziaływanie GKS/GKR może wpływać na aktywację albo represję swoistych genów, co określane jest mianem transaktywacji i transrepresji. Jeżeli przyłączenie kompleksu receptor/ligand prowadzi do aktywacji genu, to rejony tego DNA nazywamy sekwencjami wzmocnienia transkrypcji przez glikokortykosteroidy (ang. *GRE positive*). Hamujący efekt GKS na syntezę białek uwarunkowany jest obecnością miejsc wyciszenia transkrypcji przez glikokortykosteroidy (ang. *negative GRE*) [37]. U podstawy skuteczności działania GKS leży pleotropowe działanie GKR. Nieprawidłowa aktywacja

innych szlaków przesyłania informacji wewnątrzkomórkowej znoszących efekty pobudzenia GKR może istotnie wpływać na oporność na GKS [31].

ROLA GLIKOKORTYKOSTEROIDÓW W LECZENIU ASTMY OSKRZELOWEJ

Glikokortykosteroidy (GKS) są wysoce skutecznymi lekami stosowanymi w kontroli astmy oskrzelowej, chorób zapalnych oraz immunologicznych. Przyłączenie się kompleksu (swoisty ligand i receptor dla glikokortykosteroidów) do sekwencji regulatorowych genów kodujących syntezę przeciwzapalnych białek warunkuje kliniczne efekty działania GKS. Aktywacja sekwencji *positive GRE* prowadzi do syntezy lipokortyny-1, receptorów β_2 -adrenergicznych, obojętnych endopeptydaz, inhibitorów jądrowego czynnika kappaB (I-NF- κ B), antyleukoproteaz (SLPI), inhibitora elastazy, białka komórek Clara (CC10), antagonisty receptora IL-1 i IL-1R2 (ang. *decoy receptor*) [22,40,43]. GKS wywierają działania supresyjne na sekwencje promotorowe genu COX-2 (indukowana postać cyklooksygenazy). Nasilają syntezę lipokortyny-1, która hamuje aktywność fosfolipazy A₂ (PLA₂). GKS hamując aktywność PLA₂ zmniejszają produkcję wielu pochodnych kwasu arachidonowego: tromboksanów (tromboksan A₂, TXA₂), prostaglandyn (PGE, PGF, PGI, prostacyklina) i leukotrienów (LTA, LTB, LTC, LTD, SRS-A) oraz GKS hamują transkrypcję genów wielu białek. Klinicznie istotne jest blokowanie produkcji cytokin (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-13, czynnik martwicy nowotworów – TNF α , czynnik stymulujący granulocyty i makrofagi – GM-CSF, RANTES, MIP-1 α , eotaksyna, MCP-1, MCP-3, MCP-4) i ich receptorów (receptor dla IL-2) oraz enzymów i białek pośredniczących w reakcji zapalnej (indukowana synteza tlenu azotu – iNOS, COX-2, endotelina-1, receptor neurokininowy – NK₁ dla substancji P) [22,37,40,43,44]. Ważne, bo mające praktyczne implikacje kliniczne jest działanie wziewnych GKS, które zmniejszają liczbę i aktywność komórek reakcji zapalnej w oskrzelach, w szczególności mastocytów, komórek dendrytycznych, eozynofilów i limfocytów T [44].

Oporność na działanie GKS na poziomie molekularnym wynika z wielu mechanizmów modyfikujących działanie GKR w komórkach. Zmniejszenie odpowiedzi na leki tej grupy tłumaczy się zmniejszoną syntezą GKR, osłabieniem ich zdolności do wiązania się z DNA lub nasiloną ekspresją czynników transkrypcyjnych [12,31].

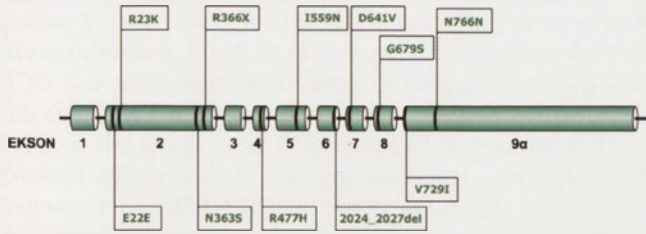
Błędy w wiązaniu ligandu, translokacja jądrowa i zaburzenia w wiązaniu GKR z kofaktorami odpowiadają za powstawanie oporności na GKS na poziomie komórkowym. Istotne jest działanie i rola niektórych cytokin, szczególnie IL-2, IL-4 i IL-13, które zmniejszają powinowactwo GKR w komórkach stanu zapalnego, co indukuje miejscową oporność na przeciwzapalne działanie GKS [12,31]. Zaburzenia tworzenia kompleksów GKS/GKR zdolnych do aktywacji GRE obserwuje się m. in. u chorych na astmę oskrzelową uczulonych na alergeny kota w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i analizowanych *in vitro* [31,41]. Zmniejszenie powinowactwa receptora dla glikokortykosteroidów do GKS odwzorowuje zatem typ zapalenia ob-

serwowany w astmie steroidoopornej [12]. Upośledzenie translokacji jądrowej i zaburzenie tworzenia kompleksów GKS/GKR wykazano również u chorych z nadprodukcją dominującej, nieaktywnej izoformy GKR – GKR β . Ito i wsp. u pacjentów z astmą steroidooporną stwierdzili, że GKR β ma istotny wpływ na funkcję GKR α w komórkach pozyskiwanych z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych [12]. Doniesienia te potwierdzili Goleva i wsp. w badaniach, w których aktywność GKR β wyłączono za pomocą krótkich interferujących sekwencji mRNA [31,41]. Funkcje receptora dla glikokortykosteroidów mogą zostać utracone lub istotnie zmienione pod wpływem aktywności enzymów modyfikujących jego konformację. Fosforylacja GKR wywołana aktywacją kinazy białkowej przez mitogen p-38 (ang. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) może prowadzić do utraty jego funkcji [45]. Również inne kinazy typu MAPK lub szlaki przesyłania sygnałów za pomocą kinaz mogą regulować funkcję GKR [12]. Do utraty zdolności tworzenia kompleksu GKS/GKR z DNA prowadzić może zaburzenie translokacji receptora dla glikokortykosteroidów do jądra komórkowego, co obserwowano szczególnie u pacjentów chorujących na steroidooporną astmę oskrzelową [12]. Silkoff i wsp. zaobserwowali podwyższone stężenie wydychanego tlenu azotu (NO) u steroidoopornych pacjentów z astmą oskrzelową. Duże stężenie NO, w wyniku reakcji nitrozylacji w miejscu wiązania Hsp90 z GKR, wpływa niekorzystnie na funkcje receptora dla glikokortykosteroidów i zmienia stopień jego powinowactwa do ligandu [46]. Zdaniem Adcock i Lane istotną rolę w ciężkiej astmie odpornej na GKS odgrywają cytokiny wytwarzane przez limfocyty pomocnicze typu 2 (Th2). Interleukiny produkowane przez Th2 stymulują syntezę AP-1, która sprzyja zwiększeniu liczby cytokin szeregu limfocytów Th2. Prowadzi to do powstania „błędnego koła” w mechanizmie nasilenia produkcji prozapalnych cytokin [47]. Prawidłowe działanie GKR warunkują także cytoskielet, witamina D₃, oddziaływania regulatorowych limfocytów T (ang. *T reg*), ekspresja onkogenu c-Jun i kofiliny-1 [48-50]. W tym kontekście, szczególnego znaczenia klinicznego, nabiera fakt skojarzenia witaminy D₃ z deksametazonem u chorych na steroidooporną astmę oskrzelową, u których obserwowano przywrócenie zdolności Treg do wydzielania IL-10. To z kolei pozwala na zwiększenie gęstości GKR pod wpływem cytokiny do poziomów obserwowanych u pacjentów wrażliwych na steroidy [50].

Na uwagę, ze względu na skutki kliniczne, zasługuje fakt palenia tytoniu i indukowany stres oksydacyjny u pacjentów chorujących na astmę oskrzelową, u których obserwuje się wzrost oporności na stosowane GKS. Efekt ten obserwowano również u byłych palaczy [51]. Palenie tytoniu wywołuje stres oksydacyjny, który wpływa na translokację jądrową GKR [12], stosunek izoform GKR α /GKR β [52] i kofaktory jądrowe [12]. Rahman i Adcock stwierdzili u chorych na ciężką astmę oporną na steroidy duże nasilenie stresu oksydacyjnego i zmniejszenie przeciwzapalnych właściwości GKS [53].

Predyspozycje genetyczne odpowiadają za około 50% ryzyka rozwoju astmy. Obecnie prowadzone są badania, których celem jest określenie znaczenia tych genów w etiopatogenezie astmy oskrzelowej [54].

POLIMORFIZMY GENU *h-GCR/NR3C1*



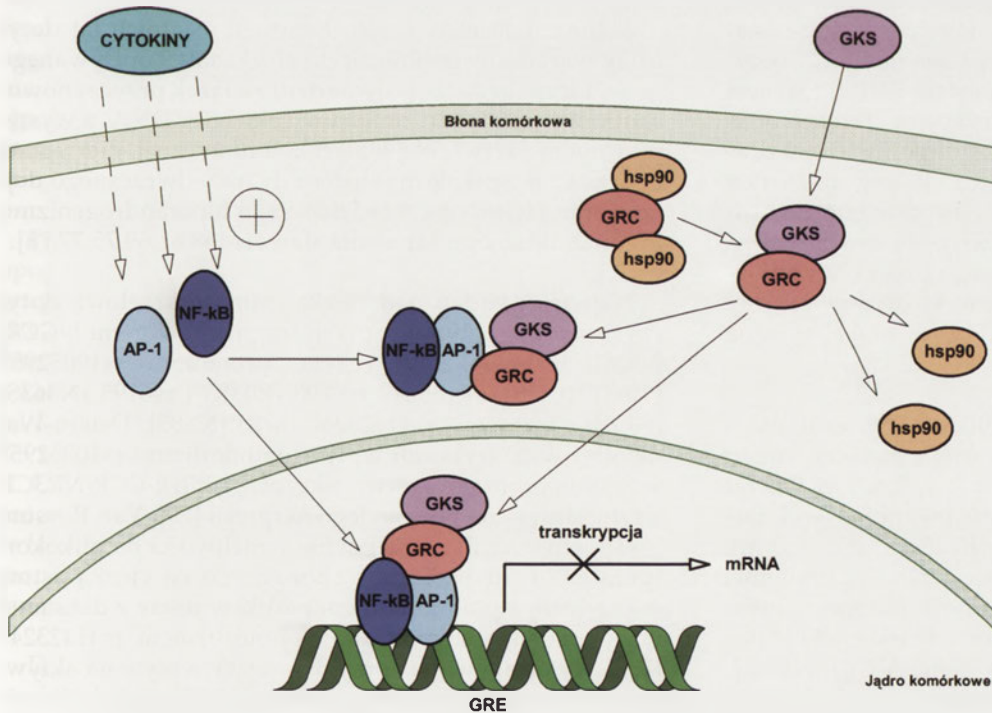
Rycina 1. Pozycje polimorfizmów w obrębie genu *h-GCR/NR3C1* o udokumentowanym wpływie na rozwój oporności na glikokortykosteroidy u chorych na astmę oskrzelową o ciężkim przebiegu. Skrót: *h-GCR/NR3C1* – gen receptora dla glikokortykosteroidów; GKS – glikokortykosteroidy

IMPLIKACJE KLINICZNE POLIMORFIZMÓW GENU RECEPTORA DLA GLIKOKORTYKOSTEROIDÓW U CHORYCH NA ASTMĘ OSKRZELOWĄ

Oporność na glikokortykosteroidy jest zagadnieniem bardzo złożonym. Istnieją poważne wątpliwości, czy rodzimy się ze steroidooporną astmą oskrzelową, czy nabywamy ją w ciągu życia. Jedną z podstawowych przesłanek genetycznych, potwierdzonych obserwacjami klinicznymi, jest występowanie polimorfizmów w obrębie genu dla receptora glikokortykosteroidowego. Na podstawie dotychczasowych badań wydaje się, że zaburzenia wzajemnego oddziaływania na poziomie receptor (GKR) – glikokortykosteroid (GKS) z czynnikami transkrypcyjnymi (m.in. białko aktywatorowe AP-1, jądrowy czynnik kappa B), tzw. oporność pierwotna, stanowią jedną z mo-

lekularnych podstaw niewrażliwości na glikokortykosteroidy stosowane w astmie oskrzelowej [12,31,45,47].

Polimorfizm genu oznacza występowanie w populacji, w danym locus, dwóch lub więcej alleli z częstością większą niż wynikająca z mutacji. Ta zmienność sekwencji nukleotydowych stanowi o zróżnicowaniu wewnątrz gatunku. Polimorfizm oznacza, że najczęściej występujący allel genu *h-GCR/NR3C1* występuje z częstością mniejszą niż 99% [55]. Dotychczas zidentyfikowano kilkanaście rejonów polimorficznych w obrębie genu *h-GCR/NR3C1* zlokalizowanych w eksonach 2–9 oraz intronach C i D, a także w rejonach bezpośrednio sąsiadujących z promotorem genu receptora dla glikokortykosteroidów [25]. W siedmiu z 9 eksonów stwierdzono występowanie różnych form allelicznych genu *h-GCR/NR3C1* związanych z występowaniem oporności na GKS. Określono pozycje, zmiany w sekwencji DNA genu receptora dla glikokortykosteroidów oraz zidentyfikowano różnice w składzie reszt aminokwasowych białka *h-GCR/NR3C1*. W kolejnych eksonach zlokalizowano następujące warianty polimorficzne genu *h-GCR/NR3C1* receptora dla glikokortykosteroidów warunkujące oporność na GKS: ekson 2: polimorfizm E22E (pozycja 198, GAG → GAA) [56], polimorfizm R23K (pozycja 200, AGG → AAG) [56], polimorfizm R366X (pozycja 1188, wstawienie T, przesunięcie ramki odczytu) [57], polimorfizm N363S (pozycja 1220, ATT → AGT, Asp363Ser) [58-60], ekson 4: polimorfizm R477H (pozycja 1562, CGC → CAC, Arg477His) [61], ekson 5: polimorfizm I559N (pozycja 1808, ATC → AAC, Ile559Asp) [58,62,63], ekson 6: polimorfizm 2024_2027del (pozycja 2024, delecja 4 bp) [64,65], ekson 7: polimorfizm D641V (pozycja 2054, GAC → GTC, Asp645Val) [66,67], ekson 8: polimorfizm G679S (pozycja 2167, GGT → AGT, Gly679Ser) [61] oraz ekson 9α: polimorfizm V729I (pozycja 2367, GGT → ATT, Ile729Val) [58,68], polimorfizm N766N (pozycja 2430, AAT → AAC) [69]. Podobne zmiany polimorficzne w genie *h-GCR/NR3C1* stwierdzono w intronach: intron C (polimorfizm IVSC-46 G>C, pozycja 1484, G → C) [56] i intron D (polimorfizm IVSD-16 G>T, pozycja 1600, G → T) [56] (Ryc. 1).



Rycina 2. Model oddziaływania czynników transkrypcyjnych z kompleksem GRC/GKS. Skrót: AP-1 – białko aktywatorowe 1; GKS – glikokortykosteroidy; GRC – receptor dla glikokortykosteroidów; GRE – elementy oddziaływujące na glikokortykosteroidy; Hsp – białko szoku cieplnego; mRNA - matrycowy (informacyjny) RNA; NF-κB – czynnik jądrowy κB; "+" – aktywacja

Badania populacyjne przeprowadzone w Holandii przez Kopera i wsp. dowiodły istnienia związku pomiędzy występowaniem polimorficznych wariantów eksonu 2 genu *h-GCR/NR3C1*, a opornością na glikokortykosteroidy [56]. Zmiany w obrębie kodującego DNA genu receptora dla

glikokortykosteroidów determinowały różnice w składzie reszt aminokwasowych domeny C białka h-GCR/NR3C1. W obszarze tym zlokalizowane jest miejsce wiążące białko aktywatorowe AP-1, które jest regulatorem aktywności wielu genów odpowiedzialnych za rozwój zapalenia. Kolejne badania wykazały, że wzrost aktywności tego białka towarzyszył zmianom w zdolności wiązania GKS/GKR z GRE, co stanowiło molekularny mechanizm oporności na glikokortykosteroidy. Adcock i wsp. wykazali, że u chorych z pierwotną opornością na GKS występuje upośledzone wiązanie kompleksu GKS/GKR z GRE, które jest spowodowane wzrostem aktywności AP-1 lub wzrostem powinowactwa AP-1 do GKR i w konsekwencji nasilenia ich bezpośredniego oddziaływania [37,70] (Ryc. 2).

Polimorfizm eksonu 4 genu *h-GCR/NR3C1* powodował zmianę reszt Arg477His w obrębie domeny B GKR odpowiedzialnej za wiązanie się receptora z DNA [61]. Pozostałe zmiany polimorficzne zlokalizowane w eksonie 5, 6, 7, 8 i 9 wpływały na zdolność wiązania cząsteczki hormonu GKS z domeną A GKR. Błędy i zmiany w łączeniu się ligandu ze właściwym receptorem istotnie wpływały na funkcję oraz aktywność GKR. Zaburzenia wiązania białka h-GCR/NR3C1 z jego agonistą GKS, wpływają na zmiany jego czynności, prawdopodobnie w skutek zahamowania jego fosforylacji i braku zmian konformacji przestrzennej receptora. Brak aktywacji kompleksu GKS/GKR prowadzi do zaburzeń w addycji GRE. W istocie dochodzi do braku aktywacji regulatorowych części genów kodujących białka syntetyzowane w odpowiedzi na GKS [37].

Niespecyficzny polimorfizm dotyczy zmian pojedynczego nukleotydu w określonym locus sekwencji DNA i określa się mianem polimorfizmu pojedynczych podstawień (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*). Specyficzność przypisuje się zaś takiej postaci SNP, która jest identyfikowana przez enzymy restrykcyjne. Ten typ polimorfizmu oznacza się jako RFLP, czyli polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, ang. *restriction fragment length polymorphism*) [71]. Te dziedziczne warianty sekwencji DNA mogą objawiać się utworzeniem lub zanikiem miejsca rozpoznawanego przez endonukleazy restrykcyjne, lub zmianą liczby nukleotydów między takimi miejscami. Polimorfizmy RFLP są przekazywane jako cechy dominujące [55].

Ważne, bo mające istotne implikacje molekularne i biochemiczne, jest opisanie przez wielu badaczy zmian sekwencji polimorficznych eksonów 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 genu *h-GCR/NR3C1*, które są hydrolizowane przez endonukleazy restrykcyjne II klasy. Identyfikacja przez enzymy restrykcyjne SNPów dowodzi specyficzności zmiennej długości fragmentów polimorficznych eksonów genu receptora dla glikokortykosteroidów. Marker RFLP dowodzi więc pośrednio mutacji w genie *h-GCR/NR3C1*, bez określenia podłoża mutacji. Zmiany sekwencji DNA dla GKR są molekularnym podłożem zmienności białka h-GCR/NR3C1.

Istnieją doniesienia wielu badaczy nad związkiem poszczególnych wariantów polimorficznych genu *h-GCR/*

NR3C1 ze zwiększonym stężeniem insuliny we krwi, nadciśnieniem tętniczym, otyłością, zaburzeniami psychicznymi i chorobami hematologicznymi oraz z podstawowym poziomem wydzielania kortyzolu. W rozważaniach nad genetycznymi czynnikami warunkującymi rozwój steroidoopornej astmy oskrzelowej, gen *h-GCR/NR3C1* pojawia się rzadko, co jest niejasne i wymaga dalszych wnikliwych badań. Karl i wsp. wykazali związek pomiędzy wystąpieniem mutacji *de novo* w 366 kodonie (w obrębie eksonu 2 genu *h-GCR/NR3C1*, a rozwojem nadmiernej pigmentacji skóry i błon śluzowych oraz objawami neurologicznymi związanymi z obecnością guza przysadki, czyli zespołem Nelsona. Objawom choroby towarzyszyła oporność na glikokortykosteroidy [57].

W obrębie eksonu 2 genu dla glikokortykosteroidów opisano zmiany sekwencji nukleotydów odpowiedzialnych za rozwój cukrzycy [59], choroby naczyń wieńcowych [59], zespołu wielotorbielowości jajników [72], nadwagi mężczyzn [73], otyłości [74] i zmniejszenie gęstości mineralnej kości [60], jak i indukcję zaburzeń psychotycznych, w tym schizofrenii [75]. Zamiana pojedynczego nukleotydu w intronie D genu *h-GCR/NR3C1* prowadziła z kolei do istotnego wzrostu ciśnienia tętniczego, co wykazali Lin i wsp. [76]. Badania nad eksonem 5 dowiodły korelacji pomiędzy zmniejszeniem ekspresji genu *h-GCR/NR3C1*, a występowaniem choroby Cushinga i oporności na glikokortykosteroidy. Obserwowano brak proliferacji limfocytów po podaniu deksometazonu oraz inaktywację rejonów GRE [58,62,63]. Natomiast zmiany w sekwencji nukleotydów w pozycji 2024 genu receptora dla glikokortykosteroidów redukują syntezę GKR oraz zmniejszają wrażliwość proliferacyjną leukocytów na GKS [64,65].

Jedne z najciekawszych doniesień ostatnich lat dotyczyły wariantów polimorficznych eksonu 9 opisywanego genu. Liczni badacze potwierdzili związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy zmianami sekwencji DNA, a występowaniem przewlekłej białaczki limfatycznej, pierwotnej oporności na glikokortykosteroidy, przedwczesnego dojrzewania płciowego, młodzieńczego hiperandrogenizmu i reumatoidalnego zapalenia stawów [58,61,69,75,77,78].

Najwięcej badań nad ciężką astmą oskrzelową dotyczyło analizy polimorficznych fragmentów genu *h-GCR/NR3C1* człowieka w rejonie promotora rs10052957 (*Tth1111*) [79], eksonu 2 rs6190 (R23K) i rs6195 (N363S) [80-83] i intronu 2 rs41423247 (*BclII*) [83-85]. Detera-Wadleigh i wsp. wykazali wpływ polimorfizmu rs10052957 w rejonie promotora na transkrypcję genu *h-GCR/NR3C1*, a tym samym na poziom jego ekspresji [79]. Van Rossum i wsp. stwierdzili zmniejszenie wrażliwości na glikokortykosteroidy u pacjentów chorujących na ciężką astmę oskrzelową z polimorfizmem rs6190 w teście z deksametazonem [80]. Badania nad polimorfizmem rs41423247 (*BclII*) wykazały jego istotny, hamujący wpływ na aktywność wydzielniczą kory nadnerczy [83-85] (Tabela 1).

Pojedyncze prace naukowe nad związkami poszczególnych wariantów polimorficznych eksonów 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 genu *h-GCR/NR3C1* u pacjentów chorujących na ciężką astmę oskrzelową z opornością na glikokortyko-

Tabela 1. Charakterystyka klinicznie istotnych polimorfizmów w obrębie genu *h-GCR/NR3C1*.

Lp.	Rejon	Pozycja	Nazwa polimorfizmu	Zmiana nukleotydów	Zmiana reszt aminokwasowych
1	Ekson 2	198	E22E	G → A	-
2	Ekson 2	200	R23K	G → A	Arg23Lys
3	Ekson 2	1188	zmiana fazy odczytu	wstawienie T	-
4	Ekson 2	1220	N363S	A → G	Asp363Ser
5	Ekson 4	1562	R477H	G → A	Arg477His
6	Ekson 5	1808	I559N	T → A	Ile559Asp
7	Ekson 6	2024	zmiana fazy odczytu	delecja 4 par zasad	-
8	Ekson 7	2054	D641V	A → T	Asp645Val
9	Ekson 8	2167	G679S	G → A	Gly679Ser
10	Ekson 9a	2367	V729I	G → A	Ile729Val
11	Ekson 9a	2430	N766N	T → C	-
12	Intron C	1484	IVSC - 46	G → C	-
13	Intron D	1600	IVSD - 16	G → T	-
14	Intron 2	Promotor	BclI	C → G	-
15	-3807C/T	Promotor	Tth111I	C → T	-

steroidy wymagają weryfikacji i kolejnych analiz. Należy podkreślić, że istniejące, stosunkowo nieliczne doniesienia, czasami o niejednoznacznych wynikach, nad sprzężeniami poszczególnych wariantów polimorficznych genu *h-GCR/NR3C1* z opisywanymi chorobami, postulują dalsze i wnikliwe badania.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przeglądu publikacji na temat roli steroidooporności w astmie oskrzelowej można dokonać próby całościowej analizy, czy jest ona zjawiskiem pierwotnym (np.: warianty polimorficzne genu *h-GCR/NR3C1*), czy też wtórnym skutkiem, np.: do działania czynników środowiskowych, nasilenia alergicznego procesu zapalnego, stosowania wysokich dawek β_2 -agonistów, zakażenia wirusowego, czy wieloletniej kortykosteroidoterapii. Oporność na steroidy jest być może także związana z mechanizmem zmniejszenia gęstości receptorów, co ma miejsce przy stosowaniu dużych dawek GKS [86].

Prace Sher i wsp., jako jednych z pierwszych badaczy oporności na GKS, przyczyniły się do wyodrębnienia w grupie pacjentów z astmą steroidooporną dwóch rodzajów defektów GKR [86,87]. Typ I, w którym obserwowali zmniejszoną zdolność wiązania GKS przez GKR, pomimo 4-krotnego wzrostu liczby receptorów przypadających na komórkę. Defekt ten dotyczył wyłącznie limfocytów T i nasilał się po inkubacji z IL-2 i IL-4 [86,87]. W typie II, GKR posiadał prawidłową zdolność wiązania z GKS, natomiast liczba receptorów przypadających na komórkę była kilkakrotnie mniejsza. Zaburzenie to stwierdzono w monocytach i limfocytach. Inkubacja komórek z interleukinami nie zmieniała liczby GKR [86,87].

Do tej pory pojawiło się niewiele badań, w których stwierdzono zmiany w strukturze GKR u pacjentów z steroidooporną astmą oskrzelową. Hurley i wsp., jako jedni z pierwszych, opisali zmiany właściwości i struktury GKR w skutek mutacji punktowej w genie *h-GCR/NR3C1* [86,88]. Prawdopodobnie istnieje pewna analogia z rodzinną opornością na GKS. U chorych tych wykazano

2-3 krotnie mniejszą zdolność wiązania GKS przez GKR [86].

Badania przeprowadzone w ciągu ostatnich lat wykazały występowanie oporności na GKS u 5-10% wszystkich chorych na astmę oskrzelową. Szczególną uwagę zwraca istotne nasilenie steroidooporności (35-50%) wśród pacjentów z ciężką astmą. Kluczową rolę w rozwoju tego zaburzenia przypisuje się mutacjom oraz polimorfizmom genu *h-GCR/NR3C1*.

Najnowsze doniesienia naukowe zwracają uwagę na rolę pozareceptorowych czynników transkrypcyjnych w powstawaniu zjawiska steroidooporności. Przypuszcza się, że zaburzenia na poziomie powinowactwa AP-1 do GKR są jedną z molekularnych dróg oporności komórek na działanie GKS. Czynniki transkrypcyjne, a wśród nich zwłaszcza białko aktywatorowe AP-1 i jądrowy czynnik kappaB (NF-kB) są modulatorami aktywności wielu genów odpowiedzialnych za rozwój zapalenia oraz łącząc się z GKR blokują wiązanie się GKS-GKR z sekwencjami DNA regulacyjnymi rejonów genów (GRE).

Na podstawie przeglądu doniesień na temat zjawiska steroidooporności w astmie oskrzelowej można stwierdzić, że jest ono uwarunkowane od wielu czynników. Istotny wpływ mają zarówno zmienne środowiskowe, jak i osobnicze. Uwagę zwraca fakt niewielkiej liczby badań nad znaczeniem i rolą polimorfizmów genu *h-GCR/NR3C1* w etiopatogenezie ciężkiej steroidoopornej astmy oskrzelowej. Ze względu na obserwowane nie tylko w astmie oskrzelowej, ale także w reumatoidalnym zapaleniu stawów, białaczkach, reakcjach odrzucania przeszczepu i wielu innych chorobach, zjawisko steroidooporności wymaga dalszych pogłębionych badań ze szczególnym uwzględnieniem roli polimorfizmów genu *h-GCR/NR3C1*, który może stać się punktem uchwytu dla nowych form terapii. Ewaluacja jego przydatności w tym zakresie wymaga dalszych analiz.

PISMIENICTWO

- Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R (2004) The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 59: 469-478
- Beasley R (2008) The Global Burden of Asthma Report, Global Initiative for Asthma (GINA), <http://www.ginasthma.com/Guidelineitem.asp>
- <http://www.who.int>
- <http://www.isaac.auckland.ac.nz>
- <http://www.ceps.eu>
- Kupryś I, Kuna P (2003) Epidemia chorób alergicznych – nowy problem zdrowotny współczesnego świata. *Pol Merkuriusz Lek* 83: 453-455

7. Available from <http://www.ginasthma.com>
8. Holloway JW, Beghè B, Holgate ST (1999) The genetic basis of atopic asthma. *Clin Exp Allergy* 29: 1023-1032
9. Wiesch DG, Meyers DA, Bleecker ER (1999) Genetics of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 104: 895-901
10. Strachan DP (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299: 1259-1260
11. Israel E, Chinchilli VM, Ford JG, Boushey HA, Cherniack R, Craig TJ, Deykin A, Fagan JK, Fahy JV, Fish J, Kraft M, Kunselman SJ, Lazarus SC, Lemanske RF Jr, Liggett SB, Martin RJ, Mitra N, Peters SP, Silverman E, Sorkness CA, Szeffler SJ, Wechsler ME, Weiss ST, Drazen JM (2004) Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial. *Lancet* 364: 1505-1512
12. Ito K, Chung KF, Adcock IM (2006) Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 117: 522-543
13. In KH, Asano K, Beier D, Grobholz J, Finn PW, Silverman EK, Silverman ES, Collins T, Fischer AR, Keith TP, Serino K, Kim SW, De Sanctis GT, Yandava C, Pillari A, Rubin P, Kemp J, Israel E, Busse W, Ledford D, Murray JJ, Segal A, Tinkleman D, Drazen JM (1997) Naturally occurring mutations in the human 5-lipoxygenase gene promoter that modify transcription factor binding and reporter gene transcription. *J Clin Invest* 99: 1130-1137
14. Drazen JM, Weiss ST (2002) Genetics: inherit the wheeze. *Nature* 418: 383-384
15. Lane SJ, Arm JP, Staynov DZ, Lee TH (1994) Chemical mutational analysis of the human glucocorticoid receptor cDNA in glucocorticoid-resistant bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 42-48
16. Tattersfield AE, Hall IP (2004) Are beta2-adrenoceptor polymorphisms important in asthma—an unravelling story. *Lancet* 364: 1464-1466
17. Jahnz-Różyk K (2008) Astma oskrzelowa ciężka i trudna. *Pol Merk Lek* 2: 41-43
18. Tarlo SM, Liss GM (2003) Occupational asthma: an approach to diagnosis and management. *CMAJ* 168: 867-871
19. Available from <http://www.thoracic.org>
20. Schwartz HJ, Lowell FC, Melby JC (1968) Steroid resistance in bronchial asthma. *Ann Intern Med* 69: 493-499
21. Komisja Chorób Układu Oddechowego Komitetu Patofizjologii Klinicznej Polskiej Akademii Nauk. Przewodnicząca Komisji: prof. Ryszarda Bożena Chazan. Stanowisko Komisji Chorób Układu Oddechowego Komitetu Patofizjologii Klinicznej Polskiej Akademii Nauk. Astma ciężka. Polska Akademia Nauk, Warszawa 2009
22. Barnes PJ (1998) Glucocorticosteroids, W: Barnes PJ, Rodger IW, Thompson NC (red) Asthma: Basic mechanisms and clinical management. Wydawnictwo Academic Press w San Diego, San Diego, str. 725-766
23. Lane SJ, Lee TH (1997) Mechanisms of corticosteroid resistance in asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 113: 193-195
24. Leung DY, Bloom JW (2003) Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 111: 3-22
25. Bray PJ, Cotton RG (2003) Variations of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): pathological and *in vitro* mutations and polymorphisms. *Hum Mutat* 21: 557-568
26. DeRijk RH, Schaaf M, de Kloet ER (2002) Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol* 81: 103-122
27. de Lange P, Koper JW, Brinkmann AO, de Jong FH, Lamberts SW (1999) Natural variants of the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor do not alter sensitivity to glucocorticoids. *Mol Cell Endocrinol* 153: 163-168
28. de Lange P, Koper JW, Huizinga NA, Brinkman AO, de Jong FH, Karl M, Chrousos GP, Lamberts SW (1997) Differential hormone-dependent transcriptional activation and repression by naturally occurring human glucocorticoid receptor variants. *Mol Endocrinol* 11: 1156-1164
29. Ruiz M, Lind U, Gafvels M, Eggertsen G, Carlstedt-Duke J, Nilsson L, Holtmann M, Stiernä P, Wikstrom AC, Werner S (2001) Characterization of two novel mutations in the glucocorticoid receptor gene in patients with primary cortisol resistance. *Clin Endo* 55: 363-371
30. Huizenga AT, de Lange P, Koper JW, de Herder WW, Abs R, Kasteren JH, de Jong FH, Lamberts SW (2000) Five patients with biochemical and/or clinical generalized glucocorticoid resistance without alterations in the glucocorticoid receptor gene. *J Clin Endo Met* 85: 2076-2081
31. Ian M, Adcock IM, Ford PA, Bhavsar P, Ahmad T, Chung KF (2008) Steroid resistance in asthma: mechanisms and treatment options. *Curr Allergy Asthma* 8: 171-178
32. Hawkins GA, Amelung PJ, Smith RS, Jongepier H, Howard TD, Koppelman GH, Meyers DA, Bleecker ER, Postma DS (2004) Identification of polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in a multi-racial asthma case and control screening panel. *DNA Seq* 15: 167-173
33. Granner DK (1998) Organizacja i replikacja DNA, W: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (red) Biochemia Harpera. Wydawnictwo Lekarskie PZWL w Warszawie, Warszawa, str. 488-512
34. Encio IJ, Detera-Wadleigh SD (1991) The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 266: 7182-7188
35. Granner DK (1998) Synteza, przekształcanie i metabolizm RNA, W: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (red) Biochemia Harpera. Wydawnictwo Lekarskie PZWL w Warszawie, Warszawa, str. 513-530
36. Rivers C, Levy A, Hancock J, Lightman S, Norman M (1999) Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4283-4286
37. Grzanka A, Rogala B (2000) Molecular mechanism of glucocorticoids and difficult asthma. *Allergy Asthma Immunology* 5: 247-252
38. Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J, Poellinger L, Okret S, Wikström AC, Brönnegård M, Gillner M, Dong Y, Fuxe K, Cintra A (1987) Biochemistry, molecular biology, and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endocr Rev* 8: 185-234
39. Miesfeld RL (1990) Molecular genetics of corticosteroid action. *Am Rev Respir Dis* 141: 11-17
40. Barnes PJ (1997) Molecular mechanisms of glucocorticoid action in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 10: 3-19
41. Goleva E, Li LB, Eves PT, Strand MJ, Martin RJ, Leung DY (2006) Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 607-616
42. Ray DW, Davis JR, White A, Clark AJ (1996) Glucocorticoid receptor structure and function in glucocorticoid-resistant small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* 56: 3276-3280
43. Barnes PJ (1998) Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci* 94: 557-572
44. van der Velden VH (1998) Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators Inflamm* 7: 229-237
45. Hew M, Bhavsar P, Torrego A, Meah S, Khorasani N, Barnes PJ, Adcock I, Chung KF (2006) Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 134-141
46. Silkoff PE, Lent AM, Busacker AA, Katial RK, Balzar S, Strand M, Wenzel SE (2005) Exhaled nitric oxide identifies the persistent eosinophilic phenotype in severe refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116: 1249-1255
47. Adcock IM, Lane SJ (2003) Corticosteroid-insensitive asthma: molecular mechanisms. *J Endocrinol* 178: 347-355
48. Vardimon L, Ben-Dror I, Oren A, Polak P (2006) Cytoskeletal and cell contact control of the glucocorticoid pathway. *Mol Cell Endocrinol* 252: 142-147
49. Vasavda N, Eichholtz T, Takahashi A, Affleck K, Matthews JG, Barnes PJ, Adcock IM (2006) Expression of nonmuscle cofilin-1 and steroid responsiveness in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 118: 1090-1096
50. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards DF, Adikibi T, Pridgeon C, Dallman M, Loke TK, Robinson DS, Barrat FJ, O'Garra A, Lavender P, Lee TH, Corrigan C, Hawrylowicz CM (2006) Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest* 116: 146-155

51. Chaudhuri R, Livingston E, McMahon AD, Lafferty J, Fraser I, Spears M, McSharry CP, Thomson NC (2006) Effects of smoking cessation on lung function and airway inflammation in smokers with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 127-133
52. Livingston E, Darroch CE, Chaudhuri R, McPhee I, McMahon AD, Mackenzie SJ, Thomson NC (2004) Glucocorticoid receptor alpha:beta ratio in blood mononuclear cells is reduced in cigarette smokers. *J Allergy Clin Immunol* 114: 1475-1478
53. Rahman I, Adcock IM (2006) Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 28: 219-242
54. Cookson W, Moffatt M (2004) Making sense of asthma genes. *N Engl J Med* 351: 1794-1796
55. Kaczmarek M, Hoppe-Golebiewska J, Napierała D, Słomski R (2008) Wykrywanie mutacji i polimorfizmów genu DMD metodą PCR-RFLP. W: Słomski R (red) Analiza DNA. Teoria i praktyka. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań str. 306-310
56. Koper JW, Stolk RP, de Lange P, Huizinga NA, Molijn GJ, Pols HA, Grobbee DE, Karl M, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SW (1997) Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Hum Genet* 99: 663-668
57. Karl M, von Wichert G, Kempter E, Katz DA, Reincke M, Monig H, Ali IU, Stratakis CA, Oldfield EH, Chrousos GP, Schulte HM (1996) Nelson's syndrome associated with a somatic frame shift mutation in the glucocorticoid receptor gene. *J Clin. Endo Met* 81: 124-129
58. de Lange P, Koper JW, Huizinga NA, Brinkman AO, de Jong FH, Karl M, Chrousos GP, Lamberts SW (1997) Differential hormone-dependent transcriptional activation and repression by naturally occurring human glucocorticoid receptor variants. *Mol Endocrinol* 11: 1156-1164
59. Dobson MG, Redfern CP, Unwin N, Weaver JU (2001) The N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor: potential contribution to central obesity in men and lack of association with other risk factors for coronary heart disease and diabetes mellitus. *J Clin Endo Met* 86: 2270-2274
60. Huizinga NA, Koper JW, de Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, Grobbee DE, Brinkman AO, de Jong FH, Lamberts SW (1998) A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with an increased sensitivity to glucocorticoids. *J Clin Endo Met* 83: 144-151
61. Ruiz M, Lind U, Gafvels M, Eggertsen G, Carlstedt-Duke J, Nilsson L, Holtmann M, Stiernä P, Wikstrom AC, Werner S (2001) Characterization of two novel mutations in the glucocorticoid receptor gene in patients with primary cortisol resistance. *Clin Endo* 55: 363-371
62. Karl M, Lamberts SW, Koper JW, Katz DA, Huizinga NA, Kino T, Haddad BR, Hughes MR, Chrousos GP (1996) Cushing's disease preceded by generalized glucocorticoid resistance: clinical consequences of a novel, dominant-negative glucocorticoid receptor mutation. *Proc Assoc Am Phys* 108: 296-307
63. Muegge K, Willimans TM, Kant WJ, Kant J, Karin M, Chiu R, Schmidt A, Siebenlist U, Young HA, Durum SK (1989) Interleukin-1 costimulatory activity on the interleukin-2 promoter *via* AP-1. *Science* 246: 249-251
64. Karl M, Lamberts SW, Detera-Wadleigh S, Encio IJ, Stratakis CA, Hurley DM, Accili D, Chrousos GP (1993) Familial glucocorticoid resistance caused by a splice site deletion in the human glucocorticoid receptor gene. *J Clin Endo Met* 76: 683-689
65. Lamberts SW, Koper JW, Biemond P, den Holder FH, de Jong FH (1992) Cortisol receptor resistance: the variability of its clinical presentation and response to treatment. *J Clin Endo Met* 74: 313-321
66. Hurley DM, Accili D, Stratakis CA, Karlsson I, Vamvakopoulos N, Rorer E, Constantine K, Taylor SI, Chrousos GP (1991) Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J Clin Invest* 87: 680-686
67. Vingerhoeds AC, Thijssen JH, Schwarz F (1976) Spontaneous hypercortisolism without Cushing's syndrome *J Clin Endo Met* 43: 1128-1133
68. Malchoff DM, Brufsky A, Reardon G, McDermott P, Javier E, Bergh EC, Rowe D, Malchoff CD (1993), A mutation of the glucocorticoid receptor in primary cortisol resistance. *J Clin Invest* 91: 1918-1925
69. Soufi M, Kaiser U, Schneider A, Beato M, Westphal HM (1995) The DNA and steroid binding domains of the glucocorticoid receptor are not altered in mononuclear cells of treated CLL patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103: 175-183
70. Adcock IM, Lane SJ, Brown CR, Lee TH, Barnes PJ (1995) Abnormal glucocorticoid receptor-activator protein 1 interaction in steroid-resistant asthma. *J Exp Med* 182: 1951-1958
71. Bal J, Bocian E (2001) Zmienność i dziedziczność. W: Bal J (red) Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN w Warszawie, Warszawa, str. 59-79
72. Kasha-Miller M, Azziz R, Feingold E, Witchel SF (2000) A variant of the glucocorticoid receptor gene is not associated with adrenal androgen excess in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 74: 1237-1240
73. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Pérusse L, Lindell K, Carlsson B, Bouchard C, Björntorp P (2000) A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obes Res* 8: 211-218
74. Echwald SM, Sorensen TI, Anderson T, Pedersen O (2001) The Asn-363Ser variant of the glucocorticoid receptor gene is not associated with obesity or weight gain in Danish men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 1563-1565
75. Feng J, Zheng J, Bennett WP, Heston LL, Jones IR, Craddock N, Sommer SS (2000) Five missense variants in the aminoterminal domain of the glucocorticoid receptor: no association with puerperal psychosis or schizophrenia. *Am J Med Genet* 96: 412-417
76. Lin RC, Wang WY, Morris BJ (1999) High penetrance, overweight, and glucocorticoid receptor variant: case-control study. *BMJ* 319: 1337-1338
77. Witchel SF, Smith RR (1999) Glucocorticoid resistance in premature pubarche and adolescent hyperandrogenism. *Mol Genet Metab* 66: 137-141
78. Derijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datsun NA, Vreugdenhil E, Cidlow-ski J, De Kloet ER, Emery P, Sternberg EM, Detera-Wadleigh SD (2001) A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28: 2383-2388
79. Detera-Wadleigh SD, Encio IJ, Rollins DY, Coffman D, Wiesch D (1991) ATthIII1 polymorphism on the 5' flanking region of the glucocorticoid receptor gene (GRL). *Nucleic Acids Res* 19: 1960
80. van Rossum EF, Koper JW, Huizinga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, van Duyn CM, Pols HA, Lamberts SW (2002) A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids *in vivo*, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes* 51: 3128-3134
81. Huizinga NA, Koper JW, De Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, Grobbee DE, Brinkmann AO, De Jong FH, Lamberts SW (1998) A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 144-151
82. Szabó V, Borgulya G, Filkorn T, Majnik J, Bányász I, Nagy ZZ (2007) The variant N363S of glucocorticoid receptor in steroid-induced ocular hypertension in Hungarian patients treated with photorefractive keratectomy. *Mol Vis* 13: 659-666
83. Gergics P, Patocs A, Majnik J, Balogh K, Szappanos A, Toth M, Racz K (2006) Detection of the Bcl I polymorphism of the glucocorticoid receptor gene by single-tube allele-specific polymerase chain reaction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 100: 161-166
84. van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, Janssen JA, Brinkmann AO, de Jong FH, Grobbee DE, Pols HA, Lamberts SW (2003) Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids *in vivo* and body mass index. *Clin Endocrinol* 59: 585-592

85. Maltese P, Canestrari E, Palma L, Ruzzo A, Corini F, Menotta M, Andreoni F, Latiano A, Annese V, Magnani M (2009) High resolution melting (HRM) analysis for the detection of ER22/23EK, BclI, and N363S polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene. *J Steroid Biochem Mol Biol* 113: 269-274
86. Wytrychowski K, Patkowski J (1998) Corticosteroid resistant chronic asthma-pathomechanism, diagnosis and treatment. *Allergy Asthma Immunology* 3: 143-148
87. Sher ER, Leung DY, Surs W, Kam JC, Zieg G, Kamada AK, Szefer SJ (1994) Steroid-resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy. *J Clin Invest* 93: 33-39
88. Hurley DM, Accili D, Stratakis CA, Karl M, Vamvakopoulos N, Rorer E, Constantine K, Taylor SI, Chrousos GP (1991) Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J Clin Invest* 87: 680-686

The analysis of the factors influencing the development of glucocorticoid resistance in the *etiopathogenesis* of severe bronchial asthma

Michał Panek¹, Tadeusz Pietras², Izabela Kupryś-Lipińska¹, Paweł Górski², Piotr Kuna¹, Janusz Szemraj³

Medical University of Lodz, ¹Division of Internal Diseases, Asthma and Allergy and ²Division of Pneumonology and Allergy, 22 Kopcińskiego St., 90-153 Lodz, Poland, ³Medical University of Lodz, Department of Medical Biochemistry, 6/8 Mazowiecka St., 92-215 Lodz, Poland

e-mail: jszemraj@csk.am.lodz.pl

Key words: polymorphism of the glucocorticoid receptor gene *h-GCR/NR3C1*, severe glucocorticoid resistance bronchial asthma, inflammation, glucocorticoid resistance

ABSTRACT

Bronchial asthma is a disease of multi - factored etiology. Current data show that multiple genes may be involved in the pathogenesis of asthma. Corticosteroids (GCS) are the most effective anti-inflammatory therapy for inflammatory disease such as bronchial asthma. There are 2 major types of GCS-resistant asthma to treatment of high doses of inhaled and oral glucocorticoids. Type I GCS-resistant asthma is cytokine-induced or acquired. Type II GCS resistance involves generalized primary cortisol resistance, which affects all tissues and is likely associated with a mutation in the GCR gene or in genes that modulate GCR function. There are clear examples of glucocorticoid gene *h-GCR/NR3C1* polymorphisms that can influence responses and sensitivity to glucocorticosteroids. This article may lead to holistic the development analysis of the factors determining the progress of the glucocorticoid resistance in the severe bronchial asthma with special acknowledgement of the influence of polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene *h-GCR/NR3C1* to formation GCS resistance.

Przewlekłe zapalenie wątroby i infekcja utajona w przebiegu zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C

STRESZCZENIE

Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) został odkryty w 1989 roku. Materiał genetyczny HCV to jednociowy, liniowy RNA o pozytywnej polarności, (+)RNA wirus. Wydało się, że HCV wykazuje tropizm jedynie w stosunku do hepatocytów, potem udowodniono, że proces replikacji może zachodzić również poza wątrobą. U około 48–86% zakażonych rozwija się przewlekłe zapalenie wątroby typu C (pzw C) z możliwymi konsekwencjami, takimi jak marskość, niewydolność wątroby i rozwój raka wątrobowo-komórkowego. Do leczenia pzw C rekomendowany jest pegylowany IFN α i rybawiryna. Obecnie wiadomo o możliwości przetrwania HCV w ustroju gospodarza pod postacią zakażenia utajonego. HCV RNA może zostać wykryty u pacjentów po samoistnym wyzdrowieniu oraz u skutecznie leczonych z powodu pzw C. Wydaje się, że utrzymująca się replikacja HCV w hepatocytach i komórkach układu odpornościowego powoduje stałą stymulację antygenową. Stała replikacja HCV, może powodować tolerancję immunologiczną i prowadzić do dalszego upośledzenia odpowiedzi immunologicznej oraz przetrwania infekcji. Coraz większego znaczenia nabiera problem utajonych zakażeń w transplantologii.

ODKRYCIE HCV

Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) został odkryty w 1989 roku [1-2]. Zakażenie HCV jest w świecie dość powszechne, w skali globu dotyka około 170 milionów ludzi, a w Stanach Zjednoczonych zakażonych jest około 3–4 milionów [3-4]. Częstość infekcji jest zróżnicowana w zależności od regionu. Najwyższa jest w Egipcie 17–26%, w Europie Wschodniej kształtuje się w przedziale od 0,7 do 4,9%. W Polsce liczba zakażonych osób stanowi około 1,4% populacji [5], wg Polskiej Grupy Ekspertów HCV około 730 000 osób.

KLASYFIKACJA, BUDOWA I REPLIKACJA HCV

HCV został zaliczony do rodzaju *Hepacivirus* i sklasyfikowany odrębnie wewnątrz rodziny *Flaviviridae*. Wirusowa cząstka HCV ma średnicę około 50 nm [6] i składa się z otoczki zbudowanej z błony lipidowej pochodzącej od gospodarza oraz materiału genetycznego. Materiał genetyczny HCV to jednociowy, liniowy RNA o długości ok. 9,6 tysięcy zasad i pozytywnej polarności, (+)RNA wirus [7]. Genom HCV składa się z sekwencji niekodujących zlokalizowanych w rejonach 3' i 5' końowych (tzw. 3'-UTR i 5'-UTR, ang. *untranslated regions*). Pomiędzy 3'-UTR i 5'-UTR znajduje się pojedyncza otwarta ramka odczytu (ORF, ang. *open reading frame*) kodująca poliproteinę złożoną z ponad 3000 reszt aminokwasowych. Po translacji poliproteina ta ulega rozszczepieniu na białka strukturalne (S) i niestrukturalne (NS). Do białek strukturalnych zalicza się białko rdzeniowe C (ang. *core protein*) tworzące nukleokapsyd oraz glikoproteiny E1 i E2 (ang. *envelope proteins*), które są zakotwiczone w zewnętrznej osłonce wirusa. W obrębie E2 znajduje się bardzo zmienny rejon (HVR, ang. *hypervariable region*) poddawany silnej selekcji. Natomiast do białek niestrukturalnych (ang. *non structural protein*) zalicza się białka NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B. Dodatkowo w zakażonych komórkach powstaje białko p7. W obrębie białek niestrukturalnych znaleziono helikazę, dwie proteazy oraz polimerazę RNA zależną od RNA [8].

Dotychczas wyodrębniono 6 podstawowych genotypów HCV (oznaczonych kolejnymi cyframi arabskimi) i ponad 50 podtypów (oznaczonych kolejnymi literami alfabetu). Genotyp 1a i 1b jest powszechny w Stanach Zjednoczonych, Europie Zachodniej, również w Polsce, genotypy 4, 5 i 6 dominują w Egipcie, Republice Południowej Afryki, południowo-wschodniej Azji [9].

Wiedza na temat cyklu życiowego HCV jest, jak do tej pory, dość ograniczona. W ciągu doby tworzy się ok. 10¹² nowych wirusów z okresem półtrwania wynoszącym 2,7–5 godzin [10-11]. Początkowo wydawało się, że HCV wykazuje tropizm jedynie do hepatocytów, późniejsze badania pokazały, że wirusy

Arleta Kowala-Piaskowska^{1,3}

Iwona Mozer-Lisewska²

Tram N.Q. Pham³

Tomasz I. Michalak³

¹Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań

²Klinika Chorób Zakaźnych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań

³Molecular Virology and Hepatology Research Group, Division of BioMedical Sciences, Faculty of Medicine, Health Sciences Centre, Memorial University, St. John's, Canada

■ Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań; tel./faks: (61) 849 13 62, e-mail: arletakp1@wp.pl

Artykuł otrzymano 12 września 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 9 grudnia 2009 r.

Słowa kluczowe: przewlekłe zapalenie wątroby typu C, utajona infekcja HCV, wirus zapalenia wątroby typu C

Wykaz skrótów: ALT – aminotransferaza alaninowa; HCV – wirus zapalenia wątroby typu C; IFN – interferon; IFN α – interferon alfa; IFN γ – interferon gamma; PBMCs (ang. *peripheral blood mononuclear cells*) – mononuklearny krwi obwodowej; PCR – polimerazowa reakcja łańcuchowa; pzw C – przewlekłe zapalenie wątroby typu C; RT-PCR – odwrotna transkrypcja i reakcja łańcuchowa polimerazy

Podziękowanie: Praca została częściowo wykonana w ramach projektu badawczego nr N401 2295 33 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, przyznanego A. K-P.

te można znaleźć w limfocytach, monocytach, komórkach nabłonkowych jelita, szpiku kostnym czy w ośrodkowym układzie nerwowym [12-15]. Jednak to hepatocyt pozostaje miejscem najbardziej intensywnej replikacji wirusa i immunologicznych oddziaływań gospodarza.

Nieprecyzyjna replikacja genomowych cząsteczek RNA oraz rekombinacja genetyczna są głównym źródłem zmienności genetycznej HCV [16]. Wpływ na to zjawisko ma m.in. brak mechanizmu korygującego błędy polimerazy RNA. W związku z tym krążące we krwi cząstki HCV są mieszaniną różnych pseudotypów HCV, czyli tworzą tzw. quasi-gatunek. Nowo powstałe mutanty są z opóźnieniem rozpoznawane przez układ immunologiczny i tym samym nieustannie wymykają się spod jego kontroli [17].

W diagnostyce zakażeń HCV wykorzystuje się obecnie dwie grupy testów: oznaczenie w surowicy krążących przeciwciał przeciwko HCV oraz wykrywanie materiału genetycznego wirusa. Druga z metod – molekularna – pozwala oznaczyć obecność i zawartość HCV RNA w surowicy, określić genotyp wirusa, wykryć jego mutanty, również te, które mogą powstać w wyniku leczenia przeciwwirusowego.

PRZEBIEG ZAKAŻENIA HCV

Przebieg kliniczny ostrej infekcji u około 60-70% pacjentów jest bezobjawowy, 20-30% ma żółtaczkę, u 10-20% występują niespecyficzne objawy, np. zmęczenie, senność, brak apetytu, złe samopoczucie, bóle mięśni, gorączka, mdłości, wymioty, bóle brzucha. U około 48-86% zakażonych rozwija się pzw C. W obrębie tej grupy u 20-30% pacjentów, po około 10-30 latach trwania pzw C, dochodzi do rozwoju marskości wątroby, w przebiegu której u 6-10% pacjentów rozwinię się niewydolność wątroby, a u 10% rak wątrobowokomórkowy [18]

Zakażenie HCV jest nie tylko przyczyną chorób wątroby. Wśród patologii pozawątrobowych wymienić można krioglobulinemię typu II, błoniasto-rozplamowe i błoniaste zapalenie kłębuszków nerkowych, zapalenie naczyń krwionośnych, limfocytarne zapalenie ślinianek, zapalenie tarczycy, prawdopodobnie chłoniaki nieziarnicze, cukrzycę, porfirię, niedokrwistość hemolityczną, nadciśnienie tętnicze i wiele innych [19-21].

PATOGENEZA HCV

Wiedza dotycząca patogenezы zakażenia HCV jest nadal poznawana. Wirus ten rozwinął liczne mechanizmy pozwalające unikać odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Uważa się, że krótko po wnikięciu wirusa do organizmu dochodzi do osłabienia zdolności dojrzewania komórek dendrytycznych w momencie, kiedy epitopy antygenów wirusa zostają rozpoznane przez zlokalizowane na ich powierzchni kompleksy MHC klasy II. W efekcie hamowana jest synteza interleukiny-2 (IL-2) i interferonu (IFN) γ oraz upośledzona jest aktywność CD4⁺ T limfocytów. Natomiast CD8⁺ T limfocyty odgrywają rolę w eliminacji zakażonych komórek, również nie bez znaczenia jest zjawisko apoptozy [22]. Powstające w trakcie zakażenia HCV przeciwciała

przeciwko HVR1 białka E2 są nieskuteczne w neutralizacji wirusa z powodu nieustannie zmieniającej się sekwencji nukleotydowej tego regionu. Dlatego uważa się, że podstawowym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój przewlekłego zakażenia jest polimorfizm genetyczny HCV wynikający z niezwykle wysokiej wydajności, jak i małej dokładności procesu replikacji. Równie ważnym czynnikiem utrudniającym eliminację HCV jest możliwość przetrwania wirusa w rezerwuarach pozawątrobowych. Okazuje się, że HCV ma znaczny wpływ na odporność wrodzoną i na odpowiedzi cytokin – niektóre białka HCV bezpośrednio reagują ze składnikami komórkowych szlaków przekazywania sygnałów i modulują odpowiedzi wrodzone. Istnieje mnóstwo doniesień dotyczących tego zagadnienia, ale wciąż pozostaje to głównie w sferze hipotez, jako że nikt nie badał tego zjawiska w hepatocytach.

LEKI STOSOWANE W PZW C

IFN stanowią grupę cytokin wytwarzanych i uwalnianych przez komórki w odpowiedzi na zakażenie wirusami, pod wpływem antygenów czy polinukleotydów, odgrywają wiodącą rolę w odporności przeciwwirusowej. Zostały odkryte przez Isaacs i Lindemanna w 1957 roku. Wykazują działanie przeciwwirusowe, antyproliferacyjne i immunomodulujące.

Początkowo w leczeniu pzw C stosowano rekombinowany IFN α , tzw. monoterapię interferonową, wprowadzono liczne modyfikacje, przede wszystkim w zakresie dawki oraz czasu trwania terapii nie uzyskując zadowalających efektów, w badaniach polskich 9,4%-20% [23-25]. Następnie zaczęto stosować terapię skojarzoną, dołączono do IFN α rybawirynę. Pozwoliło to uzyskać zdecydowanie większą liczbę trwałych odpowiedzi na leczenie, u dorosłych od 43%-45%, u dzieci od 46%-59% przy zastosowaniu 48 tygodniowego schematu leczenia [26-29].

Celem ujednoczenia kryteriów dotyczących skuteczności terapii przeciwwirusowej wprowadzono kilka definicji biologicznych pod uwagę:

– odpowiedź biochemiczną (BR, ang. *biochemical response*), kiedy uzyskuje się normalizację aktywności aminotransferaz w surowicy (w trakcie leczenia, w momencie jego zakończenia lub 24 tygodnie po zakończeniu terapii);

– odpowiedzi wirusologiczne: tzw. szybką odpowiedź wirusologiczną (RVR, ang. *rapid viral response*) zdefiniowaną jako brak HCV RNA w surowicy po 4 tygodniach leczenia przy użyciu standardowych testów laboratoryjnych, tzw. wczesną odpowiedź wirusologiczną (EVR, ang. *early virological response*), ocenianą po upływie 12 tygodni od włączenia leczenia i określająca niewykrywalność lub spadek HCV RNA $\geq 2 \log_{10}$ w surowicy w stosunku do wartości wyjściowych, tzw. odpowiedź wirusologiczną w momencie zakończenia leczenia (ETR, ang. *end of treatment response*), charakteryzującą się niewykrywalnością HCV RNA w surowicy badanego dostępnymi testami bezpośrednio po zakończeniu leczenia i tzw. trwałą odpowiedź wirusologiczną (SVR, ang. *sustained virological response*), charakteryzującą się niewykrywalnością HCV RNA w surowicy po upływie

24 tygodni od zakończenia leczenia (również przy użyciu obecnie dostępnych testów). Ponadto wyróżnia się definicje określające nawroty wirusologiczne.

Wprowadzenie do leczenia pzw C pegylovanego IFN α i podawanie go raz w tygodniu w skojarzeniu z rybawiryną stosowaną codziennie pozwala uzyskać ujemny wynik HCV RNA w surowicy u 50–59% chorych dorosłych (przy zastosowaniu testów o czułości do 50 IU/ml) [26,30–31]. Nieliczne dotąd publikacje pokazują, iż zastosowanie pegylovanego IFN α i rybawiryny u dzieci przyczynia się do dalszego, istotnego podniesienia skuteczności terapii skojarzonej – SVR u 48% do 60% chorych zakażonych genotypem 1 oraz 100% u dzieci zakażonych genotypem 3 [32–35]. Zalecany obecnie czas terapii, to w zależności od genotypu, 24 lub 48 tygodni.

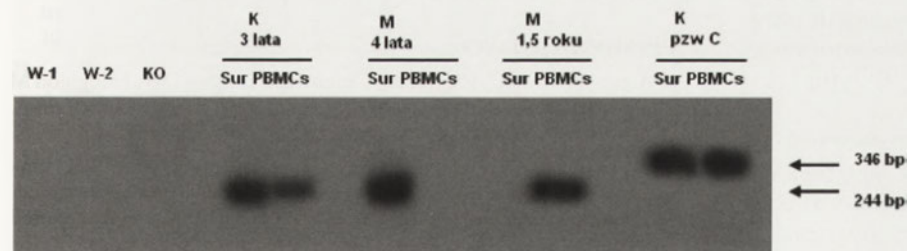
UTAJONE ZAKAŻENIE HCV

Około pięć lat temu pojawiły się pierwsze informacje na temat możliwości przetrwania HCV w ustroju gospodarza pod postacią zakażenia utajonego. Badania nad tym zjawiskiem stały się możliwe dzięki zastosowaniu bardzo czułych testów wykrywających HCV RNA w ilości ≤ 2 IU lub ≤ 10 kopii wirusowego genomu na ml. Testy o takiej czułości nie są stosowane w badaniach klinicznych. Obecnie, do tego rodzaju badań, jest stosowany test, który w pierwszym etapie przetwarza RNA wyizolowany z surowicy krwi obwodowej, mononuklearów krwi obwodowej (PBMCs, ang. *peripheral blood mononuclear cells*) lub tkanki wątrobowej do cDNA przy użyciu odwrotnej transkryptazy (RT, ang. *reverse transcription*). W następnym etapie przeprowadza się amplifikację cDNA metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) przy zastosowaniu odpowiednich starterów specyficznych dla sekwencji nukleotydowej HCV. Dla podwyższenia czułości, druga reakcja amplifikacji (ang. *nested PCR*) jest przeprowadzana z użyciem produktów pochodzących z pierwszej PCR i starterów, których sekwencje są zlokalizowane wewnątrznie w stosunku do starterów użytych w bezpośredniej reakcji amplifikacji. Ostatecznie czułość jest

dalej wzmocniona, a swoistość otrzymanych produktów potwierdzona przez hybrydyzację kwasu nukleinowego do znakowanych sond specyficznie rozpoznających sekwencje nukleotydowa HCV (tzw. *Southern blot hybridization*) [36]. Okazało się, że bardzo niskie poziomy HCV RNA są wykrywalne u większości pacjentów zarówno po samoistnym wyzdrowieniu, jak i w wyniku leczenia pzw C przy zastosowaniu IFN α i rybawiryny [37–38] (Ryc. 1).

W pracach Pham i wsp., u niektórych pacjentów siedem lat po uzyskaniu SVR poziom HCV RNA wynosił poniżej lub około 100 kopii na 1 ml surowicy oraz w większości przypadków pomiędzy 100–1000 kopii wirusowego genomu na 10^7 krążących komórek limfatycznych (tzn. PBMCs) [15,37,39]. Badając próbki pobrane w odstępach 6–12 miesięcy od tych samych pacjentów, zauważono, że poziom wirusa w surowicy zmienia się, ale zazwyczaj nie więcej niż dziesięciokrotnie [39]. Również oceniono, że testowanie seryjnych próbek surowicy i PBMCs pobranych od pacjentów z SVR, zwiększa wykrywalność utajonej infekcji o 15%. Ogólnie, pozytywny wynik na obecność HCV RNA w surowicy lub osoczu przy zastosowaniu testów o wysokiej czułości (o czym wspomniano powyżej), jest uzyskiwany u powyżej 80% osób z SVR [37, 39–40]. Te wyniki sugerują, że przewlekłe nosicielstwo niskich poziomów HCV jest naturalną konsekwencją zakażenia. Nie można też wykluczyć, że ten stan może być wynikiem bezobjawowej infekcji.

Należy też wspomnieć, że u około 30% osób z SVR wykrywa się HCV RNA w niestymulowanych PBMCs [40], jakkolwiek stymulacja tych komórek *ex vivo* podczas 72 godzinnej inkubacji z „koktajlem” zawierającym mitogeny pobudzające limfocyty T i B oraz monocyty pozwala, wg. niektórych autorów, na wykazanie dodatkowej nici HCV RNA u ponad 70% pacjentów bez zakażenia HCV. Wykryciu dodatkowej nici HCV towarzyszy, w około 75% testowanych próbek PBMCs, nić ujemna będąca dowodem na rzeczywistą replikację HCV [37,39,41]. Obecność aktywnej replikacji HCV w krążących komórkach limfoidalnych została potwierdzona przez wykrycie niestrukturalnego białka wirusa NS5A w cytoplazmie tych komórek [15]. Udokumentowano, że limfocyty T od osób z utajonym zakażeniem HCV mogą produkować pełne cząsteczki wirusa *in vitro*. Cząsteczki te wykryto z zastosowaniem ultrawirowania i immunomikroskopii elektronowej [42]. Także koniecznym wydaje się objęcie badaniami nie tylko PBMCs jako zbioru całkowitego, ale różnych, wyizolowanych, indywidualnych podtypów komórek limfatycznych. Stwierdzono bowiem, że obecność HCV i jego replikacja może być ograniczona tylko do konkretnego podtypu komórek. Uzyskanie wyniku ujemnego, po zastosowaniu wyżej wspomnianych technik w badaniach nad utajonym zakażeniem HCV, daje wiarygodną diagnozę braku infekcji [40]. Inne doniesienia z ostatnich lat pokazały, że badając niestymulowane PBMCs przy zastosowaniu testów Ro-



Rycina 1. Wykrywalność HCV RNA w próbach surowicy krwi i PBMCs pochodzących od trzech osób, które uzyskały SVR w wyniku leczenia przeciwwirusowego IFN α i rybawiryną (K-kobieta, M-mężczyzna). Przy zastosowaniu rutynowych testów używanych w badaniach klinicznych, pacjenci mieli powtarzalnie niewykrywalne poziomy HCV RNA oraz prawidłową aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) w surowicy w okresie od 1,5 roku do 4 lat po stwierdzeniu SVR. RNA był wyizolowany z 250 μ l surowicy (Sur) lub około 2×10^6 krążących PBMCs. Otrzymane cDNA powielono używając podwójnej (gniazdowej) PCR i syntetycznych starterów, których sekwencje były homologiczne z sekwencją HCV 5'-UTR. Produkty PCR zostały wykryte przez hybrydyzację ze znakowanym fragmentem rekombinowanej sekwencji HCV przy zastosowaniu hybrydyzacji typu southern (ang. *Southern blot hybridization*). RNA wyizolowane z surowicy i PBMCs od pacjenta z klasycznym pzw C było kontrolą pozytywną. Natomiast woda destylowana dodana zamiast cDNA do pierwszej reakcji amplifikacyjnej (W-1) i drugiej (gniazdowej) reakcji amplifikacyjnej (W-2) oraz produkt słupek ekstrakcji przeprowadzonej przy braku RNA (KO), zostały zastosowane jako kontrole ujemne. Pozytywne sygnały hybrydyzacyjne uzyskane po pierwszej reakcji amplifikacji ujawniły się jako prążki odpowiadające wadze molekularnej 346-bp (*base pair*), a te uzyskane po drugiej (gniazdowej) reakcji amplifikacji jako 244-bp. Czułość wykrywania HCV RNA była poniżej 10 kopii wirusowego genomu/ml [37].

che Cobas – Amplicor z czułością 50 kopii genomu wirusa na ml, można wykazać obecność HCV RNA u 11%–20% pacjentów z SVR kilka lat po zakończeniu leczenia [43–44].

POZAWĄTROBOWA REPLIKACJA HCV

Jak wspomniano wyżej, jednym z wykładników replikacji HCV jest wykrycie negatywnej nici wirusowego RNA, tzw. „minus RNA strand” lub „replicative RNA strand”. Nić negatywna występuje w liczbie 10–100 razy mniejszej niż nić pozytywna HCV RNA, która z kolei jest wykładnikiem ogólnego poziomu genomu wirusa w komórce. Uważa się, że zastosowanie RT-PCR z wykorzystaniem enzymu Tth, czyli rekombinowanej polimerazy DNA z bakterii *Thermus thermophilus*, potwierdza istnienie replikacji wirusa. Liczne prace Laskusa i wsp., Radkowskiego i wsp. czy Goutagny i wsp. udowodniły replikację w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, szpiku, komórkach dendrytycznych, komórkach układu immunologicznego [14,45–47]. Szczególnie CD4+ i CD8+ T limfocyty, limfocyty B, monocyty i komórki dendrytyczne są zaangażowane w replikację HCV. Pokazano jednak, że występują różnice w intensywności replikacji w tych komórkach w zależności od typu zakażenia, tzn. pzw C lub utajona infekcja HCV [15]. Ponadto wydaje się, że występuje różnica w wykrywaniu HCV w komórkach limfatycznych w zależności od genotypu wirusa w sytuacji zakażenia utajonego lub pzw C [48]. Uzyskane wyniki sugerują, że genotyp 1 HCV jest częściej wykrywany w PBMCs w utajonym zakażeniu, a genotypy 2 i 3 w PBMCs u osób z pzw C. Różnice te dotyczą też rodzaju cytokin, które są stwierdzane w komórkach limfatycznych w pzw C i utajonej infekcji [48]. Tak więc, PBMCs wyizolowane od osób z utajoną infekcją charakteryzują się znacznie wyższymi poziomami IFN α , IFN γ i TNF α mRNA, ale niższym poziomem IL-10 mRNA, inaczej jest u pacjentów z pzw C. Należy też podkreślić, że poziomy powyższych cytokin w PBMCs, w sytuacji utajonej infekcji, są znacznie wyższe niż u zdrowych osób. To potwierdza, że występująca na niskim poziomie replikacja HCV w komórkach limfocytarnych nie jest immunologicznie obojętna. Ogólnie biorąc, wyższy poziom HCV w komórkach limfocytarnych jest związany z niższymi poziomami transkrypcji cytokin (tych, które znane są z właściwości antywirusowych) i wyższym poziomem transkrypcji IL-10, która ma zdolność do upośledzenia odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów Th typu 1.

Bardzo interesujące jest spostrzeżenie dotyczące wariantów HCV u osób z utajonym zakażeniem HCV różniących się poszczególnymi nukleotydami np. w obrębie 5'-UTR. Różnice te występują między populacją wirusową pochodzącą z PBMCs i z surowicy. Wydaje się, że jest to dowód na limfotropizm określonych wariantów HCV, albo na możliwość powstawania swoistych wariantów podczas replikacji wirusa w komórkach układu immunologicznego [42,49]. Na obecnym etapie wiedzy skutki utajonego zakażenia HCV z klinicznego punktu widzenia są trudne do przewidzenia. Utrzymująca się replikacja HCV w hepatocytach lub komórkach układu odpornościowego powoduje stałą stymulację antygenową. Jeśli proces ten dotyczy pacjentów immunologicznie kompetentnych, to przez wiele lat udaje się gospodarzowi utrzymać infekcję pod względną kontrolą. Jednak z drugiej strony stała replikacja HCV, z utrzymującej się prezentacją antygenową przez limfocyty B lub monocyty, może powodować tolerancję immunologiczną i prowadzić do dalszego braku odpowiedzi immunologicznej na zakażenie, czego efektem będzie przetrwanie infekcji.

Obecnie coraz większego znaczenia nabiera problem utajonych zakażeń w transplantologii. Znane są opisy biorców, będących w okresie głębokiej immunosupresji, u których po kilkudziesięciu dniach od transplantacji wątroby stwierdza się HCV RNA w surowicy, również jest to obserwowane u pacjentów po przeszczepieniu nerek czy szpiku. Zjawisko to dotyczy oczywiście sytuacji, kiedy u dawcy nie stwierdzono wiremii w surowicy lub tkance wątrobowej przy zastosowaniu obecnie używanych testów, takich jak Cobas Amplicor z czułością 50 kopii/ml [50–51]. U niektórych dzieci pzw C leczonych pegylowanym IFN- α i rybawiryną wykryto HCV RNA nie tylko w surowicy, ale też zaobserwowano u tych pacjentów, w wyniku leczenia przeciwwirusowego, niejednoznaczne zachowanie się HCV RNA w PBMCs. Należy w przyszłości przyjrzeć się pacjentom, którzy odpowiedzieli na leczenie i uzyskali SVR, ale nadal w PBMCs mają obecny materiał genetyczny HCV w ilości wystarczającej do wykrycia nawet standardowymi testami dostępnymi w badaniach klinicznych. Czy jest to sukces terapeutyczny? [52]. Potwierdzeniem tych dylematów jest analiza genetyczna populacji HCV u dzieci z pzw C w oparciu o rejon NS5A oraz HVR1. Oryginalnym spostrzeżeniem, po porównaniu wyników u pacjentów z różną odpowiedzią na leczenie, był fakt że dzieci z SVR, ale obecnością HCV RNA w PBMCs, powinny być zaliczane do grupy pacjentów odpowiadających przejściowo (obecnie wykładnikiem skutecznej terapii jest brak RNA HCV w surowicy) [53].

W podsumowaniu należy zwrócić uwagę na problem czułości testów stosowanych w badaniach klinicznych. Ponadto ważna jest opieka nad pacjentami z uzyskaną SVR, lecz wiremią kontrolowaną tylko w surowicy. Być może pacjenci po samoistnym wyzdrowieniu powinni być objęci (z tych samych powodów) opieką lekarską. Te spostrzeżenia są ważne zarówno z punktu widzenia zdrowia pacjenta, jak i z powodów epidemiologicznych. Szczególną uwagę należy zwrócić na ten problem w transplantologii.

PIŚMIENICTWO

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359–362
2. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE (1998) An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244: 362–364
3. Alter MJ (1999) Hepatitis C virus infection in the United States. *J Hepatol* 31: 88–91
4. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Meyer LA, Kaslow RA, Margolis HS (1999) The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 341: 556–562
5. World Health Organization. Global surveillance and control of hepatitis C (1999) *J Med Virol* 6: 35–47
6. Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H (1996) Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 23: 205–209

7. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C (1991) Genetic organization and diversity of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2451-2455
8. Bartenschlager R, Lohmann V (2000) Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 81: 1631-1648
9. Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follett EA, Seed CR, Krusius T, Lin C, Medgyesi GA i inni (1995) Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol* 76: 1197-1204
10. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS (1998) Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282: 103-107
11. Zeuzem S, Schmidt JM, Lee JH, von Wagner M, Teuber G, Roth WK (1998) Hepatitis C virus dynamics *in vivo*: effect of ribavirin and interferon alfa on viral turnover. *Hepatology* 28: 245-252
12. Deforges S, Evtashev A, Perret M, Sodoyer M, Pouzol S, Scoazec JY, Bonnaud B, Diaz O, Paranhos-Baccalà G, Lotteau V, André P (2004) Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells *in vivo*. *J Gen Virol* 85: 2515-2523
13. Forton DM, Karayiannis P, Mahmud N, Taylor-Robinson SD, Thomas HC (2004) Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *J Virol* 78: 5170-5183
14. Radkowski M, Wilkinson J, Nowicki M, Adair D, Vargas H, Ingui C, Rakela J, Laskus T (2002) Search for hepatitis C virus negative-strand RNA sequences and analysis of viral sequences in the central nervous system: evidence of replication. *J Virol* 76: 600-608
15. Pham TNQ, King D, MacParland SA, McGrath JS, Reddy SB, Bursley FR, Michalak TI (2008) Hepatitis C virus replicates in the same immune cell subsets in chronic hepatitis C and occult infection. *Gastroenterology* 134: 812-822
16. Lohmann V, Kömer F, Dobierzewska A, Bartenschlager R (2001) Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 75: 1437-1449
17. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C (1992) Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3468-3472
18. Seeff LB (2002) Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36: 35-46
19. Manns MP, Rambusch EG (1999) Autoimmunity and extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 31: 39-42
20. Madaliński K, Dzierżanowska-Fangrat K, Józwiak P, Puszczewicz M, Zimmermann-Górska I (2002) Rola zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu C w patogenezie zespołu Sjögrena. *Pol Arch Med Wewn* 107: 167-171
21. Craxi A, Laffi G, Zignego AL (2008) Hepatitis C virus (HCV) infection: A systemic disease. *Mol Aspects Med* 29: 85-95
22. Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, Dienstag J, Houghton M, Ralston R, Walker BD (1992) Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol* 149: 3339-3344
23. Cianciara J, Hryniewicz H, Stańczak W, Nazzal K, Kotuszewska J, Jabłońska J i inni (1997) Leczenie przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C preparatami rekombinowanego interferonu alfa. Dwuletnia obserwacja po leczeniu. *Hepatol Pol* 4: 147-151
24. Woźniakowska-Gęsicka T, Zeman K, Wiśniewska-Ligier M, Kupś J, Dworniak D, Planeta-Malecka I (1998) Ocena skuteczności zastosowania interferonu alfa w leczeniu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C u dzieci. *Hepatol Pol* 5: 135-140
25. Czerwionka-Szaflarska M, Chrobot A, Szaflarska-Szczepanik A (2000) Studies of the effectiveness of interferon alpha treatment for chronic hepatitis C in children. *Med Sci Monit* 6: 964-970
26. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK (2001) Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358: 958-965
27. Służewski W, Figlerowicz M, Mozer-Lisewska I (2001) Interferon alfa i rybawiryna w leczeniu przewlekłego zapalenia wątroby typu C u dzieci. *Ped Prakt* 9: 47-50
28. Wirth S, Lang T, Gehring S, Gerner P (2002) Recombinant alfa-interferon plus ribavirin therapy in children and adolescents with chronic hepatitis C. *Hepatology* 36: 1280-1284
29. Woźniakowska-Gęsicka T, Kupś J, Kubacki J (2003) Ocena rocznej skrajzonej terapii IFN- α i rybawiryną dzieci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C. *Pediatr Pol* 11: 961-967
30. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncalves FL Jr, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J (2002) Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347: 975-982
31. Juszczyk J, Baka-Cwierż B, Beniowski M, Berak H, Bolewska B, Boroń-Kaczmarek A, Cianciara J, Cieśla A, Dziambor A, Gasiorowski J i inni (2005) Pegylowany interferon α -2A z rybawiryną w leczeniu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C (raport końcowy z badań). *Przegl Epidemiol* 59: 651-660
32. Kowala-Piaskowska A, Służewski W, Figlerowicz M, Mozer-Lisewska I (2004) Wczesna odpowiedź wirusologiczna (EVR) u dzieci z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C leczonych pegylowanym interferonem i rybawiryną. *Pediatr Pol* 79: 878-884
33. Kowala-Piaskowska A, Figlerowicz M, Mozer-Lisewska I, Służewski W (2005) Wyniki leczenia dzieci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C pegylowanym interferonem i rybawiryną. *Przegl Epidemiol* 59: 491-498
34. Kowala-Piaskowska A, Służewski W, Figlerowicz M, Mozer-Lisewska I (2005) Factors influencing early virological response in children with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon and ribavirin. *Hepatol Res* 32: 224-226
35. Wirth S, Pieper-Boustani H, Lang T, Ballauff A, Kullmer U, Gerner P, Wintermeyer P, Jenke A (2005) Peginterferon alfa-2b plus ribavirin treatment in children and adolescents with chronic hepatitis C. *Hepatology* 41: 1013-1018
36. Michalak TI, Pham TNQ, Mulrooney-Cousins PM (2007) Molecular diagnosis of occult hepatitis C and hepatitis B virus infections. *Future Virol* 2: 451-465
37. Pham TN, MacParland SA, Mulrooney PM, Cooksley H, Naoumov NV, Michalak TI (2004) Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. *J Virol* 78: 5867-5874
38. Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jabłońska J, Colby TV, Walewska-Zielecka B, Kubicka J, Wilkinson J, Adair D, Rakela J, Laskus T (2005) Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology* 41: 106-114
39. Pham TN, Mulrooney-Cousins PM, Mercer SE, MacParland SA, Inglot M, Zalewska M, Simon K, Michalak TI (2007) Antagonistic expression of hepatitis C virus and alpha interferon in lymphoid cells during persistent occult infection. *J Viral Hepat* 14: 537-548
40. Pham TNQ, Michalak TI (2008) Occult persistence and lymphotropism of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 14: 2789-2793
41. Pham TN, MacParland SA, Coffin CS, Lee SS, Bursley FR, Michalak TI (2005) Mitogen-induced upregulation of hepatitis C virus expression in human lymphoid cells. *J Gen Virol* 86: 657-666
42. MacParland SA, Pham TN, Gujar SA, Michalak TI (2006) *De novo* infection and propagation of wilde-type Hepatitis C virus in human T lymphocytes *in vitro*. *J Gen Virol* 87: 3577-3586
43. Di Liberto, Roque-Afonso AM, Kara R, Ducoulombier D, Fallot G, Samuel D, Feray C (2006) Clinical and therapeutic implications of hepatitis C virus compartmentalization. *Gastroenterology* 131: 76-84
44. Ciancio A, Smedile A, Giordanino C, Colletta C, Croce G, Pozzi M, Cariti G, Macor A, Biglino A, Di Napoli A, Tappero GF, Andreoni M, Manca A, Prandi G, Calleri G, Orsi PG, Ciccone G, Rizzetto M, Saracco G (2006) Long-term follow-up of previous hepatitis C virus positive nonresponders to interferon monotherapy successfully retreated with

- combination therapy: are they really cured? *Am J Gastroenterol* 101: 1811-1816
45. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J (1998) Search for hepatitis C virus extrahepatic replication sites in patients with acquired immunodeficiency syndrome: specific detection of negative-strand viral RNA in various tissues. *Hepatology* 28: 1398-1401
 46. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Jang SJ, Vargas H, Rakela J (1998) Hepatitis C virus quasispecies in patients infected with HIV-1: correlation with extrahepatic viral replication. *Virology* 248: 164-171
 47. Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Inchauspé G, Bain C (2003) Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 187: 1951-1958
 48. Pham TNQ, Mercer SE, Michalak TI (2009) Chronic hepatitis C and persistent occult hepatitis C virus infection are characterized by distinct immune cell cytokine expression profiles. *J Viral Hepat* 16: 547-556
 49. Nakajima N, Hijikata M, Yoshikura H, Shimizu YK (1996) Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus. *J Virol* 70: 3325-3329
 50. Forns X, Garcia-Retortillo M, Serrano T, Feliu-Suarez F, de la Mata M, Garcia-Valdecasas JC, Navasa M, Rimola A, Rodes J (2003) Antiviral therapy of patients with decompensated cirrhosis to prevent recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *J Hepatol* 39: 389-396
 51. Zekri AR, Mohamed WS, Samra MA, Sherif GM, El-Shehaby AM, El-Sayed MH (2004) Risk factors for cytomegalovirus, hepatitis B and C virus reactivation after bone marrow transplantation. *Transpl Immunol* 13: 305-311
 52. Kowala-Piaskowska A, Służewski W, Figlerowicz M, Mozer-Lisewska I, Bujnowska A, Mania A (2007) Obecność HCV RNA w mononuklearach krwi obwodowej a uzyskanie trwałej odpowiedzi wirusologicznej u dzieci z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C leczonych pegylowanym interferonem i rybawiryną. *Pediatr Pol* 82: 513-517
 53. Kowala-Piaskowska A, Jackowiak P, Figlerowicz M, Alejska M, Służewski W, Figlerowicz M (2008). Analiza zmienności wirusowego białka NS5A u dzieci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C – poszukiwanie korelacji pomiędzy polimorfizmem genetycznym wirusa a odpowiedzią na leczenie. *Pediatr Pol* 83: 455-463

Chronic hepatitis and occult HCV infection

Arleta Kowala-Piaskowska^{1,2}, Iwona Mozer-Lisewska², Tram NQ Pham³, Tomasz Michalak³

¹Department of Infectious Diseases and Child Neurology, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, 27/33 Szpitalna St., 60-572 Poznan, Poland

²Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, 2 Sw. Wincentego St., 61-003 Poznan, Poland

³Molecular Virology and Hepatology Research Group, Division of BioMedical Sciences, Faculty of Medicine, Health Sciences Centre, Memorial University, 300 Prince Philip Drive, St. John's, Nfld A1B3V6, Canada

✉ e-mail: arletakp1@wp.pl

Key words: chronic hepatitis C, occult HCV infection, hepatitis C virus

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) was discovered in 1989. HCV is a positive single-strand RNA. We all have thought, that HCV can replicate only in liver tissue, but now we know, that HCV can replicate in extrahepatic tissue as well. In about 48-86% of HCV infected patients, chronic hepatitis C (CHC) has been noticed and eventually, after tens of years, liver insufficiency, cirrhosis or hepatocellular carcinoma. The current recommended treatment for CHC is a combination of pegylated-interferon alpha and Ribavirin. Presently it is known, that HCV infection can persist as an occult infection. RNA HCV can be detected in patients after successful treatment for CHC or spontaneous elimination. Persistent HCV replication in hepatocytes or lymphoid cells would likely lead to continuous antigenic stimulation of the immune system. This prolonged replication may contribute to the immune tolerance of HCV, impairment of immune response and even further virus persistence. This occult infection grows more important in transplantation.

Wpływ toksyn bakteryjnych na proces nowotworzenia

STRESZCZENIE

Infekcje bakteryjne mogą stanowić istotny czynnik ryzyka rozwoju chorób nowotworowych. Molekularne mechanizmy indukcji zmian nowotworowych przez infekcje bakteryjne są niezwykle skomplikowane. Ich wyjaśnienie wymaga jeszcze wielu badań. Dotychczas wykazano rolę infekcji *Helicobacter pylori* w powstawaniu raka żołądka i chłoniaka MALT. Głównymi, choć nie jedynymi czynnikami wirulencji tego mikroorganizmu indukującymi zmiany nowotworowe, są dwie toksyny: VacA i CagA. Białko CagA uznano ostatnio za pierwszą scharakteryzowaną bakteryjną onkoproteinę. Wiele innych mikroorganizmów produkuje także specyficzne toksyny/efektory układów wydzielniczych, wpływające na funkcjonowanie komórek eukariotycznych lub/i wywołujące chroniczne stany zapalne. Procesy te mogą stanowić podłoże do rozwoju nowotworu. Toksyny bakteryjne ingerując w szlaki sygnałowe, zakłócają przebieg cyklu komórkowego, wpływają na procesy proliferacji i różnicowania komórek oraz modulują przebieg apoptozy. Niektóre z tej klasy białek bezpośrednio indukują uszkodzenia DNA. Prezentowany artykuł przedstawia potencjalne powiązania pomiędzy aktywnością toksyn bakteryjnych a procesem nowotworzenia.

WPROWADZENIE

Proces nowotworzenia jest skomplikowaną sekwencją zdarzeń, prowadzącą do pojawienia się nieśmiertelnych, swobodnie namnażających się, unikających apoptozy komórek, rosnących niezależnie od czynników zewnętrznych i od kontaktu z komórkami sąsiednimi. Zajście tych procesów jest możliwe, gdy w materiale genetycznym komórki pojawi się wystarczająca liczba odpowiednich mutacji, głównie w genach supresorów nowotworowych, kodujących białka odgrywające istotną rolę w procesach przekazywania sygnałów, kontroli cyklu komórkowego i apoptozy. Ścisła regulacja tych procesów zostaje wtedy zaburzona, co umożliwi komórce uniezależnienie się od naturalnego „zegara biologicznego”. Zintensyfikowane podziały sprzyjają akumulacji w materiale genetycznym komórek kolejnych mutacji. Powstaje guz, który odżywany i dotleniany jest przez nowo wytworzone naczynia krwionośne (angiogeneza). Kiedy kolonia komórek przełamuje barierę sąsiednich struktur pojawia się fenotyp inwazyjny: w najgroźniejszej swej formie komórki mogą odrywać się od guza i przemieszczać razem z krwią do innych tkanek (metastaza); etap tzw. progresji guza determinujący rodzaj nowotworu i jego kliniczne następstwa. Czynniki fizyczne, chemiczne i infekcyjne mogą być zarówno promotorami guzów, ułatwiając ich wzrost czy nagromadzanie mutacji, jak i ich inicjatorami, bezpośrednio uszkadzając DNA [1].

Idea wiążąca choroby infekcyjne z procesem nowotworzenia pojawiła się już pod koniec XIX wieku, za sprawą odkryć i prac Roberta Kocha, gdy wykazano, że konkretne gatunki mikroorganizmów są czynnikami etiologicznymi chorób infekcyjnych (opracowanie tzw. postulatów Kocha). Jednak dopiero stosunkowo niedawno udokumentowano udział niektórych infekcji wirusowych w kancerogenezie. Jako przykłady można podać m.in. wirusa mięsaka Rousa (RSV, ang. *Rous sarcoma virus*), wirusa zapalenia wątroby typu B i C (HBV, HCV, ang. *hepatitis B virus*, *hepatitis C virus*), wirusa Epsteina-Barr (EBV) czy wirusa brodawczaka człowieka (HPV, ang. *human papilloma virus*) [2]. Wpływ infekcji bakteryjnych na procesy nowotworzenia pozostaje jednak nadal kontrowersyjny, głównie ze względu na fakt, iż nasza wiedza o molekularnych mechanizmach towarzyszących infekcjom bakteryjnym jest nadal fragmentaryczna. Wielostopniowość procesu kancerogenezy, jego złożoność i rozciągłość w czasie znacznie utrudnia dokładne poznanie powiązań z infekcjami, szczególnie wpływu na ten proces przewlekłych stanów zapalnych indukowanych przez mikroorganizmy. Zakażenie bakteryjne może jedynie zapoczątkować transformację komórek, które mogą ujawnić się w postaci nowotworu po wielu latach. Konsekwencje tych oddziaływań zależą od wielu czynników: genotypu organizmu gospodarza, jego statusu immunologicznego, środowiska czy trybu życia oraz często także

Anna M. Stachowicz

Paweł Łaniewski

Elżbieta K. Jagusztyn-Krynicka

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: (22) 55 41 216, e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

Artykuł otrzymano 19 października 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 22 grudnia 2009 r.

Słowa kluczowe: GTPazy Rho, infekcje bakteryjne, kancerogeneza, szlaki sygnałowe, toksyny bakteryjne

Wykaz skrótów: GAP (ang. *GTPase-activating proteins*) – białko aktywujące GTPazę; IL – interleukina; MALT (ang. *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma*) – tkanka limfatyczna powiązana z błoną śluzową żołądka; MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*) – kinazy białkowe aktywowane przez mitogen; NF-κB (ang. *nuclear factor κB*) – czynnik jądrowy κB; NFAT (ang. *nuclear factor of activated T cells*) – czynnik jądrowy pobudzonych limfocytów T; PAI (ang. *pathogenicity island*) – wyspa patogenności; PLC – fosfolipaza C; TFSS (ang. *type four secretion system*) – aparat wydzielania typu IV; TTSS (ang. *type three secretion system*) – aparat wydzielania typu III

od genotypu patogennego mikroorganizmu. Infekcja bakteryjna jest przeważnie jednym z istotnych czynników ryzyka rozwoju choroby nowotworowej.

BADANIA EPIDEMIOLOGICZNE – NIE TYLKO *HELICOBACTER PYLORI*...

Pierwszych dowodów wskazujących na powiązanie infekcji bakteryjnych z procesem nowotworzenia dostarczają dane epidemiologiczne. Jak dotąd jedynie w przypadku infekcji *H. pylori* szczegółowo udokumentowano bezpośredni związek infekcji bakteryjnej z indukcją choroby nowotworowej. W 1994 roku Światowa Organizacja Zdrowia zaliczyła *H. pylori* do I klasy kancerogenów. *H. pylori* jest mikroaerofilną, gramujemną, spiralną bakterią, wyizolowaną po raz pierwszy w 1982 roku z wycinków błony śluzowej żołądka pobranych od pacjentów z chronicznym stanem zapalnym żołądka [3]. *H. pylori* jest drugim co do częstości występowania patogenem człowieka, którym zakażone jest ponad 50% ludzkiej populacji (w Polsce 84% – dane z 2004 roku) [4-5]. Podatność na infekcję jest większa u osób starszych, choć do zakażenia dochodzi najczęściej we wczesnym dzieciństwie, najprawdopodobniej drogą kropelkową. Infekcja utrzymuje się przez całe życie człowieka i często jest bezobjawowa. Tylko u około 10-20% zakażonych osób dochodzi do zmian morfologicznych w błonie śluzowej żołądka. Podstawową chorobą wywoływaną przez *H. pylori* jest zapalenie błony śluzowej o różnym fenotypie (fenotyp łagodnego zapalenia błony śluzowej, fenotyp wrzodu dwunastnicy i fenotyp raka żołądka). Fenotyp nowotworowy, wskazujący na możliwość rozwoju raka żołądka (gruczolakorak żołądka, ang. *gastric adenocarcinoma*) występuje u około 1% osób zakażonych; szczególnie często u osób zamieszkujących kraje azjatyckie. Infekcja tym patogenem uznawana jest także za czynnik ryzyka rozwoju chłoniaka MALT – tkanki limfatycznej powiązanej z błoną śluzową żołądka (ang. *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma*) [1,6]. Na rozwój choroby nowotworowej żołądka wpływa wiele czynników tj. genotyp szczepu bakterii i gospodarza, jego status immunologiczny, stosowany rodzaj diety oraz poziom wytwarzanego kwasu solnego [7]. Do głównych czynników wirulencji *H. pylori* zalicza się obecnie m.in. enzymy ułatwiające kolonizację (ureazę, katalazę, lipazy, fosfolipazy, proteazy), adhezyny, cytotoksynę wakuolizującą VacA, białko CagA, białka budujące aparat sekrecji typu IV (transportujący m.in. CagA do komórek eukariotycznych), białko aktywujące neutrofile (NapA). Infekcja *Helicobacter* doprowadza do chronicznego stanu zapalnego błony śluzowej oraz zachwiania homeostazy komórek nabłonkowych, równowagi pomiędzy procesami apoptozy i proliferacji. Czynniki wirulencji *H. pylori* oraz mechanizmy prowadzące do rozwoju zmian nowotworowych przedstawiono ostatnio w kilku pracach przeglądowych [6-9].

Infekcja *Helicobacter hepaticus* z kolei powoduje powstawanie nowotworów wątroby u gryzoni. Bakterię tę odkryto u myszy z ostrym zapaleniem wątroby, które przyczyniło się do rozwoju raka. Mikroorganizm ten kolonizuje zarówno kanaliki żółciowe wątroby, jak i jelito grube, stąd infekcję tę łączy się także z nowotworami jelita grubego [10]. Co ciekawe, zauważono także korelacje pomiędzy infekcją *H. hepaticus* a rozwojem raka sutka, mimo braku bezpośred-

niego kontaktu bakterii z tym gruczołem [11]. Wykazano, iż ryzyko zakażenia myszy, chronicznej infekcji i rozwoju nowotworu znacznie rośnie, kiedy dochodzi do okołoporodowej ekspozycji gryzoni na kontakt z bakteriami [10]. U ludzi sugeruje się związek bakterii infekujących wątrobę z występowaniem marskości i wątrobiaka (ang. *hepatoma*); stwierdzenie obecności *Helicobacter* spp. w tym narządzie koreluje pozytywnie z pojawieniem się tych schorzeń, szczególnie przy równoległej infekcji wirusem zapalenia wątroby typu C [12].

Infekcje *H. pylori* to nie jedyny przykład związku zakażeń mikroorganizmami z procesem nowotworzenia. Dane epidemiologiczne dokumentują korelację pomiędzy nosicielstwem *Salmonella enterica* sv. Typhi w pęcherzyku żółciowym a występowaniem nowotworu tego organu (ang. *gallbladder carcinoma*). Prawdopodobieństwo rozwoju raka w przypadku nosicielstwa jest nawet około 200 razy wyższe niż w sytuacji nieobecności patogenu [13-14]. Molekularne mechanizmy indukcji zmian nowotworowych pozostają nadal niewyjaśnione, aczkolwiek wiadomo, iż *S. enterica* sv. Typhi produkuje podjednostkę toksyny CDT (ang. *cytolethal distending toxin*): CdtB, o aktywności DNazy [15]. W skali globalnej odnotowywanych jest rocznie 17 milionów zachorowań na dur brzuszny, a statystycznie od 3 do 5% chorych pozostaje nosicielami [16]. Jest to wysoka liczba, przy tym wiadomo, iż nowotwór ten daje złe prognozy. Początkowe symptomy chorobowe są bowiem mało specyficzne, co skutkuje stosunkowo późną diagnozą choroby nowotworowej [14].

Infekcja *Campylobacter jejuni* uważana jest za czynnik ryzyka wystąpienia chłoniaka MALT jelita cienkiego (ang. immunoproliferative small intestinal disease, alpha heavy chain disease), który histologicznie przypomina chłoniaka MALT wywoływanego przez *H. pylori*, a we wczesnych fazach może być skutecznie leczony antybiotykami [17]. Niektóre szczepy *C. jejuni* również produkują toksynę CDT, co może mieć wpływ na proces nowotworzenia [18].

Związek infekcji mikroorganizmami z rodzaju *Chlamydia* z chorobami neoplastycznymi opisywany był niejednokrotnie [19-20]. Infekcje *Chlamydia psittaci* są czynnikiem ryzyka rozwoju chłoniaka przydatków oka (ang. *ocular anaxial lymphoma*), który, podobnie jak w przypadku *C. jejuni*, może całkowicie cofać się pod wpływem terapii antybiotykowej [21]. Jest to nowotwór bardzo rzadki, częstość zachorowań różni się znacznie ze względu na region geograficzny, nawet w obrębie jednego kraju. Molekularne mechanizmy indukcji zmian nowotworowych pozostają dalekie od wyjaśnienia. Sugerowana jest rola białek błony inkluzyjnej Inc, głównie IncA, które ulega fosforylacji przez kinazy komórek gospodarza [22], co może wpływać na zaburzenie szlaków sygnałowych. Dane epidemiologiczne sugerują także wpływ infekcji *Mycobacterium tuberculosis* oraz *Chlamydia pneumoniae* na rozwój raka płuc [10,14,23]. Infekcje *Chlamydia trachomatis* powodują długotrwałe bezobjawowe stany zapalne, co zgodnie z danymi epidemiologicznymi wydaje się predysponować do rozwoju raka szyjki macicy [24]. Chroniczne stany zapalne, często wieloletnie i nieodczuwalne, mogą okazać się podłożem i (lub) ważnym ogniwem w rozwoju nowotworów. Taki przebieg mają często infek-

cje wywoływane przez mykoplazmy, co może promować transformację komórek i blokować ich apoptozę poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. *nuclear factor κ B*) [1,25].

Infekcje dróg moczowych mogą również indukować powstawanie pewnych typów nowotworów tych narządów [14], a infekcja *Streptococcus bovis* uznawana jest za czynnik ryzyka rozwoju nowotworu jelita grubego [10]. U myszy czynnikiem etiologicznym choroby jelita grubego, związanej z przerostem błon śluzowych oraz stanem zapalnym jest *Citrobacter rodentium*. W konsekwencji choroby może dojść do powstania nowotworu stanowiącego myszy model do badań dotyczących raka jelita grubego u człowieka. Bakteria ta posiada w genomie wyspę patogenności LEE (ang. *locus of erythrocyte effacement*) [26], kodującą m.in. białka budujące aparat wydzielania typu III, homologiczne do tych w enteropatogennych (EPEC) i enterohemokrotocznym (EHEC) szczepach *Escherichia coli*. Przekazane do komórek nabłonka białka efektorowe wpływają na wiele szlaków przekazywania sygnałów doprowadzając do zmian cytoszkieletu i rozluźnienia połączeń międzykomórkowych [10].

Prolifercja komórek człowieka lub (i) blokowanie procesów apoptozy mogą być także indukowane przez chroniczne infekcje *Lawsonia intracellularis*, czy *Bartonella sp. L. intracellularis* odpowiedzialna jest za powstawanie rozrostowego zapalenia jelit (ang. *proliferative enteropathy*), głównie u świń [27]. Bakteria ta jest internalizowana przez komórki nabłonkowe krypt jelitowych i wywołuje ich proliferację. Obserwowane zmiany histopatologiczne przypominają te odnotowywane u ludzi z objawami choroby Leśniowskiego-Crohna, której występowanie jest jednym z czynników ryzyka raka odbytnicy oraz te powstające u myszy po infekcji *C. rodentium* [1].

TOKSYNY BAKTERYJNE A NOWOTWORY

Na powiązanie chronicznych infekcji bakteryjnych z procesem nowotworzenia zwrócono uwagę w momencie udokumentowania zależności między zakażeniem *H. pylori* a rozwojem raka żołądka i chłoniaka MALT. Wiele gatunków bakterii powodujących przewlekłe stany zapalne, produkuje toksyny specyficznie wpływające na funkcjonowanie komórek eukariotycznych. Klasyczne egzotoksyny zalicza się do trzech kategorii: toksyn destabilizujących błony cytoplazmatyczne komórek gospodarza w sposób mechaniczny lub enzymatyczny, indukujących szlaki sygnałowe bez internalizacji (superantygeny) oraz toksyn wnikających do komórek eukariotycznych i w różnorodny sposób, głównie poprzez wpływ na szlaki przekazywania sygnałów, modyfikujących ich metabolizm [28]. Często indukują one stan zapalny, co może pośrednio prowadzić do uszkodzeń DNA; reakcja zapalna skutkuje bowiem powstawaniem toksycznych reaktywnych form tlenu. Zmiany w materiale genetycznym mogą być także skutkiem bezpośredniego działania toksyn o aktywności enzymatycznej, czy też powstawać poprzez ingerencję w procesy naprawy jego uszkodzeń. Wszystkie czynniki naruszające szlaki sygnałowe w komórce prowadzą do zaburzenia prawidłowego podziału komórek, procesów apoptozy, czy wzrostu komórek będących

w kontakcie z komórkami sąsiednimi, co może nadawać im zdolności metastatyczne (progresja nowotworu) [10]. Toksyny bakteryjne zaburzające eukariotyczny cykl komórkowy określa się jako cyklomoduliny. Są one bezpośrednio przekazywane z cytoplazmy patogenu do cytoplazmy komórek docelowych poprzez aparat wydzielniczy typu III (TTSS) czy IV (TFSS) lub też wydzielane do środowiska przez systemy wydzielania typu I, II czy V a następnie pobierane przez komórki organizmu gospodarza [18].

MITOGENNE DZIAŁANIE TOKSYN POPRZEZ AKTYWACJĘ SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH ZALEŻNYCH OD MAŁYCH BIAŁEK G

Przykładem bakteryjnej toksyny o charakterze mitogennym i potencjalnych właściwościach kancerogennych jest toksyna *Pasteurella multocida*, PMT (146 kDa monomer, kodowany profagowo). *P. multocida* to mikroorganizm izolowany od pacjentów z przewlekłymi infekcjami układu oddechowego, głównie jednak związany z chorobami świń obejmującymi m.in. zanik tkanki kostnej (ang. *atrophic rhinitis*), hamowanie różnicowania osteoblastów i budowy kości [14]. Toksyna ta jest silnym mitogenem zarówno w stosunku do fibroblastów jak i osteoblastów [29,30]. W ostatnich latach rozwiązano strukturę trzeciorzędową C-terminalnego fragmentu tego białka oraz zidentyfikowano reszty aminokwasowe istotne dla jego aktywności [31,32]. Po znalezieniu się w komórce docelowej, PMT stymuluje niezależnie przynajmniej dwa szlaki przekazywania sygnałów regulujące jej wzrost, aktywując heterotrimeryczne białka G ($G_{\beta\gamma}$ z rodziny G_q oraz $G_{\alpha_{12/13}}$) [33], co prowadzi do aktywacji fosfolipazy $C\gamma$ (PLC γ); ważnego transbłonowego przekaźnika sygnałów. W konsekwencji dochodzi do akumulacji fosforanu inozytolu, co wraz z uwolnieniem jonów wapnia z zasobów wewnątrzkomórkowych, aktywuje kinazy białkowe C. Białka te aktywują kinazy Jun oraz kinazy MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*) ERK1 i ERK2 [18]. Aktywacji ulegają również kinazy Src i FAK (ang. *focal adhesion kinase*), dochodzi do transmodulacji EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*). Wszystkie te białka związane są z kancerogenezą, stąd rozregulowanie przekazywania sygnałów komórkowych może prowadzić do fenotypu nowotworowego. Komórki będące w stanie spoczynku pod wpływem toksyny, ponownie wchodzi w cykl komórkowy (wzrost poziomu cykliny D za sprawą aktywacji kinaz MAPK), utrzymana jest synteza DNA i podziały komórek. Wzrost może odbywać się niezależnie od kontaktu z podłożem i z komórkami sąsiednimi. U zwierząt PMT promuje proliferację nabłonka pęcherza moczowego bez indukcji stanu zapalnego [14]. Z kolei w hodowlach fibroblastów linii Rat1 już przejściowa ekspozycja na działanie toksyny powoduje tworzenie kolonii z pojedynczej komórki, a efekt ten jest nawet większy niż po podaniu czynników wzrostu: EGF i PDGF, co jest charakterystyczne dla fenotypu komórek nowotworowych. Komórki Rat1 są linią nienowotworową, wykazują tylko wzrost zakotwiczony, w podłożu półpłynnym nie są w stanie utworzyć kolonii. Natomiast po poddaniu komórek działaniu PMT i rozproszeniu w półpłynnym agarze dochodzi do formowania kolonii [34].

Opisując toksyny bakteryjne i mechanizm ich oddziaływania na komórki eukariotyczne, należy zwrócić uwagę na przekazywanie sygnałów w tych komórkach, a szczególnie małe białka G, w tym GTPazy Rho, będące jednym z głównych celów toksyn. Do najdokładniej scharakteryzowanych przedstawicieli tej rodziny zalicza się białka RhoA, Rac1 i Cdc42. Należą one do nadrodziny białek Ras i stanowią molekularne przełączniki (ang. *switches*) w wielu ścieżkach sygnałowych, prowadzących głównie do rearanżacji cytoszkieletu aktynowego. Aktywność małych białek G zależy od związania GTP/GDP jest dodatkowo modulowana poprzez trzy inne białka: czynniki wymiany nukleotydu guaninowego GEF (ang. *guanine nucleotide exchange factors*), białka aktywujące aktywność GTPazową: GAP (ang. *GTPase-activating proteins*) oraz inhibitor dysocjacji nukleotydu guaninowego GDI (ang. *guanine nucleotide dissociation inhibitor*). Rho są „wyłączone”, nieaktywne w formie związanej z GDP i GDI. „Włączenie”, aktywacja odbywa się przez wymianę GDP na GTP, wspomaganą przez GEF, których działanie z kolei regulowane jest sygnałami spoza komórki. Wymiana ta prowadzi do zmian konformacyjnych w domenie „switch1” Rho, co umożliwia białku oddziaływanie z jego efektorami (kinazami, fosfolipazami, białkami adaptorowymi). Aktywność Rho wymaga dodatkowo lokalizacji błonowej. Zaraz po zainicjowaniu odpowiedzi w komórce zachodzi hydroliza GTP w domenę „switch2”, z udziałem GAP, co ponownie „wyłącza” białko Rho i terminuje sygnał. Trzecim czynnikiem w regulacji aktywności Rho jest GDI, który utrzymuje Rho w cytoplazmie w formie nieaktywnej [28,35].

Działanie RhoA polega głównie na indukcji formowania włókien aktynowych i miozynowych, organizacji miejsc kontaktów komórki z macierzą zewnątrzkomórkową, gdzie skupiają się receptory adhezyjne, powstawania lamellipodiów, wypustek poruszających się komórek, silnie usieciowanych aktyną, a także tzw. kompleksów adhezji ogniskowej (ang. *focal complexes*). Natomiast Cdc42 ma wpływ na tworzenie filopodiów, mikrokolców i kontaktów adhezyjnych (jak w przypadku białka RhoA) [35]. Białka Rho regulują więc strukturę, funkcje i przyleganie komórek nabłonkowych, jak również poruszanie się komórek poprzez wpływ na procesy przebudowy cytoszkieletu aktynowego. Migracja komórek odgrywa istotną rolę w reakcjach odpornościowych, umożliwiając przemieszczanie się leukocytów, ich toczenie po ścianach naczyń krwionośnych i ekstrawazację poza ich światło [36]. Mechanizm wpływu białek Rho na poziom i rodzaj odpowiedzi immunologicznej związany jest z regulacją syntezy czynników transkrypcyjnych i cytokin w komórkach odpornościowych. Kluczowym momentem w przypadku tych akurat procesów jest aktywacja NF- κ B, centralnego regulatora zarówno wrodzonej, jak i nabytej odpowiedzi immunologicznej. Czynnikiem NF- κ B jest heterodimerem, występującym w cytoplazmie w połączeniu z inhibitorem I κ B. Aktywacja odpowiednich receptorów prowadzi do fosforylacji inhibitora i jego proteasomalnej degradacji, zaś aktywny NF- κ B ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie indukuje ekspresję zależnych od siebie genów. GTPazy Rho indukują m.in. fosforylację I κ B, natomiast białka RhoA i Rac fosforylują czynnikiem NF- κ B, co

jest niezbędne do uzyskania przez niego pełnej aktywności [28,37].

Sumarycznie, działalność małych białek G wpływa na regulację wielu procesów, m.in. migracji komórek, morfogenezy, cytokinezy, fagocytozy, kontaktu komórek z macierzą i innymi komórkami, polarności komórek, produkcji anionu ponadtlenkowego przez oksydazę NADPH, aktywacji transkrypcji, cyklu komórkowego, apoptozy i transformacji [38]. NF- κ B jest także odpowiedzialny za produkcję anty-apoptotycznych białek, takich jak Bcl-2 czy IAP (inhibitory apoptozy) [28].

Patogenne mikroorganizmy wypracowały dwie podstawowe strategie wpływu toksyn na białka Rho. Po pierwsze endocytowane toksyny bakteryjne enzymatycznie, w sposób nieodwracalny na drodze ADP-rybozylacji, glukozylacji lub deaminacji modyfikują białka G. Po drugie efekторы, wprowadzane do komórek gospodarza za pośrednictwem TTSS, o strukturze podobnej do białek regulujących aktywność Rho, GEF czy GAP, modulują ich aktywność w sposób odwracalny [28].

Bezpośrednie działanie toksyn bakteryjnych na białka Rho polega na ich modyfikacji w dwóch kluczowych domenach: „switch1” i „switch2”. Te, które inaktywują GTPazy Rho najczęściej działają na domenę „switch1”, która jest odpowiedzialna za łączenie GTPaz z ich efektorami (toksyna LT, ang. *lethal toxin Clostridium sordellii* czy toksyny TcdA i TcdB *Clostridium difficile*). SptP *S. enterica* natomiast naśladuje działanie eukariotycznych GAP, inaktywując GTPazy Rac i Cdc42. Obie funkcje z kolei pełni egzoenzym S, ExoS *Pseudomonas aeruginosa* [28,35]. Inaktywacja Rho prowadzi do destrukcji cytoszkieletu aktynowego, zmian transkrypcji genów antyapoptotycznych (BCL-2) i w konsekwencji apoptozy. Często celem takiej aktywności są też limfocyty T, w których dezorganizacja cytoszkieletu uniemożliwia indukcję apoptozy w komórkach zainfekowanych patogenami wewnątrzkomórkowymi [35]. Toksyny działające na domenę „switch2” (np. CNF) wywierają efekt odwrotny tzn. blokują proces apoptozy. Przykładowo deamidacja Gln63/Gln61 w tej domenie uniemożliwia hydrolizę GTP, zarówno indukowaną przez GAP, jak i od niego niezależną, co prowadzi do konstytutywnej aktywacji Rho, Rac czy Cdc42. W następstwie sieć aktynowa ulega przebudowie, zmienia się profil transkrypcji genów zależnych od NF- κ B, niemożliwa jest depolaryzacja błon mitochondrium i uwolnienie zeń cytochromu *c*, apoptoza jest zablokowana [28].

CNF (ang. *cytotoxic necrotizing factor*) to toksyna AB o masie cząsteczkowej około 115 kDa, wytwarzana przez wiele patogennych szczepów *E. coli*. Domena N-końcowa toksyny wiąże receptor, C-końcowa wykazuje aktywność enzymatyczną, zaś środkowy rejon białka odpowiada za jego translokację [37]. Toksyna ta modyfikuje białka z rodziny Rho (Rho, Rac, Cdc42, z wyjątkiem Ras), prowadząc do ich stałej, nieodwracalnej aktywacji. Izoformy CNF: CNF1 oraz CNF2 (a także dermonekrotyzująca toksyna, DNT *Bordetella bronchiseptica*) deamidują Gln63 białka RhoA w domenę „switch2”, blokując hydrolizę GTP [35]. W konsekwencji uruchamiane są liczne szlaki sygnałowe: aktywacji ulegają kinazy FAK, Src a także COX2 (cyklo-oksigenaza 2) oraz przejściowo kinaza Jun [14, 37].

Skutkiem działania CNF jest wejście komórki w stanie spoczynku w cykl komórkowy ponieważ białka Rho poprzez wpływ na poziom cykliny D1 oraz inhibitorów CDK: p27^{KIP1} i p21^{CIP1} przyczyniają się do progresji cyklu komórkowego [39]. Nie dochodzi jednak do cytokinezy, przez co powstają wielojądrowe komórki o charakterystycznie pomarszczonych błonach (zjawisko tzw. membrane ruffling powodowane proteasomalną degradacją Rac1 wywołaną działaniem CNF1) [35]. Takie wielojądrowe komórki zyskują zdolności fagocytarne, jednocześnie unikając apoptozy. Działanie CNF1 jest więc też powiązane z aneuploidią (zaburzeniem ilości DNA w jądrze komórkowym: prawidłowy zestaw chromosomów zostaje zubożony o jeden lub kilka chromosomów, wskutek nieprawidłowej replikacji i rozdziału materiału genetycznego do komórek potomnych), która często towarzyszy onkogenezie. Toksyna moduluje także procesy autofagii, fenomen pojawiający się często w komórkach nowotworowych [40]. CNF1 jest więc potencjalnym czynnikiem transformacyjnym, który pomimo swej mylnej nazwy promuje przetrwanie komórki: hamuje apoptozę, nie powodując równocześnie katastrofy mitotycznej (rodzaj śmierci komórek wielojądrowych ssaków powstałych wskutek aberrantnej mitozy) [37,40].

Infekcje *E. coli* (50% stanowią szczepy produkujące CNF) odpowiedzialne są za większość stanów zapalnych dróg moczowych. Zauważono również związek infekcji uropatogennymi szczepami *E. coli* (UPEC) z silnymi stanami zapalnymi prostaty, stąd przypuszcza się, że CNF i aktywacja COX2 w trakcie przewlekłych infekcji może przyczyniać się do zwiększonego ryzyka rozwoju nowotworu tego gruczołu. Ryzyko nowotworu w przypadku infekcji dróg moczowych szczepami wytwarzającymi CNF wiąże się głównie ze zdolnością indukcji ekspresji COX2, co jest konsekwencją, jak wspomniano wyżej, aktywacji białek Rho oraz procesów związanych z aktywacją NF- κ B. Nadekspresja genu COX2 jest odnotowywana w pewnych typach nowotworów [14]. Zmiany ekspresji genów kodujących białka zaangażowanych w kontrolę cyklu komórkowego: cykliny D1, kinazy CDK2, c-Myc, Rb, p21, p53, podobnie jak genów kodujących cytokiny: IL-1 β , TNF, IL-6, EGF, pełniących często funkcję czynników wzrostu dla komórek nowotworowych zależne są właśnie od tego czynnika transkrypcyjnego. Kontrola przez produkty genów bezpośrednio zależnych od NF- κ B podlegają też metaloproteazy MMP, uPA (aktywator plazminogenu typu urokinazowego), VCAM-1, ICAM-1, ELAM-1 odpowiedzialne za adhezję komórek. Wszelkie zmiany w tempie ich syntezy mogą przyczyniać się do inwazji i powstawania przerzutów w dalszych etapach rozwoju nowotworów [37]. Przedłużone przetrwanie komórki połączone ze zwiększoną adhezją do składników macierzy może wręcz promować nowotworowy potencjał komórek nablónkowych. CNF1 w komórkach nabłonka powoduje też powstawanie skomplikowanej sieci wydłużonych i powiązanych wzajemnie ze sobą mitochondriów, co zależne jest od nadekspresji Bcl-2 [37,41]. Dysfunkcja mitochondriów prowadzi do wielu chorób, a w tym nowotworów, co również popiera tezę o kancerogennym charakterze CNF. Częstą cechą zmian nowotworowych związanych ze stanem zapalnym jest też produkcja reaktywnych form tlenu i

tlenu azotu (NO), co prowadzi do pojawiania się kolejnych mutacji, a w konsekwencji dysfunkcji wielu genów [37].

Cif (ang. *cycle-inhibiting factor*) jest toksyną (białkiem efektorowym) EPEC i EHEC, kodowaną profagowo i przekazywaną do komórek docelowych przez TTSS *locus* LEE [42]. Jest to modułowe białko, złożone ze stałej domeny funkcjonalnej i wymiennie występujących sekwencji sygnałowych: translokacji i sekrecji. Translokacja Cif do komórki docelowej powoduje Rho-zależną polimeryzację włókien aktynowych oraz powiększenie jądra komórkowego w wyniku zahamowania mitozy. Ten drugi proces jest niezależny od białek Rho, ponieważ ich hamowanie nie znosi blokady cyklu komórkowego powodowanej przez Cif [18]. Inaczej niż w przypadku CDT, co opisano niżej, nie obserwuje się uszkodzeń DNA i fosforylacji histonu H2AX oraz rekrutacji systemu naprawczego, choć efekt działania jest podobny, dochodzi do zatrzymania cyklu na etapie G2/M. Działanie Cif jest niezależne od aktywacji punktu kontrolnego uszkodzeń DNA: ATM/ATR (ang. *ataxia telangiectasia mutated/ataxia telangiectasia and Rad3 related*), nie dochodzi do fosforylacji Chk1 i Chk2 (ang. *checkpoint kinase 1, 2*). Prawdopodobnie brak defosforylacji/aktywacji CDK1 spowodowany jest zmianami strukturalnymi Cdc25C, która pod wpływem działania Cif nie jest zdolna do oddziaływania z CDK1 [42].

TOKSYNY USZKADZAJĄCE DNA

Odkrycie toksyn bakteryjnych, które bezpośrednio uszkadzają DNA, potwierdziło, że toksyny bakteryjne mogą nie tylko wspomagać powstawanie nowotworów poprzez zakłócanie prawidłowego przebiegu procesów przekazywania sygnałów, ale również inicjować proces kancerogenezy. CDT to złożona toksyna typu AB rozpoznana u wielu gramujemnych bakterii (w tym *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter* spp.) [18]. Indukuje ona wzrost objętościowy komórek eukariotycznych oraz proces apoptozy limfocytów i monocytów [43]. Toksyny CDT zbudowane są z trzech podjednostek; CdtA i CdtC odpowiadają za rozpoznanie polisacharydowych receptorów na powierzchni komórek ssaków, zaś CdtB jest białkiem o aktywności DNazy zawierającym motyw NLS (ang. *nuclear localization signal*), zapewniający jej lokalizację jądrową [44]. Katalizuje ona powstawanie dwuniciowych pęknięć w DNA w sposób zależny od ATM a tym samym hamuje cykl komórkowy. Blokada cyklu na poziomie przejścia G2/M jest związana z akumulacją ufosforylowanej formy Cdk1 (kinazy zależnej od cyklin), oddziałującej z cykliną B [14,18]. Co ciekawe, *S. enterica* sv. Typhi, produkuje jedynie podjednostkę CdtB, co powinno uniemożliwiać toksynie wniknięcie do komórki docelowej (Ryc. 1). Jednakże ostatnio udokumentowano złożony mechanizm transportu tej toksyny związany z tworzeniem trimeru zbudowanego z podjednostki CdtB oraz dwu białek PltA i PltB, wykazujących podobieństwo sekwencji reszt aminokwasowych do sekwencji podjednostek toksyny *Bordetella pertussis* o aktywności ADP-rybozylującej. Składanie toksyny ma miejsce w cytoplazmie komórki eukariotycznej. Następnie toksyna transportowana jest do środowiska i ponownie pobierana przez komórki, posiadające na powierzchni odpowiednie receptory [43,45].

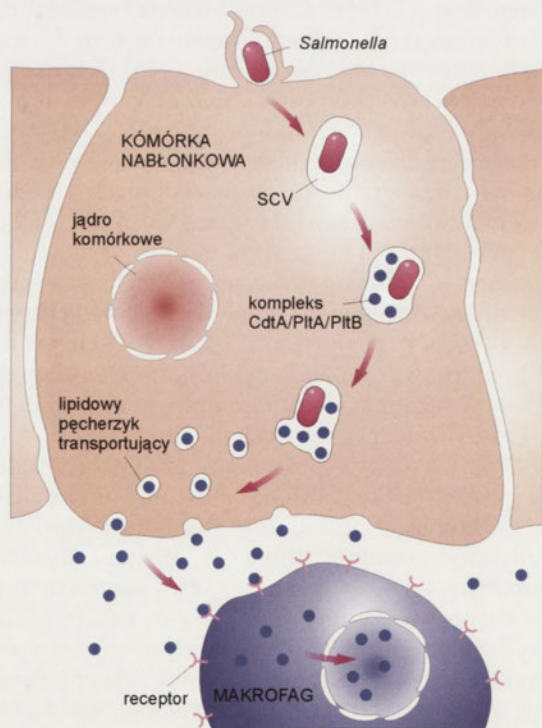
Działanie CDT prowadzi do formowania aktywnych włókien naprężeniowych poprzez aktywację RhoA. Proces ten ma miejsce w cytoplazmie, tak więc sygnały powstające w odpowiedzi na zniszczenia DNA muszą być przenoszone z jądra komórkowego. Większość białek GEF wykazuje lokalizację cytoplazmatyczną. W jądrze komórkowym zlokalizowane jest RhoA-specyficzne białko GEF-Net1 (ang. *neuroepithelioma transforming gene 1*) odpowiadające na stres genotoksyczny w komórce. Niezbędna dla aktywacji RhoA pod wpływem CDT jest więc zmiana lokalizacji Net1 z jądrowej, gdzie dwuniciowe przerwy w DNA powodują defosforylację Net1 w miejscu inhibitorowym (aktywacja), na cytosolową [46-47]. RhoA powoduje także aktywację MAPK JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinase*) i SRF (ang. *serum response factor*), jak również p38 MAPK, która promuje przeżycie komórek poddanych działaniu CDT; chroni ona przed apoptozą indukowaną uszkodzeniami DNA. MK2 (MAPK-aktywowana kinaza białkowa 2) jest bezpośrednim substratem p38 MAPK; w reakcji na działanie CDT również dochodzi do jej aktywacji. Droga ta może okazać się krytyczna w nowotworach powodowanych chronicznymi infekcjami i ekspozycją na niektóre toksyny bakteryjne, które indukują uszkodzenia DNA [46].

KANCEROGENNE TOKSYNY *H. PYLORI*

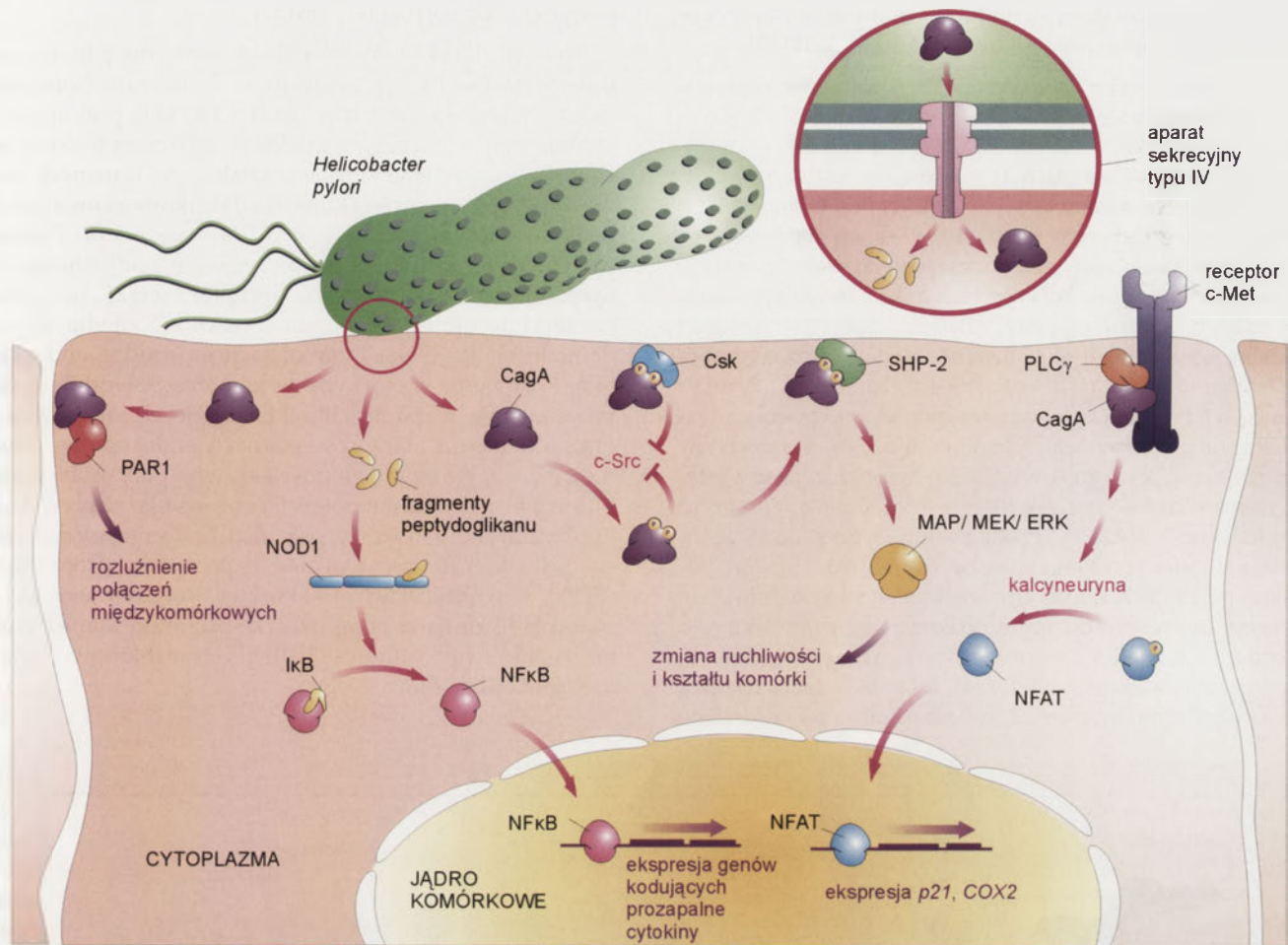
Badania epidemiologiczne bezsprzecznie udokumentowały, że ludzie zainfekowani szczepami *H. pylori* produkującymi aktywną toksynę VacA oraz posiadającymi wyspę patogenności Cag obciążeni są wyższym ryzykiem rozwoju chorób nowotworowych niż ludzie zakażeni szczepami

nieposiadającymi tych czynników wirulencji. Molekularny mechanizm tych zjawisk pozostaje nadal nie w pełni wyjaśniony. Profil ekspresji genów komórek nabłonkowych żołądka po kontakcie ze szczepami *cagA*⁺ PAI lub *cagA*, analizowany przy zastosowaniu mikropaneli cDNA, wykazuje znaczące różnice. Dotyczą one głównie ekspresji genów związanych z procesami apoptozy i regulacji cyklu komórkowego [48]. Ostatnio udokumentowano wpływ infekcji *H. pylori* na procesy metylacji genów komórek eukariotycznych. Te zmiany epigenetyczne, w szczególności metylacja skupisk nukleotydów CpG w regionach promotorów genów supresorów nowotworowych doprowadzająca do obniżenia lub całkowitego zahamowania ich transkrypcji, ma niewątpliwie wpływ na rozwój choroby nowotworowej. Mechanizm w jaki sposób infekcja *H. pylori* doprowadza do rozregulowania procesów metylacji nukleotydów w komórkach eukariotycznych jak dotąd nie został wyjaśniony. Przypuszcza się, że zaburzenia indukowane są przewlekłym stanem zapalnym. Podwyższony poziom metylacji zaindukowany infekcją dotyczy wielu genów w genomie komórek gospodarza, nie tylko genów supresorów nowotworowych. Dodatkowo istnieją geny nie podlegające temu procesowi [49-51].

Białko CagA (ang. *cytotoxin associated antigen A*) *H. pylori* dostarczane jest do komórki docelowej poprzez TFSS, zbudowany z białek strukturalnych kodowanych przez geny wyspy patogenności (PAI, ang. *pathogenicity island*) Cag. CagA to 128-146 kDa efektor tego systemu, kodowany również w obrębie wspomnianej wyspy genomowej. Większość szczepów izolowanych od pacjentów niesie w genomie wyspę i koduje CagA [52]. CagA jest białkiem wielofunkcyjnym, modulującym wiele szlaków przekazywania sygnałów (Rys. 2) w sposób zależny lub nie zależny od jego fosforylacji. Niektóre indukowane efekty są skutkiem stymulacji/zahamowania kilku szlaków przekazywania sygnałów. Na terenie komórki docelowej reszta tyrozyny motywu/ów EPIYA CagA ulega fosforylacji przez kinazę Src, co nadaje jej powinowactwo do błon komórkowych. W tej lokalizacji oddziałuje z komórkowymi fosfatazami tyrozynowymi SHP-2 (dzięki obecności w nich charakterystycznej domeny SH2) [53]. Białka tej rodziny odgrywają istotną rolę w regulacji wzrostu i ruchliwości komórek, a zakłócenie ich działania prowadzi do wielu schorzeń, w tym nowotworów, stąd nazywa się je onkoproteinami. Zmiana konformacji SHP-2 stymuluje szlak przekazywania sygnału MAP/MEK/ERK, co prowadzi do zmian morfologii komórki (tzw. fenotyp kolibry, ang. *hummingbird*, wydłużenie komórki), zmian cytoszkieletu oraz zmian w ruchliwości komórek [6,7]. Gen *cagA* charakteryzuje się silnym polimorfizmem. Dotyczy on głównie liczby i sekwencji reszt aminokwasowych sąsiadujących z motywami fosforylacji zlokalizowanych w C-końcowej domenie CagA. Szczepy izolowane od pacjentów z USA, zachodniej Europy oraz Australii (tzw. typ zachodni; Western type) zawierające inny układ motywów fosforylacji niż szczepy typu wschodnioazjatyckiego (East-Asian type), infekujące mieszkańców Chin, Korei i Japonii [14,54]. W obu typach CagA występują motywy EIPY-A i -B (miejsce oddziaływania z kinazą Csk, patrz niżej), podczas gdy typ zachodni zawiera dodatkowo jeden lub więcej motywów EIPY-C a typ wschodni CagA jeden lub więcej motywów EIPY-D. Różnorodność wariantów białka CagA różniących



Rycina 1. Mechanizm wydzielania/transportu toksyny CDT u *Salmonella enterica* sv. *Typhi* [wg 45]: (1) internalizacja bakterii; (2) ekspresja *cdtB* oraz *pltA* i *pltB*; (3) wydzielanie kompleksu CdtB/PltA/PltB do światła wakuoli oraz jego „pakowanie” do lipidowych pęcherzyków transportujących; (4) eksport kompleksu poza komórkę; (5) wnikanie toksyny do komórek niezainfekowanych, gdzie ujawnia się jej enzymatyczna aktywność DNAzy.



Rycina 2. CagA – białko efektorowe *H. pylori*. Wpływ na funkcjonowanie komórki nabłonka żołądka [wg 70]: (1) dostarczenie CagA poprzez T4SS; (2) asocjacja CagA z białkami JAM i ZO-1 niezależnie od fosforylacji tyrozynowej; (3) fosforylacja tyrozyny motywu EPIYA CagA przez Src; (4) aktywacja Csk i negatywne sprzężenie zwrotne: dezaktywacja Src; (5) defosforylacja ezryny i kortaktyny w wyniku zahamowania aktywności Src – zmiany morfologii i ruchliwości komórki; (6) ufosforylowane CagA aktywuje SHP-2; (7) asocjacja CagA z receptorem c-Met oraz PLCγ; (8) stymulacja aktywności kinazy ERK dzięki SHP-2.

się powinowactwem względem SHP-2, występująca pomiędzy szczepami wschodnioazjatyckimi a zachodnimi koreluje też ze zmienną liczbą zachorowań na raka żołądka w tych regionach; zdecydowanie więcej przypadków obserwuje się właśnie w Azji [54-55]. CagA oddziałuje też z kinazą C-końcowej domeny Src (Csk), które dzięki temu ulega aktywacji i staje się zdolne do deaktywacji kinazy Src. Mechanizm ten, redukując poziom fosforylacji samego CagA, wycisza związane z nim procesy przekazywania sygnału [18]. Wykazano również zdolność CagA do oddziaływania z innymi cząstkami sygnałowymi, tj. Grb2 (ang. *growth factor receptor bound 2*) oraz receptorem czynnika wzrostu c-Met. Ten proces nie wymaga fosforylacji CagA. Oddziaływanie to skutkuje rozproszeniem komórek, prowadząc do fenotypu podobnego do tego wywołanego przez HGF (czynnik wzrostu hepatocytów, tzw. „scatter factor”), który uczestniczy m.in. w procesie metastazy [7, 56-57].

CagA bierze udział w aktywacji kilku czynników transkrypcyjnych między innymi z rodziny NFAT (ang. *nuclear factor of activated T cells*). NFAT, podobnie jak NF-κB, też aktywowany infekcją *H. pylori* poprzez oddziaływanie fragmentów peptydoglikanu z cytoplazmatycznymi receptorami białkami NOD1 (ang. *nucleotide-binding oligomeri-*

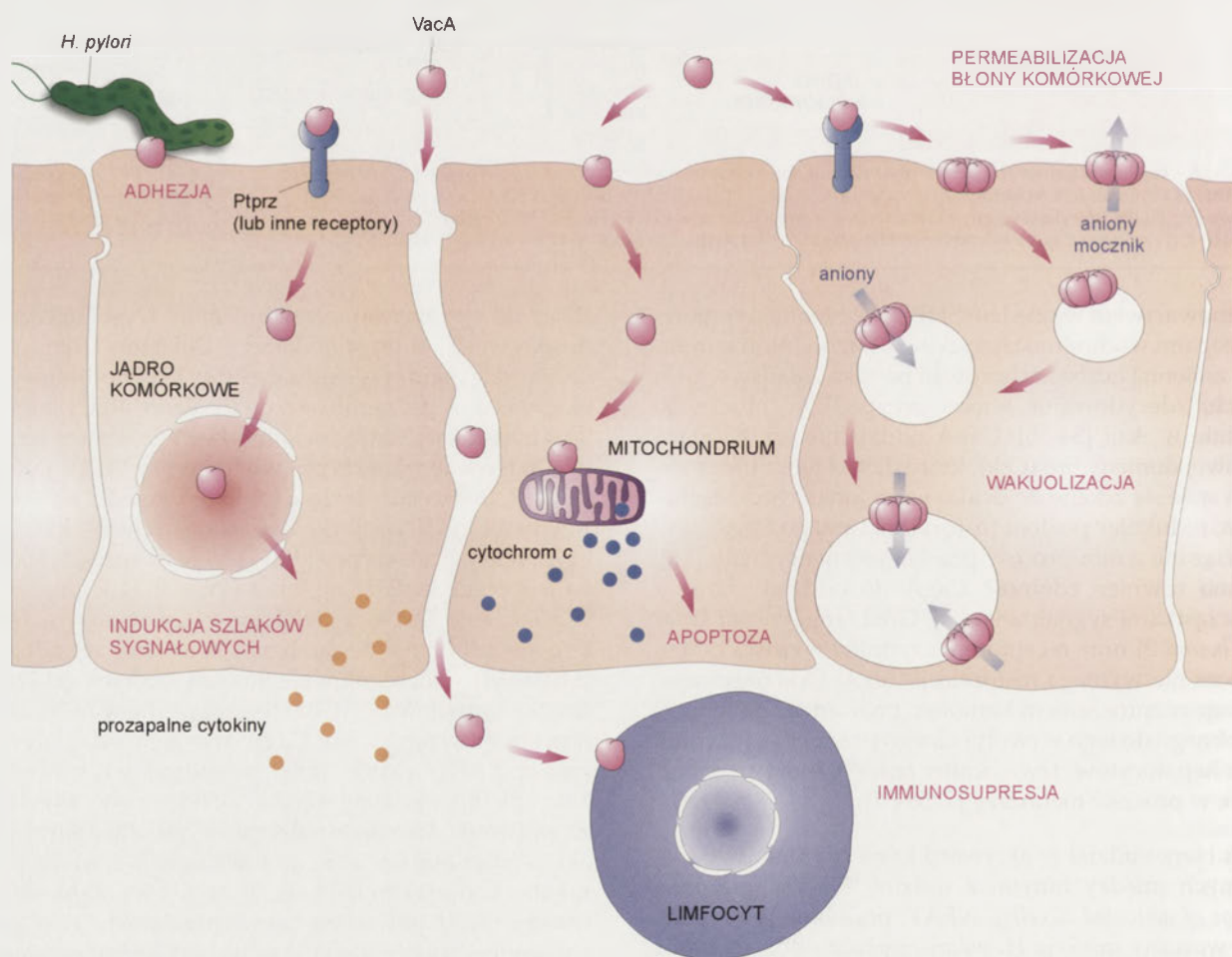
zation domain protein), w cytoplazmie występuje w formie nieaktywnej, ufosforylowanej. Defosforylacja czynnika przez kalcyneurynę, fosfatazę Ca²⁺/kalmodulino-zależną, aktywowaną pośrednio przez działanie PLCγ, umożliwia jego translokację do jądra komórkowego. Proces ten wywołuje aktywację transkrypcji wielu genów takich jak np. *p21* i *COX2*. Białko *p21*, będące inhibitorem Cdk, powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego na poziomie G1 [57]. Innym czynnikiem transkrypcyjnym którego ekspresja modulowana jest przez białko CagA jest czynnik TCF (ang. *β-catenin T-cell factor*). CagA oddziałując z C-końcowym fragmentem E-kadheryny destabilizuje kompleks tej adhezyny z β-keniną i rozregulowuje zależną od tych oddziaływań ścieżkę sygnałową [55]. Istotne znaczenie w indukcji zmian nowotworowych przez CagA ma jego oddziaływanie z kinazą PAR1/MARK (ang. *partitioning-defective/microtubule affinity regulating kinase*) białkiem odpowiedzialnym za polarność komórek nabłonkowych. Zablockowanie jego aktywności doprowadza do rozluźnienia ścisłych połączeń między komórkami nabłonka i utraty ich polarności [55,58]. Ostatecznych dowodów potwierdzających, że CagA jest bakteryjną onkoproteina dostarczyło wyhodowanie transgenicznym myszy wytwarzających dwa rodzaje białka CagA: białko typu dzikiego i białko zmutowane nie pod-

legające procesowi fosforylacji. U zwierząt produkujących dziki typ CagA zaobserwowano nagromadzenie zmian nowotworowych tkanki nabłonkowej żołądka i jelit [59].

Gen kodujący białko *VacA* jest obecny w genomach wszystkich izolowanych szczepów *H. pylori*, choć u około 50% szczepów kodowane białko nie ma właściwości cytotoksycznych. Stwierdzono, że w szczepach *Tox⁻*, które nie indukują wakuolizacji komórek eukariotycznych, transkrypcja genu *vacA* zachodzi na dużo niższym poziomie niż w szczepach fenotypowo *Tox⁺* [60]. Wśród wszystkich szczepów *H. pylori* sekwencja reszt aminokwasowych końców białka: karboksylowy i aminowy są zachowane w ewolucji. Znaczną zmienność wykazują sekwencje sygnałowa: s (3 allele: s1a, s1b, s2) oraz centralny rejon białka: m (ang. *middle region*) – 4 rodzaje: m1, m2, m1* i m1*-m2 [61]. Ponadto zidentyfikowano ostatnio trzeci zmienny rejon: i (ang. *intermediate region*), występujący w dwóch formach: i1 oraz i2, z czego i1 wydaje się być związana z występowaniem wrzodów żołądka [62]. Wśród badanych pod tym względem szczepów *H. pylori* odnaleziono wszystkie możliwe kombinacje genotypu genu *vacA* oprócz s2/m1. Szczepy posiadające genotyp *vacA* s1a odpowiedzialne są za najsilniejsze reakcje ze strony układu immunologicznego człowieka. Od pacjentów ze zmianami nowotworowymi najczęściej izolowane są szczepy z allelem *vacA* s1/m1, które wykazują większą cytotoksyczność niż wariant s1/m2 [63]. Białko produkowane

przez szczepy o genotypie *vacA* s2/m2 nie wykazuje aktywności cytotoksycznej [64].

Toksyna *VacA* *H. pylori*, należąca do grupy białek auto-transporterów (V typ sekrecji) ma strukturę homomultimeru. Produkowana jest w postaci 140 kDa prekursora zawierającego sekwencję sygnałową, właściwą toksynę oraz C-kończącą domenę odpowiedzialną za transport białka przez błonę zewnętrzną komórki. Pozakomórkowa *VacA* to białko o wielkości 95 kDa, składające się z 6 do 7 podjednostek. W tej formie za pośrednictwem podjednostki p58, rozpoznającej eukariotyczny receptor, wiąże się z błoną komórki docelowej. Po oligomeryzacji z podjednostką p37, dojrzałe białko ulega internalizacji na drodze endocytozy [65]. Pojawienie się toksyny w komórce powoduje szybkie powstawanie wakuoli, charakteryzujących się niskim pH oraz obecnością markerów późnych endosomów i lizosomów. *VacA* tworząc anionoselektywne pory w błonach lipidowych, zaburza ich potencjał i powoduje napływ do wakuoli dużych ilości wody. N-kończąca domena *VacA* wiąże się prawdopodobnie również z pompami protonowymi ATPaz w wodniczках, co skutkuje wakuolizacją całej komórki [14]. Zmiana przepuszczalności błon ma też wpływ na zwiększenie transepitelialnej i transbłonowej dyfuzji mocznika (Ryc. 3).



Rycina 3. *VacA* – toksyna wakuolizująca *H. pylori*. Efekty działania na komórki nabłonka układu pokarmowego: apoptoza, indukcja szlaków przekazywania sygnałów prowadzących do produkcji cytokin prozapalnych, zmiany przepuszczalności błon lipidowych.

W komórkach okładzinowych VacA doprowadza do permeabilizacji szczytowej części błony, wpływając na zdolności wydzielnicze tych komórek, indukując hipochlorhydrię (niedokwaśność żołądka). Napływ zewnątrzkomórkowych jonów wapnia do komórki powoduje aktywację kalpajny i za jej sprawą proteolizę ezryny, która zostaje uwolniona z błony komórkowej. Hamowanie wydzielania kwasu solnego odbywa się poprzez zablokowanie oddziaływań cytoszkieletu z apikalną błoną. Działanie tej toksyny dotyczy też ingerencji w cykl komórkowy komórek nabłonka żołądka. Zatrzymuje się on w fazie G1, głównie za sprawą wzrostu ekspresji genów *p53*, *p21* oraz *Bax*, obniżeniem poziomu cyklin fazy G1 oraz fosforylacji Rb [18]. VacA indukuje też apoptozę komórek przez aktywację jej mitochondrialnych szlaków. Domena N-końcowa VacA kieruje się do mitochondrium, gdzie doprowadza do uwolnienia cytochromu *c* i aktywacji kaspazy 3. Uniemożliwienie proliferacji limfocytów T CD4+ może tworzyć bakteriom lokalną strefę immunosupresji w błonie śluzowej żołądka, co „pomaga” w ustanowieniu chronicznej infekcji [14]. VacA hamuje ponadto autokrynną stymulację między IL-2 a jej receptorem, uniemożliwia translokację do jądra komórkowego NFAT. W ten sposób negatywnie regulowana jest synteza zarówno IL-2, jak i jej receptora [18,57]. Antagonistyczne działanie w stosunku do CagA wiąże się z blokowaniem defosforylacji NFAT przez kalcyneurynę: enzym ten nie jest aktywowany, gdyż zasoby jonów wapnia nie mogą ulec odpowiedniej mobilizacji ze względu na rozregulowanie depolimeryzacji błon w komórce. Pozytywna lub negatywna regulacja aktywności NFAT przez różne szczepy patogenu może odpowiadać za różnorodność indukowanych objawów chorobowych.

Wspólne działanie obu toksyn *H. pylori* na komórki nabłonka żołądka może prowadzić do zakłóceń procesów ich wzrostu, a w konsekwencji także i transformacji [57]. Poparciem tej tezy jest statystyczna zależność między liczbą zachorowań na raka żołądka a fenotypem szczepów wywołującym poważne objawy chorobowe: większość z nich ma fenotyp CagA+ i VacA+.

INNE MECHANIZMY DZIAŁANIA BAKTERYJNYCH TOKSYN – AKTYWNOŚĆ PROTEOLITYCZNA

BFT (fragilizyna), 20 kDa toksyna enterotoksycznych szczepów *Bacteroides fragilis* (ETBF) będących czynnikiem etiologicznym zarówno ostrych, jak i chronicznych stanów zapalnych błon śluzowych jelita (IBD, ang. *inflammatory bowel disease*) jest metaloproteinazą zależną od cynku, niszczącą E-kadherynę, białko niezbędne w utrzymaniu oddziaływań między komórkami eukariotycznymi [66]. Jej działanie prowadzi do rozluźnienia połączeń międzykomórkowych i indukcji szlaku sygnałowego TCF. BFT oddziałuje z cytoszkieletem przez α - i β -kateniny, które zwykle tworzą kompleksy z cytoplazmatyczną domeną E-kadheryny oraz aktyną. Degradacja E-kadheryny przez BFT stymuluje translokację do jądra komórkowego cytoplazmatycznej β -kateniny. Ten szlak sygnałowy prowadzi do wzmożonej ekspresji *c-myc* i genu kodującego cyklinę D, co w konsekwencji wspomaga proliferację komórek zależną od TCF [14,67].

Toksyna ta także indukuje syntezę COX2 oraz prostaglandyny E(2), PGE(2), która wraz z c-AP2 (ang. *cellular inhibitor of apoptosis 2*) hamuje proces apoptozy we wczesnej fazie ekspozycji na działanie toksyny. Procesy te regulowane są przez p38 MAPK [68]. Takie „odsunięcie w czasie” apoptotycznej śmierci komórki umożliwia jej zainicjowanie stanu zapalnego. Ważną cechą BFT, związaną także ze stanem zapalnym, jest indukcja syntezy IL-8: chemoatraktanta neutrofilii. Produkcja IL-8 może odbywać się za pośrednictwem trzech różnych, aczkolwiek powiązanych ze sobą szlaków rozpoczynających się od MAPK i angażujących kinazy tyrozynowe i czynnik transkrypcyjny NF- κ B. MAPK przekazują sygnał indukowany stresem i czynnikami wzrostowymi z powierzchni komórki do jej jądra poprzez udział ERK, p38 i JNK. W tym przypadku występuje też stymulacja sygnałów prowadząca do NF- κ B i niezależna od MAPK. Infekcje *B. fragilis* przyczyniające się do przewlekłych stanów zapalnych jelit mogą predysponować do rozwoju raka. Udział BFT w tym procesie jest prawdopodobny [69].

PODSUMOWANIE

Dane epidemiologiczne dostarczają coraz więcej danych dotyczących związku przewlekłych infekcji bakteryjnych z procesami kancerogenezy. Jednakże molekularne mechanizmy tych zjawisk, nawet w przypadku tak dokładnie już scharakteryzowanych infekcji *H. pylori* pozostają nie do końca wyjaśnione. Pomimo, że znamy czynniki wirulencji *H. pylori*, nie potrafimy dokładnie wskazać tego (tych), które mają bezpośrednie i największe znaczenie w nowotworzeniu. Dopiero rok temu wykazano, że białko CagA jest onkoproteina. Ponadto identyfikujemy produkty bakteryjne, będące potencjalnie czynnikami kancerogennymi, choć czasem wytwarzające je mikroorganizmy nie są związane epidemiologicznie z rozwojem nowotworów.

Ważnym mechanizmem wydaje się być wpływ patogenów na szlaki przekazywania sygnału w komórkach eukariotycznych. Zaburzenie równowagi w naszych komórkach: zmiana regulacji ich wzrostu, różnicowania, apoptozy może prowadzić zarówno do ich śmierci, jak i unieśmiertelnienia, powstawania nowotworu. Szczególnie ważnym etapem dla przeżycia patogenów wewnątrzkomórkowych jest wywołanie chronicznego stanu zapalnego i utrzymanie komórki gospodarza przy życiu, uniewrażliwienie jej na naturalne mechanizmy regulacyjne. Zmiany tak powstałe mogą przypominać kolejne etapy kancerogenezy, a po zastosowaniu antybiotyków ulegać nawet całkowitej remisji. Ogólnie wnioskować można, iż przewlekły stan zapalny, wywołany infekcją bakteryjną, może zakłócać normalne ścieżki sygnałowe w komórkach eukariotycznych, a tym samym inicjować lub promować rozwój nowotworów.

H. pylori nie jest jedynym przykładem bakterii powodującej nowotwory, ale najlepiej udokumentowanym. Coraz więcej wiadomo również o patogenezie *Bartonella* sp. bakterii indukującej zmiany podobne do procesów angiogenezy. Poznawana jest rola wielu toksyn bakteryjnych w procesach nowotworzenia. Białka te często zakłócają szlaki przekazywania sygnałów w komórkach eukariotycznych. Niektóre z nich mogą bezpośrednio uszkadzać DNA. Klu-

czowe znaczenie ma wpływ toksyn na GTPazy Rho, główne „przełączniki” sygnalizacyjne w naszych komórkach, czego efektem są zmiany w organizacji cytoszkieletu, ruchliwości i morfologii komórek oraz modulowanie procesów apoptozy. Zaburzenie wyżej wymienionych procesów niewątpliwie może przyczynić się do transformacji komórek. Pomimo, że do rozwoju raka niezbędne są także „sprzyjające” okoliczności ze strony organizmu człowieka i warunków środowiskowych, coraz trudniej wykluczyć rolę bakteryjnych infekcji jako istotnych czynników ryzyka chorób nowotworowych.

PIŚMIENNICTWO

- Lax AJ, Thomas W (2002) How could bacteria cause cancer: one step at a time. *Trends Microbiol* 10: 293-299
- Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D (2002) Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med* 248: 171-183
- Marshall BJ, Warren JR (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-1315
- Łaszewicz W (2004) Wyniki badań nad zakażeniem *Helicobacter pylori*. *Trans Humana - Wydawnictwo Uniwersyteckie, Białystok*
- Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H (2004) Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 9: 1-6
- Shajan P, Beglinger C (2007) *Helicobacter pylori* and gastric cancer: the causal relationship. *Digestion* 75: 25-35
- Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 19: 449-490
- Amieva MR, El-Omar EM (2008) Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 134: 306-323
- Ferreira AC, Isomoto H, Moriyama M, Fujioka T, Machado JC, Yamaka Y (2008) *Helicobacter* and gastric malignancies. *Helicobacter* 1: 28-34
- Vogelmann R, Amieva MR (2007) The role of bacterial pathogens in cancer. *Curr Opin Microbiol* 10: 76-81
- Rao VP, Poutahidis T, Ge Z, Nambiar PR, Boussahmain C, Wang YY, Horwitz BH, Fox JG, Erdman SE (2006) Innate immune inflammatory response against enteric bacteria *Helicobacter hepaticus* induces mammary adenocarcinoma in mice. *Cancer Res* 66: 7395-7400
- Pellicano R, Menard A, Rizzetto M, Megraud F (2008) *Helicobacter* species and liver diseases: association or causation? *Lancet Infect Dis* 8: 254-260
- Shukla VK, Singh H, Pandey M, Upadhyay SK, Nath G (2000) Carcinoma of the gallbladder - is it a sequel of typhoid? *Dig Dis Sci* 45: 900-903
- Lax AJ (2005) Bacterial toxins and cancer - a case to answer? *Nat Rev Microbiol* 3: 343-349
- Haghjoo E, Galan JE (2004) *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4614-4619
- World Health Organization.: Water-related diseases. Typhoid and paratyphoid enteric diseases. http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/typhoid/en (2005)
- Lecuit M, Abachin E, Martin A, Poyart C, Pochart P, Suarez F, Bengoufa D, Feuillard J, Lavergne A, Gordon JI, Berche P, Guillemin L, Lortholary O (2004) Immunoproliferative small intestinal disease associated with *Campylobacter jejuni*. *N Engl J Med* 350: 239-248
- Oswald E, Nougayrede JP, Taieb F, Sugai M (2005) Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr Opin Microbiol* 8: 83-91
- Anttila TI, Lehtinen T, Leinonen M, Bloigu A, Koskela P, Lehtinen M, Saikku P (1998) Serological evidence of an association between chlamydial infections and malignant lymphomas. *Br J Haematol* 103: 150-156
- Laurila AL, Anttila T, Läärä E, Bloigu A, Virtamo J, Albanes D, Leinonen M, Saikku P (1997) Serological evidence of an association between *Chlamydia pneumoniae* infection and lung cancer. *Int J Cancer* 74: 31-34
- You C, Ryu M, Huh J, Park JO, Kang H, Ahn H i inni (2005) Ocular adnexal lymphoma is highly associated with *Chlamydia psittaci*. *Eur J Cancer* 3: 982
- Bavoil PM, Hsia R, Ojcius DM (2000) Closing in on *Chlamydia* and its intracellular bag of tricks. *Microbiology* 146: 2723-2731
- Atickan S, Koksak D, Unsal E, Aksaray S, Berktaş B (2007) Association of chronic *Chlamydia pneumoniae* infection and the risk of lung cancer. *Turk Resp J* 8: 15-18
- Koskela P, Anttila T, Bjorge T, Brunsving A, Dillner J (2000) *Chlamydia trachomatis* infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 85: 35-39
- Huang S, Li J, Wu J, Meng L, Shou C (2001) Mycoplasma infections and different human carcinomas. *World J Gastroenterol* 7: 266-269
- Luperchio SA, Schauer DB (2001) Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes Infect* 3: 333-340
- Smith DGE, Lawson GHK (2001) *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. *Vet Microbiol* 82: 331-345
- Fiorentini C, Falzano L, Travaglione S, Fabbri A (2003) Hijacking Rho GTPases by protein toxins and apoptosis: molecular strategies of pathogenic bacteria. *Cell Death Differ* 10: 147-152
- Harmey D, Stenbeck G, Nobes CD, Lax AJ, Grigoriadis AE (2004) Regulation of osteoblast differentiation by *Pasteurella multocida* toxin (PMT): a role for Rho GTPase in bone formation. *J Bone Miner Res* 19: 661-670
- Rozengurt E, Higgins T, Chanter N, Lax AJ, Staddon JM (1990) *Pasteurella multocida* toxin: potent mitogen for cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 123-127
- Kitadokoro K, Kamitani S, Miyazawa M, Hanajima-Ozawa M, Fukui A, Miyake M, Hiriguchi Y (2007) Crystal structures reveal a thiol protease-like catalytic triad in the C-terminal region of *Pasteurella multocida* toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 5139-5144
- Pullinger GD, Lax AJ (2007) Histidine residues at the active site of *Pasteurella multocida* toxin. *The Op Biochem J* 1: 7-11
- Preuss I, Kurig B, Nürnberg B, Orth JH, Aktories K (2009) *Pasteurella multocida* toxin activates Gbetagamma dimers of heterotrimeric G proteins. *K Cell Signal* 21: 551-558
- Higgins TE, Murphy AC, Staddon JM, Lax AJ, Rozengurt E (1992) *Pasteurella multocida* toxin is a potent inducer of anchorage-independent cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4240-4244
- Aktories K, Barbieri JT (2005) Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol* 3: 397-410
- Vestweber D (2007) Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation through endothelial cell contacts. *Ernst Schering Found Symp Proc* 3: 151-167
- Travaglione S, Fabbri A, Fiorentini C (2008) The Rho-activating CNF1 toxin from pathogenic *E. coli*: a risk factor for human cancer development? *Inf Agents and Cancer* 3: 1-9
- Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjeno IM (2007) GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and function *in vivo*. *Bioessays* 29: 356-370
- Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF (2004) RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 355-366
- Malorni W, Fiorentini C (2006) Is the Rac GTPase-activating toxin CNF1 a smart hijacker of host cell fate? *FASEB J* 20: 606-609
- Giamboi Miraglia A, Travaglione S, Meschini S, Falzano L, Matarrese P, Quaranta MG, Viora M, Fiorentini C, Fabbri A (2007) Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis *via* the Akt/IkappaB kinase pathway: role of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *Mol Biol Cell* 18: 2735-2744
- Taieb F, Nougayrede JP, Watrin C, Samba-Louaka A, Oswald E (2006) *Escherichia coli* cyclomodulin Cif induces G2 arrest of the host cell cycle without activation of the DNA-damage checkpoint-sygnalling pathway. *Cell Microbiol* 8: 1910-1921

43. Spano S, Galan JE (2008) A novel pathway for exotoxin delivery by an intracellular pathogen. *Curr Opin Microbiol* 11: 15-20
44. Tejero ML, Galan JE (2000) A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science* 290: 354-357
45. Spano S, Ugalde JE, Galan JE (2008) Delivery of a *Salmonella Typhi* exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe* 3: 30-38
46. Guerra L, Carr HS, Richter-Dahlfors A, Masucci MG, Thelestam M, Frost JA, Frisan T (2008) A bacterial cytotoxin identifies the RhoA exchange factor Net1 as a key effector in the response to DNA damage. *PLoS ONE* 3: e2254
47. Schmidt A, Hall A (2002) The Rho Exchange Factor Net1 is regulated by nuclear sequestration. *J Biol Chem* 277: 14581-14588
48. Naumann M, Crabtree JE (2004) *Helicobacter pylori* epithelial cell signaling in gastric carcinogenesis. *Trends Microbiol* 12: 29-36
49. Ushijima T, Nakajima T, Maekita T (2006) DNA methylation as a marker for the past and future. *J Gastroenterol* 41: 401-407
50. Ushijima T (2007) Epigenetic field for cancerization. *J Biochem Mol Biol* 31: 142-150
51. Nakajima T, Enomoto S, Ushijima T (2008) DNA methylation: a marker for carcinogen exposure and cancer risk. *Environ Health Prev Med* 13: 8-15
52. Tang RX, Luo DJ, Sun AH, Yan J (2008) Diversity of *Helicobacter pylori* isolates in expression of antigens and induction of antibodies. *World J Gastroenterol* 14: 4816-4822
53. Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, Covacci A (2002) c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* 43: 971-980
54. Azuma T, Yamazaki S, Yamakawa A, Ohtani M, Muramatsu A, Suto H, Ito Y, Dojo M, Yamazaki Y, Kuriyama M, Keida Y, Higashi H, Hatakeyama M (2004) Association between diversity in the Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer. *J Inf Dis* 189: 820-827
55. Hatakeyama M (2008) SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 11: 30-37
56. Franke R, Muller M, Wundrack N, Gilles ED, Klamt S, Kahne T, Naumann M (2008) Host-pathogen systems biology: logical modelling of hepatocyte growth factor and *Helicobacter pylori* induced c-Met signal transduction. *BMC Syst Biol* 14: 2-4
57. Yokoyama K, Higashi H, Ishikawa S, Fujii Y, Kondo S, Kato H, Azuma T, Wada A, Hirayama T, Aburatani H, Hatakeyama M (2005) Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9661-9666
58. Zeaiter Z, Cohen D, Musch A, Bagnoli F, Covacci A, Stein M (2008) Analysis of detergent-resistant membranes of *Helicobacter pylori* infected adenocarcinoma cells reveals a role for MARK2/Par1b in CagA-mediated disruption of cellular polarity. *Cell Microbiol* 10: 781-794
59. Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, Higashi H, Musashi M, Iwabuchi K, Suzuki M, Yamada G, Azuma T, Hatakeyama M (2008) Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 1003-1008
60. Forsyth MH, Atherton JC, Blaser MJ, Cover TL (1998) Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun* 66: 3088-3094
61. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Pena S, Midolo P, Ng EK, Atherton JC, Blaser MJ, Quint WG (1998) Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* *vacA*. *J Clin Microbiol* 36: 2597-2603
62. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, Atherton JC (2007) A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 133: 926-936
63. Yamaoka Y, Kato M, Asaka M (2008) Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Inter Med* 47: 1077-1083
64. Letley DP, Rhead JL, Twells RJ, Dove B, Atherton JC (2003) Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 278: 26734-26741
65. Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burrioni D, Bugnoli M, Tecce MF, Censini S, Covacci A, Xiang Z (1994) Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* 179: 1653-1658
66. Sears CL (2001) The toxins of *Bacteroides fragilis*. *Toxicon* 39: 1737-1746
67. Wu S, Rhee K, Zhang M, Franco A, Sears CL (2007) *Bacteroides fragilis* toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and -secretase dependent E-cadherin cleavage. *J Cell Sci* 120: 1944-1952
68. Kim JM, Lee JY, Kim YJ (2008) Inhibition of apoptosis in *Bacteroides fragilis* enterotoxin-stimulated intestinal epithelial cells through the induction of c-IAP-2. *Eur J Immunol* 38: 2190-2199
69. Wu S, Powell J, Mathioudakis N, Kane S, Fernandez E, Sears CL (2004) *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces intestinal epithelial cell secretion of interleukin-8 through mitogen-activated protein kinases and a tyrosine kinase-regulated nuclear factor kappa B pathway. *Infect Immun* 72: 5832-5839
70. Bourzac KM, Guillemin K (2005) *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol* 7: 911-919

The influence of bacterial toxins on the carcinogenesis

Anna M. Stachowicz, Paweł Łaniewski, Elżbieta K. Jagusztyn-Krynicka

Department of Bacterial Genetics, Institute of Microbiology, Faculty of Biology, University of Warsaw, 1 Miecznikowa St., 02-096 Warsaw, Poland

e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

Key words: bacterial infections, bacterial toxins, cancerogenesis, Rho GTPases, signal transduction pathways

ABSTRACT

Bacterial infections may constitute an important risk factor of developing cancer disease. Molecular mechanisms by which bacteria contribute to cancer are extremely complex and still remain not fully understood. So far, it is generally accepted that *Helicobacter pylori* infections are associated with induction of gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma. Two *H. pylori* toxins which modulate many cellular functions are VacA and CagA. So far, CagA is the only one known bacterial oncoprotein. However, many other bacteria produce toxins or effector proteins perturbing host cell homeostasis or/and evoking chronic inflammation. Both processes may be associated with tumour formation. Bacterial toxins which interfere with various host signal transduction pathways, deregulate processes of cell division, proliferation and differentiation and modulate apoptosis. Some toxins cause even direct DNA damage. This review discuss the potential links between action of bacterial toxins and cancer.

Mechanizmy transportu nieorganicznych związków arsenu do komórek prokariotycznych i eukariotycznych

Paweł Lis¹

Ireneusz Litwin²

Ewa Maciaszczyk-Dziubińska^{2,✉}

¹Zakład Genetyki, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław
²Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Roślin, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

✉ Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Roślin, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, ul. Kanonia 6/8, 50-128 Wrocław, e-mail: ewa.maciaszczyk@biol.uni.wroc.pl

Artykuł otrzymano 14 sierpnia 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 22 grudnia 2009 r.

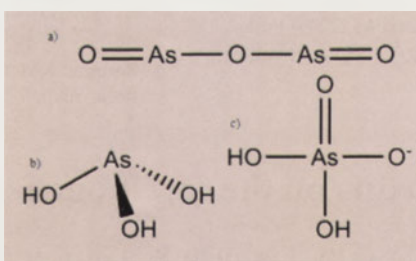
Słowa kluczowe: arsenin (As III), arsenian (As V), akwaporyny, akwagliceroporyny, permeazy heksozowe, transportery fosforanów

STRESZCZENIE

Wszystkie organizmy posiadają mechanizmy zapewniające oporność na związki arsenu obecne w środowisku. Procesy te są stosunkowo dobrze poznane u bakterii oraz drożdży, w mniejszym natomiast stopniu u zwierząt i roślin. Wciąż wiele kwestii dotyczących mechanizmów detoksykacji oraz systemów transportu arsenu nie zostało rozstrzygniętych, liczne obserwacje *in vitro* nie zostały potwierdzone doświadczalnie *in vivo*, a domniemane funkcje niektórych białkowych homologów nie zostały wykazane. Wyjaśnienie ich jest niezwykle istotne, ponieważ znajomość mechanizmów molekularnych, szczególnie systemów transportujących, może być przydatna m. in. w rozwiązywaniu problemów dotyczących zanieczyszczenia środowiska związkami arsenu i związanych z technologią usuwania zanieczyszczeń z gleby i wód podziemnych za pomocą roślin lub bakterii (tzw. bioremediacja). Może także zwiększyć skuteczność związków arsenu jako chemioterapeutyków stosowanych przeciwko pasożytom i białaczkom.

WPROWADZENIE

Arsen jest szeroko rozpowszechnionym pierwiastkiem amfoterycznym naturalnie występującym w środowisku. Pochodzi głównie ze źródeł geochemicznych – jest wprowadzany do biosfery poprzez wymywanie z formacji skalnych [1]. Innym jego źródłem są używane przez człowieka pestycydy, herbicydy oraz fungicydy [2-4]. Stosowany jest także w medycynie i przemyśle [4,5]. Jednak pomimo jego użyteczności, wywiera on szkodliwy wpływ na żywe organizmy. Długotrwała ekspozycja na arsen może powodować u ludzi wiele problemów zdrowotnych, takich jak: dermatozy, nieprawidłowości w działaniu układu immunologicznego, uszkodzenia układu nerwowego, nowotwory [6]. Związki arsenu mają także niekorzystne działanie na organizmy: zwierząt, roślin, grzybów oraz na bakterie. Toksyczność arsenu jest zależna od postaci, w jakiej zostanie on pobrany przez organizm [7]. W przyrodzie arsen występuje głównie na dwóch stopniach utlenienia: III i V, zwykle w postaci kwasów tlenowych: kwasu arsenowego(III) As_2O_3 (Ryc. 1a), zwanego też tritlenkiem arsenu, oraz kwasu arsenowego(V) H_3AsO_4 . W roztworach przy neutralnym pH As_2O_3 występuje w postaci $As(OH)_3$ (Ryc. 1b), natomiast H_3AsO_4 w postaci oksyanionu $H_2AsO_4^-$ (Ryc. 1c) [1,4].



Rycina 1. Formy nieorganicznego arsenu występujące w przyrodzie: a) kwas arsenowy(III) w postaci As_2O_3 , b) kwas arsenowy(III) w postaci $As(OH)_3$, c) kwas arsenowy(V) w postaci oksyanionu [1].

Toksyczność arseninu As(III) wynika z jego reaktywności jako jonu metalu, z czym związane są silne oddziaływania z grupami funkcyjnymi takimi jak grupa sulfhydrylowa w reszcie cysteiny, czy grupa azotowa w pierścieniu imidazolowym w reszcie histydyny [1]. Reszty cysteiny często biorą udział w tworzeniu miejsc aktywnych w białkach, więc reakcja As(III) z tymi grupami zwykle powoduje zahamowanie aktywności biologicznej tych białek [2]. U ssaków głównym efektem ostrego

zatrucia As(III) jest zmniejszenie produkcji koenzymu-A oraz zahamowanie cyklu Krebsa i metabolizmu pirogronianu. Konsekwencją zatrucia jest wyczerpanie wszystkich wewnątrzkomórkowych zapasów węglowodanów poprzez stymulację glikolizy i zahamowanie pobierania glukozy [7]. Innym toksycznym działaniem As(III) jest indukowanie powstawania reaktywnych form tlenu (np. rodniki tlenowe, rodniki hydroksylowe), które mogą przyczynić się do uszkodzeń DNA, a co za tym idzie, zapoczątkować apoptozę komórki lub powstanie komórki nowotworowej [8].

Szkodliwe działanie arsenianu As(V) jest związane z jego chemicznym podobieństwem do jonu fosforanowego [9]. Jony As(V) mogą być rozpoznawane przez transportery oraz enzymy jako jony fosforanowe. W związku z tym As(V) może zastępować fosforan w wielu procesach metabolicznych. Najczęściej arsenian jest substratem dla dehydrogenazy pirogronianowej, co w konsekwencji prowadzi do zablokowania oddychania komórkowego [10]. Arsenian zakłóca także fosforylację oksydacyjną poprzez formowanie niestabilnych estrów arsenianowych w miejsce ATP oraz stymuluje oddychanie mitochondrialne, co przyczynia się do wyczerpania ATP w komórce [7].

Powszechność występowania arsenu w środowisku spowodowała wykształcenie się mechanizmów oporności pozwalających na przetrwanie w obecności tego bardzo toksycznego pierwiastka. Mechanizmy oporności zostały znalezione zarówno u bakterii jak i pierwotniaków, grzybów, roślin i zwierząt [1,2].

Jony arseninowe As(III) są u wszystkich organizmów transportowane do komórki przez akwagliceroporyny, będące kanałami, których fizjologiczną funkcją jest import neutralnych organicznych roztworów np. glicerolu, mocznika [1,4,11]. U drożdży i ssaków zidentyfikowano także inną drogę transportu. Przy braku glukozy, permeazy heksozowe mogą uczestniczyć w pobieraniu jonów As(III) [12,13]. Jony arsenianowe As(V), ze względu na swoje podobieństwo do jonów fosforanowych, są pobierane do komórki za pomocą transporterów fosforanowych [1,4,9].

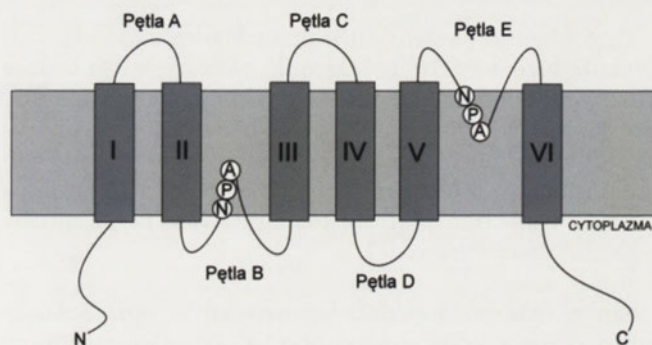
Podstawowym mechanizmem oporności, występującym zarówno u *Prokaryota* jak i *Eukaryota*, jest aktywne usuwanie arsenu z komórki [1,2,4,14]. Jony As(III) mogą być bezpośrednio po wnikięciu do komórki usuwane przez specyficzne dla niego transportery. W komórkach drożdży jony As(III) mogą być także magazynowane w wakuoli w postaci kompleksów z glutationem. Nie znaleziono natomiast transporterów odpowiedzialnych za wypływ As(V). Usuwanie go z komórki następuje dopiero po enzymatycznej redukcji do As(III). Wykształcenie reduktaz arsenianowych było więc istotnym krokiem w ewolucji mechanizmów oporności na arsen. Brak transporterów dla As(V) wynika najprawdopodobniej z faktu, iż pierwsze mechanizmy oporności na arsen wykształciły się w atmosferze beztlenowej, a więc o charakterze redukującym. W tym okresie dominującą formą arsenu występującą w środowisku był arsenin, więc tworzące się mechanizmy były specyficzne właśnie dla formy arsenu na trzecim stopniu utlenienia. Kiedy stężenie tlenu w atmosferze stawało się coraz wyższe, obecny w skorupie ziemskiej As(III) został w dużym stopniu utleniony do formy As(V). Wymusiło to na organizmach wykształcenie mechanizmów pozwalających na przeżycie w obecności pięciowartościowego arsenu. Dlaczego jednak w toku ewolucji nie wykształciły się transportery białkowe usuwające tę formę arsenu z komórki? Najprawdopodobniej łatwiejszą i szybszą drogą było wykształcenie reduktazy redukującej As(V) do As(III) i wykorzystanie istniejącego mechanizmu usuwania arseninu [1]. Wskazują na to doświadczenia polegające na konstrukcji mutantów reduktaz arsenianowych, które zaczynały wykazywać aktywność fosfatazy, tracąc

jednak aktywność reduktazy. Ta łatwość konwersji jednego enzymu w drugi sugeruje, iż reduktaza As(V) najprawdopodobniej wyewoluowała właśnie z fosfataz [14]. As(V) może ulegać także nieenzymatycznej redukcji do As(III), jednak zjawisko to jest zbyt powolne, aby mieć fizjologiczne znaczenie [15].

Istotną drogą metabolizowania nieorganicznego arsenu jest także metylacja jego związków. Reakcja taka może zachodzić zarówno u bakterii, jak i u zwierząt [16-18]. W biometylacji arsenu biorą udział reduktaza As(V) [19] i As(III)-metylotransferaza [20]. Metylowane związki arsenu pięciowartościowego, kwas metyloarsenowy(V) (MAs^V) i kwas dimetyloarsenowy(V) (DMAs^V), wykazują mniejszą toksyczność aniżeli nieorganiczna forma arsenu As(V) [16,17]. Inaczej jednak jest w przypadku As(III), którego metylowane związki: kwas metyloarsenowy(III) (MAs^{III}) oraz kwas dimetyloarsenowy(III) (DMAs^{III}) są *in vivo* bardziej toksyczne niż forma nieorganiczna As(III), co za tym idzie biometylacja arsenu nie zawsze może zostać nazwana detoksykacją [16].

AKWAGLICEROPORYNY – WROTA WNIKANIA JONÓW ARSENINOWYCH DO KOMÓREK WSZYSTKICH ORGANIZMÓW

Akwaporyny są rodziną małych (24-30 kDa) integralnych białek błonowych, której inną nazwą jest rodzina MIP (ang. *major intrinsic protein*). Akwaporyny są specyficznymi białkami tworzącymi pory przepuszczalne dla wody, jednakże nieprzepuszczalne dla protonów. Homologi akwaporyn zostały zidentyfikowane praktycznie u wszystkich badanych organizmów od *Archea* do ssaków. Wyjątkową grupą należącą do białek MIP są akwagliceroporyny. Białka te, poza przepuszczalnością wody, pozwalają na transport niektórych, obojętnych cząsteczek, które są w niej rozpuszczone. Najczęściej jest to glicerol, jednak możliwy jest także transport amoniaku czy dwutlenku węgla. Uważa się, iż wszystkie akwaporyny tworzą homotetramery, w których każdy (samodzielnie także funkcjonalny) monomer tworzy jeden kanał. Każde monomeryczne białko składa się sześciu transbłonowych helis (I-VI) połączonych pięcioma pętlami (A-E) (Ryc. 2). Fragment N-końcowy białka związany jest z funkcjami takimi jak: lokalizacja w błonie i formowanie poru, natomiast fragment C-końcowy determinuje specy-



Rycina 2. Schemat budowy akwaporyny. W jej skład wchodzi sześć domen transbłonowych (I-VI) połączonych pięcioma pętlami (A-E). Pętla B i E, zawierające zachowane w ewolucji motywy reszt aminokwasowych NPA, tworzą krótkie odcki w postaci helis częściowo wpuklające się w błonę [na podstawie 22].

ficzność substratową (głównie VI domena transbłonowa). W każdej podjednostce znajdują się dwa tandemowe powtórzenia, odwrócone względem siebie o 180°. W pętlach B oraz E znajduje się zachowany w ewolucji motyw NPA (reszty: asparaginy – proliny – alaniny), dzięki któremu przepuszczalne dla wody pory są nieprzepuszczalne dla protonów. W sekwencjach niektórych organizmów, jedna z reszt aminokwasowych motywu NPA może być zamieniona na inny, nie zmienia to jednak funkcji białka [21].

BAKTERYJNE AKWAGLICEROPORYNY TRANSPORTUJĄCE ARSEN

U bakterii *Escherichia coli* za transport jonów As(III) do komórki odpowiedzialne jest należące do akwagliceroporyn białko GlpF [1]. Glicerol jest u tej bakterii transportowany najpierw przez błonę zewnętrzną za pomocą niewybiórczych porów, a następnie przez błonę wewnętrzną za pomocą akwagliceroporyny GlpF. Można wnioskować, iż jony arseninowe korzystają z tej samej drogi. Białko GlpF, jak każda akwagliceroporyna występuje w błonie w postaci homotetramerów, tworzy por długości 28 Å, posiada zachowany w ewolucji, występujący u wszystkich akwagliceroporyn, motyw Asn-Pro-Ala (NPA) [22]

U bakterii *Sinorhizobium meliloti* wykazano obecność genu *AqpS*, wchodzącego w skład operonu *ars* (kodującego białka systemu detoksykacji arsenowej), kodującego domniemaną akwagliceroporynę. Przypuszcza się, iż białko to umożliwia usuwanie jonów arseninowych powstałych z redukcji pobranego wcześniej arsenu pięciowartościowego. Zjawisko to występuje tylko przy wyższych wewnątrzkomórkowych, niż zewnątrzkomórkowych stężeniach trójwartościowego arsenu. Sugeruje to, że transport As(III) przez *AqpS* zachodzi tylko zgodnie z gradientem stężeń, co z kolei implikuje możliwość transportu dwukierunkowego. Należy zatem wnioskować, że w wysokich stężeniach arseninu w środowisku, akwagliceroporyna *AqpS* może brać udział w jego transporcie przez błonę komórkową do wnętrza komórki. Specyficzność tego kanału jest nadal badana, gdyż pomimo jego podobieństwa do akwagliceroporyny GlpF u *E. coli* oraz akwagliceroporyn eukariotycznych, w jego strukturze brak jest dwóch zewnątrzkomórkowych domen odpowiedzialnych za wiązanie glicerolu [23].

AKWAGLICEROPORYNY DROŻDŻY

Za pobieranie jonów As(III) przez komórki drożdży odpowiada białko *Fps1p*, należące do rodziny MIP i będące drożdżowym homologiem bakteryjnej akwagliceroporyny GlpF [11]. Fizjologiczną funkcją tego białka jest utrzymywanie odpowiedniego wewnątrzkomórkowego stężenia glicerolu (poprzez umożliwianie jego wypływu z komórki), a jego aktywność transportowa jest regulowana przez zmiany ciśnienia osmotycznego [7].

Istnieje najprawdopodobniej mechanizm ograniczający transport metaloidów do komórki za pomocą transportera *Fps1p*. Obecność w środowisku jonów arseninowych powoduje znaczne zmniejszenie aktywności tego białka. Za ten mechanizm regulacji odpowiedzialna jest kinaza *Hog1p*. Kinaza ta należy do grupy kinaz MAP (ang. *mitogen activa-*

ted protein). W odpowiedzi na obecność arseninu, jest ona aktywowana przez fosforylację, katalizowaną przez kinazy *Ssk1p* i *Pbs2p*. Aktywna kinaza *Hog1p* może regulować intensywność transportu przez *Fps1p* poprzez fosforylację tego białka [24].

Drugą akwagliceroporyną prawdopodobnie występującą w komórkach drożdży *S. cerevisiae*, która mogłaby być potencjalnym transporterem dla jonów arseninowych jest *Yfl054p*. Funkcja tego białka pozostaje nieznana, a komórki z delecją genu *YFL054* nie wykazywały zwiększonej oporności na arsen, co sugeruje brak zaangażowania tego białka w transport jonów arseninowych [7,25].

AKWAGLICEROPORYNY ZIDENTYFIKOWANE W KOMÓRKACH PIERWOTNIAKÓW

U pasożytniczych pierwotniaków zostały zidentyfikowane geny prawdopodobnie kodujące akwagliceroporyny. Są to geny *TgAQP* u *Toxoplasma gondii* oraz *PfAQP* u *Plasmodium falciparum*, a także *LtAQP1* u *Leishmania terentolae* oraz *LmAQP1* u *Leishmania major*. Białka kodowane przez te geny wykazują wysokie podobieństwo do akwagliceroporyn innych eukariotów. Przypuszcza się, że katalizują transport jonów arseninowych do komórki. Kwestia identyfikacji mechanizmów transportu u pierwotniaków pasożytniczych jest istotna ze względu na stosowanie leków zawierających arsen lub antymon (także transportowany przez białka transportujące arsenin) w terapii chorób powodowanych przez pierwotniaki. Wykazano, iż w trakcie leczenia pojawia się zjawisko oporności zmniejszające jego skuteczność. Zmiany te mogą być związane z ograniczaniem ekspresji genów kodujących akwagliceroporyny, a tym samym zmniejszaniem ilości arsenu dostającego się do komórek. [26-28]

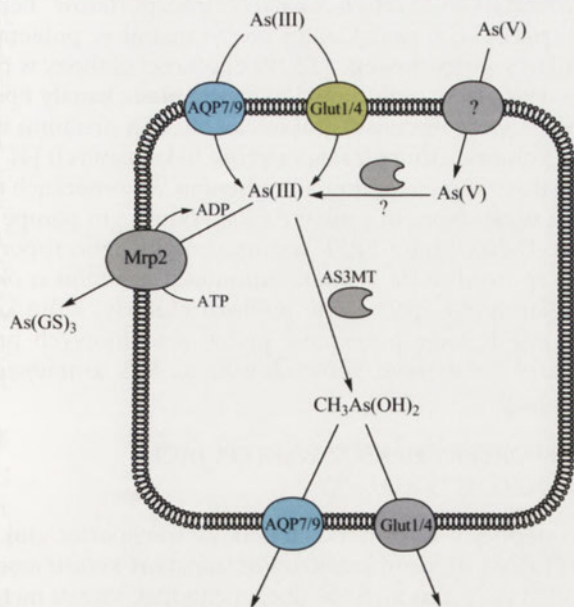
AKWAGLICEROPORYNY WYSTĘPUJĄCE W KOMÓRKACH SSAKÓW I CZŁOWIEKA

Jony arseninowe, tak jak w przypadku innych organizmów, są u ssaków transportowane do wnętrza komórek przez akwagliceroporyny [1] (Ryc. 3). Wykorzystanie tej drogi sugerują wyniki badań dowodzących, iż niektóre akwagliceroporyny ssaków biorą udział w akumulacji

Tabela 1. Występowanie akwagliceroporyn AQP3, 7, 9, 10, które mogą uczestniczyć w transporcie arseninu w tkankach ssaków [na podstawie 24].

	AQP3	AQP7	AQP9	AQP10
Mózg	+	-	-	-
Oczy	+	-	-	-
Ślinianki	+	-	-	-
Tchawica	+	+	-	-
Płuca	-	-	-	-
Serce	+	+	-	-
Wątroba	+	-	+	-
Trzustka	-	-	-	-
Śledziona	+	-	+	-
Przewód pokarmowy	+	+	-	+
Nerki	+	+	-	-
Jądra	-	++	+	-
Jajniki	+	+	+	-
Mięśnie prążkowane	-	-	-	-
Leukocyty	-	-	+	-
Erytrocyty	+	-	-	-

(++/+ obecność, - brak)



Rycina 3. Schemat komórki ssaków przedstawiający mechanizmy wnikania związków arsenu oraz jego detoksykacji. Arsenin wnika do komórki dzięki obecności akwagliceroporyn (AQP7/9), a w przypadku braku glukozy także dzięki działaniu permeaz heksozowych (Glut1/4). Arsenian wnika najprawdopodobniej dzięki obecności transporterów dla fosforanów, po czym jest redukowany do arseninu. As(III) jest usuwany z komórki przez transporter Mrp2 lub może zostać poddany metylacji i następnie przetransportowany do środowiska przez AQP7/9 i/lub Glut1/4.

jonów trójwartościowych metali [29] (Tab. 1). Akwagliceroporyny AQP9 oraz w mniejszym stopniu AQP7, transportują arsen najprawdopodobniej w postaci $As(OH)_3$ [1]. Mogą też uczestniczyć w transporcie kwasu metyloarsenowego(III), a białko AQP9 przeprowadza translokację MAs^{III} w większym nawet stopniu, niż nieorganiczny arsenin [30]. Dla akwaporyny AQP9 wyniki te zostały ostatnio potwierdzone w badaniach przeprowadzonych na modelu mysim [31].

Znajomość białek odpowiadających za ten mechanizm może mieć duże znaczenie w ochronie zdrowia człowieka. Bezwodnik kwasu arsenowego(III) (Trisenox[®]) jest chemioterapeutykiem używanym w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej [32], a skuteczność terapii może być u poszczególnych pacjentów inna właśnie z powodu różnic w stopniu ekspresji genów AQP7 i AQP9 [1]. Zmienność stopnia ekspresji tych genów może być także wynikiem indywidualnie zróżnicowanej oporności na arsen u ludzi żyjących na terenach, na których woda pitna jest w znacznym stopniu skażona związkami arsenu (Indie, Bangladesz) [33]. Badania odpornej na arsen linii komórek, w której ekspresja genu AQP3 była znacząco zmniejszona, sugerują, iż akwagliceroporyna AQP3 także może brać udział w akumulacji arsenu do komórek zwierząt [34].

Białka AQP3, AQP7 oraz AQP9 są trzema z trzynastu występujących u ludzi akwaporyn/akwagliceroporyn. Akwaporyny AQP0, 1, 2, 4, 5, 6, 8 umożliwiają przepływ wyłącznie wody, natomiast AQP3, 7, 9, 10 są akwagliceroporynami. Trzecią, najpóźniej odkrytą, grupą akwaporyn człowieka są superakwaporyny – AQP11 i AQP12. Ich funkcja nie została jak do tej pory poznana [35]. Ostatnie badania prowadzone na danio przegowanym *Danio rerio*,

potwierdzają udział homologów akwagliceroporyn: AQP3, AQP9 oraz AQP10 w pobieraniu jonów arseninowych [36].

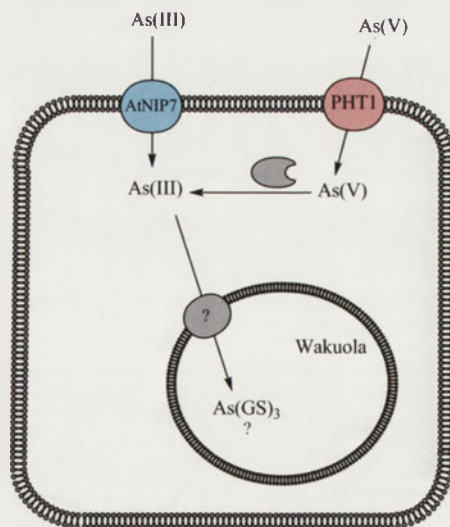
AKWAGLICEROPORYNY ROŚLIN

Akwagliceroporyny roślin sklasyfikowane zostały w cztery rodziny: PIP (ang. *plasma membrane intrinsic proteins*), TIP (ang. *tonoplast intrinsic proteins*), SIP (ang. *small basic intrinsic proteins*) oraz NIP (ang. *nodulin26-like intrinsic proteins*). Wydaje się, że u roślin arsen trójwartościowy pobierany jest przez komórki wyłącznie za pomocą transporterów należących do rodziny NIP [37] (Ryc. 4).

Badania sugerują, że akwagliceroporyna AtNIP7;1 bierze udział w transporcie jonów arseninowych u *Arabidopsis thaliana*. Zaburzenie funkcji białka AtNIP7;1 powoduje wzrost tolerancji na As(III) oraz zwiększenie całkowitej ilości zakumulowanego arsenu. Heterologiczna ekspresja genu *AtNIP7;1* w komórkach drożdży powoduje zwiększenie wrażliwości na As(III). Równocześnie w szczepie drożdży – mutancie delecyjnym genu *ACR3 (acr3Δ)* z wprowadzonym genem *AtNIP7;1* obserwowano wzrost oporności na As(V), co sugeruje możliwość występowania dwukierunkowego transportu arsenu tym kanałem [38].

Inne badania wykorzystujące heterologiczną ekspresję obcych genów w komórkach drożdży, wykazały udział kolejnych białek NIP w pobieraniu arsenu u roślin. Jak się okazało, białka AtNIP5;1 oraz AtNIP6 z *Arabidopsis thaliana*, OsNIP2;1 i OsNIP3;2 z *Oryza sativa*, LjNIP5;1 i LjNIP6;1 z *Lotus japonicus* są dwukierunkowymi kanałami dla As(III). Białka AtNIP7;1 oraz OsNIP2;2 wykazywały transport arsenu tylko do komórki [39].

Kamiya i wsp. stosując heterologiczną ekspresję genów *Arabidopsis thaliana* w oocytach *Xenopus laevis*, sugerują



Rycina 4. Schemat komórki roślinnej na przykładzie *Arabidopsis thaliana* przedstawiający mechanizmy wnikania związków arsenu oraz jego detoksykacji. Arsenin pobierany jest dzięki obecności akwagliceroporyn np. AtNIP7, natomiast arsenian dzięki działaniu transporterów dla fosforanów (PHT1) po czym następuje jego redukcja do arseninu przez niezidentyfikowaną dotąd reduktazę. Uważa się, że większość związków arsenu odkładana jest w wakuoli jako kompleksy z glutationem [58].

także udział białek AtNIP1;1 oraz AtNIP1;2 w pobieraniu jonów arseninowych [40], wynik ten jest jednak sprzeczny z wynikami wcześniejszych badań [39]. Powyższe badania wskazują, iż wszystkie akwagliceroporyny z rodziny NIP mogą brać udział w transporcie As(III), jednak wydajność tego procesu zależy głównie od izoformy białka i stopnia jego syntezy, na który silny wpływ ma rodzaj tkanki, w której dany transporter powstaje [37].

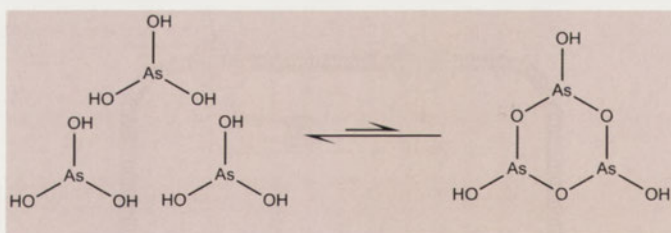
As(III) jest główną formą w jakiej arsen jest akumulowany przez organy roślinne. U większości roślin tylko niewielka ilość arseninu jest transportowana z korzenia do pędu, jednakże u roślin nazywanych hiperakumulatorami (np. *Holcus lanatus*, *Cytisus striatus*) ilość ta sięga 60–80%. Podejrzewa się, że transport jonów arseninowych między korzeniem a komórkami pędu odbywa się przez akwagliceroporyny [41]. Poznanie tego mechanizmu jest niezwykle ważne w kontekście skonstruowania organizmu roślinnego, który mógłby być zastosowany w procesie bioremediacji.

PERMEAZY HEKSOZOWE – ALTERNATYWNA DROGA WNIKANIA AS(III) DO KOMÓREK DROŻDŻY I SSAKÓW

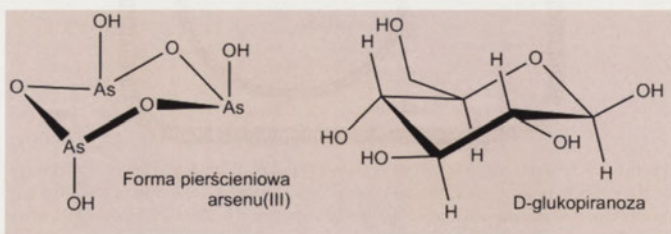
Oprócz akwagliceroporyn, również permeazy heksozowe pośredniczą w transporcie trójwartościowego arsenu. Mechanizm ten wykryto jednak tylko u drożdży oraz ssaków [12]. Zdolność permeaz heksozowych do transportowania arseninu wynika najprawdopodobniej z faktu, że produktem spontanicznej polimeryzacji trzech cząsteczek As(OH)₃ jest związek o budowie pierścieniowej, podobnej do struktury heksozy (Ryc. 5 i 6) [12].

PERMEAZY HEKSOZOWE DROŻDŻY

Wyniki badań wskazują, że brak glukozy w podłożu skutkuje transportem arseninu do komórek drożdży za pomocą permeaz heksozowych (Ryc. 7). Większość spośród



Rycina 5. Spontaniczna polimeryzacja trzech cząsteczek As(OH)₃ prawdopodobnie prowadzi do powstania formy pierścieniowej.

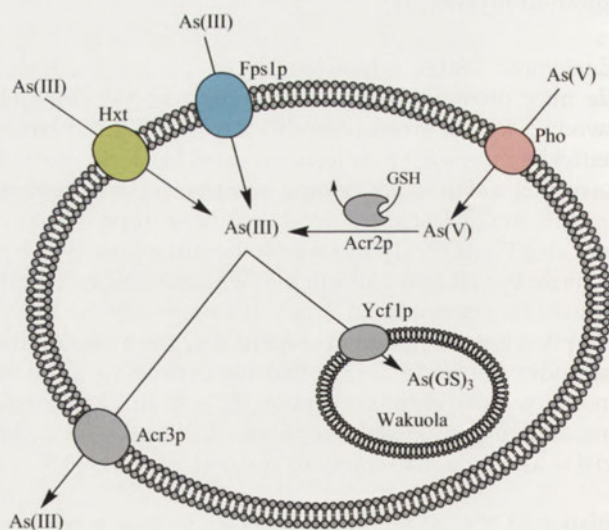


Rycina 6. Podobieństwo strukturalne formy pierścieniowej tworzonej przez arsen trójwartościowy oraz pierścienia D-glukopiranozy, prawdopodobnie umożliwia transport As(III) permeazami heksozowymi.

18 zidentyfikowanych u drożdży transporterów heksoz (HXT1p–HXT17p oraz Gal2p) bierze udział w pobieraniu arsenu trójwartościowego [42]. W obecności glukozy w podłożu większość arseninu pobierana jest przez kanały Fps1p, jednakże w nieobecności glukozy około 75% arseninu wnika do komórki drogą transporterów heksozowych [4]. Badano także stopień akumulacji arseninu w komórkach mutantów z uszkodzonym genem *ACR3*, kodującym pompę dla As(III). Delecja genu *FPS1* kodującego akwagliceroporynę Fps1p spowodowała spadek akumulacji arseninu o około 25%. Natomiast obecność w podłożu glukozy, która kompetycyjnie hamuje pobieranie jonów arseninowych przez permeazy heksozowe, spowodowała aż 80% zmniejszenie akumulacji.

TRANSPORTERY HEKSOZ WYSTĘPUJĄCE W KOMÓRKACH SSAKÓW

Występujący w komórkach ssaków transporter glukozy GLUT1 (Ryc. 3) może katalizować transport kwasu arsenowego(III) oraz jego metylowanej pochodnej, kwasu metyloarsenowego(III), do komórki. Badania aktywności tego białka prowadzone były z wykorzystaniem heterologicznej ekspresji w drożdżach oraz żabich oocytach. Obecność kwasu metyloarsenowego(III) nie hamuje w sposób kompetycyjny transportu glukozy, co sugeruje istnienie pewnych różnic w mechanizmie pobierania heksoz i związków arsenu przez GLUT1. Transporter ten katalizuje także transport kwasu arsenowego(III) oraz kwasu metyloarsenowego(III) zarówno w oocytach człowieka, jak i szczura. Z badań tych wynika, iż transporter GLUT1 może być jedną z głównych dróg pobierania zarówno nieorganicznych, jak i zmetylowanych związków arsenu przez eryocyty i komórki nabłonkowe naczyń krwionośnych, przyczyniając się do nieprawidłowości w układzie krążenia oraz neurotoksyczności związanej z obecnością arsenu [13].



Rycina 7. Schemat komórki drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* przedstawiający mechanizmy wnikania związków arsenu oraz jego detoksykacji. Arsenin pobierany jest do komórki głównie dzięki obecności akwagliceroporyny Fps1 natomiast w sytuacji braku glukozy w środowisku także dzięki działaniu permeaz heksozowych (Hxt). Arsenian wnika natomiast dzięki działaniu transporterów fosforanowych (Pho84, 87, 88). W komórce reduktaza Acr2 redukuje arsenian do arseninu, który usuwany jest do środowiska głównie przez transporter Acr3 lub odkładany jest w wakuoli jako kompleks z glutationem przy udziale transportera Ycf1.

W ostatnich badaniach wykazano także, iż transportery GLUT4 szczura oraz człowieka mogą katalizować pobieranie arseninu oraz kwasu monometyloarsenowego(III) [13]. Jako, że ani akwagliceroporyna AQP9, ani transporter GLUT1 nie zostały wykryte metodą Western-Blot w kardiomiocytach dorosłych organizmów, pobieranie nieorganicznego oraz metylowanego As(III) przez komórki serca najprawdopodobniej katalizuje transporter GLUT4. Może to być przyczyną chorób serca wynikających z zatrucia arsenem [43].

OKSYANIONY ARSENU PIĘCIOWARTOŚCIOWEGO – ANALOGI JONÓW FOSFORANOWYCH

BAKTERYJNE TRANSPORTERY FOSFORANÓW

U bakterii *E. coli* występują dwa główne systemy transportu jonów fosforanowych (Ryc. 8). Pierwszy z nich, operon Pst, jest częścią regulonu Pho. Podlega indukcji bardzo niskim stężeniem fosforu nieorganicznego (Pi). System ten, złożony z kompleksu ABC tworzonych przez białka PstA, PstB, PstC i PhoS, wykazuje wysokie powinowactwo do jonów fosforanowych [44]. Drugi z systemów – Pit, wykazujący niskie powinowactwo do fosforanu, jest główną drogą pobierania Pi, kiedy jego stężenie w środowisku jest wysokie. Do niedawna uznawano, iż jest on konstytutywnie ekspresjonowany [45], jednakże najnowsze badania wskazują, że jego ekspresja jest modyfikowana przez zmiany stężenia jonów fosforanowych oraz cynkowych (które także są pobierane przy pomocy tego transportera) [46]. Początkowo przypuszczano, że transport jonów arsenianowych do komórki może być w komórkach tej bakterii katalizowany przez oba rodzaje transporterów fosforanowych – Pit i Pst. Uważano także, że transporter Pit w większym stopniu niż Pst odpowiada za transport As(V) [3]. Ostatnie jednak ba-

daniami wskazują, że to właśnie system Pst, jest w większym stopniu zaangażowany w pobieranie arsenianu [47].

TRANSPORTERY JONÓW FOSFORANOWYCH DROŻDŻY

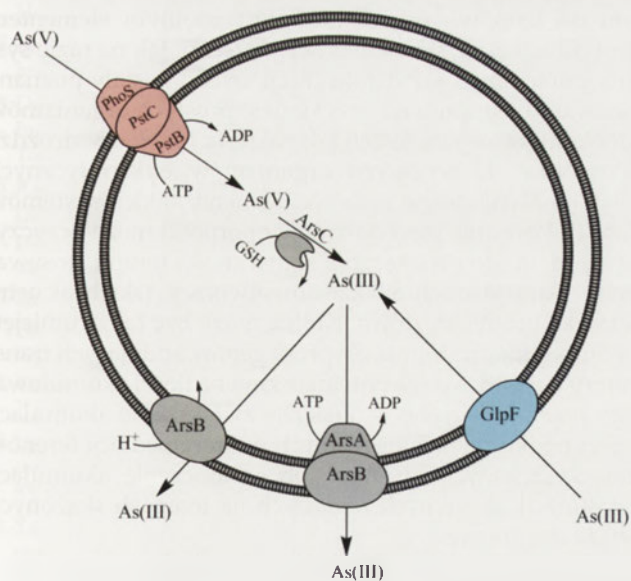
Komórki drożdży *S. cerevisiae* posiadają co najmniej pięć transporterów katalizujących pobieranie jonów fosforanowych (Ryc. 7). I tak są to: Pho84p i Pho89p o wysokim powinowactwie do Pi [48], oraz Pho87p, Pho90p, Pho91p o niskim powinowactwie [49]. Ekspresja genów *PHO84* oraz *PHO89* kodujących transportery o wysokim powinowactwie jest represjonowana, kiedy w środowisku stężenie jonów fosforanowych jest wysokie [50]. Jony As(V) są w komórkach drożdży najprawdopodobniej pobierane za pomocą transportera Pho84p. Wnioski takie wysunięto na podstawie wyników doświadczeń, w których mutanty z uszkodzonym jednym z genów: *PHO84*, *PHO86*, *PHO87*, *PHO88*, kodujących białka wchodzące w skład kompleksu transportującego jony fosforanowe, wykazywały zwiększoną tolerancję na jony arsenianowe [7,9].

TRANSPORTERY FOSFORANOWE ZIDENTYFIKOWANE U SSAKÓW

Przypuszcza się, że jony arsenianowe pobierane są przez komórki ssaków tą samą drogą jak u drożdży, za pomocą transporterów fosforanowych (Ryc. 3). Jednak nie zostało to dotąd udowodnione [1]. Potencjalną drogą wnikania As(V) do komórek u człowieka mogą być zależne od sodu kotransportery fosforanów. W zależności od tkanki, w której występują, systemu regulacji oraz różnic strukturalnych można je podzielić na trzy grupy. Do grup I oraz II należą transportery białkowe syntetyzowane głównie w komórkach nerek i nabłonku jelitowym. W skład grupy I wchodzi białka: NaPi-1, RNapi-1 oraz NPT-1, a ich fizjologiczna rola nie została dotąd wyjaśniona. Transportery grupy II: NaPi-2, NaPi-3, NaPi-4, NaPi-5, NaPi-6 oraz NaPi-7 pełnią kluczową rolę w pobieraniu jonów fosforanowych w komórkach nerek i jelita. To z kolei jest istotne dla utrzymania odpowiedniego stężenia Pi w osoczu. Niedawno odkryte transportery Pit-1 oraz Pit-2 należą do grupy III [51]. Jak dotąd nie wykazano jednak udziału któregośkolwiek z tych transporterów w pobieraniu jonów arsenianowych u ludzi.

ROŚLINNE TRANSPORTERY FOSFORANOWE

Na podstawie badań przeprowadzonych na kłosońce wełnistej *Holcus lanatus* stwierdzono, że komórki korzeni pobierają jony arsenianowe poprzez transportery jonów fosforanowych [52] (Ryc. 4). Rośliny odporne na arsen wykazują znacznie mniejszy stopień pobierania, zarówno jonów arsenianowych, jak i fosforanowych, niż rośliny o niskiej tolerancji na arsen [53]. Inne badania sugerują, iż tolerancja na arsenian u *Holcus lanatus* wymaga zarówno konstytutywnej represji systemu transportowego, jak i zwiększonej produkcji fitochelatyn, które jak się sugeruje, także uczestniczą w detoksykacji [54]. Potwierdzeniem badań wskazujących na udział transporterów fosforanowych w pobieraniu jonów arsenianowych jest identyfikacja opornego na As(V) mutantu *Arabidopsis thaliana* pht1;1-3, posiadającego mutację w genie kodującym transporter Pht1p, który jest transporterem o wysokim powinowactwie do jonów fosforanowych. Mutant pht1;1-3 wykazu-



Rycina 8. Schemat komórki bakterii *E. coli* przedstawiający mechanizmy wnikania arsenu oraz jego detoksykacji. Arsenin jest transportowany do komórki dzięki działaniu akwagliceroporyny GlpF. Arsenian natomiast dostaje się do komórki dzięki obecności transportera dla jonów fosforanowych (kompleks PhoS, PstC, PstB), a następnie jest redukowany do arseninu przez reduktazę arsenianową ArsC. Arsenin jest następnie usuwany z wnętrza komórki dzięki działaniu transportera ArsB (wykorzystującego siłę protomotoryczną) lub poprzez kompleks ArsB/ArsA (czerpiący energię z hydrolizy ATP).

Tabela 2. Podział transporterów zaangażowanych w pobieranie arsenu ze względu na: formę transportowanego arsenu, rodzinę transporterów oraz organizm, w którym występuje.

Postać pobieranego arsenu	Grupa transporterów	Nazwa transportera	Organizm posiadający dany transporter		
arsenin As(III)	akwagliceroporyny	GlpF	<i>Escherichia coli</i>	Prokaryota	
		AqpS	<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
		LmAQP1	<i>Leishmania major</i>		
		LtAQP1	<i>Leishmania terentolae</i>		
		PfAQP	<i>Plasmodium falciparum</i>		
		TgAQP	<i>Toxoplasma gondii</i>		
		Fps1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
		AtNIP1;1	<i>Arabidopsis thaliana</i>		Eukaryota
		AtNIP1;2			
		AtNIP5;1			
	AtNIP6				
	AtNIP7;1				
	OsNIP2;1	<i>Oryza sativa</i>	Eukaryota		
	OsNIP2;2				
	OsNIP3;2				
	LjNIP5;1	<i>Lotus japonicus</i>	Eukaryota		
	LjNIP6;1				
	hAQP3	<i>Homo sapiens</i>	Eukaryota		
	hAQP7				
	hAQP9				
Hxt1-Hxt17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Eukaryota			
Gal2					
GLUT1	<i>Homo sapiens</i>	Eukaryota			
GLUT4					
arsenian As(V)	transportery jonów fosforanowych	Pit	<i>Escherichia coli</i>	Prokaryota	
		Pst	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Eukaryota	
		Pho84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Eukaryota	
		PHT1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Eukaryota	

je zmniejszone tempo pobierania As(V), co prowadzi do dwukrotnego, w stosunku do osobników dzikich, zwiększenia ilości zakumulowanego arsenu. Nadprodukcja zmutowanego białka w roślinach typu dzikiego powoduje podobne efekty. Dodatkowo obecność As(V) hamuje odpowiedź na brak fosforanu w podłożu, równocześnie aktywując inne geny potencjalnie zaangażowane w zwiększenie tolerancji na As(V), sugerując istnienie wzajemnego wpływu systemu oporności na As(V) oraz transportu Pi. Mutant *phf1;1-3* pomimo zmniejszonego pobierania As(V), równocześnie wykazuje zdolność do zwiększonej jego akumulacji. Wyjaśnieniem tego paradoksu może być obniżenie ilości As(V) w cytoplazmie, co pozwala na wydajniejsze funkcjonowanie systemu detoksykacji, związanego z redukcją As(V) do As(III) oraz jego akumulacją w wakuoli [55]. Inne badania wykazały, że mutacja w genie *PHF1* kodującym białko odpowiedzialne za prawidłową lokalizację transporterów fosforanowych w błonie komórkowej, także powoduje zwiększoną tolerancję na As(V) [56].

Dodatkowym czynnikiem, który może mieć wpływ na efektywność pobierania arsenu w środowisku wodnym, jest stężenie jonów żelaza. Stwierdzono zjawisko adsorpcji jonów As(V) do złóż żelazowych tworzących się na powierzchni rośliny. Zwiększone stężenie fosforanu w wodzie może powodować desorpcję As(V) ze złóż żelaza na powierzchni rośliny, co z kolei prowadzi do zmniejszonego wnikania arsenu do komórek [57].

PODSUMOWANIE

Poznanie mechanizmów molekularnych wnikania arsenu do komórek organizmów jest istotnym elementem identyfikacji zjawiska detoksykacji arsenu. Jak na razie systemy pobierania oraz detoksykacji arsenu zostały poznane w znacznym stopniu na przykładzie prostych organizmów jednokomórkowych, takich jak bakteria *E. coli* czy drożdże *S. cerevisiae*. U wyższych organizmów eukariotycznych wciąż identyfikowane są nowe elementy takich systemów (Tab. 2). Poznanie mechanizmów oporności może przyczynić się m. in. do zwiększenia skuteczności terapii stosowanych w pasożytach, a także nowotworach, takich jak ostra białaczka promielocytowa. Istotną może być także umiejętność modyfikacji stopnia ekspresji genów kodujących transportery u roślin, a co za tym idzie zmiana ilości akumulowanego przez nie arsenu – znaczne zwiększenie akumulacji w przypadku roślin stosowanych w fitoremediacji terenów zanieczyszczonych arsenem lub ograniczenie akumulacji w roślinach uprawnych rosnących na terenach skażonych związkami arsenu.

PIŚMIENNICTWO

- Rosen BP (2002) Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett* 529: 86-92
- Rosen BP (2002) Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133: 689-693

3. Willsky GR, Malamy MH (1980) Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 144: 356-365
4. Rosen BP, Liu Z (2009) Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. *Environ Int* 35: 512-515
5. Duker AA, Carranza EJ, Hale M (2005) Arsenic geochemistry and health. *Environ Int* 31: 631-641
6. Rodríguez VM, Jiménez-Capdeville ME, Giordano M (2003) The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicol Lett* 145: 1-18
7. Tamás MJ, Wysocki R (2001) Mechanisms involved in metalloid transport and tolerance acquisition. *Curr Genet* 40: 2-12
8. Liu SX, Athar M, Lippai I, Waldren C, Hei TK (2001) Induction of oxy-doradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1643-1648
9. Bun-ya M, Shikata K, Nakade S, Yompakdee C, Harashima S, Oshima Y (1996) Two new genes, PHO86 and PHO87, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 29: 344-351
10. Szinicz L, Forth W (1988) Effect of As₂O₃ on gluconeogenesis. *Arch Toxicol* 61: 444-476
11. Wysocki R, Chery CC, Wawrzycka D, Van Hulle M, Cornelis R, Thevelein JM, Tamás MJ (2001) The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 40: 1391-401
12. Liu Z, Boles E, Rosen BP (2004) Arsenic trioxide uptake by hexose permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279: 17312-17318
13. Liu Z, Sanchez MA, Jiang X, Boles E, Landfear SM, Rosen BP (2006) Mammalian glucose permease GLUT1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 424-30
14. Rosen BP (1999) Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol* 7: 207-212
15. Bhattacharjee H, Ghosh M, Mukhopadhyay R, Rosen BP (1999) Arsenic transporters from *E. coli* to humans. In: Broome-Smith JK, Baumberg S, Sterling CJ, Ward FB (red). *Transport of molecules across microbial membranes*. W: Society for General Microbiology Symposia, Vol 58. Leeds: Society for General Microbiology, 58-79
16. Yamauchi H, Fowler BA (1994) Toxicity and metabolism of inorganic and methylated arsenicals. W: *As in Environment. Part II: Human Health and Ecosystem Effects*. New York: John Wiley and Sons, 35-43
17. Bentley R, Chasteen TG (2002) Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 250-271
18. Drobná Z, Walters SB (2005) Metabolism and toxicity of arsenic in human urothelial cells expressing rat arsenic(+3)-methyltransferase. *Toxicol Appl Pharmacol* 207: 147-59
19. Radabaugh TR, Sampayo-Reyes A, Zakharyan RA, Aposhian HV (2002) Arsenate reductase II. Purine nucleoside phosphorylase in the presence of dihydrolipoic acid is a route for reduction of arsenate to arsenite in mammalian systems. *Chem Res Toxicol* 15: 692-698
20. Lin S, Shi Q, Nix FB, Styblo M, Beck MA, Herbin-Davis KM, Simeonsson JB, Thomas DJ (2002) A novel S-adenosyl-L-methionine: As(III) methyltransferase from rat liver cytosol. *J Biol Chem* 277: 10795-10803
21. Kruse E, Uehlein N, Kaldenhoff R (2006) The aquaporins. *Genome Biol* 7: 206
22. Hénin J, Tajkhorshid E, Schulten K, Chipot C (2008) Diffusion of glycerol through *Escherichia coli* Aquaglyceroporin GlpF. *Biophys J* 94: 832-839
23. Yang HC, Cheng J, Finan TM, Rosen BP, Bhattacharjee H (2005) Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 187: 6991-6997
24. Thorsen M, Di Y, Tangemo C, Morillas M, Ahmadpour D, Van der Does C, Wagner A, Johansson E, Boman J, Posas F, Wysocki R, Tamás MJ (2006) The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Mol Biol Cell* 17: 4400-10
25. Pettersson N, Filipsson C, Becit E, Brive L, Hohmann S (2005) Aquaporins in yeasts and filamentous fungi. *Biol Cell* 97: 487-500
26. Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundaar S, Oullette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R. (2004) Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* 279: 31010-31017
27. Hansen M, Kun JF, Schultz JE, Beitz E (2002) A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J Biol Chem* 277: 4874-4882
28. Liu Z, Shen J, Carbrey JM, Mukhopadhyay R, Agre P, Rosen BP (2002) Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6053-6058
29. Liu Z, Styblo M, Rosen BP (2006) Methylarsonous acid transport by aquaglyceroporins. *Environ Health Perspect* 114: 527-31
30. Carbrey JM, Song L, Zhou Y, Yoshinaga M, Rojek A, Wang Y, Liu Y, Lujan HL, DiCarlo SE, Nielsen S, Rosen BP, Agre P, Mukhopadhyay R (2009) Reduced arsenic clearance and increased toxicity in aquaglyceroporin-9-null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 15: 15956-15960
31. Chappell WR, Beck BD, Brown KG, Chaney R, Cothorn R, Cothorn CR, Irgolic KJ, North DW, Thornton I, Tsongas TA (1997) Inorganic arsenic: a need and an opportunity to improve risk assessment. *Environ Health Perspect* 105: 1060-1067
32. Acharyya SK, Chakraborty P, Lahiri S, Raymahashay BC, Guha S, Bhowmik A (1999) Arsenic poisoning in the Ganges delta. *Nature* 401: 545-547
33. Lee TC, Ho IC, Lu WJ, Huang JD (2006) Enhanced expression of multi-drug resistance-associated protein 2 and reduced expression of aquaglyceroporin 3 in an arsenic-resistant human cell line. *J Biol Chem* 281: 18401-18407
34. Ishibashi K, Hara S, Kondo S (2009) Aquaporin water channels in mammals. *Clin Exp Nephrol* 13: 107-117
35. Hamdi M, Sanchez MA, Beene LC, Liu Q, Landfear SM, Rosen BP, Liu Z (2009) Arsenic transport by zebrafish aquaglyceroporins. *BMC Mol Biol* 25: 10-104
36. Pavlovic-Djuranovic S, Schultz JE, Beitz E (2003) A single aquaporin gene encodes a water/glycerol/urea facilitator in *Toxoplasma gondii* with similarity to plant tonoplast intrinsic proteins. *FEBS Lett* 555: 500-504
37. Ali W, Isayenkov SV, Zhao FJ, Maathuis FJ (2009) Arsenite transport in plants. *Cell Mol Life Sci* 66: 2329-2339
38. Isayenkov SV, Maathuis FJ (2008) The *Arabidopsis thaliana* aquaglyceroporin AtNIP7;1 is a pathway for arsenite uptake. *FEBS Lett* 582: 1625-1628
39. Bienert GP, Thorsen M, Schüssler MD, Nilsson HR, Wagner A, Tamás MJ, Jahn TP (2008) A subgroup of plant aquaporins facilitate the bidirectional diffusion of As(OH)₃ and Sb(OH)₃ across membranes. *BMC Biol* 10: 6-26
40. Kamiya T, Tanaka M, Mitani N, Ma JF, Maeshima M, Fujiwara T (2009) NIP1;1, an aquaporin homolog, determines the arsenite sensitivity of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 284: 2114-2120
41. Tripathi RD, Srivastava S, Mishra S, Singh N, Tuli R, Gupta DK, Maathuis FJ (2007) Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotechnol* 25: 158-165
42. Boles E, Hollenberg CP (1997) The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 21: 85-111
43. Klepper J, Leiendecker B (2007) GLUT1 deficiency syndrome - 2007 update. *Dev Med Child Neurol* 49: 707-716
44. Chan FY, Torriani A (1996) PstB protein of the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli* is an ATPase. *J Bacteriol* 178: 3974-3987
45. Rosenberg H, Gerdes RG, Chegwidden K (1977) Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 131: 505-511
46. Jackson RJ, Binet MR, Lee LJ, Ma R, Graham AI, McLeod CW, Poole RK (2008) Expression of the PitA phosphate/metal transporter of *Escherichia coli* is responsive to zinc and inorganic phosphate levels. *FEMS Microbiol Lett* 289: 219-224
47. Persson, BL, Berhe A, Fristedt U, Martinez P, Pattison J, Petersson J, Weinander R (1998) Phosphate permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1365: 23-30

48. Wykoff DD, O'Shea EK (2001) Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 159: 1491-1499
49. Pinson B, Merle M, Franconi JM, Daignan-Fornier B (2004) Low affinity orthophosphate carriers regulate PHO gene expression independently of internal orthophosphate concentration in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279: 35273-35280
50. Persson BL, Petersson J, Fristedt U, Weinander R, Berhe A, Pattison J (1991) Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1422: 255-272
51. Li X, Yang HY, Giachelli C (2006) Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 98: 905-912
52. Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53: 1-11
53. Meharg AA, Macnair MR (1992) Suppression of the phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *J Exp Bot* 43: 519-524
54. Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Vooijs R, Ten Bookum W, Schat H, Meharg AA (2001) Phytochelatinins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Plant Physiol* 126: 299-306
55. Catarecha P, Segura MD, Franco-Zorrilla JM, García-Ponce B, Lanza M, Solano R, Paz-Ares J, Leyva A (2007) A mutant of the *Arabidopsis* phosphate transporter PHT1;1 displays enhanced arsenic accumulation. *Plant Cell* 19: 1123-1133
56. Gonzalez E, Solano R, Rubio V, Leyva A, Paz-Ares J (2005) Phosphate transporter traffic facilitator1 is a plant-specific SEC12-related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 3500-3512
57. Rahman MA, Hasegawa H, Ueda K, Maki T, Rahman MM (2008) Arsenic uptake by aquatic macrophyte *Spirodela polyrrhiza* L.: Interactions with phosphate and iron. *J Hazard Mater* 30: 356-361
58. Ali W, Isayenkov SV, Zhao FJ, Maathuis FJM (2009) Arsenite transport in plants. *Cell Mol Life Sci* 66: 2329-2339

Pathways of arsenic uptake in prokaryotic and eukaryotic cells

Paweł Lis¹, Ireneusz Litwin², Ewa Maciaszczyk-Dziubińska²✉

¹Department of Genetics, Institute of Genetics and Microbiology, Faculty of Biological Sciences, University of Wrocław, 63/77 S. Przybyszewskiego St., 51-148 Wrocław, Poland

²Department of Genetics and Cell Physiology, Institute of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Wrocław, 6/8 Kanonia St., 50-128 Wrocław, Poland

✉e-mail: ewa.maciaszczyk-dziubinska@microb.uni.wroc.pl

Key words: arsenite (As III), arsenate (As V), aquaporins, aquaglyceroporins, hexose permeases, phosphate transporters

ABSTRACT

Mechanisms of arsenic uptake and detoxification are present in all studied organisms. These mechanisms are considerably well described in unicellular organisms such as bacterium *Escherichia coli* and baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, still leaving much to be revealed in multicellular organisms. Full identification of arsenic uptake and detoxification is of great importance. This knowledge can be very helpful in improving effectiveness of arsenic-containing drugs used in chemotherapy of parasitoses as well as in treatment of acute promyelocytic leukemia. Increased proficiency of bioremediation of arsenic-contaminated soils can be obtained by using plants hyperaccumulating arsenic. This kind of plants can be engineered by modulating expression levels of genes encoding arsenic transporters. The same technique may be used to decrease levels of accumulated arsenic in crops. The aim of this paper is to review current knowledge about systems of arsenic uptake in every studied organism – from bacteria to human.

Roślinne cyklazy nukleotydów purynowych

STRESZCZENIE

Cykliczne nukleotydy (cAMP i cGMP) należą do grupy wtórnych przekazników informacji, które kontrolują szereg procesów zachodzących zarówno w komórkach organizmów prokaryotycznych, jak i eukaryotycznych. Za ich tworzenie odpowiedzialne są cyklazy nukleotydów purynowych: cyklazy adenylanowa i guanylanowa, które występują w cytosolu lub są białkami związanymi z błoną komórkową. Poza różnicami w lokalizacji komórkowej rozbieżności dotyczą budowy oraz sposobu regulacji ich aktywności. Jednakże wszystkie cyklazy zawierają reszty aminokwasowe odpowiedzialne za wiązanie substratu, wiązanie jonów metali i stabilizację przeprowadzanej reakcji, co warunkuje ich specyficzność. Samo istnienie cyklicznych nukleotydów u roślin nie budzi już wątpliwości. Wiadomo, że działając jako wtórne przekazniki biorą one udział w szeregu reakcji (patofizjologicznych). Jednakże dopiero od niedawna pojawiają się bezpośrednie dowody na obecność w komórkach roślinnych cyklaz adenylanowych i guanylanowych o unikalnej strukturze. W prezentowanej pracy podsumowano dane dotyczące cyklaz prokaryotycznych oraz grzybów i zwierząt. Przedstawiono także nowe wyniki, które jednoznacznie wskazują na istnienie tej grupy enzymów w komórkach roślinnych.

WPROWADZENIE

Zróznicowanie sygnałów odbieranych przez wyspecjalizowane receptory komórkowe wymusiło powstanie układów, które są w stanie przetłumaczyć te różnorodne sygnały na bodźce regulujące wzrost, różnicowanie lub pobudliwość komórki. Istotną rolę w tych szlakach odgrywają cykliczne nukleotydy będące przedstawicielami grupy wtórnych przekazników informacji. Za ich pośrednictwem dochodzi do przekazywania sygnałów zewnątrzkomórkowych do wnętrza komórki, jak również do wielu oddziaływań w obrębie samej komórki. Prace, które zostały rozpoczęte ponad 50 lat temu odkryciem cAMP i cGMP w tkankach ssaków trwają po dzień dzisiejszy, a dotyczą one analizy przemian jakim podlegają cykliczne nukleotydy oraz sprecyzowania ich roli w komórkach, tkankach i narządach organizmów żywych reprezentujących niemal wszystkie szczeble rozwoju filogenetycznego.

Chociaż początkowe wątpliwości i niepewności odnośnie roli cyklicznych nukleotydów w sygnalizacji komórkowej u roślin zostały już wyjaśnione, ciągle istnieje wiele pytań, które pozostają bez odpowiedzi. Szczególne kontrowersje budzą cyklazy – enzymy odpowiedzialne za syntezę cyklicznych nukleotydów. Niniejsza praca jest próbą podsumowania dostępnych informacji dotyczących roślinnych cyklaz nukleotydów purynowych.

W obecnej chwili najwięcej informacji posiadamy o budowie, mechanizmach działania i roli cyklaz z komórek zwierząt. To z tymi danymi porównywane są wszystkie wyniki uzyskiwane z innego materiału badawczego. Aby w pełni zrozumieć rolę cyklaz nukleotydów purynowych jako kluczowych elementów w przekazywaniu sygnałów w komórkach roślinnych, wiedza dotycząca cyklaz zwierząt, grzybów i organizmów prokaryotycznych jest niezbędna.

Cykliczne nukleotydy (cNMP) są produkowane przez cyklazy, a ich inaktywacja zachodzi przy współudziale fosfodiesteraz. Substratami są odpowiednio ATP, dla cyklazy adenylanowej (synonimy: cyklaza adenylowa; adenylcyklaza) oraz GTP dla cyklazy guanylanowej (synonimy: cyklaza guanylowa; guanylocyklaza) (Ryc. 1). Aktywność enzymów syntetyzujących cNMP wykazana została zarówno pośród białek frakcji błonowych, jak i cytosolowych, stąd przyjęty został, utrzymujący się do dziś, podział cyklaz na cyklazy rozpuszczalne (cytosolowe; sGC, sAC) i nierozpuszczalne (błonowe; pGC, tmAC) [1].

Adriana Szmidt-Jaworska 

Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin, Toruń

Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; tel.: (56) 611 44 56, e-mail: asjawors@umk.pl

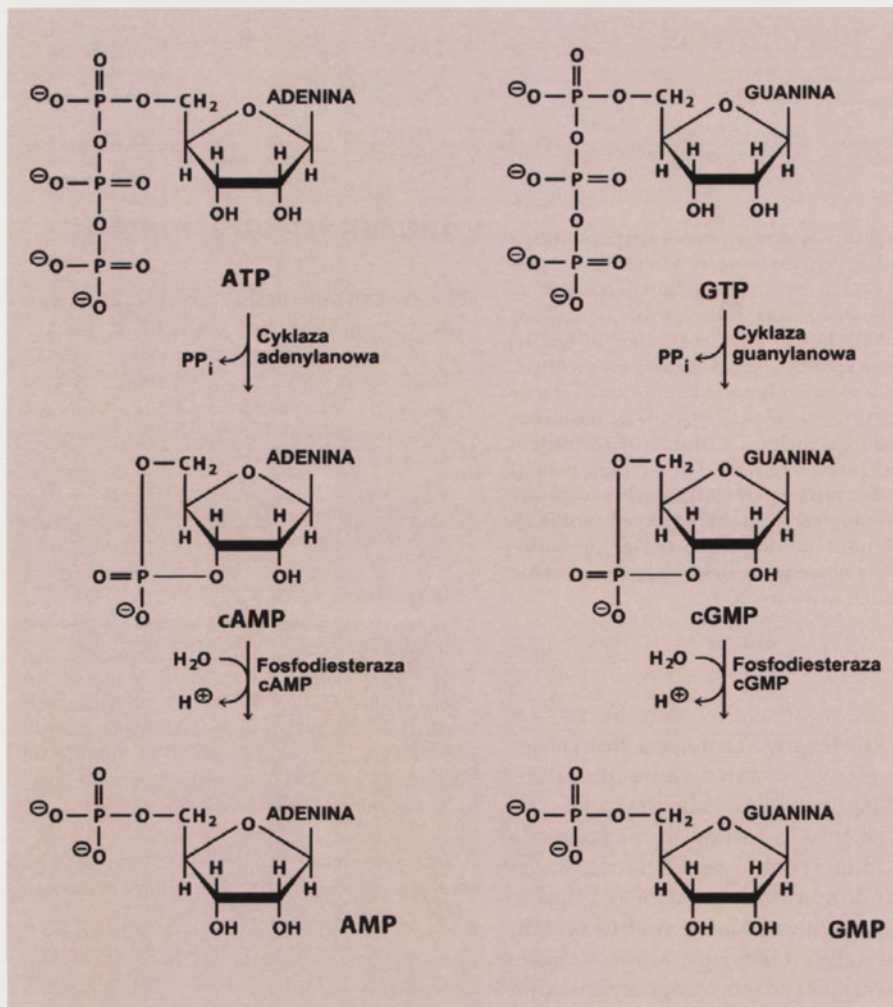
Artykuł otrzymano 23 lipca 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 13 listopada 2009 r.

Słowa kluczowe: cAMP, cGMP, cyklaza adenylanowa, cyklaza guanylanowa, cykliczne nukleotydy,

Wykaz skrótów: AC – cyklaza adenylanowa; cAMP – cykliczny 3',5' adenozylo mono-fosforan; cGMP – cykliczny 3',5' guanozylo mono-fosforan; cNMP – cykliczne nukleotydy; GC – cyklaza guanylanowa

Podziękowanie: Praca napisana w ramach realizacji projektu badawczego habilitacyjnego MNiSW nr: N N303 0704 33.



Rycina 1. Synteza i inaktywacja cyklicznego AMP i cyklicznego GMP.

ORGANIZMY PROKARIOTYCZNE

Organizmy prokariotyczne różnią się od organizmów eukariotycznych liczbą i różnorodnością cyklaz nukleotydów purynowych. Bazując na podobieństwie sekwencji reszt aminokwasowych i struktury cyklazy te zostały pogrupowane w 6 różnych klas, [2,3]. Klasy I, II, IV, V, VI charakteryzują się unikalną budową domen katalitycznych i są spotykane jedynie u organizmów prokariotycznych. Klasa I obejmuje cyklazy adenylanowe, które zostały scharakteryzowane u enterobakterii. Klasa II została opisana u bakterii patogennych takich jak wąglik (*Bacillus anthracis*), krztusiec (*Bordetella pertussis*) i pałeczki ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*), a enzymy z tej klasy są aktywowane przez kalmodulinę. Pozostałe 3 klasy są charakterystyczne wyłącznie dla gatunków *Aeromonas hydrophila* i *Prevotella ruminicola* [4].

Klasa III jest najliczniejsza i obejmuje cyklazy spotykane zarówno u organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych. Analiza 129 genomów bakteryjnych pozwoliła zidentyfikować 193 geny kodujące cyklazy tej klasy. Powstające na ich bazie enzymy posiadają wysoki stopień podobieństwa, zarówno względem siebie, jak i eukariotycznych cyklaz adenylanowych i guanylanowych. Pro-

wadzone analizy wykazały, że cyklazy te cechuje duża różnorodność w liczbie i układzie domen. Większość z nich posiada pojedynczą domenę katalityczną, ale są i takie charakteryzujące się dwiema domenami katalitycznymi opisanymi również w cyklazie adenylanowej ssaków [5] (Ryc. 2).

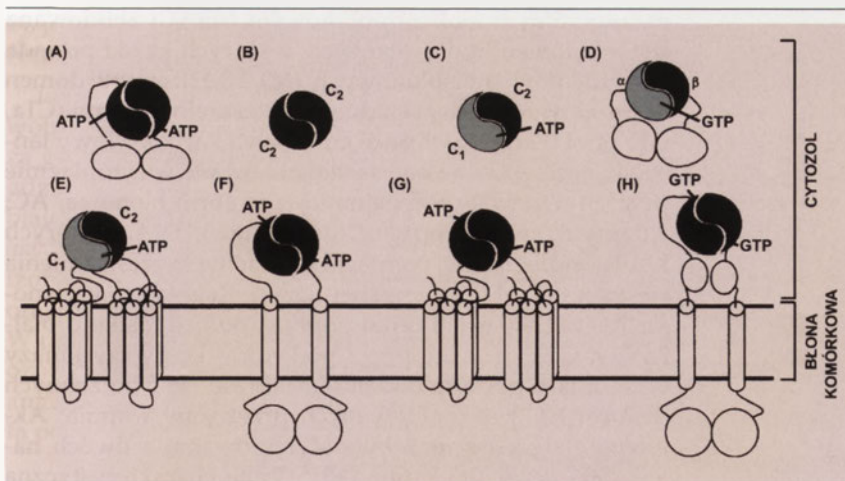
Do chwili obecnej u organizmów prokariotycznych, opisano tylko jedną cyklazę guanylanową (Cya2). Enzym z cyjanobakterii (*Synechocystis sp.* PCC6803) posiada na końcu C pojedynczą domenę katalityczną, 4 przypuszczalne domeny transbłonowe i rejon zewnątrzkomórkowy z domeną CHASE (ang. *cyclases/histidine kinases associated sensory extracellular*) na końcu N. Ta ostatnia domena, odpowiedzialna za wiązanie liganda, jest charakterystyczna również dla bakteryjnych cyklaz adenylanowych i kinaz histydynowych [6]. Badanie aktywności tego enzymu *in vivo* wykazało, że inaktywacja Cya2 powodowała 60% spadek ilości cGMP w komórkach bakterii bez widocznego spadku ilości cAMP, co pozwoliło przyporządkować ten enzym do klasy cyklaz guanylanowych [7].

Przytoczone powyżej wyniki wskazują na duże, strukturalne zróżnicowanie klasy III cyklaz, z których część może być uważana za formy wyjściowe cyklaz eukariotycznych. Przykładowo, enzymy bakteryjne posiadające 6 segmentów transbłonowych poprzez ich duplikację mogły dać początek cyklazom adenylanowym kręgowców posiadającej 12 segmentów transbłonowych [8].

ORGANIZMY EUKARIOTYCZNE

CYKLAZY NUKLEOTYDÓW PURYNOWYCH U GRZYBÓW

Wyniki uzyskane z doświadczeń przeprowadzonych na drożdżach (*Saccharomyces cerevisiae* i *Candida albicans*) pozwoliły stwierdzić, że grzyby nie posiadają genów kodujących cyklazy guanylanowe, kinazy regulowane cGMP czy fosfodiesterazy cyklicznych nukleotydów [8]. Natomiast występuje w nich cyklaza adenylanowa, której obecność potwierdzono u *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Podospora anserina* i *Ustilago maydis*. Budowa i sposób aktywacji wskazują na to, że różnią się one od ich odpowiedników u ssaków. Przykładowo enzym CRY-1 z *Saccharomyces cerevisiae* jest rozpuszczalnym białkiem, które posiada możliwość łączenia się z błonami. Wyodróżniono w nim domenę fosfatazową, domenę asocjacji małego białka G (Ras) oraz serie odcinków bogatych w powtórzenia leucynowe. Ostatnie dwie domeny uczestniczą w wiązaniu białka Ras, niezbędnego do aktywacji cyklazy. Wykazano również możliwość aktywacji enzy-



Rycina 2. Topologia cykloz adenylanowych (AC) i guanylanowych (GC). (A) rozpuszczalna AC grzybów i bakterii; (B) rozpuszczalna AC ssaków – homodimer; (C) rozpuszczalna AC ssaków – heterodimer; (D) rozpuszczalna GC ssaków; (E) błonowa AC ssaków; (F) błonowa AC z pierwotniaków i organizmów bezkręgowych; (G) błonowa AC z organizmów prakaryotycznych; (H) błonowa GC ssaków (wg [59], zmodyfikowano).

mu przez podjednostkę α białka G oraz białko Gpa2 (ang. *guanine nucleotide-binding regulatory protein*) [9].

CYKLAZY NUKLEOTYDÓW PURYNOWYCH ZWIERZĄT

W komórkach zwierząt cykliczne nukleotydy są kluczowymi cząsteczkami sygnałowymi zaangażowanymi w szeroką gamę procesów biologicznych. Cykliczny GMP bierze udział w hamowaniu agregacji płytek krwi, rozkurczu mięśni gładkich, rozszerzaniu naczyń krwionośnych, immunomodulacji [10,11], natomiast cAMP uczestniczy w regulacji ciśnienia krwi, zapobieganiu agregacji płytek krwi, rozszerzaniu oskrzeli czy wzmacnianiu siły skurczu mięśnia sercowego [12]. Nie dziwi więc fakt, że enzymy odpowiedzialne za syntezę tych wtórnych przekazników są przedmiotem intensywnych badań w zakresie fizjologii, biochemii i biologii molekularnej. Stąd też najwięcej informacji dotyczących cykloz nukleotydów purynowych pochodzi z analiz enzymów ssaków.

Cyklozy guanylanowe występują w dwóch głównych formach: w formie rozpuszczalnej (sGC, ang. *soluble guanylyl cyclase*; frakcja cytosolowa) i w formie związanej z błoną (pGC, ang. *particulate guanylyl cyclase*; frakcja błonowa). W obu przypadkach mechanizm syntezy cGMP jest identyczny, a różnice dotyczą lokalizacji komórkowej, budowy enzymów i typów aktywatorów zaangażowanych w regulację ich aktywności [1].

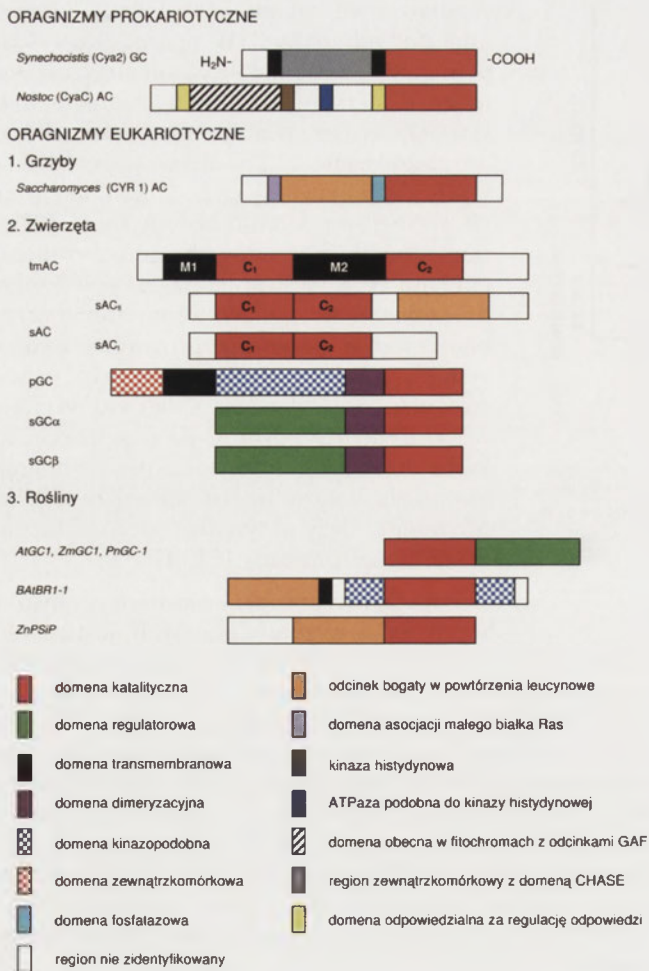
Rozpuszczalne cyklozy zwierząt są heterodimerami zbudowanymi z dwóch łańcuchów polipeptydowych: łańcucha α o masie cząsteczkowej 73-82 kDa oraz łańcucha β o masie cząsteczkowej 70-74 kDa. Podjednostki te kodowane są przez różne geny dzięki czemu zachodzi możliwość zróżnicowania ich syntezy. W wyniku badań ustalono, że istnieją trzy izoformy podjednostki α : 1, 2, 3 oraz trzy izoformy podjednostki β : 1, 2, 3. Każdy łańcuch składa się z N-końcowej domeny regulatorowej, domeny dimeryzacyjnej umożliwiającej łączenie się dwóch łańcuchów oraz domeny katalitycznej, umiejscowionej na C-końcu. Stwierdzono, że poszczególne izoformy różnią się

w dość znacznym stopniu, a właściwości regulatorowe całego kompleksu determinuje podjednostka β . W przypadku cykloz pełna aktywność katalityczna enzymu wymaga dimeryzacji obydwu podjednostek. Powstaje w ten sposób centrum katalityczne zbudowane z 250 reszt aminokwasowych zlokalizowane przy C-końcu. Mutacje w regionie katalitycznym tylko jednej podjednostki powodowały unieczynnienie enzymu [13]. Istnieją jednakże pojedyncze doniesienia wskazujące, że monomeryczne białko jest w stanie przeprowadzić reakcję syntezy cGMP z GTP. W komórkach nerwowych ćmy (*Manduca sexta*) zidentyfikowano dwie sGC (MsGC- β 3 oraz MsGC-I), które do swojej aktywności nie wymagają tworzenia heterodimeru, jednakże mechanizm regulujący aktywność tych cykloz nie został dotąd poznany [13,14].

Podstawowym aktywatorem cytosolowych cykloz guanylanowych jest tlenek azotu (NO). Mechanizm aktywacji opiera się na zmianie konformacji enzymu powodowanej rozluźnieniem wiązania grupy prostetycznej z łańcuchem β w wyniku związania NO z grupą hemową domeny regulatorowej. Dezaktywacja enzymu następuje poprzez oddysocjowanie NO od hemu. Innym, chociaż znacznie słabszym aktywatorem sGC jest tlenek węgla. Ponadto stwierdzono, że w obecności jonów wapnia następuje zahamowanie aktywności enzymu, co może sugerować, że zmiany stężenia cGMP i Ca^{2+} w komórce oparte są na zasadzie sprzężenia zwrotnego [11].

Poznane cyklozy błonowe u zwierząt (pGC) można podzielić na dwie kategorie: enzymy związane z błoną komórkową (będące jednocześnie białkami efektorowymi) oraz enzymy regulowane przez zmiany stężenia Ca^{2+} , występujące w rząskach pierwotniaków i w komórkach fotoreceptorowych kręgowców. Inny podział, bazujący na tkankowej lokalizacji wyróżnił 7 izoform, z których cyklozy A, B, G występują w różnych tkankach, cykloza C występuje w jelitach, D w komórkach węchowych, natomiast cyklozy E, F występują w komórkach siatkówki [11].

Cyklozy błonowe zbudowane są z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie cząsteczkowej 110-180 kDa. Podobnie jak w przypadku sGC do pełnej aktywności katalitycznej niezbędny jest proces dimeryzacji, w wyniku którego powstaje homodimer. W strukturze pGC możemy wyróżnić domenę zewnątrzkomórkową zlokalizowaną na N-końcu, składającą się z ok. 500 reszt aminokwasowych, ze specyficznymi usytuowanymi resztami cysteiny (Ryc. 3). Domena ta uczestniczy w odbieraniu zewnątrzkomórkowego sygnału dzięki występowaniu miejsc N-glikozylacji. Kolejną domeną jest domena transbłonowa zbudowana z około 25 reszt aminokwasowych tworzących strukturę α -helisy, a jej podstawowym zadaniem jest utrzymywanie łańcucha polipeptydowego w błonie komórkowej. Domena ta połączona jest z dome-



Rycina 3. Domenowa budowa cyklaz adenylanowych i guanylanowych organizmów prokariotycznych i eukariotycznych.

na wewnątrzkomórkową wykazującą homologię do kinaz białkowych. Fosforylacja występujących w niej reszt treoniny i seryny jest niezbędna do aktywności niektórych cyklaz błonowych np. GC-A i GC-B. Na C-końcu zlokalizowane są domeny dimeryzacyjna i katalityczna, których sekwencja aminokwasowa jest najbardziej zachowana w ewolucji. Pierwsza z nich umożliwia dimeryzację łańcuchów polipeptydowych podjednostek homodimeru, natomiast druga odpowiada za wiązanie GTP i przekształcenie go do cGMP [11,15]. Za specyfikę reakcji odpowiedzialne są reszty glicyny i argininy łączące się z grupą fosforanową GTP oraz reszta cysteiny rozpoznająca guaninę. Dwie reszty kwasu asparaginowego lub glutaminowego odgrywają istotną rolę w wiązaniu jonów dwuwartościowych (Mn²⁺ lub Mg²⁺), a reszty asparaginy i lizyny stabilizują zachodzącą reakcję. Istnieje wiele czynników i procesów wpływających na wzrost aktywności cyklaz błonowych. Do najważniejszych należą ATP, jony wapnia, peptydy natriuretyczne, enterotoksyny bakteryjne oraz proces fosforylacji [11].

U ssaków cyklaza adenylanowa, podobnie jak to ma miejsce w przypadku cyklazy guanylanowej, występuje w 2 formach: rozpuszczalnej i błonowej. Cyklaza będą-

ca integralnym białkiem błonowym (tmAC) zbudowana jest z 2 domen hydrofobowych, z których każda posiada 6 segmentów transbłonowych (M1 i M2) oraz 2 domen hydrofilowych będących domenami katalitycznymi (C1a, C1b oraz C2a, C2b). Końce aminowy i karboksylowy łańcucha polipeptydowego są zlokalizowane w cytoplazmie (Ryc. 3). Opisano przynajmniej 9 izoform błonowej AC, zidentyfikowanej poprzez klonowanie cDNA, z których każda podlega innej regulacji, a poziom ekspresji zmienia się zależnie od analizowanej tkanki. Regulacja aktywności AC zachodzi nie tylko poprzez podjednostkę α białka G_i i G_q, lecz także przez podjednostkę $\beta\gamma$ czy kinazy C. W miarę postępu badań okazało się, że 5 ze znanych izoform AC jest regulowanych przez jony wapnia. Aktywność trzech z nich była stymulowana, a dwóch hamowana przez ten kation [12]. Cechą charakterystyczną wszystkich błonowych form AC jest możliwość stymulacji ich aktywności poprzez egzogenne podanie forsokliny.

Od kilku lat w centrum zainteresowania badaczy znajdują się rozpuszczalne cyklazy adenylanowe [16-19]. Ich aktywność nie jest regulowana przez białka G i forsoklinę, a jedynie przez jony Mn²⁺. Ponadto są one wrażliwe na zmiany stężenia dwuwęglanów i CO₂ [17,20], co nasuwa przypuszczenie, że rozpuszczalne AC funkcjonują jako sensory aktywności anhidrazy węglanowej [19]. Analiza cDNA wykazała, że cyklaza adenylanowa ssaków jest białkiem o masie cząsteczkowej 187 kDa, podczas gdy wyizolowany i oczyszczony enzym o aktywności cyklazy adenylanowej jest białkiem o masie jedynie 48 kDa. Autorzy wskazują więc na rolę procesu proteolizy w uzyskaniu aktywnego białka [20,21].

Rozpuszczalna cyklaza adenylanowa o pełnej długości (sAC_{fl}, ang. *soluble adenyllyl cyclase – full-length*) zbudowana jest z 2 domen katalitycznych (C1, C2) na końcu N oraz zlokalizowanej na końcu C domeny autoinhibitorowej, która jest w stanie modulować szybkość reakcji bez wpływu na powinowactwo do substratu [18]. Charakterystyczną cechą tych enzymów jest obecność tzw. pętli P, będącej motywem odpowiedzialnym za wiązanie ATP lub GTP [20]. Ponadto we fragmencie C-końcowym znajduje się odcinek bogaty w resztę leucyny, czyli potencjalne miejsce powstawania zamka leucytowego, oraz odcinek o charakterystycznej konformacji wskazującej na możliwość przyłączania sAC do organelli komórkowych [21]. Skrócona forma cyklazy (sAC_{tr}, ang. *soluble adenyllyl cyclase – truncated*) posiada tylko 2 domeny katalityczne i jest 20-krotnie aktywniejsza od sAC_{fl}. Enzym ten ulega aktywacji w jądrach komórkowych, lecz sam mechanizm tego procesu nie został poznany [20,22].

W porównaniu do cyklaz guanylanowych, także w domenie katalitycznej cyklaz adenylanowych występują reszty aminokwasowe warunkujące ich specyficzność. W domenie C2 zlokalizowane są reszty lizyny i kwasu asparaginowego, które odpowiadają za specyficzne wiązanie ATP oraz reszty argininy i asparaginy biorące udział w stabilizacji wiązania. Natomiast, znajdujące się w domenie C1, dwie reszty kwasu asparaginowego są odpowiedzialne za wiązanie jonów magnezu lub manganu. Nale-

ży jednak wspomnieć, że odstępstwa od takiego układu reszt aminokwasowych są spotykane dosyć często [22].

Istnieje obszerna bibliografia opisująca cyklazy pierwotniaków i organizmów bezkręgowych. Błonowa cyklaza guanylanowa została opisana w plemnikach jeżowca, gdzie jest zaangażowana w proces chemotaksji i detekcji białek wydzielanych przez oocyty [1]. U nicienia *Caenorhabditis elegans* odkryto 27 błonowych i 7 rozpuszczalnych izoform GC. Biorą one udział w procesach powonienia oraz determinacji jego neuronalnej asymetryczności [23]. W przypadku muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) oznaczono 6 błonowych i 5 rozpuszczalnych cykraz guanylanowych, jednak do chwili obecnej ich rola nie została poznana [24].

U ćmy zmierzchnicy (*Manduca sexta*) zidentyfikowano kilka izoform cykraz guanylanowych. Typ RetGC będący błonowym enzymem jest regulowany przez jony wapnia, natomiast MsGC-1 jest enzymem rozpuszczalnym, który wykazuje homologię do cykrazy receptorowej typu GC-B ssaków, lecz pozbawiony jest domen zewnątrzkomórkowej, transbłonowej i kinazowej. Kolejny enzym, MsGC-β3, przypomina izoformę β ssaków, jednak w jego domenie regulatorowej brak jest motywu zawierającego resztę cysteiny, odpowiedzialnego za wiązanie hemu. Enzym ten jest aktywny jako homodimer niewrażliwy na tlenek azotu [24]. Autorzy tych odkryć sugerują jednocześnie, że aktywacja GC przez NO jest ewolucyjnie młodszym zjawiskiem i pojawia się dopiero u zwierząt bardziej rozwiniętych, za czym dodatkowo przemawia fakt braku w genomie np. *C. elegans* genu o homologii do syntazy tlenu azotu [8].

Przeprowadzone szczegółowe analizy szeregu izoform cykraz adenylanowych i guanylanowych z orzęsków *Paramecium* i *Tetrahymena* pozwoliło na stwierdzenie, że enzymy te są regulowane poprzez przepływ jonów przez plazmalemmę. Wykazano, że posiadają one domeny charakterystyczne dla cykraz, jak również domeny spotykane w kanałach zależnych od potencjału błony z sześcioma pętlami transbłonowymi. W miarę postępu badań okazało się, że ortologi tych genów, zachowane w ewolucji w mniejszym stopniu, są także obecne u *Plasmodium*, *Toxoplasma gondii* i *Cryptosporidium parvum* [25,26]. U zarodźca sierpowatego (*Plasmodium falciparum*) odnaleziono również gen kodujący prawdopodobnie cyklazę adenylanową (*PfAC2*). Cyklaza ta charakteryzuje się unikalną budową, ponieważ powstające na bazie tego genu białko zawiera pojedynczą domenę katalityczną, czym bardziej przypomina sGC z *Dictyostelium*, niż typową cyklazę adenylanową [2,22,26].

W komórkach *Dictyostelium* wykryto zarówno cyklazę adenylanową jak i guanylanową, które wykazują wyraźne podobieństwo do cykraz kręgowców [26,27]. Cyklaza adenylanowa jest białkiem błonowym zbudowana z dużej domeny zewnątrzkomórkowej, domeny transbłonowej oraz wewnątrzkomórkowej domeny cykrazowej. Część zewnątrzkomórkowa zawiera domenę CHASE odpowiedzialną za wiązanie liganda. Nie zaobserwowano jednak występowania domeny homologicznej z kinaza-

mi, ani α-helikalnej struktury coiled-coil, odpowiedzialnej za proces dimeryzacji białka. Cyklaza guanylanowa natomiast jest białkiem rozpuszczalnym, charakteryzującym się występowaniem zachowanych w ewolucji domen C1 i C2 oraz domeny AAA z motywem pętli P, brakiem zaś domen transbłonowych. Warto jednak zaznaczyć, że w przypadku GC domeny C1 i C2 są odwrócone w ten sposób, że domena C2 znajduje się na N-końcu, a regulacja aktywności zachodzi poprzez heterotrimeryczne białka G, poprzez które enzym łączy się z błoną komórkową.

ROŚLINNE CYKLAZY NUKLEOTYDÓW PURYNOWYCH

Podobnie jak ma to miejsce w komórkach zwierzęcych, także w komórkach roślinnych cykliczne nukleotydy są cząsteczkami sygnałowymi zaangażowanymi w szereg procesów, które ponadto odgrywają integracyjną rolę dla wielu szlaków przekazywania sygnału. Zmiany stężenia cyklicznych nukleotydów były obserwowane podczas kiełkowania i orientacji ziaren pyłku, grawitropizmie korzeni, ruchach aparatów szparkowych, odpowiedzi na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe i fotomorfogenezie [28,29]. Przydatność uzyskanych danych byłaby jednak ograniczona jeśli nie towarzyszyłyby im typowo biochemiczne i molekularne badania enzymów odpowiedzialnych za zmiany endogennego poziomu cyklicznych nukleotydów oraz „efektorów” zaangażowanych w odbiór informacji zawartych w tych zmianach. W ostatnich latach sukcesywnie pojawiają się prace, których przedmiotem badań są właśnie cyklazy nukleotydów purynowych.

Jednokomórkowy glon *Chlamydomonas reinhardtii* jest wykorzystywany jako system modelowy w badaniu zjawiska przekazywania sygnałów u roślin. Prowadząc badania na tym materiale stwierdzono, że w komórkach występuje duże stężenie cyklicznego AMP, który odgrywa znaczącą rolę w rozmnażaniu płciowym, a jego synteza zachodzi w momencie łączenia się komórek o odmiennym ładunku. Kolejne badania wskazały na istnienie w komórkach tego glonu cykazy adenylanowej, która jest niewrażliwa na forskolinę czy GTPγS, regulatory zwierzęcej tmAC [8].

W 2005 roku realizowano projekt, którego celem było poznanie genomu *Chlamydomonas*. Analiza uzyskanych fragmentów wykazała istnienie 92 sekwencji homologicznych do cykraz guanylanowych. Wyselekcjonowano 12, które analizowano pod kątem ich podobieństwa do znanych AC i GC. Okazało się, że 3 spośród nich kodują białka posiadające w domenie katalitycznej reszty aminokwasowe warunkujące specyficzność działania tych enzymów jako cykraz guanylanowych. Do chwili obecnej brak jest informacji o roli jaką odgrywa cGMP w komórkach glonów, jednakże istnienie tak dużej liczby genów kodujących GC może wskazywać na jego istotne znaczenie.

Istnieje szereg pośrednich dowodów wskazujących na występowanie cykazy guanylanowej w tkankach roślinnych. Pochodzą one zarówno z doświadczeń fizjologicznych, w których poprzez zastosowanie tzw. związków

farmakologicznie czynnych wpływało na procesy zachodzące w komórkach roślinnych, jak również z analiz aktywności cyklaz *in vivo*, czyli pomiaru endogennego stężenia cyklicznych nukleotydów w analizowanych tkankach. Osiągnięcia na tym polu prezentowane były w pracach przeglądowych opublikowanych w ostatnich latach w czasopiśmie o zasięgu krajowym i ogólnościowym [8,28-30]. W prezentowanej pracy skupiono się jedynie na dowodach bezpośrednich, które jednoznacznie wskazują na istnienie tej grupy enzymów w komórkach roślinnych.

Pierwszych takich dowodów dostarczyły badania, których wyniki wskazują na istnienie w chloroplastach komórek szpinaku (*Spinacia oleracea*) dwóch cyklaz: jednej o aktywności odpowiadającej cyklazie guanylanowej, natomiast drugiej adenylanowej [30]. Wyniki doświadczeń prowadzonych na owsie (*Avena sativa*) i wilcu wielkokwiatowym (*Pharbitis nil*) dowodzą istnienia w ich komórkach cyklaz guanylanowych. We frakcjach błonowych wyizolowanych z komórek owsa zaobserwowano aktywność enzymu, który powodował konwersję GTP do cGMP, a proces ten był pod kontrolą fitochromu [31]. W organach wilca natomiast występuje białko o masie 40 kDa zdolne do syntezy cGMP, wykazujące powinowactwo do przeciwciał skierowanych przeciwko domenom katalitycznej cyklaz rozpuszczalnych. Badania prowadzone na skrawkach tkankowych wykazały silny sygnał znakowania w komórkach miększu palisadowego, gąbczastego i aparatach szparkowych. Natomiast analizy na poziomie ultrastrukturalnym wykazywały obecność intensywnego znakowania w chloroplastach, peroksysomach i cytosolu [32]. Ponieważ podobne doświadczenia nie były wcześniej wykonywane, brak jest wcześniejszych prób wyjaśnienia takiego rozmieszczenia enzymu.

Dobrym potwierdzeniem tego, że cyklazy są obecne w tkankach roślinnych jest znalezienie genu/ów kodujących te enzymy. Do chwili obecnej w Banku genów zdeponowano kilka sekwencji kodujących przypuszczalne roślinne cyklazy [33]. Ponadto ukazały się prace doświadczalne poruszające problem obecności u roślin genów kodujących cyklazy nukleotydów purynowych. Analizy wszystkich 4 opisanych roślinnych cyklaz guanylanowych: AtGC1 [34] i AtBRI-1 z rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) [35], ZnGC-1 z kukurydzy (*Zea mays*) [36], PnGC-1 z wilca (*Pharbitis nil*) [33] wykazują, że posiadają one cechy pozwalające je zakwalifikować do rodziny cyklaz guanylanowych, jednocześnie różnią się one w budowie od znanych cyklaz zwierząt. Po pierwsze, analizy prawdopodobnej sekwencji reszt aminokwasowych wykazały, że w domenie katalitycznej występują wszystkie reszty aminokwasowe, które warunkują specyficzność reakcji [3]. Po drugie, centrum katalityczne zostało zlokalizowane na N-końcu, co odróżnia roślinne GC od zwierzęcych izoform. Po trzecie, spośród oznaczonych cyklaz jedynie AtBRI1 został scharakteryzowany jako część receptora brasinosteroidów, natomiast trzy pozostałe wydają się być enzymami zlokalizowanymi w cytosolu. Nie posiadają one ani sekwencji kierującej do błony, ani domen charakterystycznych dla cyklaz błonowych, tj. domeny odpowiedzialnej za wiązanie liganda, domeny transbłonowej oraz wewnątrzkomórkowej o właściwości kinaz. Po

czwarte, zwierzęce rozpuszczalne cyklazy guanylanowe należą do dużej rodziny białek H-NOX (ang. *heme nitric oxide and/or oxygen-binding domain*), których aktywność jest regulowana poprzez tlenek azotu (NO) [37,38]. Białka te posiadają zachowany w ewolucji motyw C-X-X-H, który jest odpowiedzialny za wiązanie hemu i NO. Żadna z izoform roślinnych GC nie posiada takiej sekwencji, zaś aktywność AtGC1 i PnGC-1 nie zwiększała się w obecności SNP, jako donora NO. Dodatkową cechą PnGC-1 była obecność aminokwasów odpowiedzialnych za przyłączenie kwasu mirystynowego. Proces N-mirystoilacji odgrywa istotną rolę w wiązaniu białka do błon i procesie oddziaływania białko-białko. Odwracalne kotwiczenie lipidowe jest także jednym z czynników kontroli przekazywania sygnału w komórkach eukariotycznych. Pewne białka z kowalencyjnie przyłączonym lipidem, mogą zachowywać się jak białka rozpuszczalne, a kotwice nie pełnią wtedy funkcji unieruchamiającej białko, lecz odpowiadają za przekazywanie sygnału, co zostało zaobserwowane podczas odpowiedzi roślin na czynniki stresowe [39]. Jednakże jaką rolę odgrywa ten proces w przypadku cyklazy guanylanowej z *P. nil* nie wiadomo.

Istnieje także szereg pośrednich dowodów na obecność w komórkach roślinnych cyklaz adenylanowych. Stwierdzono, że znaczący wpływ na zmiany endogennej poziomu cAMP odgrywają: niska temperatura [39], egzogennie aplikowane fitohormony [30,40,41], światło [42,43], jak również czynniki pochodzenia wirusowego, bakteryjnego i grzybowego [44-46]. Wskazuje to na obecność u roślin cyklazy adenylanowej, której aktywność podlega modulacji przez te czynniki.

Początkowe doświadczenia zmierzające do zidentyfikowania roślinnych cyklaz adenylanowych związanych z błonami (tmAC) prowadzone były poprzez pomiar ilości grup fosforanowych, powstających jako rezultat formowania cAMP z ATP, wiązanych poprzez metale ciężkie (takie jak ołów, cer). Metoda ta była obarczona szeregiem błędów, ponieważ w przypadku wielu reakcji PPI jest jednym z uzyskiwanych produktów. Ponadto samo użycie metali ciężkich mogło zredukować aktywność enzymu. Pomimo tych mankamentów metoda ta wykazała obecność AC w plazmalemmie i błonie chloroplastów komórek roślinnych [47].

Kolejnych dowodów dostarczyły wyniki badań z wykorzystaniem imido-difosforanu adenozy, jako substratu cyklazy adenylanowej [48]. Stwierdzono, że tmAC jest zlokalizowana w plazmalemmie, tonoplaście i plastydach komórek mchu prątnika srebrzystego (*Bryum argenteum*). Inni badacze [49] używając takiego samego substratu i przeciwciał znakowanych złotem, skierowanych na cAMP, zlokalizowali cAMP jako produkt aktywności AC w stromie i przestrzeni międzybłonowej chloroplastów tytoniu (*Nicotiana tabacum*). U ziemniaka (*Solanum tuberosum*) cAMP powstaje prawie we wszystkich organelach komórkowych, przy czym najsilniejszym sygnałem charakteryzowały się chloroplasty i jądro [45,50]. Analiza frakcji błonowych uzyskanych z kwiatów lilii (*Lilium x hybridum hort cv. Connecticut*) wykazała, że występujący tam enzym konwertuje ATP do cAMP, a jego

aktywność zmienia się pod wpływem forskoliny i AlF_3 [51].

Dane literaturowe wskazują, że roślinne izoformy tmAC działają w szerokim zakresie pH, od 4,8 do 8,8 [52,53], a do swojej aktywności wymagają obecności jonów magnezowych, analogicznie do cyklaz zwierzęcych i tych opisanych u mikroorganizmów. Również związki takie jak forskolina czy NaF, które modulują aktywność cyklaz adenylanowych u zwierząt, mają wpływ na aktywność tmAC wyizolowanych z tkanek roślinnych [40,41].

W 2002 roku stwierdzono [27], na podstawie analizy genomu organizmów prokaryotycznych i eukaryotycznych, że rośliny nie posiadają rozpuszczalnej cyklazy adenylanowej. Aby wyjaśnić brak u roślin odpowiednika zwierzęcych cyklaz adenylanowych wysunięto hipotezę [54], która zakłada, że geny kodujące cyklazy adenylanowe u roślin mają inną budowę domenową i mogą być ukryte pośród innych genów, szczególnie genów odporności, których liczba u *Arabidopsis* sięga 300, a u ryżu ok. 1500. Produkty ekspresji tych genów mogą bezpośrednio wpływać na aktywność szlaków przekazywania informacji u roślin. Dotychczasowe, pojedyncze jeszcze wyniki sugerują poprawność tej hipotezy. Na podstawie homologii do rejonu bogatego w reszty leucyny, charakterystycznego dla cyklaz adenylanowych, u *Zea mays* zidentyfikowano gen *PSiP*. Gen ten posiada domenę ATPazy typu AAA, lecz brak mu typowej domeny katalitycznej C1 i C2, charakterystycznej dla cyklaz adenylanowych. Brak tej domeny budzi wątpliwości co do przypisywanej mu funkcji. Istnieją jednakże dodatkowe dowody, że białko to jest rzeczywiście cyklazą adenylanową. Dostarczyły je badania wykonane na zmutowanym szczepie *E. coli*, który charakteryzował się zaburzoną przemianą węglowodanów. Bakterie te nie posiadały także aktywnej cyklazy adenylanowej. Wprowadzenie do tych komórek genu *PSiP* spowodowało pojawienie się w nich cyklicznego AMP i normalną przemianę cukrów. Moutinho i wsp. [54] zaobserwowali również, że ekspresja tego genu i podniesienie endogennego poziomu cAMP są niezbędne do kiełkowania i wzrost łagiewki pyłkowej, a stymulujący wpływ forskoliny wskazuje na udział błonowej cyklazy adenylanowej w tym procesie.

W roku 1988 roku [55] wyizolowano i częściowo oczyszczono rozpuszczalną cyklazę adenylanową z komórek lucerny. Jej aktywność w obecności Mg^{2+} -ATP była stymulowana poprzez dodanie Ca^{2+} lub kalmoduliny. GTP, forskolina, NaF i toksyna cholery (modulatory tmAC) nie miały wpływu na aktywność tego enzymu. Dziewięć lat później Ishikawa i wsp. [41] zidentyfikowali gen kodujący prawdopodobną rozpuszczalną cyklazę adenylanową. Białko stworzone na bazie cDNA, oznaczone jako axi141, posiadało odcinek bogaty w reszty leucyny i wykazywało homologię do cyklazy adenylanowej z komórek drożdży rozszczepkowych (*Schizosaccharomyces pombe*).

Ostatnio, w wyniku prac prowadzonych na ziemniaku [47,50] zidentyfikowano rozpuszczalną cyklazę adenylanową, która była aktywowana przez jony magnezu i jony dwuwęglanowe, natomiast NaF nie miał wpływu na

tempo syntezy cAMP. Analizy immunochemiczne z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciw domenie katalitycznej cyklaz adenylanowych pozwoliły na zidentyfikowanie białek o różnych masach cząsteczkowych, od 225 do 60 kDa, dostarczając tym samym dowodów na rolę proteolizy w procesie uzyskiwania aktywnego enzymu.

Obecność w komórkach roślinnych białek CAP (ang. *cyclase associated protein*) (synonim: Srv2p), biorących udział w polimeryzacji aktyny, stanowi ostatni z dowodów na istnienie u roślin cyklaz adenylanowych. Białka te opisane początkowo u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [55] zostały następnie zidentyfikowane także u roślin [57,58]. Co najważniejsze, białka te posiadają na końcu N domenę wiążącą cyklazę adenylanową, która jest niezbędna do ich aktywacji. Wskazuje to jednoznacznie na konieczność istnienia takich cyklaz u roślin.

PODSUMOWANIE

W ostatnich latach nasza wiedza dotycząca cyklicznych nukleotydów, jako elementów łańcucha przekazywania sygnałów u roślin, jest sukcesywnie uzupełniana i wzbogacana o nowe informacje. Ciągłe jednak jesteśmy na początku drogi prowadzącej do zrozumienia różnorodności i złożoności roślinnych systemów przekazywania sygnałów. W przypadku cyklicznych nukleotydów i układów generujących ich powstawanie ta wiedza jest szczególnie uboga i fragmentaryczna.

Początkowe niepowodzenia dotyczące identyfikacji cyklaz nukleotydów purynowych u roślin tłumaczone były tym, że w komórkach kręgowców przekazywanie sygnałów z udziałem cyklicznych nukleotydów związane jest z kontrolą procesów związanych z ruchem, tak więc utrata przez rośliny tych zdolności spowodowała zanik cyklaz adenylanowych i guanylanowych. Jednakże mija się to z prawdą, ponieważ w komórkach roślinnych zachodzi wiele procesów, w których ruch komórki odgrywa istotną rolę tj. ruchy aparatów szparkowych, kiełkowanie ziarna pyłku, ruch organelli komórkowych. W procesach tych, jak również w szeregu innych udział cGMP i cAMP został udowodniony. Skłaniać by się należało raczej do stwierdzenia, że cyklazy roślinne charakteryzują się inną budową i wymagają innych aktywatorów warunkujących ich aktywność, a przedstawione powyżej wyniki potwierdzają to założenie.


PIŚMIENNICTWO

1. Murad F (1994) Cyclic GMP: synthesis, metabolism and function, W: Murad F (red) *Advances in Pharmacology*, Academic Press, Inc, San Diego, California vol. 26
2. Baker DA, Kelly JM (2004) Purine nucleotide cyclases in the malaria parasite. *Trends Parasitol* 20: 227-232
3. Mc Cue LA, MC Donough KA, Lawrence CE (2000) Functional classification of cNMP-binding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in *Mycobacterium tuberculosis*. *Genom Res* 10: 204-219
4. Tellez-Sosa J, Soberon N, Vega-Segura A, Torres-Marquez ME, Cevallos MA (2002) The *Rhizobium etli cyaC* product: characterization of a novel adenylate cyclase class. *J Bacteriol* 184: 3560-3568

5. Shenoy AR, Visweswariah SS (2004) Class III nucleotide cyclases in bacteria and archaeobacteria: lineage specific expansion of adenylyl cyclases and a dearth of guanylyl cyclases. *FEBS Lett* 561: 11-21
6. Annatharaman V, Aravind L (2001) The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem Sci* 26: 579-582
7. De Alda J, Ajlani G, Houmar J (2000) *Synechocystis* strain PCC 6803 *cya2*, a prokaryotic gene that encodes a guanylyl cyclase. *J Bacteriol* 182: 3839-3842
8. Schaap P (2005) Guanylyl cyclases across the tree of life. *Front Biosci* 10: 1485-1498
9. Kido M, Shima F, Satoh T, Asato T, Kariya K-I, Kataoka T (2002) Critical function of the Ras-associating domain as a primary Ras-binding site for regulation of *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 277: 3117-3123
10. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman AS (2001) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52: 375-414
11. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schultz S, Chepenik KP, Waldman SA (2000) Guanylyl cyclase and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52: 375-413
12. Sunahara RK, Taussig R (2002) Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interventions* 2: 168-184
13. Nighorn A, Byrnes KA, Morton DB (1999) Identification and characterization of a novel beta subunit of soluble guanylyl cyclase that is active in the absence of a second subunit and is relatively insensitive to nitric oxide. *J Biol Chem* 274: 2525-2531
14. Simpson PJ, Nighorn A, Morton DB (1999) Identification of a novel guanylyl cyclase that is related to receptor guanylyl cyclases, but lacks extracellular and transmembrane domains. *J Biol Chem* 274: 4440-4446
15. Biswas KH, Shenoy AR, Dutta A, Visweswariah SS (2009) The evolution of guanylyl cyclases as multidomain proteins: conserved features of kinase-cyclase domain fusions. *J Mol Evol* 68: 587-602
16. Cooper DMF, Mons N, Karpen JW (1995) Adenylyl cyclase and the interaction between calcium and cAMP signaling. *Nature* 374: 421-424
17. Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR (1999) Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 79-84
18. Litvin TN, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J, Levin LR (2003) Kinetic properties of „soluble“ adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 278: 15922-15926
19. Zippin JH, Levin LR, Buck J (2001) CO₂/HCO₃-responsive soluble adenylyl cyclases a putative metabolic sensor. *Trends Endocrinol Metab* 12: 366-370
20. Wuttke MS, Buck J, Levin LR (2001) Bicarbonate-regulated soluble adenylyl cyclase. *JOP J Pancreas* 2: 154-158
21. Kamenetsky M, Middelhaufe S, Bank EM, Levin LR, Buck J, Steegborn C (2006) Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J Mol Biol* 362: 623-639
22. Linder JU, Schultz JE (2003) The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell Signal* 15: 1081-1089
23. L'Etoile ND, Bargmann CI (2000) Olfaction and odor discrimination are mediated by the *C. elegans* guanylyl cyclase ODR-1. *Neuron* 25: 575-586
24. Morton DB, Anderson EJ (2003) MsGC-beta3 forms active homodimers and inactive heterodimers with NO sensitive soluble guanylyl cyclase subunits. *J Exp Biol* 206: 937-947
25. Weber JH, Vishnyakov A, Hambach K, Schultz A, Schultz JE, Linder JU (2004) Adenylyl cyclases from *Plasmodium*, *Paramecium* and *Tetrahymena* are novel ion channel/enzyme fusion proteins. *Cell Signal* 16: 115-125
26. Linder JU, Schultz JE (2002) Guanylyl cyclase in unicellular organisms. *Mol Cell Biochem* 230: 149-158
27. Roelofs J, Van Haastert PJ (2002) Characterization of two unusual guanylyl cyclases from *Dictyostelium*. *J Biol Chem* 277: 9167-9174
28. Szalaty M (2004) Udział cGMP w szlakach transdukcji sygnałów w komórkach roślinnych. *Post Biol Kom* 30: 31-46
29. Szmidi-Jaworska A, Jaworski K, Kopcewicz J (2007) Cykliczne nukleotydy u roślin wyższych. *Post Biol Kom* 34: 49-67
30. Newton RP, Roef L, Witters E, Van Onckelen H (1999) Cyclic nucleotides in higher plants: the enduring paradox. *New Phytol* 143: 427-455
31. Volotovskiy ID, Dubovskaya LV, Molchan OV (2003) Photoreceptor phytochrome regulates the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate synthesis in *Avena sativa* L. cells. *Bull J Plant Physiol* 29: 3-12
32. Szmidi-Jaworska A, Jaworski K, Kopcewicz J (2008) Effect of light on soluble guanylyl cyclase activity in *Pharbitis nil* seedlings. *J Photochem Photobiol B: Biol* 93: 9-15
33. Szmidi-Jaworska A, Jaworski K, Pawelek A, Kopcewicz J (2009) Molecular cloning and characterization of a guanylyl cyclase, *PuGC-1*, involved in light signaling in *Pharbitis nil*. *J Plant Growth Regul* 28: 367-380
34. Ludidi N, Gehring C (2003) Identification of a novel protein with guanylyl cyclase activity in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 278: 6490-6494
35. Kwezi L, Meier S, Mungur L, Ruzvidzo O, Irving H, Gehring C (2007) The *Arabidopsis thaliana* brassinosteroid receptor (AtBRI1) contains a domain that functions as a guanylyl cyclase *in vitro*. *PLoS ONE* 2: e449
36. Yuan J, Liakat AM, Taylor J, Liu J, Sun G, Liu W, Masilimany P, Gulati-Sakhuja A, Pauls KP (2008) A guanylyl cyclase-like gene is associated with giberella ear rot resistance in maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet* 116: 465-479
37. Boon EM, Marletta MA (2005) Ligand discrimination in soluble guanylate cyclases and the H-NOX family of heme sensor proteins. *Curr Opin Chem Biol* 9: 441-446
38. Lawson DM, Stevenson CE, Andrew CR, Eady RR (2000) Unprecedented proximal binding of nitric oxide to heme: implications for guanylate cyclase. *EMBO J* 19: 5661-5671
39. de Vries JS, Andriotis VM, Wu AJ, Rathjen JP (2006) Tomato Pto encodes a functional N-myristoylation motif that is required for signal transduction in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* 45: 31-45
40. Karimova G, Tyrikina EY, Zaharova Y (2005) cAMP – dependent phosphorylation of pea proteins, induced by forskolin. *Physiol Plant* 52: 27-35
41. Ichikawa Y, Homsy C (1997) The adenylyl cyclases as integrators from transmembrane signal transduction. *Circ Res* 80: 297-304
42. Gasumov KG, Shichijo S, Bayramov SM, Hashimoto T (2001) Membrane and soluble fractions of adenylyl cyclase from *Sorgum bicolor* seedlings positively react to the action of red and far red lights. First Conference on Photochemistry and Photobiology (<http://photobiology.com>)
43. Koumura Y, Suzuki T, Yoshikawa S, Watanabe M, Iseki M (2004) The origin of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), the *Euglena* blue-light receptor: phylogenetic analysis of orthologues of PAC subunits from several euglenoids and trypanosome-type adenylyl cyclase from *Euglena gracilis*. *Photochem Photobiol Sci* 3: 580-586
44. Jiang J, Fan LW, Wu WH (2005) Evidences for involvement of endogenous cAMP in *Arabidopsis* defense responses to *Verticillium* toxins. *Cell Res* 15: 585-592
45. Lomovatskaya LA, Romanenko AS, Krivolopova NV, Kopytchuk VN (2006) Activity of transmembrane and „soluble“ forms of adenylyl cyclases in potato cell organelles during bacterial pathogenesis. *Doklady Biol Sci* 409: 570-573
46. Zhao J, Guo YG, Fujita K, Sakai K (2003) Involvement of cAMP signaling in elicitor-induced phytoalexin accumulation in *Cupressus lusitanica* cell cultures. *New Phytol* 161: 723-733
47. Lomovatskaya LA, Romanenko AS, Filinova NV (2008) Plant adenylyl cyclases. *J Recep Signal Trans* 28: 531-542
48. Bhalta SC, Chopra RN (1984). Subcellular localization of adenylyl cyclase in the shoot apices of *Bryum argenteum* Hedw. *Ann Botany* 54: 195-200
49. Witters E, Valcke R, Van Onckelen H (2005) Cytoenzymological analysis of adenylyl cyclase activity and 3':5'-cAMP immunolocalization on chloroplasts of *Nicotiana tabacum*. *New Phytol* 168: 99-107
50. Lomovatskaya LA, Romanenko AS, Krivolopova NV, Kopytchuk VN (2007) Functioning of soluble and membrane-associated forms of ad-

- enylyl cyclase in plant cell organelles under biotic stress. *Biol Memb* 24: 370-378
51. Legendre L, Derckel JP, Wisez F, Correze C, Audran JC, Haye B, Lambert B (1997) Evidence for the existence of cAMP in lily plant flower tissues. *Phytochem* 44: 769-774
 52. Tarshevsky IA (2001) Plant metabolism under stress. *Kasan, FAN* 296-302
 53. Viskrebenceva AI, Ivanov GG (1981) Adenylyl cyclase of sugar-beet edible roots. Localization and some properties. *Doklady Biol Sci* 258: 1515-1516
 54. Moutinho A, Hussey PJ, Trewavas AJ, Malho R (2001) cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10481-10486
 55. Carricarte VC, Bianchini GM, Muschietti JP, Tellez-Inon MT, Peticari A, Torres N, Flawia M (1988) Adenylate cyclase activity in a higher plant alfalfa (*Medicago sativa*). *Biochem J* 249: 807-811
 56. Gerst JE, Ferguson K, Vojtek A, Wigler M, Field J (1991) CAP is a bifunctional component of the *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase complex. *Mol Cell Biol* 11: 1248-1257
 57. Chaudhry F, Guerin C, Von Witsch M, Blanchoin L, Staiger CJ (2007). Identification of *Arabidopsis* cyclase-associated protein 1 as the first nucleotide exchange factor for plant actin. *Mol Biol Cell* 18: 3002-3014
 58. Wang S, Zhao G-H, Jia Y-H, Du X-M (2008) Cloning and characterization of a CAP gene expressed in *Gossypium arboreum* fuzzless mutant. *Crop Sci* 48: 23140-2320
 59. Zippin JH, Farrek J, Kamenetsky W, Hess KC, Fischman DA, Levin LR, Buck J (2004) Bicarbonate-responsive "soluble" adenylyl cyclase defines a nuclear cAMP microdomain. *J Cell Biol* 64: 527-534

Plant purine nucleotide cyclases

Adriana Szmidt-Jaworska 

Nicolaus Copernicus University, Institute of General and Molecular Biology, Department of Physiology and Molecular Biology of Plants, 9 Gagarina St., PL 87-100 Torun, Poland

e-mail: asjawors@umk.pl

Key words: cAMP, cGMP, adenylyl cyclase, guanylyl cyclase, cyclic nucleotides

ABSTRACT

Cyclic nucleotides (cAMP and cGMP) play an essential role in many important cellular processes in prokaryotic and eukaryotic organisms. They are produced by purine nucleotide cyclases: adenylyl and guanylyl cyclases. They are classified as one of two distinct forms: soluble and bound to membranes. Beside the differences in enzyme localization, the domain structure and regulation of enzymes activity are also diverse. However, all cyclases possess three groups of important residues: substrate specifying residue, metal binding residues and transition state stabilization residues. The natural occurrence of cyclic nucleotides in plants is now established. It was shown that in higher plants cNMPs act as a second messengers in a large number of (patho)physiological responses. However, it is only recently that the first plant enzymes with AC and GC activity of the unique structure have been identified and functionally characterized. In this study a systematic analysis of all the known prokaryotic, fungal and animal cyclases was done and direct evidences for the presence AC and GC in plant cells were shown.

Indukowana światłem redukcja protochlorofilidu u okrytonasiennych a rozwój chloroplastów

Beata Myśliwa-Kurdziel[✉]

Kazimierz Strzałka

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytet Jagielloński, Kraków

[✉]Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; tel.: (12) 664 63 72, e-mail: b.myśliwa-kurdziel@uj.edu.pl

Artykuł otrzymano 11 lutego 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 19 kwietnia 2010 r.

Słowa kluczowe: ciała prolamellarne, etiolacja, fotoenzym, oksydoreduktaza protochlorofilid: NADPH, protochlorofilid

Wykaz skrótów: ALA – kwas δ -aminolewulinowy; Chl – chlorofil; Chlid – chlorofilid; DV-Pchlid – diwinyloprotochlorofilid; EPR – elektronowy rezonans paramagnetyczny; NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego; LPOR – oksydoreduktaza protochlorofilid:NADPH zależna od światła; MV-Pchlid – monowinyloprotochlorofilid; PLB – ciała prolamellarne; PT – protylakoidy; Pchl – protochlorofil; Pchlid – protochlorofilid; Pchlid₂ – protochlorofilid charakteryzujący się maksimum fluorescencji przy x nm; PORA, PORB, PORC – izoformy LPOR

Podziękowanie: Artykuł przygotowany w ramach projektu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, nr 50/N-DFG/2007/0.

STRESZCZENIE

Jedną z końcowych reakcji szlaku biosyntezy chlorofilu u okrytonasiennych: redukcja protochlorofilidu (Pchlid) do chlorofilidu (Chlid), jest indukowana światłem i katalizowana przez zależną od światła oksydoreduktazę Pchlid:NADPH (1.3.1.33; LPOR). Brak światła, skutkuje zatrzymaniem biosyntezy chlorofilu na etapie utworzenia protochlorofilidu, zmianami w wyglądzie siewki i strukturze plastydów oraz zahamowaniem syntezy niektórych białek aparatu fotosyntetycznego. Światło indukuje fotoredukcję Pchlid→Chlid oraz wyzwala szereg reakcji biochemicznych i zmian strukturalnych prowadzących do wykształcenia struktury tylakoidów. Przedstawiona praca stanowi podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat białka LPOR, mechanizmu reakcji redukcji protochlorofilidu, roli struktur lipidowych charakterystycznych dla etioplastów, jak również właściwości spektralnych protochlorofilidu w etiolowanych siewkach okrytonasiennych i układach modelowych.

WPROWADZENIE

Wszystkie organizmy, które odżywiają się autotroficznie, tj. dzięki przeprowadzanemu procesowi fotosyntezy, zawierają chlorofil (Chl) lub bakteriochlorofil – podstawowe barwniki fotosyntetyczne. U roślin okrytonasiennych jedna z końcowych reakcji szlaku biosyntezy Chl, redukcja protochlorofilidu do chlorofilidu (Chlid), jest indukowana światłem i katalizowana przez zależną od światła oksydoreduktazę Pchlid:NADPH (1.3.1.33; LPOR). W toku ewolucji okrytonasienne utraciły geny enzymu zdolnego katalizować tę reakcję bez udziału światła (geny niezależnej od światła oksydoreduktazy protochlorofilidu [1,2]). Enzym ten jest obecny we wszystkich pozostałych grupach organizmów fotosyntetyzujących.

Reakcja fotoredukcji Pchlid→Chlid u okrytonasiennych odgrywa kluczową rolę nie tylko w procesie biosyntezy chlorofilu, ale też w regulacji rozwoju rośliny, w szczególności w wykształceniu chloroplastów zawierających aktywny aparat fotosyntetyczny. W ciemności, np. w przypadku kiełkujących w ziemi nasion, proces biosyntezy chlorofilu zostaje zatrzymany, a rozwój plastydów oraz całej siewki skierowany na drogę skotomorfogenezy. Rośliny rosnące bez dostępu światła stają się etiolowane, o charakterystycznym wyglądzie: mają wydłużony hipokotyl, haczyk wierzchołkowy, małe żółtawe liścienie. Etiolacja siewki może trwać kilka lub kilkanaście dni kosztem energii pochodzącej z rozkładu substancji zapasowych zgromadzonych w nasieniu. W takich siewkach biosynteza chlorofilu zachodzi do etapu utworzenia protochlorofilidu. Barwnik ten gromadzi się w błonach wewnętrznych etioplastów, które rozwijają się w roślinach etiolowanych w miejsce chloroplastów. W warunkach ekspozycji na światło w młodych, etiolowanych siewkach okrytonasiennych dochodzi do zmian programu procesów wzrostu i rozwoju rośliny o charakterze fotomorfogenetycznym, który obejmuje ekspansję liścieni, zatrzymanie wydłużania hipokotyli, dokończenie biosyntezy chlorofilu, wreszcie rozwój chloroplastów z błonami tylakoidów i formowanie funkcjonalnego aparatu fotosyntetycznego.

Fotoenzym LPOR katalizujący przemianę Pchlid→Chlid, od wielu lat przyciąga uwagę badaczy ze względu na udział w regulacji biosyntezy chlorofilu i rozwoju siewek roślin okrytonasiennych. W ostatnich latach ukazało się kilka prac przeglądowych dotyczących własności tego enzymu [2-6], charakterystyki spektralnej kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH w etiolowanym materiale roślinnym [7-9], jak również podsumowujących stan obecnej wiedzy dotyczącej poznania reakcji biochemicznych szlaku biosyntezy chlorofilu [1,2,10]. Zainteresowanie LPOR wynika z przekonania, że jest to wygodny model do badania oksydoreduktaz [5,6]. W przypadku tej oksydoreduktazy kompleks enzym-substrat tworzy się w ciemności, podczas gdy sama reakcja w tych warunkach jest zahamowana. Reakcję można zainicjować poprzez oświetlenie i w ściśle kontrolowanych warunkach badać jej kinetykę.

Od czasu ukazania się artykułu przeglądowego na temat indukowanej światłem biosyntezy chlorofilu, opublikowanego w *Postęпах Biochemii* [11], uzyskano wiele nowych danych na temat tego procesu. Obecny stan wiedzy na temat właściwości LPOR i mechanizmu reakcji, którą katalizuje, wymaga ponownego podsumowania w języku polskim. W niniejszej pracy przedstawiono najnowsze doniesienia na temat białka LPOR i indukowanej światłem reakcji redukcji protochlorofilidu oraz relacji między akumulacją tego związku w błonach wewnętrznych etioplastów, a strukturą tych błon i właściwościami spektralnymi protochlorofilidu. Zaprezentowano też uzyskane ostatnio wyniki prac dotyczących właściwości fotofizycznych protochlorofilidu w układach modelowych.

BIOSYNTETA PROTOCHLOROFILIDU

U roślin wyższych, w tym okrytonasiennych, związkiem wyjściowym w biosyntezie Pchlidu, która dalej prowadzi do powstania chlorofilu, jest glutaminian. Ten szlak biosyntezy chlorofilu określa się jako szlak C5. Glutaminian zaktywowany przez przyłączenie odpowiedniego tRNA ulega redukcji i przekształceniu do kwasu δ -aminolewulinowego (ALA). ALA jest prekursorem zarówno dla szlaku biosyntezy chlorofilu jak i hemu. Kolejne produkty pośrednie reakcji prowadzących do powstania cząsteczki protochlorofilidu przedstawione są na Ryc. 1a. Wiele enzymów szlaku biosyntezy chlorofilu zostało oczyszczonych lub otrzymanych drogą ekspresji w bakteriach, a ich struktura i mechanizm są przedmiotem dalszych badań. Zainteresowanego czy-

telnika odsyłamy do opublikowanych prac przeglądowych [1,2,10,12].

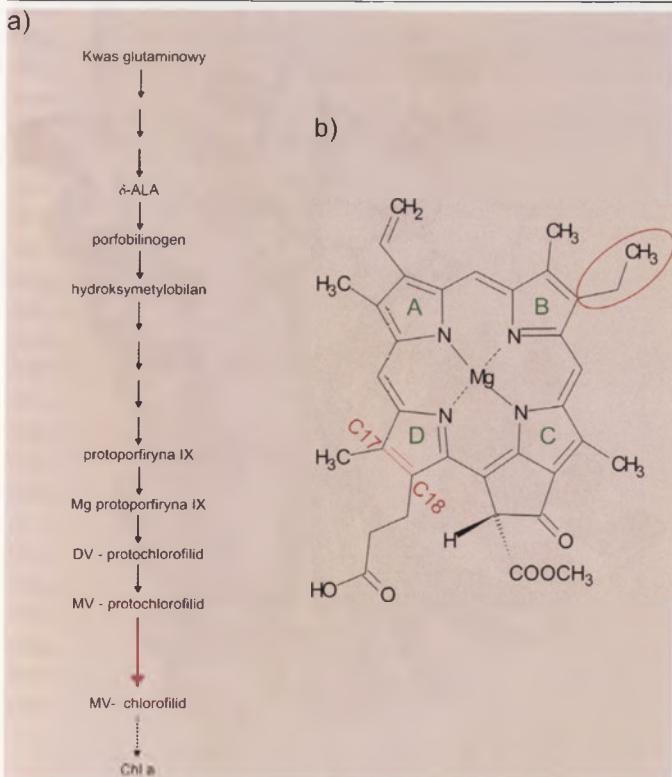
Protochlorofilid w etiolowanych siewkach występuje w postaci mono- lub diwinylowych pochodnych (MV-Pchlid i DV-Pchlid; Ryc. 1b). Obie formy mogą być substratem dla LPOR. Inne związki pośrednie szlaku biosyntezy chlorofilu również mogą występować w postaci pochodnych mono- lub diwinylowych. Zaproponowano uogólniony wielogałęziowy schemat biosyntezy chlorofilu poprzez obie formy związków pośrednich [13].

Protochlorofilid gromadzący się w etiolowanych siewkach hamuje biosyntezę ALA poprzez sprzężenie zwrotne; tym samym regulowana jest wielkość puli tego związku [3]. Mechanizm tej regulacji nie jest jeszcze dokładnie znany. Cząsteczkę protochlorofilidu stanowi układ porfirynewy złożony z 4 pierścieni pirolowych i pierścienia izopentanowego (Ryc. 1b). Jest to cząsteczka o charakterze hydrofilowym. Pchlid rozpuszcza się w polarnych rozpuszczalnikach organicznych (np. etanol, metanol, acetonitryl) oraz w wodzie. Jest słabo rozpuszczalny w rozpuszczalnikach hydrofobowych (np. benzyna). Sprzężony układ wiązań podwójnych protochlorofilidu odpowiada za jego właściwości spektralne. Absorbuje on światło w dwóch zakresach długości fal: niebieskim (pasmo Soret) i czerwonym (pasmo Q). Grupy ketonowe i atom Mg w centrum układu oddziałują z cząsteczkami otoczenia poprzez tworzenie wiązań wodorowych i koordynacyjnych.

RODZINA GENÓW POR I IZOFORMY BIAŁKA

LPOR jest białkiem kodowanym w genomie jądrowym, następnie kierowanym do plastydów: etioplastów lub chloroplastów. Mechanizm transportu tego białka został ostatnio podsumowany w [2,10,14] i nie jest przedmiotem niniejszego opracowania. Geny kodujące LPOR występują w sinicach, glonach i roślinach wyższych. Poza okrytonasiennymi, gdzie LPOR jest jedynym enzymem zdolnym przeprowadzić redukcję protochlorofilidu, w innych organizmach enzym ten występuje razem z niezależną od światła oksydoreduktazą protochlorofilidu (patrz prace przeglądowe [1,2,4,10,15]).

Dotychczas wyizolowano i sklonowano geny *por* m.in. jęczmienia (*Hordeum vulgare*), owsa (*Avena sativa*), grochu (*Pisum sativum*), rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) i innych (szczegółowa lista zbadanych pod tym względem organizmów znajduje się w pracach [4,10]). Rośliny okrytonasienne różnią się między sobą pod względem liczby kopii genów tego białka, jak również liczby jego izoform. U *A. thaliana* wykryto trzy funkcjonalne kopie genów i trzy izoformy białka: PORA, PORB, PORC [16-18]. W genomie jęczmienia występują geny *porA* i *porB* i dwa izoenzymy: PORA i PORB [19]. W grochu i ogórku znaleziono po jednej kopii genu *por* lecz zidentyfikowano różną liczbę izoform białka: jedną w przypadku ogórka i dwie w grochu [20,21]. Obecność różnej liczby kopii genów nasuwa pytanie o ich funkcjonalne znaczenie, na które dotychczas nie uzyskano jednoznacznej odpowiedzi. Wykazano, że ekspresja genów *porA* i *porB* jest w różny sposób regulowana światłem. Podczas wzrostu siewki w ciemności ulega nagromadzeniu mRNA PORA i białko PORA, a po oświetleniu obserwuje się zanik mRNA PORA



Rycina 1. (a) Schemat szlaku biosyntezy chlorofilu. Wyróżniono fragment dotyczący fotoredukcji Pchlid → Chlid. (b) Budowa cząsteczki protochlorofilidu. Zaznaczona grupa CH₂-CH₃ w cząsteczce MV-Pchlid ulega zmianie na CH=CH₂ w przypadku cząsteczki DV-Pchlid. Wyróżnione atomy węgla C17 i C18 tworzą wiązanie ulegające redukcji podczas fotokonwersji Pchlid → Chlid.

jak również proteolizę białka. Stwierdzono, że *porB* wykazuje stały i niezależny od światła poziom ekspresji. Na tej podstawie zasugerowano, że PORA odgrywa rolę w transformacji protochlorofilidu zgromadzonego w etiolowanych siewkach, podczas gdy rolą PORB jest podtrzymywanie biosyntezy chlorofilu podczas wzrostu rośliny na świetle [2,9,10,22]. PORC dotychczas znaleziono tylko w *A. thaliana*. Gen kodujący PORC ulega ekspresji tylko w świetle, zatem może potencjalnie odgrywać jakąś rolę w odpowiedzi rośliny na warunki stresowe [17,18]. W dalszym ciągu pozostaje bez odpowiedzi pytanie, w jaki sposób regulowana jest biosynteza protochlorofilidu w roślinach posiadających tylko jedną kopię genu i jedną lub dwie izoformy LPOR.

STRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI BIAŁKA LPOR

Cząsteczka białka LPOR zbudowana jest z jednego łańcucha polipeptydowego o masie 35–38 kDa [11,12]. Izoenzymy PORA i PORB wykazują duży stopień homologii na poziomie składu aminokwasowego dojrzałego białka [3,11]. Na podstawie sekwencji reszt aminokwasowych LPOR zakwalifikowano do rodziny enzymów „RED”, w skład której wchodzi niektóre reduktazy, epimerazy, dehydrogenazy [23,24]. Charakterystyczne cechy łączące enzymy „RED” to: tworzenie dimerów lub tetramerów, użycie NAD(P)⁺ lub NAD(P)H jako kofaktora oraz obecność zachowanych w ewolucji reszt Tyr i Lys, przedzielonych 3 resztami dowolnych aminokwasów, które są niezbędne do zachowania aktywności katalitycznej enzymu [15]. Kofaktorem wymaganym przez LPOR jest NADPH [25]. W strukturze tego białka zidentyfikowano zachowany w ewolucji motyw Tyr-X-X-X-Lys i przy zastosowaniu mutacji punktowej wykazano rolę reszt Tyr i Lys w prawidłowej koordynacji substratów (NADPH i protochlorofilidu) w centrum katalitycznym LPOR [24,26–28]. Ponadto reszta Tyr bezpośrednio zaangażowana jest w dostarczenie H⁺ w czasie redukcji Pchlidu, a reszta Lys zapewnia utrzymanie pKa umożliwiającego przekaz protonu [24,26]. Pokazano również, że związanie NADPH w centrum katalitycznym LPOR chroni jedną lub więcej reszt Cys występujących w łańcuchu LPOR przed chemiczną modyfikacją [5].

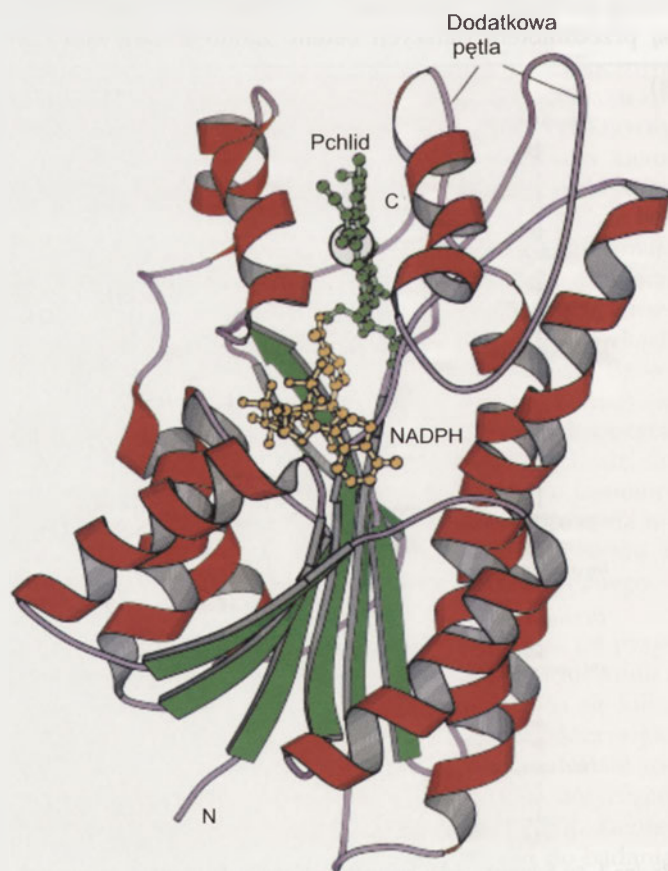
Struktura krystaliczna enzymu LPOR nie została dotychczas rozwiązana. Na podstawie podobieństwa sekwencji LPOR i białek rodziny „RED” oraz w oparciu o znajomość struktury krystalicznej niektórych spośród białek tej rodziny opracowano trójwymiarowy model budowy cząsteczki LPOR z *Synechocystis* [29]. W modelu tym centralną część cząsteczki białka stanowi β kartka złożona z 7 równoległych łańcuchów otoczona 9 helisami α (Ryc. 2). Cechą odróżniającą LPOR od innych białek rodziny „RED” jest dodatkowa pętla między 5 i 6 łańcuchem β zbudowana z 33 reszt aminokwasowych. Znaczenie tego elementu struktury nie zostało dotychczas wyjaśnione, aczkolwiek sugeruje się, że może on odgrywać istotną rolę w wiązaniu cząsteczki Pchlidu, oddziaływaniu białko-błona, lub w procesie agregacji kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH [24,29]. W N-końcowym fragmencie cząsteczki białka znajduje się miejsce wiązania NADPH. Obszar ten, charakterystyczny dla wiązania nukleotydów, zawiera sekwencję reszt aminokwasowych GxxxGxG zlokalizowaną w fałdzie $\beta\alpha\beta$ określaną jako tzw. motyw Rossmanna [3,5,11,30]. W opi-

sywanym modelu zachowane w ewolucji reszty Tyr i Lys, ważne z punktu widzenia aktywności katalitycznej [24,28], znajdują się w proponowanym centrum katalitycznym enzymu [29]. Sugerowana budowa tego centrum jest zgodna z modelem centrum katalitycznego LPOR opracowanym wcześniej na podstawie badań NMR i struktury pierwszorzędowej białka [31].

MECHANIZM FOTOREDUKCJI PROTOCHLOROFILIDU

Wynikiem fotokonwersji Pchlid→Chlid jest redukcja podwójnego wiązania C17=C18 w pierścieniu D cząsteczki protochlorofilidu (Ryc. 1b). W wyniku tej reakcji struktura układu porfiryнового cząsteczki protochlorofilidu ulega przekształceniu w strukturę chloryny, którą posiada zarówno chlorofilid, jak i chlorofil [9]. Reakcja ta jest jednokwantowa, a widmo działania podobne do widma absorpcji protochlorofilidu [3].

Fotoredukcji ulega tylko protochlorofilid związany z enzymem w trójskładnikowy kompleks Pchlid:LPOR:NADPH. Kompleksy takie ulegają nagromadzeniu w etiolowanych siewkach. Pula protochlorofilidu nie związana w kompleks enzym-substrat nie ulega redukcji pod wpływem krótkiego (milisekundowego) błysku światła, lecz może być wykorzystana jako substrat w kolejnych obrotach enzymu [3,9]. Mechanizm indukowanej światłem fotoredukcji protochlorofilidu jest intensywnie badany od ponad 40 lat, zarówno dla



Rycina 2. Przestrzenny model budowy cząsteczki LPOR z *Synechocystis* zaproponowany przez Townley i wsp. [29] (za zgodą Autorów) skonstruowany na podstawie analizy porównawczej pierwszorzędowej struktury tego enzymu i struktury innych enzymów rodziny „RED”.

białka oczyszczanego z etiolowanego materiału, jak i białek rekombinowanych [3-5,11,30].

W wyniku absorpcji kwantu światła cząsteczka protochlorofilidu, pozostając w stanie wzbudzenia elektronowego, jest redukowana do chlorofilidu przez NADPH, który dostarcza H^- do atomu węgla C17 cząsteczki protochlorofilidu (Ryc. 1b), natomiast zachowana w ewolucji reszta Tyr w centrum katalitycznym jest donorem H^+ dla węgla C18 [3,4,9,30]. W ostatnich latach uzyskano znaczny postęp w dokładnym zrozumieniu mechanizmu reakcji katalizowanej przez LPOR dzięki zastosowaniu do badań kinetyki reakcji oczyszczonych rekombinowanych białek (podsumowanie w pracach przeglądowych [5,6]). Na podstawie pomiarów widm fluorescencji i absorpcji oraz spektroskopii absorpcji przejściowej zidentyfikowano kilka etapów reakcji fotoredukcji protochlorofilidu, z których pierwszy jest inicjowany światłem, zaś kolejne zachodzą niezależnie od światła. Doświadczenia te potwierdziły wyniki wcześniejszych badań prowadzonych na izolowanych błonach etioplastów, liściach etiolowanych siewek lub rekombinowanym białku MbP-LPORB z jęczmienia, na podstawie których zaproponowano dwuetapowy model redukcji Pchlidu. W modelu tym pierwszy etap reakcji jest indukowany światłem, a drugi zachodzi spontanicznie w ciemności [3,11,26,32].

Fotoaktywne kompleksy Pchlid:LPOR:NADPH, odtworzone z rekombinowanego białka LPOR, wykazywały maksimum fluorescencji przy długości fali 644 nm w temperaturze 77 K [5]. Oświetlenie mieszaniny reakcyjnej milisekundowym błyskiem światła w temperaturze z zakresu 120–180 K przekształcało te fotoaktywne kompleksy w pierwotny niefluoryzujący produkt reakcji, posiadający maksimum absorpcji przy długości fali 696 nm (w temperaturze 77 K). Po tym indukowanym światłem etapie obserwowano szereg reakcji niezależnych od światła, pod warunkiem podniesienia temperatury mieszaniny reakcyjnej. Wzrost temperatury powyżej 180 K powodował przekształcenie pierwotnego produktu reakcji w drugi związek przejściowy: kompleks Chlid:LPOR:NADP⁺, wykazujący maksima absorpcji i fluorescencji odpowiednio przy długościach fal 681 i 684 nm. Przy dalszym wzroście temperatury następowało uwolnienie cząsteczki NADP⁺ z kompleksu Chlid:LPOR:NADP⁺ i związanie kolejnej cząsteczki NADPH w kompleks Chlid:LPOR:NADPH. Etapy te również obserwowano poprzez niewielkie zmiany w widmie fluorescencji mierzonym w temperaturze 77 K. Znaczne przesunięcie maksimum fluorescencji (do 674 nm w temperaturze 77 K) odpowiadało odłączeniu cząsteczki chlorofilidu od kompleksu LPOR:NADPH i przypominało tzw. przesunięcie Shibaty obserwowane dla etiolowanych liści [7,22,30]. Ostatnie etapy, podczas których zachodziła wymiana NADP⁺ na NADPH oraz Chlid na Pchlid, prowadzące do odtworzenia fotoaktywnego kompleksu Pchlid:LPOR:NADPH, wymagały zmiany konformacji enzymu [6,33–35]. Oszacowany czas zajścia reakcji przeniesienia H^+ i H^- wynosił 400 ps [5].

Trwają prace nad wyjaśnieniem natury pierwotnego produktu reakcji fotoredukcji protochlorofilidu, powstającego bezpośrednio w wyniku absorpcji światła i charakteryzującego się maksimum absorpcji przy długości fali 696 nm. Obserwowano go przeprowadzając reakcję w zakresie temperatur 120–180 K [3,5,30]. W doświadczeniach z wykorzystaniem

spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) wykazano rodnikowy charakter tego produktu, który tworzy się wskutek przesunięcia H^- z NADPH na cząsteczkę protochlorofilidu [32,36,37]. Wyników tych nie potwierdzili inni badacze [27]. Zaproponowano, że pierwotny produkt fotoredukcji ma charakter kompleksu z przesunięciem ładunku (ang. *charge-transfer*) powstającego w osi podwójnego wiązania C17=C18 cząsteczki protochlorofilidu (Ryc. 1b) wskutek działania światła, a jego powstanie prawdopodobnie sprzyja transferowi H^- i H^+ i redukcji podwójnego wiązania [38]. Ostatnio w doświadczeniach z rekombinowanym białkiem LPOR potwierdzono, że pierwotny produkt tej reakcji ma charakter kompleksu z przesunięciem ładunku [39]. Zaobserwowano również pojawienie się sygnału EPR, wskazującego na rodnikowy charakter pierwotnego produktu reakcji, jednak na podstawie analizy stosunków stechiometrycznych protochlorofilidu i rodnika wykluczono taką możliwość. Stwierdzono ponadto [40], że zachowana w ewolucji reszta Cys zlokalizowana w pobliżu centrum katalitycznego LPOR ma znaczenie dla przebiegu pierwszego, indukowanego światłem etapu reakcji fotoredukcji protochlorofilidu. Mechanizm fotoredukcji Pchlid→Chlid w mieszaninie reakcyjnej z oczyszczonym białkiem LPOR wydaje się być już dobrze poznany. Otwartym pozostaje dokładne opisanie mechanizmu fotoredukcji protochlorofilidu w etioplastach okrytonasiennych, które zawierają oligomery kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH złożone z różnej liczby monomerów.

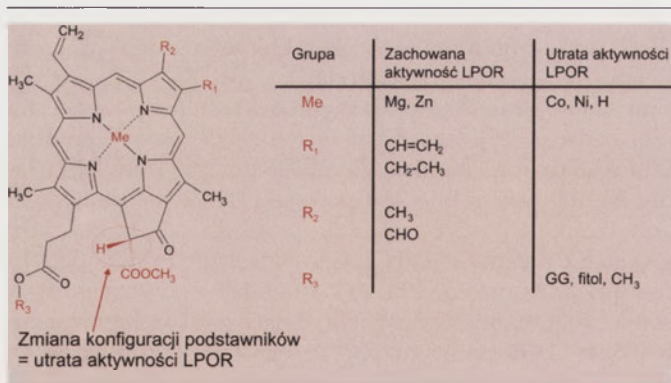
SPECYFICZNOŚĆ SUBSTRATOWA LPOR

Wykorzystując oczyszczony enzym izolowany z etiolowanych siewek wykazano, że substratem dla LPOR mogą być analogi Pchlid *a* różniące się podstawnikami w pierścieniach A i B układu porfirynowego (Ryc. 3), w tym Pchlid *b* oraz MV-Pchlid i DV-Pchlid [3,4]. W doświadczeniach z wykorzystaniem rekombinowanego białka LPOR wykazano, że poszczególne etapy reakcji fotoredukcji zachodzą podobnie dla MV-Pchlid i DV-Pchlid, choć parametry kinetyczne (k_M i V_{max}) nieco się różnią [41]. Modyfikacja pierścieni C i D cząsteczki protochlorofilidu (Ryc. 3) uniemożliwia zajście tej reakcji. Istotnym dla utrzymania aktywności elementem budowy cząsteczki protochlorofilidu jest rodzaj metalu w układzie porfirynowym. Szczegółową listę przebadanych pochodnych protochlorofilidu, które są akceptowane lub nieakceptowane jako substrat przez LPOR przedstawiono na Ryc. 3.

Reakcja katalizowana przez LPOR zachodzi tylko dla β -NADPH [11], a nie zachodzi dla NADH. Z zastosowaniem rekombinowanego białka wykazano, że protochlorofilid ulega związaniu z LPOR dopiero po uprzednim związaniu przez to białko cząsteczki NADPH [34].

LPOR, PROTOCHLOROFILID, A STRUKTURA ETIOPLASTÓW

W etiolowanych siewkach okrytonasiennych proplastydy różnicują do etioplastów, zawierających charakterystycznie ułożone błony wewnętrzne: ciało prolamellarne (PLB) będące lipidową strukturą parakrystaliczną o wysokiej symetrii, otoczone układem błon przypominającym tylakoidy stromy zwanych protylakoidami (PT) [22,42]. PLB obecne są również w chloroplastach młodych liści w okresie zaciemnienia



Rycina 3. Specyficzność substratowa LPOR. Dalsze objaśnienia w tekście.

(np. w nocy), choć ich rola nie została dotychczas poznana [22,43]. Wykazano też ich obecność w wewnętrznych warstwach liści kapusty *Brassica oleracea* [44] i młodych pąkach drzew [45]. PLB charakteryzuje większa proporcja lipidów do białek, oraz większa względna zawartość MGDG w porównaniu do PT [22]. Granica między tymi strukturami wydaje się być umowna, należy raczej traktować je jako dynamiczny układ błon, którego organizacja strukturalna zależy od gatunku rośliny, wieku i warunków hodowli [22].

Dominującym białkiem w PLB jest LPOR [22,46], która występuje w fotoaktywnych kompleksach Pchlid:LPO-R:NADPH [3,8,22]. Kompleksy te zgromadzone w PLB tworzą agregaty (oligomery) o różnej wielkości [3,8], które charakteryzują się różnym położeniem maksimum fluorescencji w temperaturze 77K, w zależności od wielkości agregatów (własności spektralne Pchlidu w etioplastach omówiono poniżej). Dokładne rozmieszczenie tych agregatów w strukturze PLB i ich wzajemne ułożenie nie zostało dotychczas wyjaśnione. Nieliczne dane wskazują na to, że LPOR jest raczej białkiem powierzchniowym; w jego sekwencji nie znaleziono domeny transbłonowej [11]. Dotychczas nie wyjaśniono w jaki sposób LPOR wiąże się z błonami. Wykazano na przykład [47], że w układzie heterologicznym LPOR z grochu wiąże się z oczyszczonymi błonami PLB lub protylakoidu z pszenicy tylko w obecności NADPH i tylko wtedy, gdy rejon białka wiążący NADPH nie jest zmutowany. Na podstawie badań z zastosowaniem dichroizmu kołowego wykazano sprzężenie ekscytonowe między cząsteczkami Pchlidu w oligomerach Pchlid:LPOR:NADPH [48]. Uważa się, że LPOR w takich oligomerach stabilizuje strukturę PLB; zatem wzrost intensywności fluorescencji przy długości fali w zakresie 655-657 nm, może być wskaźnikiem występowania regularnych struktur PLB w etioplastach [22,47,49-50]. Należy jednak wspomnieć, że w przypadku mutanta z zaburzonym procesem biosyntezy karotenoidów nie wykryto struktury PLB pomimo zarejestrowania sygnału fluorescencji protochlorofilidu przy 655 nm [51].

Oprócz PORA w dobrze oczyszczonej frakcji PLB z etioloowanych siewek pszenicy wykazano obecność 64 białek związanych ze szlakiem biosyntezy barwników (w tym PORB i syntazy chlorofilu), fazą świetlną fotosyntezy i cyklem Calvina, białek opiekuńczych oraz związanych z aparatem biosyntezy białek [46]. Obecność licznych białek uczestniczących w reakcjach fazy świetlnej fotosyntezy wskazuje na rolę błon PLB w tworzeniu błon tylakoidów w

czasie deetiolacji. Względna proporcja PORA:PORB w PLB izolowanym z etioloowanych siewek wydaje się być zależna od procedury izolacji [10]. Skład barwnikowy PLB obejmuje protochlorofilid oraz karotenoidy z przewagą luteiny i anteraksantyny [52].

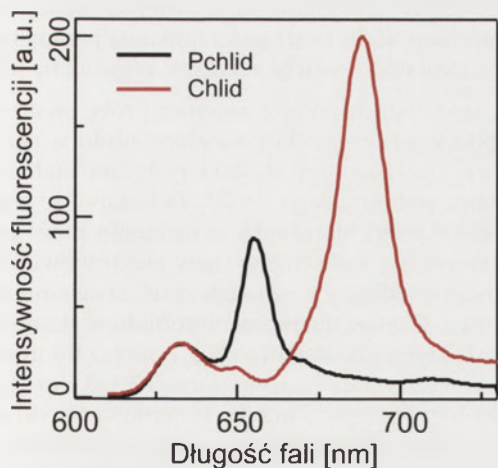
Długo uważano, że funkcją PLB jest przechowanie lipidów i barwników potrzebnych do formowania błon tylakoidów zawierających kompleksy fotosyntetyczne [22]. Obecnie sugeruje się, że rozmieszczenie fotoaktywnych kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH w postaci agregatów w regularnej strukturze PLB chroni również chlorofilid w warunkach nadmiernego oświetlenia [3,15,53].

WŁAŚCIWOŚCI SPEKTRALNE PROTOCHLOROFILIDU W ETIOLOWANYCH SIEWKACH I W IZOLOWANYCH BŁONACH ETIOPLASTÓW

Spektrofotometria absorpcyjna i fluorescencyjna jest powszechnie stosowanym narzędziem analitycznym do monitorowania procesu etiolacji i wywołanej światłem deetiolacji roślin okrytonasiennych [8,9]. Aby uniknąć przypadkowej fotoredukcji protochlorofilidu wszelkie manipulacje związane z przygotowaniem próbki wykonuje się w słabym zielonym świetle, którego zakres spektralny odpowiada minimum absorpcji cząsteczki tego związku, a pomiary wykonuje się w temperaturze 77 K, w której reakcja ta nie zachodzi. W niniejszej pracy skoncentrowano się głównie na opisie własności fluorescencyjnych protochlorofilidu. Za interesowanego czytelnika odsyłamy do cytowanych prac przeglądowych [3,7,8,22] celem uzupełnienia informacji na temat własności absorpcyjnych tego związku.

W typowym widmie fluorescencji otrzymanym dla etioloowanych siewek wyróżnić można dwa szczyty z maksimum przy długości fali 630 nm i 655-657 nm. Względna intensywność fluorescencji obu pasm zmienia się w zależności od gatunku rośliny, wieku etioloowanych siewek, czynników stresowych itp. Podobne widmo można otrzymać dla izolowanych błon wewnętrznych etioplastów (Ryc. 4), natomiast przypadku izolowanych PLB względna intensywność pasma fluorescencji z maksimum przy długości fali w zakresie 655-657 nm jest kilkukrotnie wyższa. Ekspozycja etioloowanego liścienia na błysk światła o czasie trwania rzędu milisekund pozwala wyróżnić dwie pule protochlorofilidu. Szczyt fluorescencji przy długości fali 655-657 nm pochodzi od protochlorofilidu fotoaktywnego czyli związanego w kompleksy z LPOR i NADPH, i znika po zadziaaniu krótkotrwałym błyskiem światła. Zamiast niego pojawia się szczyt fluorescencji z maksimum przy długości fali w zakresie 688-692 nm pochodzący od nowo utworzonego chlorofilidu (Ryc. 4), który również pozostaje w kompleksie z LPOR i NADP⁺. Osobną pulę Pchlidu stanowi tzw. Pchlid niefotoaktywny posiadający maksimum fluorescencji w 630 nm, który nie ulega fotoredukcji w tych warunkach, dlatego w widmie fluorescencji po oświetleniu błyskiem światła nadal obserwuje się pasmo fluorescencji z maksimum przy długości fali 630 nm (Ryc. 4).

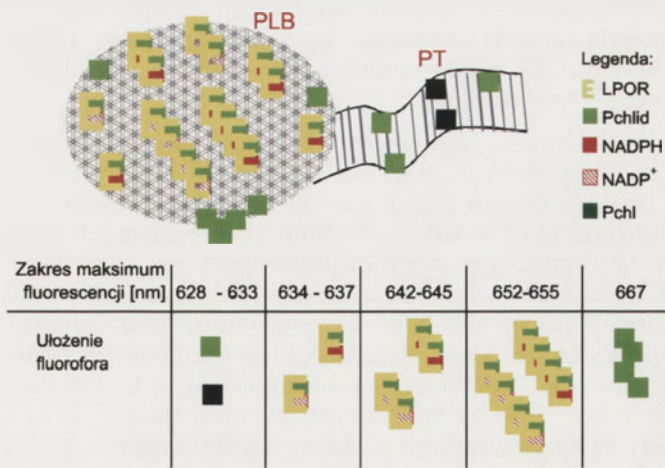
Dokładna analiza składowych gaussowskich widm fluorescencji liści kilku gatunków roślin oraz izolowanych błon etioplastów pozwoliła na wyróżnienie czterech powszechnie



Rycina 4. Widmo fluorescencji etioplastów liści pszenicy zmierzone w temperaturze 77 K (linia czarna) oraz widmo uzyskane po oświetleniu etioplastów błyskiem światła (~ms, linia czerwona). Próbkę wzbudzano światłem o długości fali 440 nm.

występujących form Pchlidu: Pchlid_{630'}, Pchlid_{645'}, Pchlid₆₅₅ i Pchlid_{667'}, gdzie wskaźnik dolny oznacza położenie maksimum fluorescencji w temperaturze 77 K odpowiedniej składowej gaussowskiej widma [3,54]. Formy spektralne Pchlid₆₅₅ i Pchlid₆₄₅ pochodzą od fotoaktywnych kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH zgromadzonych w PLB w postaci oligomerów o różnym stopniu agregacji. Należy podkreślić, że forma Pchlid₆₄₅ zazwyczaj jest niewidoczna w widmie fluorescencji etiolowanego materiału (Ryc. 4), a jej obecność można stwierdzić na podstawie rozkładu widma na składowe gaussowskie [54]. Pchlid₆₃₀ obserwowany zarówno w PLB, jak i protylakoidach pochodzi od protochlorofilidu oraz niewielkiej ilości protochlorofilu (Pchl) niezwiązanych w fotoaktywne kompleksy z LPOR. Pchlid₆₆₇ pochodzi prawdopodobnie od agregatów Pchlidu. Ostatnio sugeruje się obecność większej liczby form protochlorofilidu w etiolowanym materiale roślinnym; co najmniej pięć form protochlorofilidu niefotoaktywnego i trzy formy protochlorofilidu fotoaktywnego [7,8]. Prawdopodobne pochodzenie różnych form spektralnych protochlorofilidu i zakres położenia odpowiednich maksimum fluorescencji przedstawiono na Ryc. 5. Spektralna heterogenność protochlorofilidu jest wynikiem [3,7,22,48]: (1) różnic w wielkości oligomerów kompleksów Pchlid:LPO-R:NADPH, (2) tego czy w kompleksach protochlorofilidu i LPOR występuje NADPH lub NADP⁺, co wywołuje niewielkie przesunięcie maksimum fluorescencji. W pierwszym przypadku kompleksy Pchlid:LPOR:NADPH są fotoaktywne, w drugim fotoredukcja protochlorofilidu nie zachodzi. Dodatkowo heterogenność spektralna jest skutkiem (3) obecności protochlorofilidu i Pchl w formie niezwiązanej z LPOR.

Zanik fluorescencji protochlorofilidu ma charakter złożony zarówno w etiolowanych liściach [55], jak i izolowanych błonach wewnętrznych etioplastów [56]. Na podstawie analizy porównawczej składowych gaussowskich widma fluorescencji i czasu zaniku fluorescencji stwierdzono, że Pchlid₆₅₅ charakteryzuje się występowaniem dwóch składowych 0,25 ns i 2-5 ns oraz 0,7 ns i 4,0 ns odpowiednio w temperaturze 288 i 77 K [56]. Pchlid₆₃₃ posiada charakterystyczny czas zaniku fluorescencji rzędu 5-5,5 ns. Podobne czasy zaniku fluorescencji obserwowano dla etiolowanych liści czterech roślin w temperaturze 77 K, ale dodatkowo obserwowano krótką składową



Rycina 5. Model różnych spektralnych form protochlorofilidu obserwowanych w etiolowanym materiale roślinnym z uwzględnieniem ich występowania w PLB i PT. Kompleksy Pchlid:LPOR:NADPH umownie przedstawiono w formie monomerów, dimerów i tetramerów, choć dokładna ich stechiometria nie jest znana.

czasu zaniku fluorescencji dla Pchlidu₆₃₃ [55], co odzwierciedla transfer energii wzbudzenia między cząsteczkami protochlorofilidu [3]. Uzyskane wyniki stanowią przybliżenie stanu rzeczywistego, gdyż mnogość form spektralnych protochlorofilidu i niewielka różnica między położeniem ich pasm absorpcji i emisji, jak również przekaz energii wzbudzenia uniemożliwiają selektywne wzbudzenie i pomiar zaniku fluorescencji jednej tylko formy protochlorofilidu.

STABILNOŚĆ FOTOAKTYWNEGO PROTOCHLOROFILIDU I STRUKTURY PLB W IZOLOWANYCH BŁONACH ETIOPLASTÓW

Stabilność długofalowej formy Pchlid_{655'} pochodzącej od zagregowanych fotoaktywnych kompleksów Pchlid:LPO-R:NADPH w izolowanych błonach etioplastów, silnie zależy od stężenia NADPH [57] oraz temperatury [58]. Podczas ogrzewania izolowanych błon wewnętrznych etioplastów od temperatury 278 K (5°C) obserwowano stałą intensywność fluorescencji przy długości fali 655 nm (Pchlid₆₅₅), następnie w przedziale temperatur między 298-311 K (25-38°C) wolny spadek tej intensywności z jednoczesnym wzrostem intensywności fluorescencji przy 630-633 nm (Pchlid₆₃₀). Przy dalszym podnoszeniu temperatury obserwowano szybkie zmiany tych intensywności do osiągnięcia temperatury 323 K (50°C), przy której następowała ostateczna, nieodwracalna utrata fotoaktywności preparatu [58]. Jony metali ciężkich również powodują przekształcenie Pchlid₆₅₅ do nieulegającego redukcji pod wpływem błysku światła Pchlid₆₃₀ [59,60] i mogą przyczyniać się do zburzenia regularnej struktury PLB [61]. Podobnie działa obniżenie pH roztworu oraz obecność niektórych soli nieorganicznych np. KJ, KCl, MgCl₂ [50,62]. Dodanie NADPH w niektórych przypadkach częściowo hamuje obserwowane zmiany [59,61]. Stosowane jony metali ciężkich mogą oddziaływać ze składnikami fotoaktywnych kompleksów Pchlid:LPO-R:NADPH w zależności od ich natury chemicznej poprzez (1) utlenienie NADPH; (2) oddziaływanie z grupami SH reszt Cys w białku LPOR, niezbędnych do utrzymania jego aktywności katalitycznej [24]; (3) degradację protochlorofilidu w kompleksach; (4) oddziaływanie ze składnikami błony [59-61]. W innej pracy zasugerowano, że bezpośrednią przyczyną

degradacji PLB w wyniku działania soli lub obniżonego pH może być zmiana właściwości elektrostatycznych błon PLB, a nie oddziaływanie bezpośrednie ze składnikami fotoaktywnych kompleksów [62].

Wielu autorów sugeruje, że wysoki stosunek intensywności fluorescencji przy długości fali 655 nm i 630 nm, świadczący o obecności dużych ilości formy Pchlid₆₅₅, może być wskaźnikiem utrzymania regularnej struktury PLB, tym samym dobrej jakości uzyskanego preparatu izolowanych błon wewnętrznych etioplastów lub oczyszczonych PLB [22,47,50,57,61,63]. Ostatnio jednak zostało to zakwestionowane przez badaczy [62], którzy zaobserwowali, że stosując milimolowe stężenia soli (m.in. KJ, KCl, MgCl₂) można doprowadzić do zburzenia regularnej struktury PLB, bez zmian widma absorpcji preparatu PLB izolowanych z etiolowanych liści kukurydzy (*Zea mays*). Wynik ten wymaga potwierdzenia dla innych preparatów i dokładnej analizy wpływu poszczególnych składników stosowanej przez autorów mieszaniny reakcyjnej, gdyż w innych pracach [60,61] pokazano, że podobne stężenia soli powodowały jednocześnie zburzenie struktury PLB, jak i zanik fluorescencji Pchlid₆₅₅. Ustalenie czynników niezbędnych do zachowania regularnej struktury PLB i zdolności do fotoredukcji zgromadzonego w nich protochlorofilidu, jak również rozpracowanie mechanizmu rozpadu PLB i zaniku fotoredukowalności wymaga jeszcze wyjaśnienia.

Dotychczas ukazały się dwie prace dotyczące próby odtworzenia Pchlid₆₅₅ w preparacie zawierającym jedynie krótkofalowe formy protochlorofilidu, charakteryzujące się maksimum fluorescencji przy długości fali 630–640 nm. Pojawienie się fluorescencji Pchlid₆₅₅ i regularnych struktur PLB obserwowano w homogenacie epikotyli grochu (*P. sativum*) pod wpływem sacharozy i glicerolu [63]. Glicerol z dodatkiem lipidów plastydowych spowodował też przesunięcie maksimum fluorescencji w stronę fal dłuższych w przypadku fotoaktywnych kompleksów uzyskanych dla Zn-Pchlid i LPOR izolowanej z etioplastów owsa (*A. sativa*, [64]).

WŁAŚCIWOŚCI FOTOFIZYCZNE PROTOCHLOROFILIDU W UKŁADACH MODELOWYCH

Poznanie właściwości fotofizycznych protochlorofilidu w układach modelowych takich jak rozpuszczalniki organiczne, micelle, liposomy, filmy stanowi dobre odniesienie do warunków *in vivo*. Maksimum absorpcji protochlorofilidu w rozpuszczalnikach organicznych obserwowano w zakresie długości fal 433–451 nm dla pasma Soret i 623–633 nm dla pasma Q, natomiast maksimum fluorescencji występowało w zakresie 626–642 nm [65]. Przesunięcie Stokesa, zdefiniowane jako różnica między położeniem maksimum absorpcji w paśmie Q i maksimum fluorescencji, wynosiło 50–300 cm⁻¹, co świadczy o niewielkim wpływie oddziaływań niespecyficznych (zależnych od stałej dielektrycznej i współczynnika załamania światła) cząsteczek protochlorofilidu z cząsteczkami rozpuszczalnika. Czas zaniku fluorescencji zmieniał się w przedziale między 5,2 ± 0,1 ns dla dioksanu i 3,5 ± 0,1 ns dla metanolu, a ponadto był krótszy w rozpuszczalnikach protycznych niż w aprotycznych o podobnej polaryzowalności, np. etanolu i acetonie lub metanolu i acetonitrylu [65,66]. Dodatek wody do metanolu powodował dalsze skrócenie czasu zaniku fluorescencji i przesunięcie maksimum fluorescencji w stronę fal

dłuższych [65]. Wpływ wiązań wodorowych między cząsteczkami protochlorofilidu i rozpuszczalnika na parametry spektralne tego barwnika został teoretycznie wyjaśniony [67].

W ostatnich latach podjęto również próbę analizy dynamiki wzbudzonej cząsteczki protochlorofilidu w skali pikosekundowej i wyznaczono charakterystyczne stałe czasowe zaniku stanu wzbudzonego [68–70]. Pokazano, że wzbudzona cząsteczka protochlorofilidu w metanolu może osiągnąć dwa zrelaksowane wzbudzone stany elektronowe: stan S₁ i stan S_{1CT} odpowiadający wewnątrzcząsteczkowemu rozdzielowi ładunku. Cząsteczka protochlorofilidu w stanie S₁ może powrócić do stanu podstawowego S₀ poprzez fluorescencję z charakterystyczną stałą czasową zaniku 3,4–3,5 ns [65,69–71] lub może ulegać przejściu międzysystemowemu do stanu T₁ [70]. W rozpuszczalniku niepolarnym (cykloheksan) obserwowano jedynie fluorescencję związaną z przejściem S₁→S₀ i nie obserwowano stanu S_{1CT}. Stałe czasowe deekscytacji stanu S_{1CT} wyznaczone w metanolu [71] są zgodne ze stałymi kinetyki reakcji fotoredukcji protochlorofilidu [5], co jest podstawą do postawienia hipotezy o udziale stanu S_{1CT} wzbudzonego protochlorofilidu w reakcji fotoredukcji Pchlid→Chlid.

PODSUMOWANIE

W niniejszym artykule przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat reakcji fotoredukcji Pchlid→Chlid charakterystycznej dla roślin okrytonasiennych. Rośliny te, stojące na szczycie ewolucyjnym królestwa roślin, prowadzą biosyntezę chlorofilidu w sposób zależny od światła, a jednocześnie reakcja fotoredukcji protochlorofilidu stanowi jeden ze sposobów regulacji światłem biosyntezy aparatu fotosyntetycznego i rozwoju rośliny. Dlatego wyjaśnienie mechanizmu tej reakcji i wywoływanych przezeń zmian w strukturze plastydów jest niezbędne do zrozumienia złożonego procesu wzrostu roślin. Prowadzone obecnie badania można pogrupować następująco: (1) badanie nad białkiem LPOR i mechanizmem reakcji którą katalizuje, (2) wyjaśnienie związku przyczynowo-skutkowego między strukturą błon wewnętrznych etioplastów, a zawartością LPOR i Pchlidu oraz ich wzajemnym ułożeniem i oddziaływaniem, (3) wyjaśnienie mechanizmów przemian indukowanych światłem. Znanych jest coraz więcej elementów tej mozaiki, ale jej złożenie w całość w chwili obecnej nie jest możliwe.

PIŚMIENICTWO

1. Willows RD (2003) Biosynthesis of chlorophylls from Protoporphyrin IX. *Nat Prod Rep* 20: 327–334
2. Masuda T (2008) Recent overview of the Mg branch of the tetrapyrrole biosynthesis leading to chlorophylls. *Photosynth Res* 96: 121–143
3. Schoefs B, Franck F (2003) Protochlorophyllide reduction: mechanisms and evolution. *Photochem Photobiol* 78: 543–557
4. Masuda T, Takamiya K (2004) Novel insights into the enzymology, regulation and physiological functions of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in angiosperms. *Photosynth Res* 81: 1–29
5. Heyes DJ, Hunter CN (2005) Making light work of enzyme catalysis: protochlorophyllide oxidoreductase. *Trends Plant Sci* 30: 642–649
6. Sytina OA, Heyes DJ, Hunter CN, Groot ML (2009) Ultrafast catalytic processes and conformational changes in the light-driven enzyme protochlorophyllide oxidoreductase (POR). *Biochem Soc Trans* 37: 387–391
7. Schoefs B (2001) The protochlorophyllide-chlorophyllide cycle. *Photosynth Res* 70: 257–271

8. Schoefs B (2005) Protochlorophyllide reduction – what is new in 2005? *Photosynthetica* 43: 329-343
9. Belyaeva OB, Litvin FF (2007) Photoactive pigment-enzyme complexes of chlorophyll precursor in plant leaves. *Biochemistry (Moscow)* 72: 1458-1477
10. Bollivar DW (2006) Recent advances in chlorophyll biosynthesis. *Photosynth Res* 90: 173-194
11. Bereza B, Kubiak A, Leluk A, Hendrich W (2003) Fotoenzym oksydo-reduktaza: NADPH-protochlorofilid (LPOR) – klucz do biosyntezy chlorofilu. *Postepy Biochem* 49: 46-55
12. Eckhardt U, Grimm B, Hörtensteiner S (2004) Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Mol Biol* 56: 1-14
13. Rebeiz CA, Ioannides IM, Kolossov V, Kopetz KJ (1999) Chloroplast biogenesis 80. Proposal of a unified multibranched chlorophyll a/b biosynthesis pathway. *Photosynthetica* 36: 117-128
14. Aronsson H, Sundqvist C, Dahlin C (2003) POR hits the road: import and assembly of a plastid protein. *Plant Mol Biol* 51: 1-7
15. Yang J, Cheng Q (2004) Origin and evolution of the light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase (LPOR) genes. *Plant Biol* 6: 537-544
16. Armstrong GA, Runge S, Frick G, Sperling U, Apel K (1995) Identification of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B: a branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 108: 1505-1517
17. Oosawa N, Masuda T, Awai K, Fusada N, Shimada H, Ohta H, Takamiya K (2000) Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 474: 133-136
18. Su Q, Frick G, Armstrong G, Apel K (2001) POR C of *Arabidopsis thaliana*: a third light- and NADPH-dependent protochlorophyllide oxidoreductase that is differentially regulated by light. *Plant Mol Biol* 47: 805-813
19. Holtorf H, Reinbothe S, Reinbothe C, Bereza B, Apel K (1995) Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3254-3258
20. Spano AJ, He Z, Michel H, Hunt DF, Timko MP (1992) Molecular cloning, nuclear gene structure, and developmental expression of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Mol Biol* 18: 967-972
21. Fusada N, Masuda T, Kuroda H, Shiraishi T, Shimada H, Ohta H, Takamiya K (2000) NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in cucumber is encoded by a single gene and its expression is transcriptionally enhanced by illumination. *Photosynth Res* 64: 147-154
22. Sundqvist C, Dahlin C (1997) With chlorophyll pigments from prolamellar bodies to light-harvesting complexes. *Physiol Plant* 100: 748-759
23. Baker ME (1994) Protochlorophyllide reductase is homologous to human carbonyl reductase and pig 20-beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem J* 300: 605-607
24. Wilks HM, Timko MP (1995) A light-dependent complementation system for analysis of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase: Identification and mutagenesis of two conserved residues that are essential for enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 724-728
25. Griffiths WT (1978) Reconstruction of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes. *Biochem J* 174: 681-692
26. Lebedev N, Karginova O, McIvor W, Timko MP (2001) Tyr275 and Lys279 stabilize NADPH within the catalytic site of NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductase and are involved in the formation of the enzyme photoactive state. *Biochemistry* 40: 12562-12574
27. Townley HE, Griffiths WT, Nugent JP (1998) A reappraisal of the mechanism of the photoenzyme protochlorophyllide reductase based on studies with the heterologously expressed protein. *FEBS Lett* 422: 19-22
28. Heyes DJ, Hunter CN (2002) Site-directed mutagenesis of Tyr-189 and Lys-193 in NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from *Synechocystis*. *Biochem Soc Trans* 30: 601-604
29. Townley H E, Sessions RB, Clarke AR, Dafforn TR and Griffiths WT (2001) Protochlorophyllide oxidoreductase: a homology model examined by site directed mutagenesis. *Proteins* 44: 329-335
30. Lebedev N, Timko MP (1998) Protochlorophyllide photoreduction. *Photosynth Res* 58: 5-23
31. Begley TP, Young H (1989) Protochlorophyllide reductase. 1. Determination of the regiochemistry and the stereochemistry of the reduction of protochlorophyllide to chlorophyllide. *J Amer Chem Soc* 111: 3095-3096
32. Lebedev N, Timko MP (1999) Protochlorophyllide oxidoreductase B-catalysed protochlorophyllide photoreduction *in vitro*: insight into the mechanism of chlorophyll formation in light adapted plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9954-9959
33. Heyes DJ, Sakuma M, Scrutton NS (2007) Laser excitation studies of the product release steps in the catalytic cycle of the light-driven enzyme protochlorophyllide oxidoreductase. *J Biol Chem* 282: 32015-32020
34. Heyes DJ, Menon BRK, Sakuma M, Scrutton NS (2008) Conformational events during ternary enzyme-substrate complex formation are rate limiting in the catalytic cycle of the light-driven enzyme protochlorophyllide oxidoreductase. *Biochemistry* 47: 10991-10998
35. Sytina OA, Heyes DJ, Hunter CN, Alexandre MT, van Stokkum IHM, van Grondelle R, Groot ML (2008) Conformational changes in an ultrafast light-driven enzyme determine catalytic activity. *Nature* 456: 1001-1004
36. Belayeva OB, Timofeev KN, Litvin FF (1988) The primary reaction in the protochlorophyll(ide) photoreduction as investigated by optical and ESR spectroscopy. *Photosynth Res* 15: 274-256
37. Belayeva OB, Griffiths WT, Kovalev JV, Timofeev KN, Litvin FF (2001) Participation of free radicals in photoreduction of protochlorophyllide to chlorophyllide in an artificial pigment-protein complex. *Biochemistry (Moscow)* 66: 173-177
38. Raskin VI, Schwartz A (2002) The charge transfer complex between protochlorophyllide and NADPH: an intermediate in protochlorophyllide photoreduction. *Photosynth Res* 74: 181-186
39. Heyes DJ, Heathcote P, Rigby SEJ, Palacios MA, van Grondelle R, Hunter CN (2006) The first catalytic step of the light-driven enzyme protochlorophyllide oxidoreductase proceeds via a charge transfer complex. *J Biol Chem* 281: 26847-26853
40. Menon BRK, Davison PA, Hunter CN, Scrutton NS, Heyes DJ (2010) Mutagenesis alters the catalytic mechanism of the light-driven enzyme protochlorophyllide oxidoreductase. *J Biol Chem* 285: 2113-2119
41. Heyes DJ, Kruk J, Hunter CN (2006) Spectroscopic and kinetic characterization of the light-dependent enzyme protochlorophyllide oxidoreductase (POR) using monovinyl and divinyl substrates. *Biochem J* 394: 243-248
42. Solymosi K, Schoefs B (2008) Prolamellar body: a unique plastid compartment, which does not only occur in dark-grown leaves, W: Schoefs B (red) *Plant Cell Compartments – Selected Topics, Research Sign Post, India, str. 152-202*
43. Schoefs B, Franck F (2008) The photoenzymatic cycle of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase in primary bean leaves (*Phaseolus vulgaris*) during the first days of photoperiodic growth. *Photosynth Res* 96: 15-26
44. Solymosi K, Martinez K, Kristóf Z, Sundqvist C, Böddi B (2004) Plastid differentiation and chlorophyll biosynthesis in different leaf layers of white cabbage (*Brassica oleracea* cv. capitata). *Physiol Plantarum* 121: 520-529
45. Solymosi K, Boka K, Böddi B (2006) Transient etiolation: protochlorophyll(ide) and chlorophyll forms in differentiating plastids of closed and breaking leaf buds of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*). *Tree Physiol* 26: 1087-1096
46. Blomqvist LA, Ryberg M, Sundqvist C (2008). Proteomic analysis of highly purified prolamellar bodies reveals their significance in chloroplast development. *Photosynth Res* 96: 37-50
47. Engdahl S, Aronsson H, Sundqvist C, Timko MP, Dahlin C (2001) Association of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR) with isolated etioplast inner membranes from wheat. *Plant J* 27: 297-304

48. Böddi B, Lindsten A, Ryberg M, Sundqvist C (1989) On the aggregational states of protochlorophyllide and its protein complexes in wheat etioplasts. *Physiol Plant* 76: 135-143
49. Franck F, Sperling U, Frick G, Pochert B, van Cleve B, Apel K, Armstrong GA (2000) Regulation of etioplast pigment-protein complexes, inner membrane architecture, and protochlorophyllide *a* chemical heterogeneity by light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B. *Plant Physiol* 124: 1678-1696
50. Selstam E, Schelin J, Brain T, Williams WP (2002) The effects of low pH on the properties of protochlorophyllide oxidoreductase and the organization of prolamellar bodies of maize (*Zea mays*). *Eur J Biochem* 269: 2336-2346
51. Park H, Kreunen SS, Cuttriss AJ, DellaPenna D, Pogson BJ (2002) Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation and photomorphogenesis. *Plant Cell* 14: 321-332
52. Ouazzani Chahdi MA, Schoefs B, Franck F (1998) Isolation and characterization of photoactive complexes of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from wheat. *Planta* 206: 673-680
53. Erdei N, Barta C, Hideg E, Böddi B (2005) Light-induced wilting and its molecular mechanism in epicotyls of dark-germinated pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Plant Cell Physiol* 46: 185-191
54. Böddi B, Ryberg M, Sundqvist C (1992) Identification of four universal protochlorophyllide forms in dark-grown leaves by analyses of the 77 K fluorescence emission spectra. *J Photochem Photobiol B: Biol* 12: 389-401
55. Myśliwa-Kurdziel B, Amirjani MR, Strzałka K, Sundqvist C (2003) Fluorescence lifetimes of protochlorophyllide in plants with different proportions short-wavelength and long-wavelength protochlorophyllide forms. *Photochem Photobiol* 78: 205-215
56. Myśliwa-Kurdziel B, Franck F, Strzałka K (1999) Analysis of fluorescence lifetime of protochlorophyllide and chlorophyllide in isolated etioplast membranes measured from multifrequency cross-correlation phase fluorometry. *Photochem Photobiol* 70: 616-623
57. Ryberg M, Sundqvist C (1988) The regular ultrastructure of isolated prolamellar bodies depends on the presence of membrane-bound NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. *Physiol Plant* 73: 218-226
58. Myśliwa-Kurdziel B, Franck F, Oazani Chahdi MA, Strzałka K (1999) Changes in endothermal transitions associated with light-induced chlorophyllide formation, as investigated by differential scanning calorimetry. *Physiol Plant* 107: 230-239
59. Myśliwa-Kurdziel B, Strzałka K (2005) Influence of Cd(II), Cr(VI) and Fe(III) on early steps of deetiolation process in wheat: fluorescence spectral changes of protochlorophyllide and newly formed chlorophyllide. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 199-207
60. Solymosi K, Lenti K, Myśliwa-Kurdziel B, Fidy J, Strzałka K, Böddi B (2004) Hg²⁺ reacts with different components of the NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductase Macrod domains. *Plant Biol* 6: 358-363
61. Solymosi K, Myśliwa-Kurdziel B, Boka K, Strzałka K, Böddi B (2006) Disintegration of the prolamellar body structure at high concentrations of Hg²⁺. *Plant Biol* 8: 627-635
62. Selstam E, Schelin J, Williams WP, Brain APR (2007) Structural organisation of prolamellar bodies (PLB) isolated from *Zea mays*. Parallel TEM, SAXS and absorption spectra measurements on samples subjected to freeze-thaw, reduced pH and high-salt perturbation. *Biochim Biophys Acta* 1768: 2235-2245
63. Kósa A, Márton Z, Solymosi K, Bóka K, Böddi B (2006) Aggregation of the 636 nm emitting monomeric protochlorophyllide form into flash-photoactive, oligomeric 644 and 655 nm emitting forms *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 1757: 811-820
64. Klement H, Oster U, Rüdiger W (2000) The influence of glycerol and chloroplast lipids on the spectral shifts of pigments associated with NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from *Avena sativa* L. *FEBS Lett* 480: 306-310
65. Myśliwa-Kurdziel B, Kruk J, Strzałka K (2004) Fluorescence lifetimes and spectral properties of protochlorophyllide in organic solvents and their relations to the respective parameters *in vivo*. *Photochem Photobiol* 79: 62-67
66. Myśliwa-Kurdziel B, Solymosi K, Kruk J, Böddi B, Strzałka K (2008) Solvent effects on fluorescence properties of protochlorophyll and its derivatives with various porphyrin side chains. *Eur Biophys J* 37: 1185-1193
67. Zhao GJ, Han KL (2008) Site-specific solvation of the photoexcited protochlorophyllide *a* in methanol: formation of the hydrogen-bonded intermediate state induced by hydrogen bond strengthening. *Biophys J* 94: 38-46
68. Dietzek B, Maksimenka R, Siebert T, Birckner E, Kiefer W, Popp J, Hermann G, Schmitt M (2004) Excited-state processes in protochlorophyllide *a*. A femtosecond time-resolved absorption study. *Chem Phys Lett* 397: 110-115
69. Dietzek B, Kiefer W, Popp J, Hermann G, Schmitt M (2006) Solvent effects on the excited-state processes of protochlorophyllide: A femtosecond time-resolved absorption study. *J Phys Chem B* 110: 4399-4406
70. Dietzek B, Kiefer W, Yartsev A, Sundström V, Schellenberg P, Grigaričius P, Hermann G, Popp J, Schmitt M (2006) The excited-state chemistry of protochlorophyllide *a*: A time-resolved fluorescence study. *Chem Phys Chem* 7: 1727-1733
71. Dietzek B, Tschierle S, Hermann G, Yartsev A, Pascher T, Sundström V, Schmitt M, Popp J (2008) Protochlorophyllide *a*: A Comprehensive Photophysical Picture. *Chem Phys Chem* 9: 1-8

Light-induced reduction of protochlorophyllide in angiosperms and chloroplast development

Beata Myśliwa-Kurdziel[✉], Kazimierz Strzałka

Department of Plant Physiology and Biochemistry, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, 7 Gronostajowa St., 30-387 Kraków, Poland

[✉]e-mail: b.mysliwa-kurdziel@uj.edu.pl

Key words: etiolation, NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase, photoenzyme, prolamellar body, protochlorophyllide

ABSTRACT

One of the final reactions of chlorophyll (Chl) biosynthesis, e.g: photoreduction of protochlorophyllide (Pchlid) to chlorophyllide (Chlid) is a light-induced process in Angiosperm plants and it is catalyzed by light-dependent NADPH-Pchlid oxidoreductase (1.3.1.33; LPOR). In darkness, Chl biosynthesis is stopped at the stage of Pchlid formation. Seedlings and plastids develop according to a different pattern than that observed in the light. Moreover, synthesis of some proteins of the photosynthetic apparatus is inhibited. Light triggers the Pchlid photoreduction to Chlid, which induces the cascade of biochemical reactions and structural changes leading to the assembly of thylakoid membranes. In the present paper, the current knowledge on LPOR protein, mechanism of Pchlid to Chlid photoreduction, the role of lipid structure in etioplasts as well as spectral properties of Pchlid in etiolated seedlings and model systems is summarized.

Aktywność chitynolityczna bakterii

STRESZCZENIE

Bakterie chitynolityczne pełnią istotną rolę w procesie degradacji chityny, jednego z najbardziej rozpowszechnionych biopolimerów w przyrodzie. Syntetyzują one białka enzymatyczne, katalizujące hydrolizę wiązań β -1,4-glikozydowych w polimerach chityny, przekształcając trudnodostępne źródło węgla, jakim jest chityna, w łatwo przyswajalne, niskocząsteczkowe związki. Badania nad bakteryjnymi enzymami chitynolitycznymi są stymulowane potrzebami medycyny, rolnictwa i niektórych gałęzi przemysłu. W oparciu o specyficzność substratową, a także na podstawie podobieństw sekwencji reszt aminokwasowych zaproponowano klasyfikację tych enzymów. Dzięki wykorzystaniu technik krystalografii rentgenowskiej i spektroskopii NMR poznano strukturę przestrzenną niektórych chitynaz, co umożliwiło częściowe wyjaśnienie ich mechanizmów katalizy enzymatycznej. Ogromny postęp technik biologii molekularnej umożliwia dalsze badania skupiające się obecnie w głównej mierze na regulacji i ekspresji genów warunkujących aktywność chitynolityczną bakterii.

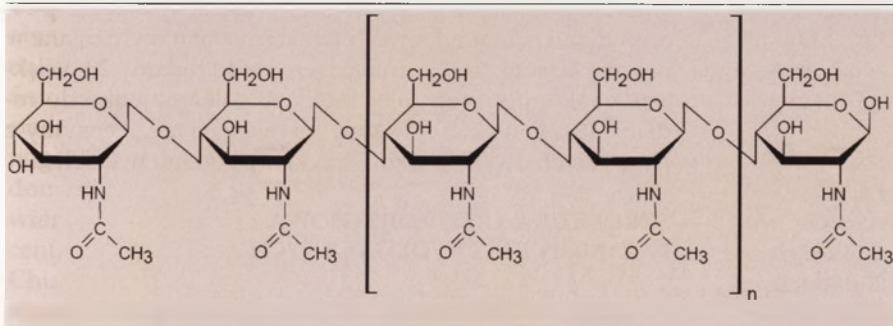
WPROWADZENIE

Wiele organizmów syntetyzuje enzymy chitynolityczne, które w zależności od fizjologii i potrzeb naturalnych producentów, pełnią różnorodne funkcje. Chitynolityczne mikroorganizmy takie jak bakterie i grzyby strzępkowe wykorzystują chitynę jako źródło składników pokarmowych [1]. Przeprowadzany przez drobnoustroje proces hydrolizy chityny zawartej w detrytusie jest istotnym elementem obiegu pierwiastków w przyrodzie, co wskazuje na ekologiczną rolę mikroorganizmów chitynolitycznych [2]. W przypadku organizmów, u których chityna jest elementem strukturalnym, enzymy chitynolityczne mogą brać udział w ich wzroście i morfogenezie. Mogą one umożliwiać m. in. podziały komórkowe drożdży, kiełkowanie zarodników i wzrost strzępek grzybów czy przeobrażenie owadów [3,4]. Roślinne enzymy degradujące chitynę stanowią ważny element mechanizmów obronnych skierowanych przeciwko patogenom grzybowym [5]. Analogiczną rolę zaproponowano dla chitynaz ssaków o aktywności przeciwgrzybowej [6]. Zdolność do syntezy enzymów chitynolitycznych stwierdzono również u wirusów, gdzie białka te zaliczane są do czynników wirulencji [7].

Wśród opisanych dotychczas enzymów chitynolitycznych szczególnym zainteresowaniem cieszą się białka pochodzenia bakteryjnego. Celem niniejszej pracy jest przegląd dotychczasowej wiedzy na temat charakterystyki biochemicznej i molekularnej oraz praktycznego zastosowania bakteryjnych enzymów chitynolitycznych w przemyśle, rolnictwie i medycynie.

CHARAKTERYSTYKA FIZYKOCHEMICZNA CHITYNY I JEJ WYSTĘPOWANIE

Chityna jest jednym z najpowszechniej występujących polimerów naturalnych. Jest to wysokocząsteczkowy, liniowy polisacharyd zbudowany z reszt



Rycina 1. Budowa homopolimeru chityny.

Elżbieta Saks

Urszula Jankiewicz[✉]

Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

[✉]Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: urszula_jankiewicz@sggw.pl

Artykuł otrzymano 29 czerwca 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 13 listopada 2009 r.

Słowa kluczowe: enzymy chitynolityczne, chityna, chitooligosacharydy, ChBD, biokontrola

β -N-acetylo-D-glukozyminy (GlcNAc) połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi (Ryc. 1), pod względem struktury chemicznej przypominający celulozę. Obecność grupy acetamidowej $-NHCOCH_3$ przy drugim węglu w pierścieniu reszty cukrowej sprawia, że chityna jest dla wielu mikroorganizmów nie tylko źródłem węgla, ale także azotu. Sąsiadujące cząsteczki liniowych polimerów połączone są wiązaniami wodorowymi, co warunkuje dużą wytrzymałość chityny. W zależności od pochodzenia i metody pozyskiwania charakteryzuje ją różny stopień deacetylacji. Często występuje w połączeniach z innymi polimerami, np. β -glukanami, czy białkami. W przyrodzie jest spotykana w trzech formach krystalicznych [8]:

- α -chityna – łańcuchy polimerów ułożone są antyrównolegle, co sprzyja tworzeniu się między nimi silnych wiązań wodorowych; najbardziej stabilna i najczęściej spotykana forma, nierozpuszczalna w wodzie;
- β -chityna – łańcuchy polimerów ułożone są równolegle, w większej odległości od siebie niż w formie α , co powoduje tworzenie słabszych wiązań wodorowych, wykazuje niewielkie powinowactwo do wody;
- γ -chityna – układ mieszany.

Tabela 1. Obecna i dawna nomenklatura enzymów chitynolitycznych według IUBMB.

Położenie hydrolizowanego wiązania	Nomenklatura wg IUBMB
Losowe wiązania w polimerach chityny	chitynaza EC.3.2.1.14
Terminalnie, przy nieredukującym końcu łańcucha	β -N-acetyloheksosaminidaza EC.3.2.1.52, dawniej: chitobiasa EC.3.2.1.29 β -N-acetyloglukozaminidaza EC.3.2.1.30

Ze względu na swoją trwałość chityna stanowi ważny składnik ścian komórkowych grzybów i glonów, jest także budulcem powłok nicieni i mięczaków oraz zewnętrznych szkieletów stawonogów, np. skorupiaków i owadów, którym, głównie jako kompleks chitynowo-białkowy wysyceny solami wapnia, zapewnia wysoką wytrzymałość mechaniczną. Nie stwierdzono jej występowania u roślin, kręgowców i organizmów prokariotycznych.

KLASYFIKACJA BAKTERYJNYCH BIAŁEK DEGRADUJĄCYCH CHITYNĘ

Rozkład chityny jest stopniowym procesem, w który zaangażowane są enzymy chitynolityczne należące do podklasy hydrolaz O-glikozydowych. Ich działanie może być wspomagane przez białka wiążące chitynę (CBP), które nie wykazują aktywności enzymatycznej, ale przyłączając się do chityny modyfikują jej strukturę krystaliczną, co zwiększa dostępność substratu dla enzymów [9].

W wyniku hydrolitycznej aktywności enzymów, od długich polimerów chityny odszczepiane są krótsze, rozpuszczalne w wodzie oligomery o małej masie cząsteczkowej, np. N-acetylochitoheksosa, N-acetylochitetraza, N-acetylochitotrioza. W kolejnych etapach N-acetylochitoooligosacharydy ulegają hydrolizie do poje-

dynczych cząsteczek β -N-acetylo-D-glukozyminy [10]. Końcowe produkty rozkładu chityny są następnie przekształcane przez bakterie w octan, amoniak i fruktozo-6-fosforan [11]. Ze względu na położenie hydrolizowanego wiązania, chitynazy (EC.3.2.1.14) można ogólnie podzielić na [12] endochitynazy, które hydrolizują losowe wiązania położone wewnątrz łańcucha, odszczepiając N-acetylochitoooligosacharydy i egzochitynazy – odszczepiają dwucukier chitobiozę (niektóre źródła podają, że także chitotriozę) od redukującego lub nieredukującego końca łańcucha chityny.

Dawniej wyróżniano dodatkowo dwa typy enzymów: chitobiazę odpowiedzialną za hydrolizę chitobiozy oraz β -N-acetyloglukozaminidazę, odszczepiającą monomery β -N-acetylo-D-glukozyminy. Obecnie, według nomenklatury ustalonej przez Komitet Nazewnictwa Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (IUBMB), oba typy enzymów zostały włączone do wspólnej grupy β -N-acetyloheksosaminidaz (EC.3.2.1.52) (Tab. 1)

W 1991 roku [13] zaproponowano podział hydrolaz glikozydowych na 35 rodzin w oparciu o podobieństwo ich sekwencji reszt aminokwasowych. Aktualizowana przez ostatnie lata baza informacji o enzymach [14], będąca kontynuacją tej listy, obecnie stanowi ważne uzupełnienie nomenklatury wprowadzonej przez IUBMB, której podstawą jest głównie specyficzność substratowa. Podobieństwo sekwencji reszt aminokwasowych i bezpośrednio z

nią związany sposób pofałdowania białek odzwierciedla cechy strukturalne enzymów i stanowi cenne źródło informacji przy wyjaśnianiu molekularnych mechanizmów działania oraz powiązań ewolucyjnych między poszczególnymi hydrolazami. Dotychczas wyróżniono 115 rodzin hydrolaz glikozydowych, w tym trzy, do których zalicza się enzymy chitynolityczne: rodzinę 18, 19 i 20. Enzymy zgrupowane w danej rodzinie posiadają charakterystyczne dla niej zachowane w ewolucji motywy w domenie katalitycznej. Rodzina 18 obejmuje endo- i egzochitynazy pochodzące z różnych źródeł takich jak wirusy, archaea, grzyby, rośliny, bezkręgowce i kręgowce, ale przeważają w niej enzymy bakteryjne. Chitynazy z rodziny 19 początkowo odnaleziono jedynie u roślin wyższych, a dopiero później u bakterii, głównie należących do rodzaju *Streptomyces*. β -N-acetyloglukozaminidazy i chitobiazę osobno wyróżniane w dawnej klasyfikacji obecnie włączono do rodziny 20. Większość bakterii syntetyzuje chitynazy należące tylko do rodziny 18, ale niektóre szczepy wytwarzają także enzymy z pozostałych dwóch rodzin. Przykłady podano w tabeli 2.

STRUKTURA TRZECIORZĘDOWA ENZYMÓW CHITYNOLITYCZNYCH

Dzięki wykorzystaniu technik krystalografii rentgenowskiej i spektroskopii NMR poznano trójwymiarowe

Tabela 2. Przykłady bakteryjnych enzymów chitynolitycznych należących do różnych rodzin hydrolaz glikozydowych.

Organizm	Enzym chitynolityczny	Rodzina	Piśmiennictwo
<i>Bacillus cereus</i> CH	ChiA, ChiB	18	[15]
<i>Burkholderia gladioli</i> CHB101	ChiA	18	[16]
	ChiB	19	[16]
<i>Serratia marcescens</i> 2170	ChiA, ChiB, ChiC	18	[17]
	Chb	20	[18]
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	ChiA, ChiB, ChiC, ChiD, ChiE, ChiH	18	[19]
	ChiG, ChiF	19	[19]
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> OPC-520	Chi30, Chi40	18	[20,21]
	Chi25, Chi35	19	[22]
	NagB, NagC	20	[23,24]
<i>Vibrio harveyi</i> B392	ChiA	18	[25]
	Chb	20	[26]

struktury niektórych bakteryjnych enzymów chitynolitycznych. Wszelkie informacje na ich temat zgromadzone są w powszechnie dostępnych, internetowych bankach danych, co umożliwia analizę porównawczą i identyfikację różnych domen zachowanych w ewolucji na podstawie znanej sekwencji reszt aminokwasowych badanego enzymu [27-29].

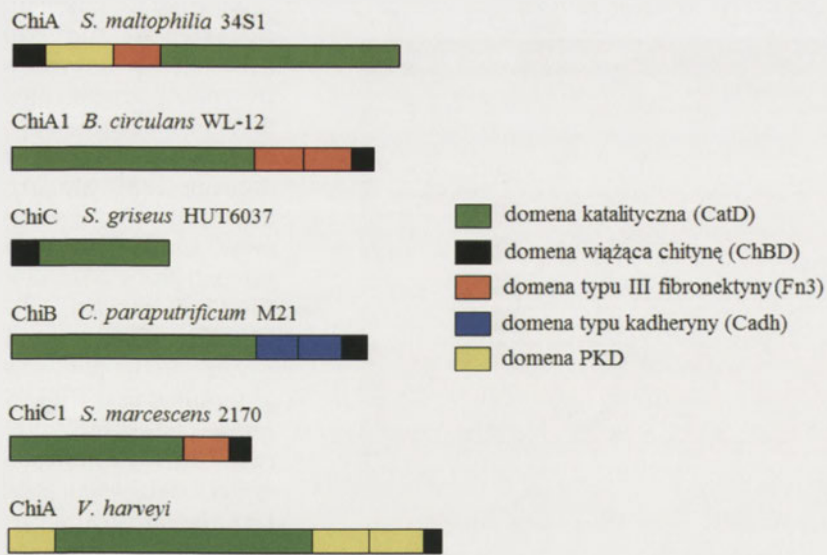
Opisane dotychczas białka enzymatyczne degradujące chitynę składają się z co najmniej jednej domeny białkowej. Główną rolę w procesie hydrolizy chityny odgrywa domena katalityczna enzymu (CatD), która zawiera zachowane w ewolucji motywy charakterystyczne dla 18, 19 lub 20 rodziny hydrolaz glikozydowych. Domeny katalityczne enzymów chitynolitycznych należących do różnych rodzin nie wykazują znaczących podobieństw w sekwencji reszt aminokwasowych. Różni je także struktura przestrzenna. Domeny katalityczne chitynaz z rodziny 19, jak np. ChiC *Streptomyces griseus* HUT6037 oraz ChiG *Streptomyces coelicolor* A3(2) są bogate w struktury α -helikalne [27,28], podczas gdy domena katalityczna chitynaz z rodziny 18, podobnie jak β -N-acetyloheksosaminidaz z rodziny 20, ma strukturę beczułki (β/α)₈, najczęściej z podłużną szczeliną tworzącą centrum aktywne enzymu. Uwzględniając filogenetyczne związki między domenami katalitycznymi chitynaz należących do rodziny 18 podzielono ją dalej na 3 podrodziny: A, B oraz C [29]. Do tej pory opublikowano dane o strukturze przestrzennej zaledwie kilku chitynaz bakteryjnych z rodziny 18, a mianowicie ChiA1 *Bacillus circulans* WL-12, ChiA i ChiB *Serratia marcescens* QMB1466 oraz ChiA *Vibrio harveyi*, przy czym każda z tych chitynaz należy do podrodziny A [30]. Domena katalityczna ChiA *Serratia marcescens* QMB1466 oraz ChiA *Vibrio harveyi* posiada insercję w postaci małej dodatkowej domeny $\alpha\beta$ pogłębiającej szczelinę centrum aktywnego [31,32], zaś domena katalityczna ChiA1 *Bacillus circulans* WL-12 zawiera dwie małe insercyjne domeny β [33]. W szczelinie centrum aktywnego ChiA *S. marcescens* QMB1466 oraz ChiA1 *B. circulans* WL-12 znajdują się reszty aminokwasów aromatycznych, które uczestniczą w procesie hydrolizy substratu [30].

Kolejną domeną charakterystyczną dla bakteryjnych enzymów chitynolitycznych jest domena wiążąca chitynę (ChBD). C-kończową domenę ChBD zidentyfikowano m.in. u enzymów ChiB *Clostridium paraputrificum* M21 [34], ChiA1 *B. circulans* WL-12 [35], ChiC *S. marcescens* 2170 [29], zaś N-terminalną u ChiC *S. griseus* HUT 6037 [27] czy ChiA *Stenotrophomonas maltophilia* 34S1 [36]. Badania z wykorzystaniem rekombinowanych chitynaz

pozbawionych ChBD wykazały wyraźny spadek wydajności wiązania różnych rodzajów chityny (nieprzetworzonej, koloidalnej, glikolowej), co wskazuje na kluczową rolę ChBD w tym procesie [34,35]. Chitynazy pozbawione ChBD nadal posiadały ograniczoną zdolność do wiązania substratu, co przypuszczalnie wynika z niewielkiego powinowactwa domeny katalitycznej do nieprzetworzonej chityny. W mechanizm wiązania chityny prawdopodobnie zaangażowane są reszty aminokwasów aromatycznych takich jak tryptofan czy tyrozyna, które są eksponowane na powierzchni ChBD [29,34].

Analiza porównawcza sekwencji reszt aminokwasowych chitynaz z sekwencjami innych białek wykazała, że wiele enzymów chitynolitycznych, między domeną katalityczną a domeną wiążącą chitynę, posiada rejony o wyraźnym podobieństwie sekwencji reszt aminokwasowych do modułu typu III fibronektyny [29,35,36], a także do domeny kadheryny [34]. Fibronektyna i kadheryna to eukariotyczne białka uczestniczące w procesach adhezji komórkowej, jednak rejony chitynaz bakteryjnych wykazujące podobieństwo sekwencji reszt aminokwasowych do ich modułów nie pełnią funkcji związanej z adhezją enzymu do substratu, a ich rola nie jest dotąd jednoznacznie wyjaśniona. ChiA1 *B. circulans* WL-12 posiada tandemowo powtórzone, złożone z 95 reszt aminokwasowych, sekwencje R-1 i R-2, homologiczne do modułów typu III fibronektyny. Ich usunięcie nie miało żadnego wpływu na zdolność do wiązania chityny, ale zauważalnie obniżyło chitynolityczną aktywność ChiA1 względem chityny koloidalnej, co może świadczyć o ich roli w degradacji chityny przez enzym już związany z substratem [35]. Podobnie jest w przypadku domen typu kadheryny u *C. paraputrificum* M21. Autorzy sugerują także strukturalną funkcję wyżej opisanych domen, polegającą na zapewnieniu optymalnej odległości i orientacji między CatD a ChBD.

Poza wyżej opisanymi bakteryjnymi enzymami chitynolitycznymi mogą zawierać inne domeny białkowe, jak np. domenę PKD [36], charakterystyczną dla policystyny, białka błony komórkowej zwierząt. Dotychczas nie wyjaśniono, jaką rolę



Rycina 2. Organizacja domen białkowych w przykładowych chitynazach bakterii [80,81].

domena PKD spełnia u bakterii. Organizację domen białkowych w przykładowych chitynazach bakteryjnych przedstawiono schematycznie na rycinie 2.

KATALITYCZNY MECHANIZM CHITYNAZ BAKTERYJNYCH

Proces degradacji chityny prowadzi do powstania produktów o dwóch możliwych konfiguracjach, α lub β , przy czym forma β jest zwykle dominująca. Hydroliza wiązania β -1,4-glikozydowego zachodzi na drodze ogólnej katalizy kwasowej, która wymaga obecności dwóch grup katalitycznych: donora protonów oraz nukleofila. W zależności od ich przestrzennej pozycji może ona przebiegać zgodnie z dwoma różnymi mechanizmami prowadzącymi do retencji lub inwersji konfiguracji powstałych anomerów [37,38] przy czym retencja jest zjawiskiem charakterystycznym dla większości chitynaz bakteryjnych.

W przypadku hydrolaz glikozydowych z rodziny 18 i 20 stereochemiczny przebieg reakcji zachodzi z retencją konfiguracji anomerycznej. Katalitycznym donorem protonów jest tu reszta kwasu glutaminowego enzymu, zaś nukleofilem jest tlen karbonylowy z grupy acetamidowej przyłączonej do drugiego węgla w pierścieniu reszty β -N-acetylo-D-glukozaminy substratu [39]. Ponieważ nukleofil nie jest dostarczany przez enzym, tylko przez substrat, reakcja przebiega zgodnie z mechanizmem podwójnej wymiany. Zgodnie z proponowanym mechanizmem katalitycznym dla egzochitynazy ChiB *Serratia marcescens* [40] po związaniu do substratu dochodzi do zniekształcenia pierścienia reszty cukrowej w pozycji -1, co ułatwia dalszy przebieg reakcji. Tlen glikozydowy ulega protonacji przez resztę kwasu glutaminowego, po czym następuje atak nukleofilowy na anomeryczny atom węgla C1. Powstały w ten sposób pośredni jon oksazolinowy (ang. oxazolinium ion), ulega hydrolizie przy udziale cząsteczki wody, a uzyskany produkt ma tę samą konfigurację anomeryczną co substrat.

Reakcje katalizowane przez chitynazy z rodziny 19 przebiegają z inwersją konfiguracji anomerycznej. Badacze korzystając z techniki RP-HPLC wykazali, że w początkowej fazie reakcji hydrolizy chitotetraozy przez chitynazę ChiC-1 *Streptomyces griseus* HUT6037 dominujący produkt stanowiła chitobioza w formie α -anomerycznej [41]. Dopiero po 24 godzinach reakcji, w wyniku mutarotacji, część α -chitobiozy przekształciła się w formy β . Początkowe nagromadzenie α -anomerów wskazuje na to, że ChiC działa wykorzystując mechanizm inwersji konfiguracji anomerycznej. Mechanizm ten nie jest dobrze zbadany u bakterii, ale prawdopodobnie uczestniczą w nim dwie odległe przestrzennie reszty kwasowe enzymu, które już bez udziału grupy acetamidowej cukru, umożliwiają cząsteczce wody bezpośredni atak nukleofilowy na węgiel anomeryczny [41,42].

GENY WARUNKUJĄCE AKTYWNOŚĆ CHITYNOLITYCZNĄ BAKTERII

Geny kodujące bakteryjne enzymy chitynolityczne są zlokalizowane na chromosomach. W genomie bakteryjnym może znajdować się tylko jeden gen kodujący chitynazę, jak np. *chiA* u *S. maltophilia* 34S1 [43] lub kilka, np. 6 genów u *S. coelicolor* A3(2) [19], co zwiększa efektywność degradacji chityny. System chitynolityczny, który składa się z wielu białek enzymatycznych może być uwarunkowany przez niewielką liczbę genów, jak w przypadku szczepu bakterii *Bacillus circulans* WL-12, który wzrastając na podłożu z chityną syntetyzuje co najmniej 9 różnych izoform chitynaz kodowanych przez 3 geny. Prekursorami tych enzymów są 3 białka, Pre-A1, Pre-C1 i Pre-D1, kodowane odpowiednio przez geny *chiA1*, *chiC1* i *chiD1*. W wyniku potranslacyjnej obróbki proteolitycznej białko Pre-A1 zostaje przekształcone w chitynazy A1, A2 i A3, białko Pre-C1 w chitynazy C1 i C2, a białko Pre-D1 w chitynazy ChiD1, ChiD2, ChiB1 i ChiB2 [44].

Ustalono, że ekspresja genów kodujących enzymy chitynolityczne podlega regulacji na poziomie transkrypcji. W przypadku regulacji negatywnej za represor syntezy enzymów chitynolitycznych uznaje się głównie glukozę, zaś rolę induktora pełni chityna oraz produkty jej degradacji [45,46]. Związek między metabolizowanym źródłem węgla a syntezą enzymów chitynolitycznych potwierdziły badania z zastosowaniem różnych substratów węglowych. Aktywność chitynolityczną wykrywano u bakterii, gdy hodowano je na podłożach zawierających nieprzetworzoną, koloidalną lub glikolową chitynę, a także β -N-acetylo-D-glukozaminę, chitoooligosacharydy czy ściany komórkowe niektórych gatunków grzybów. Brak lub śladowa aktywność enzymatyczna towarzyszyły hodowlom tych samych bakterii na podłożach, w których źródłem węgla była glukoza czy laminarin [47,48]. Badania na poziomie molekularnym potwierdziły udział dwuskładnikowych systemów regulacyjnych w regulacji syntezy chitynaz m.in. u *Pseudoalteromonas piscicida* O-7 oraz *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. Systemy te składają się z dwóch białek: kinazy histydynowej oraz regulatora odpowiedzi. W odpowiedzi na sygnał pochodzący ze środowiska, czyli na obecność chityny lub jej

pochoďnych w podłożu hodowlanym, bakteryjna kinaza ulega autofosforylacji w miejscu reszty histydy, a następnie katalizuje reakcję przeniesienia grupy fosforanowej na resztę asparaginy w sekwencji regulatora odpowiedzi. Ufosforylowany regulator odpowiedzi łączy się z sekwencją promotora aktywując transkrypcję genów kodujących chitynazę [49,50]. Molekularne mechanizmy zaangażowane w kataboliczną represję syntezy enzymów chitynolitycznych nie są dobrze poznane. Wykazano, że glukokinaza będąca produktem genu *glkA* *Streptomyces lividans* TK24 uczestniczy w represji gluko-

nadprodukcję enzymu. Po spryskaniu grzybni fitopatogenicznej, w warunkach laboratoryjnych, roztworem częściowo oczyszczonej chitynazy obserwowano rozerwanie szczytowych części strzępek [53]. Chitynazy bakteryjne nie działają w sposób uniwersalny na wszystkie patogeny grzybowe. Poziom zahamowania wzrostu jest uzależniony od gatunku grzyba i bakterii syntetyzującej chitynazę. Przykłady bakterii biorących udział biokontroli określonych fitopatogenów grzybowych podano w tabeli 3.

Bakteryjne enzymy chitynolityczne mogą także znaleźć zastosowanie jako potencjalne insektycydy w połączeniu z innymi białkami o aktywności owadobójczej. W dotychczasowych badaniach zaobserwowano, że toksyczne dla larw szkodników białka Cry (δ -endotoksyny) syntetyzowane przez

Tabela 3. Wybrane gatunki bakterii syntetyzujące enzymy chitynolityczne o aktywności przeciugrzybowej.

Bakteria	Patogen	Roślina (gospodarz)	Piśmiennictwo
<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	bawełna	[54]
	<i>Fusarium oxysporum</i>	bawełna	[54]
<i>Chromobacterium</i> sp. C-61	<i>Rhizoctonia solani</i>	bakłażan	[55]
<i>Enterobacter agglomerans</i> IC1270	<i>Rhizoctonia solani</i>	bawełna	[56]
<i>Lysobacter enzymogenes</i> C3	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	kostrzewa trzcinowa	[57]
<i>Paenibacillus</i> sp. 300 + <i>Streptomyces</i> sp. 385	<i>Fusarium oxysporum</i>	ogórek	[58]
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 34S1	<i>Magnaporthe poae</i>	wiechlina łąkowa	[36]

zowej, gdy w środowisku znajduje się chityna i glukoza [51]. Jednakże nie jest to mechanizm charakterystyczny dla wszystkich bakterii z rodzaju *Streptomyces*. W przypadku szczepu *S. coelicolor* JW402 mutacja genu *glkA* nie miała żadnego wpływu na represję glukozową syntezy chitynazy Chi63, co wskazuje na istnienie różnych mechanizmów represji glukozowej u bakterii [52].

POTENCJALNE ZASTOSOWANIE BAKTERYJNYCH ENZYMÓW CHITYNOLITYCZNYCH

CZYNNIKI BIOKONTROLI

Biologiczne czynniki ochrony roślin stanowią istotną alternatywę dla stosowanych obecnie toksycznych pestycydów. Chityna jest ważnym budulcem strukturalnym fitopatogenów grzybowych i owadów szkodników, dlatego też enzymy chitynolityczne mogą zostać wykorzystane w ich zwalczaniu. Rola chitynaz w biokontroli została wykazana podczas doświadczeń z udziałem izolowanych ze środowiska bakterii, konstruowanych mutantów bakteryjnych lub ich oczyszczonych enzymów hamujących wzrost patogenów *in vitro* oraz *in vivo*. Zdolność do rozkładu chityny jest uważana za jeden z ważniejszych mechanizmów biokontroli, w której mogą brać udział także inne metabolity bakterii, np. glukanazy, enzymy proteolityczne, antybiotyki i siderofory [36,47,57-59].

Wiele bakterii glebowych syntetyzuje chitynazę o aktywności przeciugrzybowej. Zaobserwowano, że rozwój fitopatogena *Sclerotium rolfsii* na nasionach fasoli był spowolniony w obecności bakterii *Serratia marcescens* w glebie. Zjawisko to przypisano głównie chitynolitycznej aktywności *S. marcescens*, która prowadziła do lizy komórek grzyba [47]. Rola enzymów chitynolitycznych *S. marcescens* w degradacji strzępek *S. rolfsii* została potwierdzona w kolejnym doświadczeniu, gdzie gen kodujący chitynazę ChiA wprowadzono do komórek *E. coli*, dzięki czemu uzyskano

bakterie *Bacillus thuringiensis* stosowane w kombinacji chitynazami o wysokiej aktywności, wykazują synergistyczny efekt owadobójczy [10,60,61]. Współdziałanie δ -endotoksyn i chitynaz prawdopodobnie polega na tym, że enzymy uszkadzają chitynowe błony perytroficzne larw, co ułatwia wnikanie toksyn do głębszych tkanek owadów. Ponieważ ekspresja genów kodujących enzymy chitynolityczne *B. thuringiensis* jest niska, podejmowano próby wprowadzenia do komórek *B. thuringiensis* obcych genów bakteryjnych kodujących chitynazę, m.in. genów *Aeromonas hydrophila* i *Bacillus circulans* No.4.1. Zmutowany szczep *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* niosący gen *B. circulans* No.4.1. wykazywał wyższą aktywność owadobójczą względem larw *Lymantria dispar* niż szczep dziki oraz mutant z wprowadzonym genem *A. hydrophila* [62]. Wysoki poziom nadprodukcji chitynaz uzyskano poprzez wprowadzenie do komórek *B. thuringiensis* Cry-B plazmidu ekspresyjnego niosącego sklonowany gen kodujący chitynazę *B. thuringiensis* subsp. *kuratsaki* 4.0718, pozbawiony rejonu kodującego sekwencję sygnałową. Rekombinowane chitynazy gromadzone były w zarodnikujących komórkach *B. thuringiensis* CryB w formie sferycznych ciałek inkluzyjnych, które ze względu na dobrą rozpuszczalność i tolerancję zasadowego pH mogą być zastosowane w zwiększeniu toksyczności białek Cry względem larw szkodników *Spodoptera exigua* i *Helicoverpa armigera* [63].

POZYSKIWANIE PROTOPLASTÓW GRZYBÓW

Enzymy chitynolityczne są wykorzystywane w celu wydajnego uzyskiwania protoplastów grzybów stosowanych w biotechnologii [64]. Rozkład ściany komórkowej grzybów przy udziale bakteryjnych chitynaz po raz pierwszy zaobserwował Skujins i wsp. podczas doświadczenia, w którym chitynaza *Streptomyces* w połączeniu z β -1,3-glukanazą efektywnie degradowała ściany strzępek *Aspergillus oryzae* i *Fusarium solani* [65]. Współdziałanie chitynaz z glukanazami jest bardzo istotne w procesie formowania protoplastów

grzybowych ze względu na udział obu polisacharydów w ścianie komórkowej grzybów strzępkowych. Mieszanina chitynazy I i α -1,3-glukanazy wyizolowanych z pynu pochodzącego *B. circulans* KA-304 wykorzystywana jest w celu uwalniania protoplastów *Schizophyllum commune*, podczas gdy enzymy stosowane osobno nie wykazują tej aktywności [66]. Podobnie w przypadku chitynazy A syntetyzowanej przez *S. cyaneus* SP-27, która może być wykorzystywana do pozyskiwania protoplastów *S. commune* jedynie w kombinacji z α -1,3-glukanazą *B. circulans* KA-304 [67].

BIODEGRADACJA ODPADÓW ZAWIERAJĄCYCH CHITYNĘ

Przetwórstwo owoców morza na całym świecie dostarcza rocznie ogromnych ilości odpadów bogatych w chitynę, głównie w postaci pancerzyków morskich skorupiaków takich jak kraby czy krewetki. Chitynolityczne mikroorganizmy pełnią ważną rolę ekologiczną, która polega na efektywnej degradacji tych odpadów na drodze enzymatycznego rozkładu trudnodostępnego źródła energii jakim jest nierozpuszczalna w wodzie chityna, do prostszych, wartościowych związków, np. chitooligosacharydów czy β -N-acetylo-D-glukozaminy. Rola chitynolitycznych bakterii i grzybów mikroskopowych w utylizacji odpadów krewetkowych była badana z wykorzystaniem izolowanych ze świeżych odpadów krewetkowych, które służyły bakteriom jako źródło chityny [68]. Aktywność chitynolityczną wyizolowanych drobnoustrojów badano metodą spektrofлуometryczną z zastosowaniem syntetycznego substratu znakowanego fluoroforem MUF. Wykazano, że badane szczepy bakteryjne posiadały większą aktywność chitynolityczną względem odpadów krewetkowych niż szczepy grzybowe, mimo iż procentowy udział drugiej grupy mikroorganizmów w degradacji chityny był znaczenie wyższy. Podobne obserwacje poczyniono w przypadku szczepów bakterii wyizolowanych z gleb zlewni Jeziora Chełmżyńskiego [69]. Według autorów wyższa aktywność chitynaz bakteryjnych może wskazywać na ich większą efektywność w biodegradacji odpadów zawierających chitynę.

PRODUKCJA N-ACETYLOCHITOOLIGOSACHARYDÓW

Chitooligosacharydy pełnią wiele ważnych biologicznych funkcji. Wykazano, że N-acetylochitoheksoza posiada właściwości przeciwrakowe. Podanie N-acetylochitoheksozy grupie laboratoryjnych myszy ze zmianami nowotworowymi spowodowało zahamowanie wzrostu nowotworu nawet o 44%. Podczas badań zaobserwowano zwiększony poziom syntezy cytokin IL-1 przez makrofagi i IL-2 przez komórki śledziony myszy oraz wyższą aktywność limfocytów T cytotoksycznych [70]. Stosowanie N-acetylochitoheksozy zmniejszyło także ryzyko powstawania przerzutów u myszy z wszczepionym rakiem płuc Lewis'a [71]. N-acetylochitooligosacharydy powodują zahamowanie ekspresji genów kodujących E-selektynę w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, co utrudnia adhezję toczącym się leukocytom. Dzięki tym właściwościom oligomery chityny mogą znaleźć zastosowanie jako substancje o działaniu przeciwwzapalnym [72]. U organizmów roślinnych N-acetylochitooligosacharydy pełnią rolę elicytorów inicjujących mechanizm obronny, w tym syntezę fitoaleksyn [73]. Indukcja

mechanizmów obronnych może odbywać się poprzez aktywację fosfolipazy C (PLC) i fosfolipazy D (PLD), które stanowią istotny element przekazywania sygnałów u roślin [74].

N-acetylochitooligosacharydy można uzyskać na drodze chemicznej hydrolizy kwasowej, jednakże stosowane są też metody enzymatyczne z wykorzystaniem bakteryjnych enzymów o wysokiej aktywności chitynolitycznej jak np. chitynaz *Paenibacillus illioisensis* KJA-424 [75]. Bakteryjne enzymy chitynolityczne można wykorzystać również przy produkcji chitobiozy i β -N-acetylo-D-glukozaminy, która, jak niedawno wykazano, może być stosowana w zapobieganiu lub leczeniu chorób autoagresywnych u ludzi, gdyż zwiększając stopień rozgałęzień rozpoczynających się resztami β -1,6-GlcNAc N-glikanów w limfocytach T, hamuje mechanizmy autoimmunizacyjne [76].

PODSUMOWANIE

Bakterie, pośród wielu organizmów zdolnych do syntezy enzymów chitynolitycznych, są szczególnie interesującym obiektem badań. Duża różnorodność i wysoka aktywność bakteryjnych enzymów stwarza perspektywy ich praktycznego zastosowania w biotechnologii, medycynie czy rolnictwie. Pomimo tego, że poznano już szereg bakteryjnych enzymów chitynolitycznych, scharakteryzowano ich właściwości, budowę i mechanizm działania, jednak wciąż nasza wiedza w tej dziedzinie jest niepełna i wymaga dalszych badań, głównie z zakresie biochemii i biologii molekularnej. Biorąc pod uwagę bogactwo literatury dotyczącej innych hydrolaz bakteryjnych, enzymy te wydają się być wciąż mało poznane i doceniane.

PIŚMIENNICTWO

1. Cohen-Kupiec R, Chet I (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotechnol* 9: 270-277
2. Cottrell MT, Moore JA, Kirchman DL (1999) Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 65: 2553-2557
3. Adams DJ (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiol* 150: 2029-2035
4. Mikitani K, Sugasaki T, Shimada T, Kobayashi M, Gustafsson J (2000) The chitinase gene of the silkworm, *Bombyx mori*, contains a novel Tc-like transposable element. *J Biol Chem* 275: 37725-37732
5. Sahai AS, Manocha MS (2006) Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol Rev* 11: 317-338
6. Chen L, Shen Z, Wu J (2009) Expression, purification and in vitro antifungal activity of acidic mammalian chitinase against *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* strains. *Clin Exp Dermatol* 34: 55-60
7. Hawtin RE, Zarkowska T, Arnold K, Thomas CJ, Gooday GW, King LA, Kuzio JA, Possee RD (1997) Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* 238: 243-253
8. Kurita K (2001) Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog Polym Sci* 26: 1921-1971
9. Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, van Aalten DMF, Synstad B, Eijsink VGH (2005) The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J Biol Chem* 280: 28492-28497
10. Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK (2007) Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit Rev Biotechnol* 27: 21-28
11. Keyhani NO, Roseman S (1999) Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1473: 108-122


12. Gokul B, Lee JH, Song KB, Rhee SK, Kim CH, Panda T (2000) Characterization and applications of chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Bioproc Engin* 23: 691-694
13. Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem J* 280: 309-316
14. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics *Nucleic Acids Research* 37(Database issue): D233-8. Epub 2008 Oct 5
15. Mabuchi N, Araki Y (2001) Cloning and sequencing of two genes encoding chitinases A and B from *Bacillus cereus* CH Can *J Microbiol* 47: 895-902
16. Shimosaka M, Fukumori Y, Narita T, Zhang X, Kodaira R, Nogawa M, Okazaki M (2001) The bacterium *Burkholderia gladioli* strain CHB101 produces two different kinds of chitinases belonging to families 18 and 19 of the glycosyl hydrolases. *J Biosci Bioeng* 91: 103-105
17. Suzuki K, Sugawara N, Suzuki M, Uchiyama T, Katouno F, Nikaidou N, Watanabe T (2002) Chitinases A, B and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: Enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 1075-1083
18. Tews I, Vincentelli R, Vorgias CE (1996) N-acetylglucosaminidase (chitinase) from *Serratia marcescens*: gene sequence, and protein production and purification in *Escherichia coli*. *Gene* 170: 63-67
19. Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitz E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141-147
20. Tsujibo H, Hatano N, Endo H, Miyamoto K, Inamori Y (2000) Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 and cloning of the encoding gene. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 96-102
21. Tsujibo H, Endo H, Minoura K, Miyamoto K, Inamori Y (1993) Cloning and sequence analysis of the gene encoding a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Gene* 134: 113-117
22. Tsujibo H, Okamoto T, Hatano N, Miyamoto K, Watanabe T, Mitsutomi M, Inamori Y (2000) Family 19 chitinases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520: molecular cloning and characterization. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 2445-2453
23. Tsujibo H, Hatano N, Mikami T, Izumizawa Y, Miyamoto K, Inamori Y (1998) Cloning, characterization and expression of beta-N-acetylglucosaminidase gene from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520(1). *Biochim Biophys Acta* 1425: 437-440
24. Kubota T, Miyamoto K, Yasuda M, Inamori Y, Tsujibo H (2004) Molecular Characterization of an Intracellular beta-N-Acetylglucosaminidase Involved in the Chitin Degradation System of *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 1306-1314
25. Hunt DE, Gevers D, Vahora NM, Polz MF (2008) Conservation of the chitin utilization pathway in the *Vibrionaceae*. *Appl Environ Microbiol* 74: 44-51
26. Soto-Gil RW, Zyskind JW (1989) N,N'-diacetylchitinase of *Vibrio Harveyi*. Primary structure, processing, and evolutionary relationships. *J Biol Chem* 264: 14778-14783
27. Kezuka Y, Ohishi M, Itoh Y, Watanabe J, Mitsutomi M, Watanabe T, Nonaka T (2006) Structural studies of a two-domain chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. *J Mol Biol* 358: 472-484
28. Hoell IA, Dalhus B, Heggset EB, Aspms SI, Eijsink VG (2006) Crystal structure and enzymatic properties of a bacterial family 19 chitinase reveal differences from plant enzymes. *FEBS J* 273: 4889-4900
29. Suzuki K, Taiyoji M, Sugawara N, Nikaidou N, Henrissat B, Watanabe T (1999) The third chitinases gene (chiC) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochem J* 343: 587-596
30. Uchiyama T, Katouno F, Nikaidou N, Nonaka T, Sugiyama J, Watanabe T (2001) Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170. *J Biol Chem* 276: 41343-41349
31. Perrakis A, Tews I, Dauter Z, Oppenheim AB, Chet I, Wilson KS, Vorgias CE (1994) Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure* 2: 1169-1180
32. Songsiririthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC, Suginta W (2008) Crystal structures of *Vibrio Harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: implications for the catalytic mechanism. *J Struct Biol* 162: 491-499
33. Matsumoto T, Nonaka T, Hashimoto M, Watanabe T, Mitsui Y (1999) Three-dimensional structure of the catalytic domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 at very high resolution. *Proc Jpn Acad Ser.B* 75: 269-274
34. Morimoto K, Karita S, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K (1997) Cloning, sequencing and expression of the gene encoding *Clostridium paraputrificum* chitinases ChiB and analysis of the functions of novel cadherin-like domains and chitin-binding domain. *J Bacteriol* 179: 7306-7314
35. Watanabe T, Ito Y, Yamada T, Hashimoto M, Sekine S, Tanaka H (1994) The roles of the C-terminal domain and type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in chitin degradation. *J Bacteriol* 176: 4465-4472
36. Kobayashi DY, Reedy RM, Bick JA, Oudemans PV (2002) Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Appl Environ Microbiol* 68: 1047-1054
37. Davies G, Henrissat B (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3: 853-859
38. Iseli B, Armand S, Boller T, Neuhaus J-M, Henrissat (1996) Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Lett* 382:186-188
39. Tews I, Terwisscha van Scheltinga AC, Perrakis A, Wilson KS, Dijkstra BW (1997) Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes *J Am Chem Soc* 119: 7954-7959
40. van Aalten DMF, Komander D, Synstad B, Gaseidnes S, Peter MG, Eijsink VGH (2001) Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8979-8984
41. Ohno T, Armand S, Hata T, Nikaidou N, Henrissat B, Mitsutomi M, Watanabe T (1996) A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J Bacteriol* 178: 5065-5070
42. Brameld KA, Goddard III WA (1998) The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4276-4281
43. Crossman LC, Gould VC, Dow JM, Vernikos GS, Okazaki A, Sebahia M, Saunders D, Arrowsmith C, Carver T, Peters N, Adlem E, Kerhornou A, Lord A, Murphy L, Seeger K, Squares R, Rutter S, Quail MA, Rajandream M-A, Harris D, Churcher C, Bentley SD (2008) The complete genome, comparative and functional analysis of ***Stenotrophomonas maltophilia*** reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* 9: R74
44. Alam MDM, Mizutani T, Isono M, Nikaidou N, Watanabe T (1996) Three chitinase genes (chiA, chic and ChiD) comprise the chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12. *J Ferm Bioeng* 82: 28-36
45. Felse PA, Panda T (1999) Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 141-151
46. Ni X, Westpheling J (1997) Direct repeat sequences in the *Streptomyces* chitinase-63 promoter direct both glucose repression and chitin induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13116-13121
47. Ordentlich A, Elad Y, Chet I (1988) The role of chitinases of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopatol.* 78: 84-88
48. Zhang Z, Yuen GY, Sarath G, Penheiter AR (2001) Chitinases from the plant disease biocontrol agent *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Phytopatol* 91: 204-211
49. Miyamoto K, Okunishi M, Nukui E, Tsuchiya T, Kobayashi T, Imada C, Tsujibo H (2007) The regulator CdsS/CdsR two-component system

- modulates expression of genes involved in chitin degradation of *Pseudalteromonas piscicida* strain O-7. Arch Microbiol 188: 619-628
50. Tsujibo H, Hatano N, Okamoto T, Endo H, Miyamoto K, Inamori Y (1999) Synthesis of chitinase in *Streptomyces thermoviolaceus* is regulated by a two-component sensor-regulator system. FEMS Microbiol Lett 181: 83-90
 51. Saito A, Fujii T, Yoneyama T, Miyashita K (1998) glkA is involved in glucose repression of chitinase production in *Streptomyces lividans*. J Bacter 180: 2911-2914
 52. Ingram C, Westpheling J (1995) The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* is not required for glucose repression of the chi63 promoter. J Bact 177: 3587-3588
 53. Shapira R, Ordentlich A, Chet I, Oppenheim AB (1989) Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in *Escherichia coli*. Phytopatol 79: 1264-1269
 54. Inbar J, Chet I (1991) Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in biological control of soil borne plant pathogen by this bacterium. Soil Biol Biochem 23: 973-978
 55. Park SK, Lee M-C, Harman GE (2005) The biocontrol activity of *Chromobacterium* sp. Strain C-61 against *Rhizoctonia solani* depends on the productive ability of chitinase. Plant Pathol J 21: 275-282
 56. Chernin LS, Fuente L, Sobolev V, Haren S, Vorgias C, Oppenheim A, Chet I (1997) Molecular cloning, structural analysis and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. Appl Environ Microbiol 63: 834-839
 57. Zhang Z, Yuen GY (2000) The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. Phytopatol 90: 384-389
 58. Singh PP, Shin YC, Park CS, Chung YR (1999) Biological control of *Fusarium wilt* of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopatol 89: 92-99
 59. Minkwitz A, Berg G (2001) Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Clin Microbiol 39: 139-145
 60. Regev A, Keller M, Strizhof N, Sneh B, Prudovsky E, Chet I, Ginzberg I, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Schell J, Zilberstein A (1996) Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. Appl Environ Microbiol 62: 3581-3586.
 61. Sampson M, Gooday GW (1998) Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. Microbiol 144: 2189-2194
 62. Lertcanawanichakul M, Wiwat C, Bhumiratana A, Dean DH (2004) Expression of chitinase-encoding genes in *B. thuringiensis* and toxicity of engineered *B. thuringiensis* subsp aizawai toward *Lymantria dispar* larvae. Curr Microbiol 48: 175-181
 63. Hu SB, Liu P, Ding XZ, Yan L, Sun YJ, Zhang YM, Li WP, Xia LQ (2009) Efficient constitutive expression of chitinase in the mother cell of *Bacillus thuringiensis* and its potential to enhance the toxicity of Cry1Ac protoxin. Appl Microbiol Biotechnol 82: 1157-1167
 64. Felse PA, Panda T (2000) Production of microbial chitinases - a revisit. Bioproc Engineer 23: 127-134
 65. Skujins JJ, Potgieter HJ, Alexander M (1965) Dissolution of fungal cell walls by *Streptomyces chitinase* and β -1,3-glucanase. Arch Biochem Biophys 111: 358-364
 66. Yano S, Rattanakit N, Wakayama M, Tachiki T (2004) A chitinase indispensable for formation of protoplast of *Schizophyllum commune* in basidiomycete-lytic enzyme preparation produced by *Bacillus circulans* KA-304. Biosci Biotechnol Biochem 68: 1299-1305
 67. Yano S, Rattanakit N, Honda A, Noda Y, Wakayama M, Plikomol A, Tachiki T (2008) Purification and characterization of chitinase A of *Streptomyces cyaneus* SP-27: an enzyme participates in protoplast formation. Biosci Biotechnol Biochem 72: 54-61
 68. Swiontek-Brzezinska M, Lalke-Porczyk E, Donderski W (2007) Chitinolytic activity of bacteria and fungi isolated from shrimp exoskeletons. Ocean. Hydrob. Studies 36: 101-111
 69. Swiontek-Brzezinska M, Lalke-Porczyk E, Donderski W (2008) The role of chitinolytic bacteria and fungi in biodegradation of crustacean remains in lacustrine habitats. Pol J Ecol 56: 335-342
 70. Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, Mikami T, Suzuki S, Suzuki M (1988) Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against meth-A solid tumor. Chem Pharm Bull 36: 784-790
 71. Tsukada K, Matsumoto T, Aizawa K, Tokoro A, Naruse R, Suzuki S, Suzuki M (1990) Antimetastatic and growth-inhibitory effects of N-acetylchitohexaose in mice bearing Lewis lung carcinoma. Jpn J Cancer Res 81: 259-265
 72. Lin C-W, Chen L-J, Lee C-I, Lee P-L, Chiu J-J (2006) N-acetylated chitooligosaccharides inhibit TNF- α induced E-selectin expression in endothelial cells via the JNK-NK- κ B pathways. Tech Sci Press 3: 165-166
 73. Yamada A, Shibuya N, Kodama O, Akatsuka T (1993) Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides. Biosci Biotech Biochem 57: 405-409
 74. Yamaguchi T, Minami E, Ueki J, Shibuya N (2005) Elicitor-induced activation of phospholipases plays an important role for the induction of defense responses in suspension-cultured rice cells. Plant Cell Physiol 46: 579-587
 75. Jung W-J, Souleimanov A, Park R-D, Smith DL (2007) Enzymatic production of N-acetyl chitooligosaccharides by crude enzyme derived from *Paembacillus illinoisensis* KJA-424. Carbohydr Polym 67: 256-259
 76. Grigorian A, Lee S-U, Tian W, Chen I-J, Gao G, Mendelsohn R, Dennis JW, Demetriou M (2007) Control of T cell-mediated autoimmunity by metabolite flux to N-glycan biosynthesis. J Biol Chem 282: 20027-20035
- <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>; <http://www.cathdb.info/>
<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>; <http://smart.embl-heidelberg.de/>
<http://pfam.sanger.ac.uk/>

Chitinolytic activity of bacteria

Elżbieta Saks, Urszula Jankiewicz 

Department of Biochemistry, Faculty of Agriculture and Biology, Warsaw University of Life Sciences, 159 Nowoursynowska St., 02-776 Warszawa, Poland

 e-mail: urszula_jankiewicz@sggw.pl

Key words: chitinolytic enzymes, chitin, chitooligosaccharides, ChBD, biocontrol

ABSTRACT

Chitinolytic bacteria play an important role in degradation of chitin, one of the most abundant biopolymers in nature. These microorganisms synthesize specific enzymes, that catalyze hydrolysis of β -1,4-glycosidic bonds in low-digestible chitin polymers, turning it into low-molecular, easy to digest compounds. During last decades many bacterial chitinolytic enzymes have been studied and characterized, mainly for their potential applications in agriculture, industry and medicine. Several chitinase classifications have been proposed, either on the base of substrate specificity or amino acid sequence similarities. X-ray crystallography and NMR spectroscopy techniques enabled the determination of three dimensional structure of some chitinases, what was helpful in explaining their catalytic mechanism. Development of biotechnology and molecular biology enables a deep research in regulation and cloning of bacterial chitinase genes.

Metabolizm heterocyklicznych amin aromatycznych – mutagenów/ kancerogenów izolowanych z żywności

STRESZCZENIE

Szacuje się, że około 1/3 wszystkich przypadków zachorowań na nowotwory wywołwana jest przez składniki diety. Wśród nich ważną rolę przypisuje się heterocyklicznym aminom aromatycznym (HCA), które występują w mięsie i rybach przetwarzanych w wysokiej temperaturze. Wykazano, że HCA mają silne działanie rakotwórcze po uprzedniej aktywacji metabolicznej. Pierwszy etap aktywacji obejmuje powstawanie *N*-hydroksylowych pochodnych HCA i zachodzi z udziałem cytochromu P450, głównie izoenzymu CYP1A2. Dalsza aktywacja HCA zachodzi z udziałem *N*-acetylotransferaz i sulfotransferaz, które prowadzą reakcje estryfikacji *N*-hydroksylowych pochodnych HCA. Tak zaktywowane, wysoce reaktywne pochodne HCA zdolne są do bezpośredniego oddziaływania z DNA poprzez tworzenie adduktów, których powstawanie powoduje błędy w replikacji i może prowadzić do wystąpienia mutacji, a w konsekwencji do rozwoju nowotworu. HCA podlegają także reakcjom detoksykacji z udziałem enzymów z grupy UDP-glukuronozylotransferaz oraz *S*-transferazy glutationu. Równowaga pomiędzy procesami aktywacji i detoksykacji HCA, jak również uwarunkowane genetycznie różnice w metabolizmie HCA są kluczowym elementem w ocenie potencjalnego ryzyka wystąpienia nowotworu wywołanego HCA u poszczególnych osób.

WPROWADZENIE

Choroby nowotworowe to jedna z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie, a liczba zachorowań rośnie w zastraszającym tempie. Według Światowej Organizacji Zdrowia obecnie na nowotwory choruje około 25 milionów osób, a ich ofiarami padają coraz młodsi ludzie. Powodem zapadania na choroby z tej grupy mogą być predyspozycje genetyczne, a także czynniki środowiskowe. Wśród czynników środowiskowych predysponujących do zachorowania na chorobę nowotworową wymienia się dym papierosowy, spożywanie alkoholu, stany zapalne wywołane przewlekłymi infekcjami, zanieczyszczenia wody i powietrza, a także niewłaściwą dietę [1]. Dane epidemiologiczne wskazują, że dieta może w znaczący sposób przyczyniać się do powstawania nowotworów [2]. Szczególnie silny związek obserwuje się pomiędzy spożywaniem potraw mięsnych a zachorowalnością na nowotwory, zwłaszcza układu pokarmowego [3-7]. Z kolei analizy laboratoryjne wykazały, że podczas obróbki termicznej mięsa i produktów mięsnych powstaje grupa związków chemicznych wykazujących bardzo silną aktywność mutagenną, które zostały sklasyfikowane jako heterocykliczne aminy aromatyczne (HCA) [8]. Struktury wybranych HCA zostały przedstawione na rycinie 1. Cechą charakterystyczną tej grupy związków jest obecność w ich strukturze pierścieni aromatycznych i silnie reaktywnej egzocyklicznej grupy aminowej, odpowiedzialnej za ich genotoksyczność [8]. Heterocykliczne aminy aromatyczne są często wykorzystywane jako modelowe związki w badaniach nad procesami mutagenyzy i kancerogenyzy.

POWSTAWANIE, PODZIAŁ I WYSTĘPOWANIE HETEROCYKLICZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH

Formowanie HCA w mięsnych pokarmach związane jest ściśle z typem mięsa, temperaturą, czasem i rodzajem przetwarzania (gotowania, smażenia, grillowania), dlatego stężenia poszczególnych HCA w próbkach żywności są zróżnicowane. Generalna zasada jest taka, że im wyższa temperatura i dłuższy czas obróbki termicznej, tym stężenie powstających HCA jest wyższe [9]. Stężenia HCA w potrawach przygotowywanych w niskich, nie przekraczających 100°C temperaturach (np. w przypadku gotowania czy duszenia) są zazwyczaj bardzo niewielkie. Natomiast podczas obróbki termicznej w wysokiej temperaturze, takiej jak grillowanie, wytwarzają się bardzo duże ilości tych związków, przekraczające 100 ng/g w przypadku MeIQx, dochodzące do 180 ng/g w przypadku AαC oraz nawet 480 ng/g w przypadku PhIP [10].

Anna Woziwodzka[✉]

Marta Tarasewicz

Jacek Piosik

Katedra Biologii Molekularnej i Komórkowej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Gdańsk

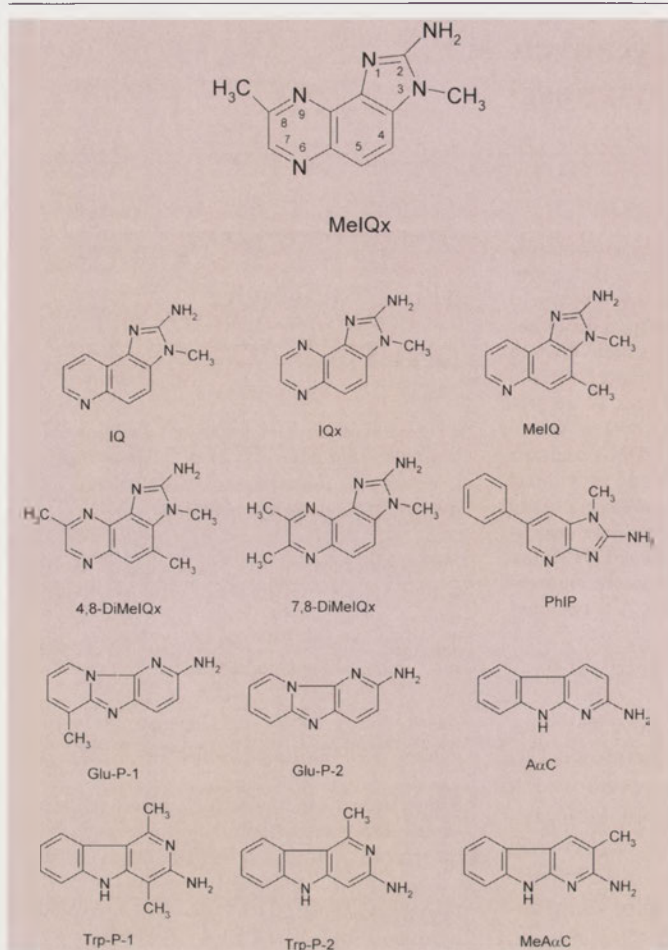
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; tel.: (58) 523 63 11; e-mail: anna.woziwodzka@biotech.ug.gda.pl

Artykuł otrzymano 6 października 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 3 grudnia 2009 r.

Słowa kluczowe: nowotwory, heterocykliczne aminy aromatyczne, mutageny w żywności, cytochrom P450, metabolizm, addukty

Wykaz skrótów: CYP1A1 – cytochrom P450 izoenzym 1A1; CYP1A2 – cytochrom P450 izoenzym 1A2; CYP1B1 – cytochrom P450 izoenzym 1B1; GST – *S*-transferaza glutationu; HCA – heterocykliczne aminy aromatyczne; NAT – *N*-acetylotransferaza; PAH – policykliczne węglowodory aromatyczne; SULT – rozpuszczalna sulfotransferaza; UGT – UDP-glukuronozylotransferaza

Podziękowanie: Praca finansowana z projektu nr N N301 029834.



Rycina 1. Struktury chemiczne wybranych heterocyklicznych amin aromatycznych (HCA). MelQx – 2-amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina; IQ – 2-amino-3-metyloimidazo[4,5-f]chinolina; IQx – 2-amino-3-metyloimidazo[4,5-f]chinoksalina; MeIQ – 2-amino-3,4-dimetyloimidazo[4,5-f]chinolina; 4,8-DiMeIQx – 2-amino-3,4,8-trimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina; 7,8-DiMeIQx – 2-amino-3,7,8-trimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina; PhIP – 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-b]pirydyna; Glu-P-1 – 2-amino-6-metylodipirydo[1,2-a:3',2'-d]imidazol; Glu-P-2 – 2-amino-dipirydo[1,2-a:3',2'-d]imidazol; Trp-P-1 – 3-amino-1,4-dimetylo-5H-pirydo[4,3-b]indol; AaC – 2-amino-9H-pirydo[2,3-b]indol; Trp-P-2 – 3-amino-1-metylo-5H-pirydo[4,3-b]indol; MeAaC – 2-amino-3-metylo-9H-pirydo[2,3-b]indol.

W potrawach, takich jak grillowane mięso wołowe, boczki, drób i ryby, w największych stężeniach występują MeIQx i PhIP [11]. Przeważnie zawartość HCA jest wyższa w mięsie niż w rybach. Mięso zawiera większe stężenie HCA również w porównaniu z produktami pochodzenia mięsnego, takimi jak np. kiełbasy. Zauważono natomiast bardzo niską zawartość HCA w komercyjnie dostępnych kostkach rosółowych [11]. Oprócz przetwarzanych termicznie mięs i ryb, HCA wykryć można w śladowych ilościach także w dymie papierosowym, spalinach, wodzie deszczowej, ściekach komunalnych czy wodzie rzecznej [12].

Z raportu EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) z 2007 roku wynika, że średnie dzienne spożycie HCA wynosi 69 ng, z czego około 70% przypada na PhIP, który występuje w największym stężeniu [13]. Według innych doniesień szacuje się, że ilość spożywanego HCA może osiągnąć wartości przekraczające 10 µg/dzień [11].

Istnieją dwie główne drogi powstawania HCA. HCA należące do imidazochinolin, imidazochinoksalin i imidazopirydyn, wspólnie klasyfikowane jako aminoimidazoazareny (AIA), powstają w wyniku reakcji Maillarda, w którą zaangażowane są obecne w mięsie wolne aminokwasy, kreatyna i monosacharydy, w temperaturach pomiędzy 100°C a 300°C. Z kolei HCA należące do aminokarbolin, takie jak Glu-P-1, Trp-P-1 czy AaC, generowane są pod nieobecność cukru, jako produkt pirolizy aminokwasów i białek, w temperaturach przekraczających 300°C [8].

Heterocykliczne aminy aromatyczne dzieli się na dwie główne grupy. Jedną z nich są aminy typu IQ, których grupa aminowa nie ulega przemianie pod wpływem NaNO₂. Drugą stanowią wszystkie pozostałe aminy („nie-IQ”), które pod wpływem 2 mM NaNO₂ tracą swoją mutagenność, w związku z zastąpieniem grupy aminowej hydroksylową [14]. Podział wybranych HCA na dwa typy przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Podział heterocyklicznych amin aromatycznych.

Aminy typu IQ:	Aminy typu „nie-IQ”
IQ	AaC
IQx	MeAaC
MeIQ	Glu-P-1
MeIQx	Glu-P-2
4,8-DiMeIQx	Trp-P-1
7,8-DiMeIQ	Trp-P-2

MUTAGENNOŚĆ I KANCEROGENNOŚĆ HETEROCYKLICZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH

MeIQ, IQ i MeIQx należą do grupy najsilniejszych mutagenów badanych kiedykolwiek za pomocą testu Amesa [14]. Mutagenność HCA zależy od ich struktury chemicznej, z którą wiąże się zdolność do ulegania reakcji N-oksydacji, w wyniku której powstają reaktywne jony nitreniowe [15]. Testy bakteryjne wykazują znaczące, nawet 1000-krotne różnice w mutagenności poszczególnych HCA. Z kolei w komórkach ssaków, gdzie aktywność biologiczna HCA jest znacznie niższa, różnice w mutagenności HCA są zdecydowanie mniejsze [14]. Poziom mutagenności HCA w komórkach ssaków jest znacznie wyższy w przypadku zastosowania komórek modyfikowanych genetycznie w kierunku zwiększonej syntezy enzymów II fazy, jak NAT2 lub SULT1A1, zaangażowanych w metaboliczną aktywację HCA [16,17].

Wyniki testów mutagenności z wykorzystaniem bakterii bywają niewystarczające do rzetelnej oceny ryzyka związanego z ekspozycją na HCA. Przykład stanowią dwie aminy – MeIQx i PhIP. W teście Ames PhIP wykazuje działanie mutagenne około 100 razy słabsze niż MeIQx, pomimo że PhIP ulega reakcji N-oksydacji (aktywacji) z natężeniem dalece wyższym niż MeIQx [18]. Oba związki mają silne kancerogenne działanie na komórki gryzoni i powodują powstawanie wielu różnych nowotworów przy długoterminowym podawaniu obydwu amin w porównywalnych dawkach [14]. W przypadku gryzoni stwierdzono również, że MeIQ, PhIP i IQ indukują charakterystyczne

mutacje, określane jako „mutacyjny odcisk palca” (ang. *mutational fingerprint*), w genach związanych z procesami nowotworzenia [19].

W celu ustalenia aktywności kancerogennej HCA przeprowadzono także wiele badań na zwierzętach. Wykazano, że związki te zwiększają ryzyko powstawania nowotworów wątroby, żołądka i płuc, a także chłoniaków i białaczek u myszy [14]. U szczurów, po podaniu HCA nowotwory rozwijają się w głównie w okrężnicy, jelicie cienkim, wątrobie, mózgu, gruczole mlekowym, skórze, jamie ustnej. Wyjątkiem jest PhIP, który nie wywołuje raka wątroby zarówno u myszy, jak i u szczurów [14]. PhIP wywołuje natomiast chłoniaki u myszy oraz nowotwory okrężnicy i gruczołu mlekowego u szczurów. IQ wykazuje silnie kancerogenne działanie u małp naczelnych, u których wywołuje nowotwory wątroby po kilku latach podawania [14]. Czyni to z tego związku jeden z najsilniejszych kancerogenów testowanych u tej grupy zwierząt.

WPLYW HETEROCYKLICZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH NA PROCESY NOWOTWORZENIA U LUDZI

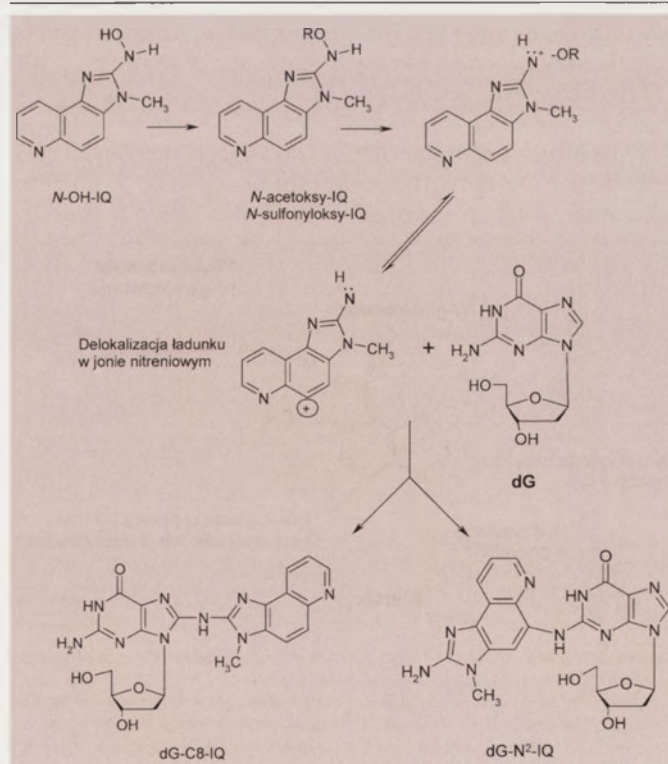
Wyniki wielu badań epidemiologicznych wskazują na zwiększone ryzyko występowania nowotworów okrężnicy i odbytu w przypadku częstego spożywania czerwonego mięsa [7]. Ryzyko to zwiększa się znacznie, lecz jest zauważalnie mniejsze niż ryzyko zapadania na raka płuc spowodowane działaniem dymu tytoniowego oraz nowotwory wątroby wywołane działaniem aflatoksyny [20]. Wyniki szeregu badań wskazują, że największe ryzyko zachorowania na nowotwory odbytu i okrężnicy obserwuje się u osób, które często spożywają grillowane mięso, zawierające duże ilości HCA [7]. Stwierdzono, że spożywanie dobrze wypieczonego czerwonego mięsa powoduje zwiększenie ryzyka zapadania na gruczolaki okrężnicy i odbytu do 29% na 10 g spożytego mięsa [21] i czterokrotne zwiększenie ryzyka zachorowań na inne nowotwory tej części układu pokarmowego [22]. Badania dowiodły także, że najwyższe ryzyko zachorowania na te nowotwory występuje u osób, które posiadają genotyp „szybkiego oksydatora” (szybka *N*-oksydacja przy udziale CYP1A2) oraz „szybkiego *N*-acetylatora” (szybka *N*-acetylowanie przy udziale enzymów NAT). Dane wskazują na odpowiednio sześć- i ośmiokrotne zwiększenie ryzyka wystąpienia nowotworu w porównaniu z osobami o „wolnych” genotypach, które nie spożywały mięsa przetwarzanego termicznie [23,24]. Zauważono również, że ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi związane jest częste spożywanie grillowanego, dobrze wypieczonego mięsa [6]. Powstawanie nowotworów piersi powiązано również z przyjmowaniem HCA, analogicznie jak u zwierząt [14].

Pomimo licznych danych populacyjnych wskazujących na silną zależność pomiędzy częstą konsumpcją mięsa a zapadalnością na nowotwory, dane molekularne dotyczące związku aktywności enzymów metabolizmu ksenobiotyków, spożywania przetwarzanego termicznie mięsa i rozwoju nowotworów są nie do końca spójne. Rozbieżność tych wyników spowodowała nawet powstanie pewnych wątpliwości co do roli HCA w powstawaniu nowotworów [25].

Zwiększone ryzyko zachorowań na raka można zauważyć właściwie tylko u osób, które zarówno posiadają „szybkie” genotypy („szybki acetylator”, „szybki oksydator”), co jest ściśle związane z konkretną ścieżką bioaktywacji HCA, jak też często spożywają pokarmy zawierające wysoki poziom HCA [23,24]. Przetworzone termicznie mięso zawiera, poza HCA, również inne kancerogeny, występujące w niewielkich stężeniach, takie jak policykliczne węglowodory aromatyczne (PAH), związki *N*-nitrozowe, nadtlenki lipidowe oraz inne aktywne utleniacze. Rakotwórcze działanie grillowanego mięsa może być zatem związane nie tylko z obecnością HCA, lecz może być wynikiem działania całej mieszaniny kancerogenów [7].

FORMOWANIE ADDUKTÓW HETEROCYKLICZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH Z DNA

HCA, tak jak większość chemicznych mutagenów, tworzą addukty z DNA, co może prowadzić do błędów w replikacji, a w konsekwencji, w przypadku, gdy nie zadziałają mechanizmy naprawcze, do inicjacji procesu kancerogenezy [26]. *N*-hydroksy-HCA wykazują niską reaktywność wobec DNA, która nieznacznie wzrasta w środowisku kwaśnym [27]. Reaktywność *N*-hydroksy-HCA zwiększa się natomiast drastycznie po ich estryfikacji do *N*-acetoksy-HCA czy *N*-sulfonyloksy-HCA, które, ulegając heterolitycznemu cięciu, tworzą reaktywne jony nitreniowe [26]. Rycina 2 przedstawia mechanizm tworzenia adduktów HCA-DNA. Formowanie adduktów HCA-DNA następuje poprzez reakcję zestryfikowanej *N*-hydroksypochodnej HCA i atomu C8 deoksyguanozyny (dG). Wynikiem reakcji jest addukt w postaci dG-C8-HCA. Produktem pośrednim tej reakcji jest



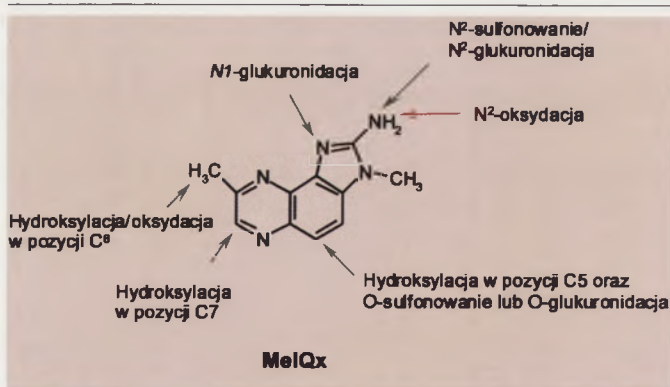
Rycina 2. Mechanizm formowania adduktów IQ z deoksyguanozyną (dG-C8-IQ i dG-N² IQ) [29]. *N*-hydroksy-IQ ulega dalszej aktywacji poprzez estryfikację do *N*-acetoksy-IQ bądź *N*-sulfonyloksy-IQ, które tworzą wysoce reaktywne jony nitreniowe, reagujące z deoksyguanozyną (dG). Addukty tworzą się głównie na atomie C8 dG, zaś w mniejszej ilości na atomie N² dG.

wysocze reaktywny jon nitreniowy [26,28]. W przypadku IQ i 8-MeIQx addukty z DNA tworzą się również poprzez połączenie między grupą N²-dG i atomem C5 heterocyklicznej struktury pierścieniowej HCA [28].

METABOLIZM HETEROCYKLICZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH

HCA w formie, w której przyjmowane są do organizmu człowieka (wraz z pokarmami) wykazują słabe działanie rakotwórcze. W procesie biologicznej aktywacji, prowadzonej przez układ enzymatyczny metabolizmu ksenobiotyków zostają one przekształcone w silne, bardzo niebezpieczne substancje rakotwórcze. Aktywacja HCA polega na przemianie tych związków do wysocze reaktywnych form elektrofilowych [26]. HCA są intensywnie metabolizowane zarówno w komórkach człowieka, jak i zwierząt [18]. Miejsca działania enzymów metabolizujących HCA na przykładzie MeIQx przedstawia rycina 3. Główne produkty detoksykacji HCA powstają w wyniku utleniania pierścienia heterocyklicznego i grup metylowych, jak i na drodze bezpośrednich reakcji koniugacji. Aktywacja HCA następuje natomiast poprzez N-oksydację egzocyklicznej grupy aminowej prowadzoną przez CYP1A2 w wątrobie. Produktami tej reakcji są N-hydroksypochodne HCA [29]. W tkankach innych niż wątroba oksydację HCA katalizują z kolei izoformy CYP1A1 i CYP1B1 [30]. Kolejną reakcją w szlaku aktywacji HCA jest acetylowanie lub sulfonowanie otrzymanych wcześniej N-hydroksypochodnych. Reakcje te zachodzą w wątrobie z udziałem odpowiednio acetylotransferaz (NAT) i sulfotransferaz (SULT) [31]. W wyniku tych reakcji powstają reaktywne, wysocze niestabilne estry wiążące się do DNA. Wśród enzymów z rodziny SULT najbardziej aktywną w tym procesie izoformą jest SULT1A1, która katalizuje między innymi reakcję sulfonowania N-hydroksy-PhIP i N-hydroksy-MeAaC [32].

N-hydroksypochodne HCA podlegają detoksykacji z udziałem UDP-glukuronozylotransferaz (UGT). Ta grupa enzymów katalizuje reakcje, w wyniku których powsta-



Rycina 3. Miejsca działania enzymów metabolizujących MeIQx z uwzględnieniem dróg detoksykacji (zielone strzałki), jak i aktywacji MeIQx (czerwona strzałka). Zarówno oksydacja pierścienia aromatycznego, jak i bezpośrednie reakcje koniugacji niezmodyfikowanego MeIQx prowadzą do powstania produktów detoksykacji. Dodatkowo u ludzi zaobserwowano oksydację grupy metylowej C⁶, prowadzącą do powstania kwasu karboksylowego, będącego głównym produktem detoksykacji MeIQx. Aktywacja MeIQx zachodzi poprzez oksydację azotu N² egzocyklicznej grupy aminowej z udziałem cytochromu P450. Tak powstały N-OH-MeIQx może wiązać się do DNA lub ulegać dalszej aktywacji poprzez reakcje koniugacji – sulfonowanie bądź acetylowanie, przeprowadzane przez enzymy fazy II metabolizmu ksenobiotyków [35].

ją stabilne koniugaty glukuronidowe HCA. W przypadku glukuronidacji N-hydroksy-PhIP najbardziej aktywną izoformą jest UGT1A1 [33]. N-hydroksy-HCA podlegają również detoksykacji poprzez redukcję do macierzystych amin. Reakcja ta przeprowadzana jest przy udziale NADPH reduktaz. Reaktywna estrowa N-acetoksypochodna PhIP podlega także detoksykacji przy udziale S-transferazy glutationu (GST). Reakcja ta polega na redukcji reaktywnego produktu pośredniego – prawdopodobnie przez uformowanie niestabilnego koniugatu z glutationem (GSH) – do macierzystej aminy. Najbardziej aktywną izoformą w tym procesie jest enzym GSTA1 [34]. Glukuronidacja i sulfonowanie egzocyklicznej grupy aminowej w przypadku kilku HCA zachodzą przy udziale enzymów z grupy UGT i SULT. Procesy te należą do reakcji detoksykacji [35].

ENZYMY BIORĄCE UDZIAŁ W AKTYWACJI HETEROCYKLICZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH

CYTOCHROM P450

Cytochrom P450 to rodzina enzymów wykazujących aktywność monoooksygenazy. Uważa się, że istnieją one od początku życia na Ziemi, czyli od około 3 i pół miliarda lat. Występują powszechnie u wszystkich organizmów, nawet u *Archeae* i w niemal wszystkich tkankach. Ich największą aktywność obserwuje się w wątrobie i rdzeniu nadnerczy [36]. W genomie człowieka znanych jest około 150 genów kodujących różne cytochromy P450 [37]. Bakteryjne cytochromy P450 są rozpuszczalne i zbudowane z około 400 reszt aminokwasowych. W komórkach eukariotycznych występują nieco dłuższe białka z tej grupy, liczące około 500 reszt aminokwasowych [36]. Są to białka transbłonowe, związane z błoną siateczki śróplazmatycznej oraz wewnętrzną błoną mitochondrialną, zawierające hem jako grupę prostetyczną. U ludzi występuje 18 rodzin cytochromu P450 [38]. Po związaniu *in vitro* z tlenkiem węgla większość z nich wykazuje maksimum absorpcji światła przy długości fali równej 450 nm [36].

Enzymy z rodziny cytochromu P450 w obrębie różnych grup organizmów mają niezwykle szerokie spektrum aktywności. U bakterii uczestniczą w produkcji antybiotyków takich jak na przykład erytromycyna, a także ogrywiają kluczową rolę w procesach bioremediacji poprzez degradację węglowodorów. U grzybów cytochrom P450 katalizuje syntezę ergosterolu i bierze udział w detoksykacji toksyn roślinnych, ułatwiając tym samym proces patogenezy. U roślin natomiast bierze udział w syntezie fitohormonów, fitoaleksyn i pigmentów kwiatowych. U ssaków cytochromy P450, jako enzymy I fazy uczestniczą w metabolizmie leków, syntezie steroidów, metabolizmie kwasów tłuszczowych oraz w przemianie promutagenów do genotoksycznych pochodnych [36].

Cytochrom P450 katalizuje reakcję hydroksylacji przebiegającą zgodnie z sumarycznym wzorem:

$$\text{SH} + \text{O}_2 + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+ \rightarrow \text{SOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD(P)}^+ [36],$$

gdzie SH – substrat hydroksylacji, SOH – produkt hydroksylacji.

Cytochrom P450 jest ważnym elementem w metabolizmie ksenobiotyków, zwłaszcza tych o charakterze hydrofo-

bowym. Niemira i inni oraz Wiśniewska i Mazerska podają bardzo szczegółowy opis cytochromu P450 ze szczególnym uwzględnieniem roli poszczególnych jego izoenzymów w metabolizmie ksenobiotyków, głównie leków [39,40]. Produkty tego metabolizmu zwykle są bardziej hydrofilowe od substratów, co sprzyja ich dalszemu przekształcaniu i wydalaniu [38]. Oprócz reakcji hydroksylacji, cytochrom P450 katalizuje reakcje deaminacji, desulfuracji, dehalogenacji, epoksydacji, N-, S- i O-dealkilacji, N-oksydacji, peroksydacji oraz sulfoksydacji [36].

CYTOCHROM P450 1A2 (CYP1A2)

CYP1A2 to najważniejsza izoforma cytochromu P450 zaangażowana w aktywację HCA. Jest to monoooksygenaza hemotiolowa, u ludzi występuje głównie we frakcji mikrosomalnej wątroby [41]. Enzym ten zaangażowany jest w zależną od NADPH ścieżkę transportu elektronów [42]. Utlenia wiele bardzo zróżnicowanych strukturalnie związków, takich jak steroidy, kwasy tłuszczowe czy ksenobiotyki. Największą aktywność wykazuje w przypadku reakcji 2-hydroksylacji [43]. CYP1A2 bierze udział w metabolizmie aflatoksyny B₁ [44] i acetaminofenu [45], a także zaangażowany jest w metabolizm kofeiny, który odbywa się z jego udziałem w wątrobie [36]. Gen kodujący CYP1A2 znajduje się na chromosomie 15, w bezpośrednim sąsiedztwie genu kodującego inny izoenzym cytochromu P450-CYP1A1 (25kB). Skierowane są one w przeciwnych kierunkach – „head to head” – i mają wspólny region 5' flankujący [42].

Ekspresja CYP1A2 indukowana jest przez bardzo wiele czynników. Do czynników diety, będących jego induktorami należy na przykład grillowane mięso. Innymi induktorami tego enzymu są brokuły, brukselka i tytoń oraz substancje takie jak insulina, omeprazol, fenobarbital, α -naftoflawon, metylocholanren, nafcylina i modafinil. Za inhibitory CYP1A2 uważa się natomiast leki: amiodaron, cymetydynę, fluorochinolony, fluwoksaminę czy tiklopidynę [36]. U ludzi synteza CYP1A2 zachodzi głównie w wątrobie, a w tkankach innych niż wątroba jego synteza jest nieznaczna [42]. Przy jego udziale zachodzi pierwsza z reakcji prowadzących do aktywacji HCA, czyli N-hydroksylacja, której efektem jest powstanie N-hydroksypochodnych HCA (N-OH-HCA) [29].

CYTOCHROM P450 1A1 (CYP1A1)

Tak jak pozostałe izoenzymy cytochromu P450, CYP1A1 należy do monoooksygenaz hemotiolowych i także bierze udział w utlenianiu kwasów tłuszczowych, sterydów i ksenobiotyków [36]. Pod względem sekwencji reszt aminokwasowych wykazuje ponad 70% identyczności z izoenzymem CYP1A2 [36]. Enzym ten występuje w tkankach innych niż wątroba, głównie w płucach, limfocytach i łożysku [36]. Ponieważ CYP1A2 jest w tych tkankach ledwo wykrywalny, znacznie większą rolę w N-hydroksylacji HCA (w której powstają toksyczne pochodne typu N-OH-HCA) może tu odgrywać właśnie CYP1A1 [30]. Biorąc pod uwagę możliwość indukcji jego ekspresji, jak ma to miejsce u osób palących [46], ten izoenzym może w istotny sposób przyczynić się do procesów kancerogenezy zależnych od HCA, szczególnie w organach takich jak płuca [47]. Endogennym

substratem tego izoenzymu jest 17 β -estradiol (E₂), którego hydroksylowe pochodne, powstające w reakcji katalizowanej przez CYP1A1 i CYP1B1, odgrywają istotną rolę w rozwoju nowotworów piersi [48]. Poza aktywacją HCA, bierze także udział w aktywacji policyklicznych węglowodorów aromatycznych, które są również induktorem tego izoenzymu [36]. Jego aktywność, podobnie jak aktywność CYP1A2, hamowana jest przez flawonoidy [49].

CYTOCHROM P450 1B1 (CYP1B1)

Cytochrom P450 1B1 został w pełni zidentyfikowany dopiero w 1994 roku [50]. Jego gen podlega konstytutywnej ekspresji w mózgu, okrężnicy, jelicie cienkim, nerkach, płucach, sercu, leukocytach, prostatie, grasicy, mięśniach szkieletowych i śledzionie [50]. Podobnie jak CYP1A1, CYP1B1 bierze udział w metabolizmie estrogenów, w którym katalizuje reakcję hydroksylacji 17 β -estradiolu [48]. Ponadto, jest głównym enzymem zaangażowanym w aktywację PAH do kancerogennych pochodnych w organizmie [51]. Enzym ten prowadzi również reakcję N-hydroksylacji HCA (z utworzeniem N-OH-HCA) w tkankach innych niż wątroba, jednak na mniejszą skalę niż CYP1A2 i CYP1A1 [30]. Polimorfizm CYP1B1 w niektórych pracach wiązany jest ze zwiększonym ryzykiem zachorowań na raka nerek [52]. Ostatnie badania wykazały istotny udział tego enzymu w rozwoju płodowym. Mutacje w genie kodującym CYP1B1 powodują bowiem wrodzoną jaskrę (glaukomę) [53].

ENZYMY II FAZY ZAANGAŻOWANE W AKTYWACJĘ HETEROCYKLICZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH

N-ACETYLOTRANSFERAZY

N-acetylotransferazy kodowane są u ludzi przez dwa różne geny: NAT1 i NAT2. Produkty obu tych genów (NAT1 i NAT2) katalizują O-acetylację HCA [54]. NAT2 wykazuje najwyższą aktywność w wątrobie i w przewodzie pokarmowym, podczas gdy NAT1 działa w wątrobie (w mniejszym stopniu niż NAT2), jak również w innych tkankach [55]. W przypadku większości N-hydroksypochodnych HCA reakcja acetylacji zachodzi przy udziale NAT2. N-hydroksypochodne PhIP oraz AaC ulegają acetylacji przy udziale obydwu izoform [29]. Obydwa izoenzymy wykazują duży polimorfizm i dzielą populację ludzką na tzw. „szybkich acetylatorów” i „wolnych acetylatorów”. Genotyp „szybkiego acetylatora” związany ze zwiększoną aktywacją HCA do form genotoksycznych, zarówno w obrębie NAT1, jak i NAT2, wydaje się być związany ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka okrężnicy ze względu na obecność obu izoform w tym organie, lecz wyniki badań dotyczących tego zagadnienia wciąż nie są jednoznaczne [54,56]. Polimorfizm w obrębie genu NAT1 ma także wedle niektórych badaczy wpływ na zapadanie na nowotwory okrężnicy i odbytu [55]. Należy nadmienić, że oprócz reakcji O-acetylacji, prowadzącej do aktywacji HCA, N-acetylotransferazy katalizują również reakcje N-acetylacji, powodujące detoksykację tych związków [55]. W związku z tym, w przypadku nowotworów, dla których N-acetylacja jest etapem prowadzącym do detoksykacji HCA, jak w przypadku nowotworu pęcherza moczowego, osoby o genotypie NAT2 „wolnego acetylatora” znajdują się w grupie podwyższonego ryzyka [55].

RODZINA ROZPUSZCZALNYCH SULFOTRANSFERAZ (SULT)

Wszystkie enzymy z grupy sulfotransferaz katalizują sulfonowanie ksenobiotyków oraz bioaktywnych kancerogenów, a także związków endogennych, takich jak estrogeny, steroidy, eikozanoidy, katecholaminy, serotonina czy jodotyronina [32]. Enzymy te katalizują reakcje przeniesienia reszt siarczanowych na grupy hydroksylowe, aminowe, sulfhydrylowe, czy *N*-oksydowe. Produktem reakcji może być siarczan lub ester kwasu siarkowego (w przypadku *O*-sulfonowania). Substraty makromolekularne, takie jak białka, peptydy, lipidy czy glikozaminoglikany, metabolizowane są przez sulfotransferazy związane z błoną aparatu Golgiego, podczas gdy ksenobiotyki oraz małe substraty endogenne, takie jak steroidy, kwasy żółciowe czy neurotransmitery ulegają transformacji z udziałem enzymów pochodzących z cytozolu, należących do rodziny SULT [57]. W ludzkim organizmie występują 3 rodziny enzymów SULT: SULT1, SULT2 i SULT4, spośród których można wyróżnić przynajmniej 13 izoform SULT [57]. Główna z nich kodowana jest przez gen *SULT1A1*, który wykazuje wysoki poziom polimorfizmu. *SULT1A1* wraz z innym enzymem z tej rodziny – *SULT1A2* – przenoszą reszty siarczanowe na hydroksylowe pochodne HCA (na przykład *N*-OH-PhIP) [16,32,58]. *SULT1A1* ma wysoką aktywność w bardzo wielu tkankach, zarówno w wątrobie, jak i poza nią (na przy-

kład w piersi i jelicie), w których prawdopodobnie odgrywa istotną rolę w aktywacji HCA, a w największym stopniu jednej z nich – PhIP [59]. Jeśli chodzi o transformację innych prokancerogenów, enzymy SULT odpowiedzialne są także za aktywację PAH [60].

ENZYMY BIORĄCE UDZIAŁ W DETOKSYKACJI HETEROCYKLICZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH

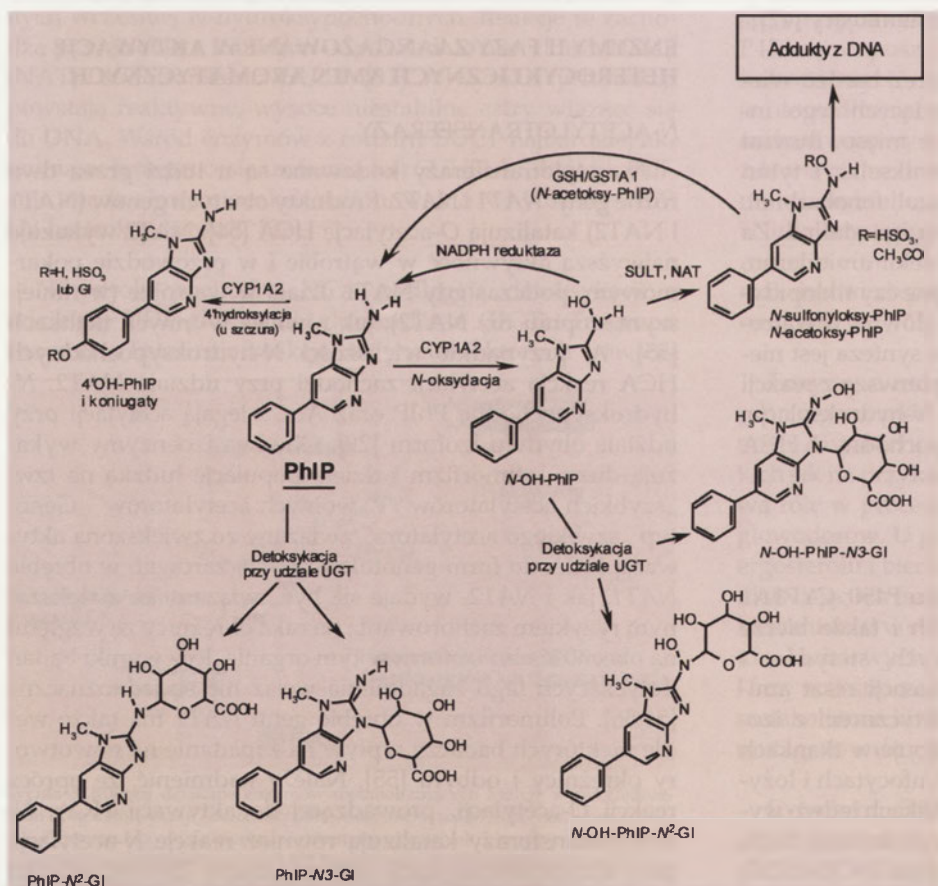
RODZINA S-TRANSFERAZ GLUTATIONU (GST)

Enzymy z grupy GST katalizują reakcję sprzęgania toksycznych związków (w tym HCA) z glutationem [61]. Najważniejsze z nich to GSTM1, GSTT1, GSTA1 i GSTA2. Najbardziej istotną izoformą GSTA1 jest GSTA1-1. Katalizuje ona na przykład detoksykację *N*-acetoksy-PhIP, poprzez redukcję toksycznej pochodnej tego związku do macierzystej aminy. Najbardziej istotną izoformą GSTA2 jest GSTA2-2, która spełnia taką samą funkcję, jak GSTA1-1, jednak przeprowadza redukcję na mniejszą skalę [62]. Wciąż badany jest wpływ polimorfizmu tych enzymów na kancerogenezę. Niektóre prace sugerują wpływ polimorfizmu genu *GSTM1* na zwiększenie ryzyka zachorowań na nowotwory piersi, prostaty, wątroby i okrężnicy [63]. Inne opisują wręcz odwrotne wyniki [64]. Polimorfizm genu *GSTA1* jest natomiast związany z nowotworami okrężnicy [62]. Sprzęganie z glutationem to krok w drodze detoksykacyjnej

wielu ksenobiotyków. Taka reakcja zachodzi na przykład w przypadku PhIP, a dokładniej jej toksycznej pochodnej, *N*-acetoksy-PhIP. Reakcji z glutationem nie obserwuje się z kolei w przypadku IQ i MeIQx. Uważa się zatem, że nie są one substratami dla GST [34,62].

RODZINA UDP- GLUKURONOZYLOTANSFERAZ (UGT)

Enzymy z tej grupy przeprowadzają glukuronidację wielu kancerogennych związków, w tym HCA. Sprzęganie z cukrem to droga detoksykacyjna szeregu endogennych i egzogennych substancji. Enzymy z grupy UGT występują w bardzo wielu różnych organizmach, od bakterii do człowieka [65]. Katalizują one przyłączenie grupy glikozylowej cukru do endogennych hydrofobowych cząsteczek, takich jak bilirubina, hormony steroidowe i tarczycowe, kwasy tłuszczowe czy retinoidy, jak również do wielu hydrofobowych ksenobiotyków [65]. W rezultacie powstają związki bardziej hydrofilowe, które są łatwiej wydalane z organizmu. UDP-glukuronozylotransferazy stanowią odmianę enzymów z rodziny UGT, występujących w organizmach ssaków. Wykorzystują kwas UDP-glukuronowy jako donor



Rycina 4. Schemat metabolizmu PhIP [41], zmodyfikowane. Aktywacja PhIP zachodzi poprzez oksydację do *N*-OH-PhIP, dalej estryfikowane do silnie reaktywnych *N*-sulfonyloksy-PhIP i *N*-acetoksy-PhIP, tworzących addukty z DNA. U szczura istnieje alternatywna droga metabolizmu PhIP – 4'hydroksylacja, prowadząca do detoksykacji PhIP. Detoksykacja PhIP zachodzi głównie w drodze glukuronidacji, której podlegać może zarówno PhIP, jak i *N*-OH-PhIP. *N*-OH-PhIP i *N*-acetoksy-PhIP mogą ponadto zostać zredukowane do PhIP w wyniku działania odpowiednio NADPH reduktazy i transferazy glutationu (GSH/GSTA1).

reszty cukrowej. UDP-glukuronozylotransferazy zlokalizowane są w siateczce śródplazmatycznej i są związane z błoną. Głównym miejscem działania UGT u człowieka jest wątroba, jednak jego obecność stwierdzono również w tkankach takich jak: prostata, nerka, mózg, jelita czy płuca [65]. Badania wykazały, że wiele HCA, a zwłaszcza PhIP, podlega intensywnej detoksykacji na drodze glukuronidacji przy udziale enzymów UGT. Najbardziej aktywną w tym procesie izoformą jest UGT1A1 [33].

METABOLIZM WYBRANYCH HCA

METABOLIZM PhIP

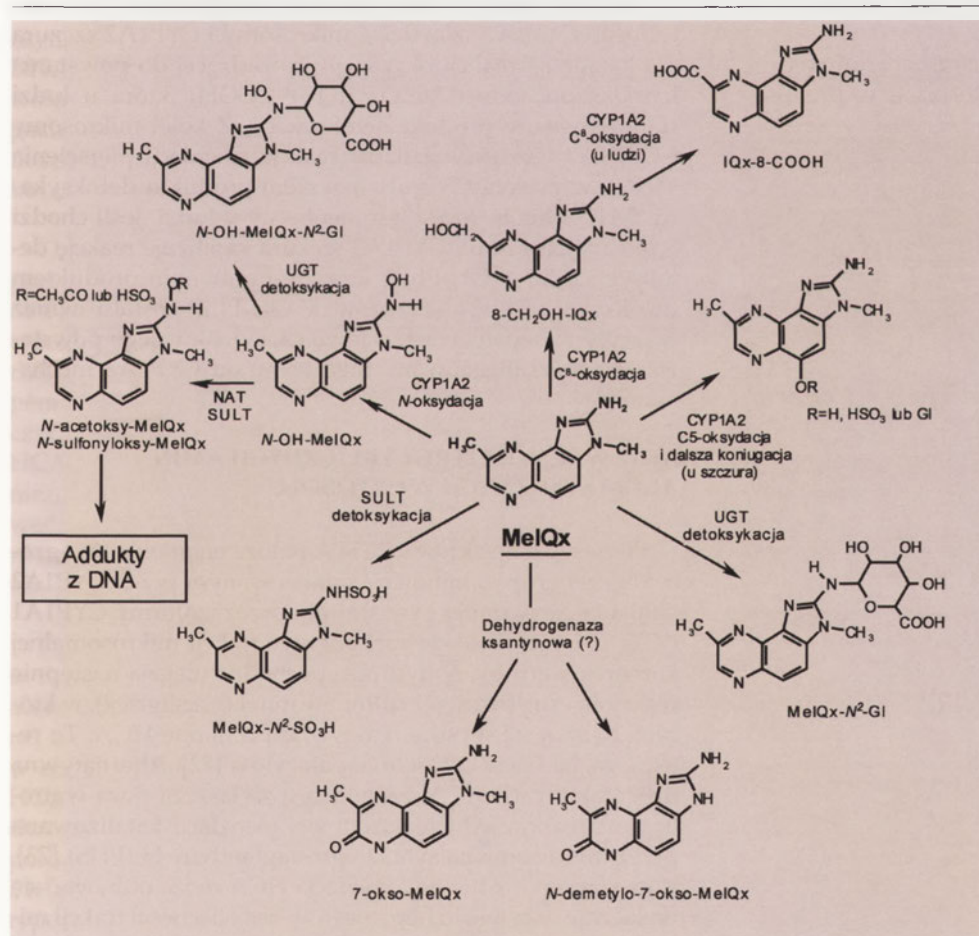
Rycina 4 przedstawia schemat metabolizmu PhIP. Pierwszą reakcją biotransformacji PhIP w organizmie człowieka jest utlenianie przy udziale CYP1A2 w wątrobie, a także CYP1A1 i CYP1B1 w tkankach innych niż wątroba [30]. W postaci *N*-hydroksypochodnej PhIP, powstałej w wyniku utleniania przy udziale cytochromu P450, związek ten może ulegać dalszym przemianom, prowadzącym do detoksykacji. Pod wpływem NADPH reduktazy może zostać zredukowany do macierzystej aminy, a przy udziale enzymów z grupy UGT (głównie UGT1A1) może ulec detoksykacji na drodze sprzęgania z glukuronianem, co prowadzi do

powstania stabilnych koniugatów glukuronianowych [66]. Natomiast aktywacja *N*-hydroksypochodnej PhIP zachodzi poprzez estryfikację przy udziale enzymów II fazy – NAT lub SULT. W wyniku tych reakcji powstają silnie reaktywne pochodne: *N*-sulfonyloksy-PhIP (w przypadku działania SULT) lub *N*-acetoksy-PhIP (w przypadku działania NAT) [31]. Obydwa związki są toksyczne i zdolne do utworzenia adduktów z DNA. *N*-acetoksy-PhIP może także ulec detoksykacji przy udziale systemu GSH/GSTA1 (glutation/transferaza glutationu) [34]. Reakcja ta polega na redukcji toksycznej pochodnej do macierzystej aminy. W organizmie człowieka ważną rolę w detoksykacji PhIP odgrywa także bezpośrednie sprzęganie tej aminy z glukuronianem, przeprowadzane przez enzymy z grupy UGT. Warto wspomnieć, iż w komórkach wątrobowych szczura w metabolizmie PhIP dominuje reakcja 4'-hydroksylacji, a następnie glukuronidacji i sulfonowania 4'-OH-PhIP, co prowadzi do detoksykacji tego związku [67].

METABOLIZM MeIQx

Rycina 5 przedstawia różne drogi metabolizmu MeIQx. Schemat dotyczy zarówno dróg występujących w komórkach człowieka, jak i szczura. Wiele z tych procesów zachodzi w obydwu typach komórek, część tylko w komórkach

człowieka, zaś część wyłącznie w komórkach szczura. Pierwszym etapem aktywacji MeIQx, zachodzącym zarówno w hepatocytach człowieka, jak i szczura, jest *N*-oksydacja do *N*-OH-MeIQx, zachodząca przy udziale CYP1A2. Tak otrzymana *N*-OH-MeIQx może podlegać dalszej aktywacji przez enzymy II fazy z utworzeniem form wiążących się do DNA, lub też ulec detoksykacji do pochodnej *N*²-glukuronidowej (*N*-OH-MeIQx-*N*²-Gl) z udziałem enzymów z grupy UGT. Alternatywną drogą metabolizmu MeIQx jest utlenienie w pozycji C8, również z udziałem CYP1A2. W efekcie tej reakcji powstaje 8-CH₂-OH-IQx. Związek ten może podlegać dalszemu utlenieniu, tworząc kolejną pochodną, IQx-8-COOH. Szlak ten jest głównym procesem detoksykacji MeIQx w komórkach człowieka [68], nie stwierdzono go natomiast u szczura [41]. W komórkach szczurzych utlenianie prowadzone przez enzym CYP1A2 odbywa się przy węglu C5. MeIQx po wnikięciu do organizmu może również od razu (bez poprzedniej *N*-oksydacji) ulec detoksykacji poprzez sprzęganie z kwasem glukuronowym i wytworzenie innej pochodnej glukuronidowej *N*² (MeIQx-*N*²-Gl), także z udziałem enzymów



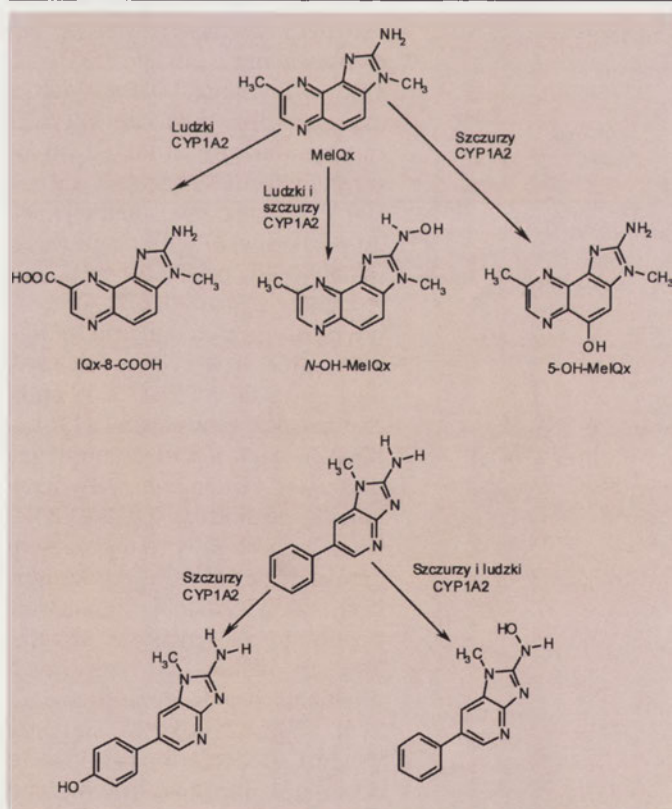
Rycina 5. Schemat metabolizmu MeIQx [41], zmodyfikowany. MeIQx ulega aktywacji poprzez *N*-oksydację do *N*-OH-MeIQx, a dalej do wysoce reaktywnych estrów: *N*-acetoksy-MeIQx i *N*-sulfonyloksy-MeIQx, mogących tworzyć addukty z DNA. Dwuetapowa oksydacja w pozycji C⁸ prowadząca do otrzymania karboksylowej pochodnej, IQx-8-COOH, jest główną drogą detoksykacji MeIQx u człowieka. Inne drogi detoksykacji MeIQx to glukuronidacja MeIQx i *N*-OH-MeIQx, sulfonowanie MeIQx i oksydacja MeIQx w pozycji C⁷. U szczura możliwa jest również detoksykacja na drodze oksydacji MeIQx w pozycji C⁵.

z grupy UGT. Inną przemianą, jakiej może ulec MeIQx w hepatocytach człowieka jest powstawanie pochodnych: 7-okso-MeIQx oraz *N*-demetylo-7-okso-MeIQx, których nie stwierdzono w hepatocytach szczura [41]. Reakcję tę katalizuje najprawdopodobniej dehydrogenaza ksantynowa. Możliwa jest także bezpośrednia reakcja w pozycji *N*² MeIQx z udziałem enzymów z grupy SULT, która prowadzi do powstania sulfamidowej pochodnej MeIQx (MeIQx-*N*²-SO₃H), będącej produktem detoksykacji [41].

RÓŻNICE W METABOLIZMIE HETEROCYKLIKZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH U SZCZURA I CZŁOWIEKA

Badania dotyczące dróg aktywacji heterocyklicznych amin aromatycznych prowadzone były do tej pory głównie na komórkach człowieka, szczura i królika. Chociaż frakcje komórkowe szczura okazały się niezwykle przydatne jako materiał badawczy do tego rodzaju doświadczeń, wykryto kilka zasadniczych różnic międzygatunkowych w przemianach metabolicznych HCA w porównaniu do komórek człowieka, które przedstawiono schematycznie na rycinie 6. Różnice te, dotyczące zarówno aktywności katalitycznej poszczególnych izoform cytochromu P450, jak i regioselektywności reakcji oksydacji HCA, mogą powodować rozbieżności w toksyczności HCA obserwowane u szczurów i ludzi [18,69].

MeIQx i PhIP to heterocykliczne aminy aromatyczne występujące w bardzo znaczących ilościach w przetwa-



Rycina 6. Różnice międzygatunkowe w regioselektywnej oksydacji MeIQx i PhIP przy udziale CYP1A2 [29]. Aktywacja MeIQx, zarówno u człowieka, jak i u szczura, zachodzi poprzez *N*-oksydację. Detoksykacja MeIQx u człowieka polega na oksydacji w pozycji C⁸, zaś u szczura na oksydacji w pozycji C⁵. PhIP jest aktywowane zarówno u człowieka, jak i u szczura w drodze *N*-oksydacji. CYP1A2 szczura, w przeciwieństwie do CYP1A2 człowieka, przeprowadza reakcję oksydacji do 4'-OH-PhIP, który jest u szczurów głównym produktem detoksykacji PhIP.

rzanych termicznie pokarmach mięsnych i rybach. Jak wcześniej wspomniano, te dwie aminy, jak i inne HCA są aktywowane do formy kancerogennej w reakcji *N*-hydroksylacji, która jest przeprowadzana przez cytochrom P450 (CYP1A2 w wątrobie i CYP1A1 oraz CYP1B1 w innych tkankach [30]). Analizy przeprowadzone na oczyszczonych izoenzymach CYP1A2 wykazały, że rekombinowany CYP1A2 człowieka wykazuje 10 do 19-krotnie efektywniejszą aktywację MeIQx i PhIP w porównaniu z CYP1A2 szczura [18]. Co więcej, natężenie reakcji *N*-oksydacji MeIQx w niektórych populacjach hepatocytów człowieka okazało się być zbliżone do natężenia tej reakcji w hepatocytach szczurzych, potraktowanych wcześniej bardzo silnym induktorem CYP1A1/CYP1A2 [18]. Podczas tych badań zauważono również, że poziom syntezy CYP1A2 w wątrobie człowieka jest 10-krotnie wyższy niż w wątrobie szczura [18].

Wyniki badań regioselektywności form CYP1A2 występujących u ludzi i szczurów wykazały znaczące różnice w profilu aktywacji MeIQx [69]. Zarówno mikrosomy z wątroby człowieka, jak i CYP1A2 przeprowadzały oksydację MeIQx do formy genotoksycznej – *N*-hydrokso-MeIQx. Ponadto wyizolowano produkty oksydacji w pozycji C⁸ grupy metylowej (8-CH₂OH-IQx, IQx-8-CHO i IQx-8-COOH). W przeciwieństwie do mikrosomów człowieka i oczyszczonego CYP1A2 człowieka, mikrosomy i CYP1A2 szczura nie katalizują reakcji oksydacji prowadzącej do powstania karboksypochodnej MeIQx (IQx-8-COOH), która u ludzi stanowi ważny produkt detoksykacji. Z kolei mikrosomy i CYP1A2 szczura katalizują reakcję oksydacji pierścienia MeIQx w pozycji C⁵ z utworzeniem produktu detoksykacji, 5-HO-MeIQx, który jest nieobecny u ludzi. Jeśli chodzi o metabolizm PhIP, CYP1A2 szczura katalizuje reakcję detoksykacji do 4'-OH-PhIP, który jest głównym produktem detoksykacji PhIP u szczurów. 4'-OH-PhIP został również wykryty w hepatocytach człowieka, jednak w jego powstawanie jest zaangażowany niezależny od CYP1A2 mechanizm [41].

AKTYWACJA HETEROCYKLIKZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH W CYTOSOLU

Pierwszy etap aktywacji HCA polega na utlenieniu egzocyklicznej grupy aminowej, katalizowanym przez CYP1A2 [70], a także w mniejszym stopniu przez izoformy CYP1A1 i CYP1B1 [71]. Reakcja zachodzi we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby. *N*-hydroksypochodne ulegają następnie reakcjom estryfikacji (*O*-sulfonowaniu i *O*-acetylacji), w których tworzą się wysoce reaktywne pochodne HCA. Te reakcje zachodzą w cytosolu hepatocytów [72]. Alternatywną drogą aktywacji HCA, zachodzącą zwłaszcza poza wątrobą, jest reakcja jednoelektronowej oksydacji katalizowana przez mikrosomalną syntazę prostaglandyny H (PHS) [73]. Wykazano ponadto, że aktywacja HCA może odbywać się wyłącznie w cytosolu hepatocytów bez obecności frakcji mikrosomalnej. Badania z wykorzystaniem frakcji cytosolowej S-12 wykazały, że w przypadku IQ i MeIQ poziom aktywacji jest porównywalny z poziomem aktywacji obserwowanym przy zastosowaniu frakcji mikrosomalnej, a w przypadku aktywacji Trp-P-2 frakcja cytosolowa S-12 okazała się nawet efektywniejsza niż frakcja mikrosomalna [74].

ZNACZENIE POLIMORFIZMU GENÓW W METABOLIZMIE HETEROCYKLICZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH

Wiązanie HCA do DNA, a w konsekwencji pojawienie się mutacji, w dużej mierze zależy od równowagi pomiędzy szlakami aktywacji i detoksykacji HCA, jak również od efektywności naprawy DNA. Aktywność większości enzymów zaangażowanych w metabolizm HCA jest zdeterminowana osobniczymi cechami genetycznymi, a dodatkowo może być modyfikowana poprzez rozmaite czynniki środowiskowe, takie jak np. styl życia.

Wyniki badań *in vitro* jednoznacznie wskazują na wpływ polimorfizmu genów na aktywność biologiczną HCA. Wykazano, że hamowanie wiązania wysoce reaktywnej pochodnej *N*-acetoksy-PhIP do DNA w obecności GST jest ściśle zależna od użytej izoformy tego enzymu. Najbardziej skuteczna w tym przypadku okazała się izoforma alfa [34]. Badania z wykorzystaniem komórek raka prostaty wykazały z kolei, że ekspresja *GSTP1* powoduje zmniejszenie ilości adduktów powstających w komórkach, w których jego ekspresja była wyciszona [75]. Analizę poziomu adduktów przeprowadzono również dla HCA przy zastosowaniu odpowiednio izoformy *NAT2* szybko- i wolno acetylującej. Okazało się, że izoforma *NAT2* szybko acetylująca przyczynia się do powstawania większej ilości adduktów HCA-DNA w porównaniu z wolno acetylującą izoformą *NAT2* wolno acetylującą [76]. Badania na kongenicznych szczepach chomika syryjskiego wykazały z kolei brak różnic w ilości adduktów PhIP-DNA u osobników z wolno – i szybko acetylującym genotypem *NAT2* [77].

Dane dotyczące wpływu polimorfizmu genetycznego na poziom adduktów HCA-DNA u ludzi są bardzo ograniczone i często niejednoznaczne. Wykazano, że u osób z genotypem *NAT2* wolno acetylującym ilość adduktów DNA w tkance pobranej z piersi była wyższa niż u osób z genotypem *NAT2* szybkich acetylatorów. Należy jednak zaznaczyć, że adduktów tych nie udało się zidentyfikować jako HCA. Jednocześnie wykazano, że poziom adduktów był niezależny od genotypu *NAT1* [78]. Można zatem wnioskować, że podobnie jak w przypadku pęcherza moczowego, w tkance piersi *NAT* odgrywają rolę w detoksykacji HCA, a nie, jak w przypadku okrężnicy, w ich aktywacji.

Podwyższony poziom całkowitej ilości adduktów DNA w tkance piersi u osób posiadających genotyp *NAT2* wolno acetylujący został również stwierdzony w innej, analogicznej analizie [79]. Dodatkowo poddano analizie polimorfizm w obrębie innych genów zaangażowanych w metabolizm HCA. Wykazano, że wśród palaczy homozygoty *CYP1A1*1* charakteryzowały się mniejszą ilością adduktów DNA w porównaniu z osobami o genotypach *CYP1A1*1*2* i *CYP1A1*2*2*. Co więcej, stwierdzono, że w przypadku genotypów *CYP1A1*1*2* i *CYP1A1*2*2* poziom adduktów typu benzo[α]piren był zdecydowanie wyższy niż u osób z genotypem *CYP1A1*1*1* [79]. Inne doniesienia przemawiają z kolei za brakiem zależności pomiędzy polimorfizmem w obrębie *CYP1A1* a całkowitą ilością adduktów DNA w tkance piersi [80]. Podobne wyniki uzyskano dla genów: *CYP1A2*, *GSTT1*, *GSTM1* i *NQO1* (NAD(P)H oksydoreduktazy chino-

nowej). Zaobserwowano z kolei zwiększoną ilość adduktów u osób z wariantem genu *GSTP1*B* lub *GSTP1*C* w porównaniu z homozygotami typu dzikiego, *GSTP1*A/A* [80].

W analizie zawartości adduktów PhIP-DNA w leukocytach chorych na nowotwory okrężnicy pacjentów, stwierdzono, że poziom adduktów był niezależny od polimorfizmu w obrębie genów *NAT1*, *NAT2*, *SULT1A1*, *GSTM1* i *GSTA1*. Stwierdzono natomiast znacząco podwyższoną ilość adduktów w grupie młodych osób posiadających dwa zmutowane allele genu *GSTA1* w porównaniu z heterozygotami bądź homozygotami typu dzikiego [81].

Wpływ polimorfizmu genów na metabolizm HCA obserwuje się również poprzez badanie poziomu poszczególnych metabolitów HCA wydalanych w moczu. U osób z wysokim poziomem aktywności *CYP1A2* ilość wydalanego niezmodyfikowanego MeIQx była niższa, co może wskazywać na to, że u tych osób większa ilość MeIQx uległa przekształceniu do genotoksycznych pochodnych [82]. W tej samej analizie nie stwierdzono z kolei związku pomiędzy aktywnością *NAT2* a poziomem wydalanego MeIQx w moczu [82]. Inne doniesienia potwierdzają niższą zawartość wydalanego niezmetabolizowanego MeIQx u osób z wysoką aktywnością *CYP1A2*. Jednocześnie można zauważyć, że w przypadku PhIP taka odwrotna zależność pomiędzy aktywnością *CYP1A2* a ilością HCA wydalanych w postaci niezmetabolizowanej nie ma miejsca [83]. Świadczyć to może o tym, że metabolizm MeIQx u ludzi jest silniej zależny od aktywności *CYP1A2* niż w przypadku metabolizmu PhIP [83].

Jak widać, dotychczasowe wyniki badań dotyczące wpływu polimorfizmu genów na metabolizm HCA, szczególnie tych przeprowadzonych na ludziach, są niejednoznaczne, a także często nie potwierdzają one wyników uzyskanych z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych. Można zatem stwierdzić, że polimorfizm genów metabolizujących HCA nie tłumaczy obserwowanych międzyosobniczych różnic w profilu metabolizmu HCA, co wskazywać może na to, że czynniki zewnętrzne, takie jak palenie papierosów czy ilość spożywanych warzyw i owoców mogą mieć większy wpływ niż czynniki genetyczne na zróżnicowane w obrębie populacji ryzyko związane z ekspozycją na HCA.

PODSUMOWANIE

Składniki diety stanowią jedną z najważniejszych przyczyn zapadania na choroby nowotworowe. Spożywanie mięsa poddanego silnej obróbce termicznej, podczas której powstają heterocykliczne aminy aromatyczne (HCA), znacząco zwiększa ryzyko wystąpienia nowotworów układu pokarmowego, piersi czy prostaty. W związku z tym zaproponowano, że HCA odgrywają niezwykle istotną rolę w etiologii tych nowotworów. Według IARC (International Agency for Research on Cancer, klasyfikacja z 1997 roku) HCA należą do klasy 2A lub 2B, czyli są sklasyfikowane jako związki prawdopodobnie lub możliwie kancerogene dla ludzi. HCA są w organizmie metabolizowane przez enzymy metabolizmu ksenobiotyków (XME, ang. *xenobiotic metabolism enzymes*), co może prowadzić do ich aktywacji lub też detoksykacji. Zarówno liczne badania epidemio-

logiczne, jak i wyniki badań na zwierzętach dostarczają dowodów na kancerogenne działanie HCA. Jednakże oceniając potencjalne ryzyko związane ze spożywaniem HCA wśród ludzi na podstawie wyników badań na zwierzętach laboratoryjnych, należy wziąć pod uwagę istotne różnice międzygatunkowe w profilu metabolizmu HCA. Ogromny wpływ na potencjał kancerogeny HCA mają również czynniki takie jak indywidualne preferencje żywieniowe (związane głównie ze spożywaniem związków o działaniu przeciwnowotworowym, takich jak np. składniki wielu warzyw i owoców) oraz różnice w metabolizmie HCA u poszczególnych osób wynikające z polimorfizmu genów metabolizmu ksenobiotyków.

PIŚMIENNICTWO

- Ames BN, Gold LS (1997) The causes and prevention of cancer: gaining perspective. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 4: 865-873
- Willett WC (1995) Diet, nutrition, and avoidable cancer. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 8: 165-170
- Cross AJ, Leitzmann MF, Gail MH, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Sinha R (2007) A prospective study of red and processed meat intake in relation to cancer risk. *PLoS Med* 4: e325
- Sinha R, Peters U, Cross AJ, Kulldorff M, Weissfeld JL, Pinsky PF, Rothman N, Hayes RB (2005) Meat, meat cooking methods and preservation, and risk for colorectal adenoma. *Cancer Res* 65: 8034-8041
- Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE (2008) Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer* 60: 131-144
- Dai Q, Shu XO, Jin F, Gao YT, Ruan ZX, Zheng W (2002) Consumption of animal foods, cooking methods, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 801-808
- Cross AJ, Sinha R (2004) Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environ Mol Mutagen* 44: 44-55
- Cheng KW, Chen F, Wang M (2006) Heterocyclic amines: chemistry and health. *Mol Nutr Food Res* 50: 1150-1170
- Keating GA, Layton DW, Felton JS (1999) Factors determining dietary intakes of heterocyclic amines in cooked foods. *Mutat Res* 443: 149-156
- Skog K, Solyakov A (2002) Heterocyclic amines in poultry products: a literature review. *Food Chem Toxicol* 40: 1213-1221
- Skog KI, Johansson MA, Jagerstad MI (1998) Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem Toxicol* 36: 879-896
- Kataoka H (1997) Methods for the determination of mutagenic heterocyclic amines and their applications in environmental analysis. *J Chromatogr A* 774: 121-142
- Rohrmann S, Zoller D, Hermann S, Linseisen J (2007) Intake of heterocyclic aromatic amines from meat in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Heidelberg cohort. *Br J Nutr* 98: 1112-1115
- Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M (2004) Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci* 95: 290-299
- Felton JS, Knize MG, Wu RW, Colvin ME, Hatch FT, Malfatti MA (2007) Mutagenic potency of food-derived heterocyclic amines. *Mutat Res* 616: 90-94
- Glatt H, Pabel U, Meindl W, Frederiksen H, Frandsen H, Muckel E (2004) Bioactivation of the heterocyclic aromatic amine 2-amino-3-methyl-9H-pyrido [2,3-b]indole (MeAαPhC) in recombinant test systems expressing human xenobiotic-metabolizing enzymes. *Carcinogenesis* 25: 801-807
- Wu RW, Tucker JD, Sorensen KJ, Thompson LH, Felton JS (1997) Differential effect of acetyltransferase expression on the genotoxicity of heterocyclic amines in CHO cells. *Mutat Res* 390: 93-103
- Turesky RJ, Constable A, Richoz J, Varga N, Markovic J, Martin MV, Guengerich FP (1998) Activation of heterocyclic aromatic amines by rat and human liver microsomes and by purified rat and human cytochrome P450 1A2. *Chem Res Toxicol* 11: 925-936
- Nagao M, Ushijima T, Toyota M, Inoue R, Sugimura T (1997) Genetic changes induced by heterocyclic amines. *Mutat Res* 376: 161-167
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 14: 473-486
- Sinha R, Chow WH, Kulldorff M, Denobile J, Butler J, Garcia-Closas M, Weil R, Hoover RN, Rothman N (1999) Well-done, grilled red meat increases the risk of colorectal adenomas. *Cancer Res* 59: 4320-4324
- Nowell S, Coles B, Sinha R, MacLeod S, Luke RD, Stotts C, Kadlubar FF, Ambrosone CB, Lang NP (2002) Analysis of total meat intake and exposure to individual heterocyclic amines in a case-control study of colorectal cancer: contribution of metabolic variation to risk. *Mutat Res* 506-507: 175-185
- Lang NP, Butler MA, Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Hauer Jensen M, Kadlubar FF (1994) Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3: 675-682
- Le ML, Hankin JH, Pierce LM, Sinha R, Nerurkar PV, Franke AA, Wilkens LR, Kolonel LN, Donlon T, Seifried A, Custer LJ, Lum-Jones A, Chang W (2002) Well-done red meat, metabolic phenotypes and colorectal cancer in Hawaii. *Mutat Res* 506-507: 205-214
- Barrett JH, Smith G, Waxman R, Gooderham N, Lightfoot T, Garner RC, Augustsson K, Wolf CR, Bishop DT, Forman D (2003) Investigation of interaction between N-acetyltransferase 2 and heterocyclic amines as potential risk factors for colorectal cancer. *Carcinogenesis* 24: 275-282
- Schut HA, Snyderwine EG (1999) DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 20: 353-368
- Turesky RJ, Lang NP, Butler MA, Teitel CH, Kadlubar FF (1991) Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. *Carcinogenesis* 12: 1839-1845
- Turesky RJ, Vouros P (2004) Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine-DNA adducts in vitro and in vivo. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 802: 155-166
- Turesky RJ (2007) Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicol Lett* 168: 219-227
- Crofts FG, Sutter TR, Strickland PT (1998) Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by human cytochrome P4501A1, P4501A2 and P4501B1. *Carcinogenesis* 19: 1969-1973
- Airolidi L, Magagnotti C, Pastorelli R, Fanelli R (2004) Enzyme polymorphisms influencing the metabolism of heterocyclic aromatic amines. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 802: 175-181
- Glatt H, Meindl W (2004) Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs). *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369: 55-68
- Malfatti MA, Felton JS (2001) N-glucuronidation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N-hydroxy-PhIP by specific human UDP-glucuronosyltransferases. *Carcinogenesis* 22: 1087-1093
- Lin D, Meyer DJ, Ketterer B, Lang NP, Kadlubar FF (1994) Effects of human and rat glutathione S-transferases on the covalent DNA binding of the N-acetoxy derivatives of heterocyclic amine carcinogens in vitro: a possible mechanism of organ specificity in their carcinogenesis. *Cancer Res* 54: 4920-4926
- Turesky RJ (2002) Heterocyclic aromatic amine metabolism, DNA adduct formation, mutagenesis, and carcinogenesis. *Drug Metab Rev* 34: 625-650
- Danielson PB (2002) The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab* 3: 561-597
- Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW (2004) Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* 14: 1-18

38. Nebert DW, Russell DW (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360: 1155-1162
39. Wisniewska A, Mazerska Z (2009) Izoenzymy cytochromu P450 w metabolizmie związków endo- i egzogennych. *Postepy Biochem* 55: 259-271
40. Niemira M, Wisniewska A, Mazerska Z (2009) Rola polimorfizmu i zróżnicowanej ekspresji genów cytochromów P450 w metabolizmie ksenobiotyków. *Postepy Biochem* 55: 279-289
41. Turesky RJ, Guengerich FP, Guillouzo A, Langouet S (2002) Metabolism of heterocyclic aromatic amines by human hepatocytes and cytochrome P4501A2. *Mutat Res* 506-507: 187-195
42. Landi MT, Sinha R, Lang NP, Kadlubar FF (1999) Human cytochrome P4501A2. *IARC Sci Publ* 173-195
43. Badawi AF, Cavalieri EL, Rogan EG (2001) Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16alpha-hydroxylation of 17beta-estradiol. *Metabolism* 50: 1001-1003
44. Gallagher EP, Wienkers LC, Stapleton PL, Kunze KL, Eaton DL (1994) Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the bioactivation of aflatoxin B1. *Cancer Res* 54: 101-108
45. Tonge RP, Kelly EJ, Bruschi SA, Kalhorn T, Eaton DL, Nebert DW, Nelson SD (1998) Role of CYP1A2 in the hepatotoxicity of acetaminophen: investigations using Cyp1a2 null mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 153: 102-108
46. Kim JH, Sherman ME, Curriero FC, Guengerich FP, Strickland PT, Sutter TR (2004) Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers. *Toxicol Appl Pharmacol* 199: 210-219
47. Ma X, Idle JR, Malfatti MA, Krausz KW, Nebert DW, Chen CS, Felton JS, Waxman DJ, Gonzalez FJ (2007) Mouse lung CYP1A1 catalyzes the metabolic activation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis* 28: 732-737
48. Parl FF, Dawling S, Roodi N, Croke PS (2009) Estrogen metabolism and breast cancer: a risk model. *Ann N Y Acad Sci* 1155: 68-75
49. Zhai S, Dai R, Friedman FK, Vestal RE (1998) Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metab Dispos* 26: 989-992
50. Sutter TR, Tang YM, Hayes CL, Wo YY, Jabs EW, Li X, Yin H, Cody CW, Greenlee WF (1994) Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J Biol Chem* 269: 13092-13099
51. Shimada T, Oda Y, Gillam EM, Guengerich FP, Inoue K (2001) Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009. *Drug Metab Dispos* 29: 1176-1182
52. Sasaki M, Tanaka Y, Okino ST, Nomoto M, Yonezawa S, Nakagawa M, Fujimoto S, Sakuragi N, Dahiya R (2004) Polymorphisms of the CYP1B1 gene as risk factors for human renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 10: 2015-2019
53. Chakrabarti S, Kaur K, Kaur I, Mandal AK, Parikh RS, Thomas R, Majumder PP (2006) Globally, CYP1B1 mutations in primary congenital glaucoma are strongly structured by geographic and haplotype backgrounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 43-47
54. Hein DW (2000) N-Acetyltransferase genetics and their role in predisposition to aromatic and heterocyclic amine-induced carcinogenesis. *Toxicol Lett* 112-113: 349-356
55. Hein DW (2002) Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res* 506-507: 65-77
56. Sachse C, Smith G, Wilkie MJ, Barrett JH, Waxman R, Sullivan F, Forman D, Bishop DT, Wolf CR (2002) A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 23: 1839-1849
57. Glatt H, Engelke CE, Pabel U, Teubner W, Jones AL, Coughtrie MW, Andrae U, Falany CN, Meinel W (2000) Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett* 112-113: 341-348
58. Muckel E, Frandsen H, Glatt HR (2002) Heterologous expression of human N-acetyltransferases 1 and 2 and sulfotransferase 1A1 in *Salmonella typhimurium* for mutagenicity testing of heterocyclic amines. *Food Chem Toxicol* 40: 1063-1068
59. Windmill KF, Christiansen A, Teusner JT, Bhasker CR, Birkett DJ, Zhu X, McManus ME (1998) Localisation of aryl sulfotransferase expression in human tissues using hybridisation histochemistry and immunohistochemistry. *Chem Biol Interact* 109: 341-346
60. Gamage N, Barnett A, Hempel N, Duggleby RG, Windmill KF, Martin JL, McManus ME (2006) Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol Sci* 90: 5-22
61. Singh MS, Michael M (2009) Role of xenobiotic metabolic enzymes in cancer epidemiology. *Methods Mol Biol* 472: 243-264
62. Coles B, Nowell SA, MacLeod SL, Sweeney C, Lang NP, Kadlubar FF (2001) The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on colorectal cancer risk. *Mutat Res* 482: 3-10
63. Sheweta SA, Tilmisany AK (2003) Cancer and phase II drug-metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* 4: 45-58
64. Gertig DM, Stampfer M, Haiman C, Hennekens CH, Kelsey K, Hunter DJ (1998) Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and colorectal cancer risk: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 1001-1005
65. Guillemette C (2003) Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J* 3: 136-158
66. Malfatti MA, Felton JS (2004) Human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 is the primary enzyme responsible for the N-glucuronidation of N-hydroxy-PhIP *in vitro*. *Chem Res Toxicol* 17: 1137-1144
67. Langouet S, Paehler A, Welti DH, Kerriguy N, Guillouzo A, Turesky RJ (2002) Differential metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in rat and human hepatocytes. *Carcinogenesis* 23: 115-122
68. Langouet S, Welti DH, Kerriguy N, Fay LB, Huynh-Ba T, Markovic J, Guengerich FP, Guillouzo A, Turesky RJ (2001) Metabolism of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in human hepatocytes: 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoxaline-8-carboxylic acid is a major detoxification pathway catalyzed by cytochrome P450 1A2. *Chem Res Toxicol* 14: 211-221
69. Turesky RJ, Parisod V, Huynh-Ba T, Langouet S, Guengerich FP (2001) Regioselective differences in C(8)- and N-oxidation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline by human and rat liver microsomes and cytochromes P450 1A2. *Chem Res Toxicol* 14: 901-911
70. Ishii K, Yamazoe Y, Kamataki T, Kato R (1981) Metabolic activation of glutamic acid pyrolysis products, 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole and 2-amino-dipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole, by purified cytochrome P-450. *Chem Biol Interact* 38: 1-13
71. Gonzalez FJ, Gelboin HV (1991) Human cytochromes P450: evolution, catalytic activities and interindividual variations in expression. *Prog Clin Biol Res* 372: 11-20
72. Yamazoe Y, Shimada M, Kamataki T, Kato R (1982) Covalent binding of N-hydroxy-Trp-P-2 to DNA by cytosolic proline-dependent system. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 165-172
73. Petry TW, Krauss RS, Eling TE (1986) Prostaglandin H synthase-mediated bioactivation of the amino acid pyrolysate product Trp P-2. *Carcinogenesis* 7: 1397-1400
74. De FS, Bencicelli C, D'Agostini F, Izzotti A, Camoirano A (1994) Cytosolic activation of aromatic and heterocyclic amines. Inhibition by dicoumarol and enhancement in viral hepatitis B. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 6: 69-74
75. Nelson CP, Kidd LC, Sauvageot J, Isaacs WB, De Marzo AM, Groopman JD, Nelson WG, Kensler TW (2001) Protection against 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine cytotoxicity and DNA adduct formation in human prostate by glutathione S-transferase P1. *Cancer Res* 61: 103-109
76. Stone EM, Williams JA, Grover PL, Gusterson BA, Phillips DH (1998) Interindividual variation in the metabolic activation of heterocyclic

- amines and their N-hydroxy derivatives in primary cultures of human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis* 19: 873-879
77. Fretland AJ, Devanaboyina US, Feng Y, Leff MA, Xiao GH, Webb SJ, Hein DW (2001) Oral administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) yields PhIP-DNA adducts but not tumors in male Syrian hamsters congenic at the N-acetyltransferase 2 (NAT2) locus. *Toxicol Sci* 59: 226-230
78. Pfau W, Stone EM, Brockstedt U, Carmichael PL, Marquardt H, Phillips DH (1998) DNA adducts in human breast tissue: association with N-acetyltransferase-2 (NAT2) and NAT1 genotypes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 1019-1025
79. Firozi PF, Bondy ML, Sahin AA, Chang P, Lukmanji F, Singletary ES, Hassan MM, Li D (2002) Aromatic DNA adducts and polymorphisms of CYP1A1, NAT2, and GSTM1 in breast cancer. *Carcinogenesis* 23: 301-306
80. Brockstedt U, Krajcinovic M, Richer C, Mathonnet G, Sinnett D, Pfau W, Labuda D (2002) Analyses of bulky DNA adduct levels in human breast tissue and genetic polymorphisms of cytochromes P450 (CYPs), myeloperoxidase (MPO), quinone oxidoreductase (NQO1), and glutathione S-transferases (GSTs). *Mutat Res* 516: 41-47
81. Magagnotti C, Pastorelli R, Pozzi S, Andreoni B, Fanelli R, Airoidi L (2003) Genetic polymorphisms and modulation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-DNA adducts in human lymphocytes. *Int J Cancer* 107: 878-884
82. Sinha R, Rothman N, Mark SD, Murray S, Brown ED, Levander OA, Davies DS, Lang NP, Kadlubar FF, Hoover RN (1995) Lower levels of urinary 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in humans with higher CYP1A2 activity. *Carcinogenesis* 16: 2859-2861
83. Stillwell WG, Kidd LC, Wishnok JS, Tannenbaum SR, Sinha R (1997) Urinary excretion of unmetabolized and phase II conjugates of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in humans: relationship to cytochrome P4501A2 and N-acetyltransferase activity. *Cancer Res* 57: 3457-3464

Heterocyclic aromatic amines, food-derived mutagens: metabolism and relevance to cancer susceptibility

Anna Woziwodzka[✉], Marta Tarasewicz, Jacek Piosik

Department of Molecular and Cellular Biology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology University of Gdańsk and Medical University of Gdańsk (IFB UG-MUG), 24 Kładki St., 80-822 Gdańsk, Poland

[✉]email: anna.woziwodzka@biotech.ug.gda.pl

Key words: food-borne mutagens, cancer, heterocyclic amines, metabolism, cytochrome P450, adducts

ABSTRACT

It is estimated that diet contributes to as much as one-third of cancer incidents. Heterocyclic aromatic amines (HCAs) are well-known mutagens/carcinogens found in thermal-processed meat and fish. HCAs require metabolic activation to exert their carcinogenic potential. First step in HCAs activation – the generation of N-hydroxy-HCA derivatives – is catalyzed by cytochrome P450, mainly isoenzyme CYP1A2. Further activation is carried out by N-acetyltransferases and sulfotransferases, which catalyze esterification of N-hydroxy-HCAs. The products of these reactions are highly genotoxic, capable of direct interaction with DNA by adduct formation. HCA-DNA adducts may cause errors in DNA replication and the generation of mutations, which, when not repaired, may contribute to cancer development. On the other hand, among enzymes involved in HCAs detoxication, UDP-glucuronosyltransferases and glutathione S-transferases can be mentioned. Balance between activation and detoxication processes of HCAs, together with genetically determined differences in HCA metabolism are crucial for the assessment of HCA-dependent cancer risk among individuals.

Spór o źródła mocy katalitycznej enzymów

STRESZCZENIE

Źródło niezwyklej mocy katalitycznej enzymów jest nadal przedmiotem kontrowersji. Eksperymentalne udokumentowanie zdolności enzymów do użycia naturalnych ruchów dynamicznych ich poszczególnych elementów strukturalnych w procesie katalitycznym nie zamknęło problemu pochodzenia energii koniecznej do wykonania pracy katalitycznej. Wydaje się zatem, że rozwiązanie tego zagadnienia nastąpi dopiero po takim zwiększeniu mocy komputerów, kiedy możliwa będzie symulacja *ab initio* całej, olbrzymiej cząsteczki białka lub kwasu rybonukleinowego, zaangażowanej w proces katalityczny.

WPROWADZENIE

Burzliwy rozwój technik biologii molekularnej a szczególnie sposobów kierowanej mutagenyzy oraz postęp w krystalograficznych badaniach trójwymiarowej struktury wielkich cząsteczek, wzbudziły pod koniec ubiegłego wieku oczekiwania na szybkie rozwiązanie tajemnicy niezwyklej zdolności katalitycznych enzymów. Jednak pomimo rozpoznania wielu mechanizmów katalitycznych, dla żadnego z enzymów nie udało się dotąd przedstawić kompletnego, ilościowego wyjaśnienia osiąganych przyspieszeń. Prawdopodobnie ten właśnie fakt sprawia, że nadal jesteśmy świadkami zarówno ponawiania prób „kwantyfikacji” znanych wcześniej teorii [1], ponownego sprawdzania odrzuconych hipotez [2,3], prób upowszechnienia bardziej logicznej nomenklatury [4], jak i prób adopcji nowszych teorii i metod do badań katalizy enzymatycznej [5-8]. W latach dziewięćdziesiątych redakcja *Journal of Biological Chemistry* [9] a kilka lat później *European Journal of Biochemistry* (obecnie *FEBS Journal*) [10] oraz Królewskie Towarzystwo Naukowe [11] zorganizowały specjalne dyskusje dotyczące tego problemu z publikacją serii artykułów przeglądowych, będących bezpośrednio konfrontacją różnych poglądów na mechanizmy katalityczne enzymów oraz na ich źródła. Niniejszy przegląd, będący skondensowaną relacją z tych trzech ważnych dla enzymologii wydarzeń, zawiera również krótką prezentację najważniejszych narzędzi teoretycznych oraz próbę podsumowania aktualnego stanu wiedzy na ten temat.

NAJWAŻNIEJSZE NARZĘDZIA TEORETYCZNE BĘDĄCE PODSTAWĄ DISKUSJI


JEDNOWYMIAROWY PROFIL ENERGETYCZNY I TEORIA STANU PRZEJŚCIOWEGO

Zaproponowany przez Polanyi'a [12] diagram zmian poziomu energetycznego reagentów, liczy już sobie prawie 90 lat i po rozwinięciu teorii stanu przejściowego [13] oraz po jej uzupełnieniu o postulat Hammonda i teorię Marcusa, jest powszechnie używanym narzędziem zarówno w dydaktyce jak i w praktyce badawczej. Diagram Polanyi'a-Eyringa jest właściwie przekrojem przez barierę energetyczną rozdzielającą studnie potencjału substratu i produktu w reakcjach chemicznych. Postulat Hammonda [14] dotyczy zależności pomiędzy strukturą stanu przejściowego a położeniem i wysokością tej bariery energetycznej, natomiast teoria Marcusa [15] opisuje wielkość i kształt tej bariery dla reakcji przenoszenia elektronów oraz wpływ solwentu na taką reakcję. Diagram Polanyi'a-Eyringa w odniesieniu do reakcji enzymatycznych jest oczywiście bardziej złożony niż diagramy zwykłych reakcji chemicznych (Ryc. 1).

Sama teoria stanu przejściowego (ang. *transition state theory*) jest oparta o dwa podstawowe założenia, z których jedno dotyczy istnienia dynamicznej przeszkody w reakcjach chemicznych a drugie odnosi się do stosowalności prawa

Jan Hutny 

Katedra Biochemii Farmakologii i Toksykologii, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

 Katedra Biochemii Farmakologii i Toksykologii, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C. Norwida 31, 50-375 Wrocław; tel.: (71) 320 54 35, e-mail: jan.hutny@gmail.com

Artykuł otrzymano 10 lutego 2010 r.
Artykuł zaakceptowano 19 kwietnia 2010 r.

Słowa kluczowe: kataliza enzymatyczna, sprawność katalityczna, stan przejściowy

Wykaz skrótów: ES – kompleks enzymu z substratem; S[‡] – stan przejściowy

Podziękowanie: Autor dziękuje za pomoc w publikacji tego artykułu Prorektorowi d/s Nauki oraz Dziekanowi Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

działania mas w pierwszym etapie pokonywania tej przeszkody. Teorię można ilustrować powszechnie znanym empirycznym wzorem Arrheniusa:

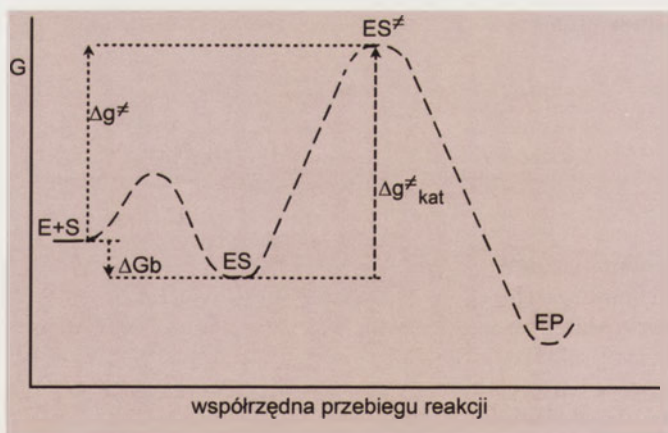
$$k = A \exp(\Delta E^\ddagger / k_B T) \quad (\text{wzór 1}),$$

w którym symbol k oznacza stałą prędkości reakcji, E^\ddagger jest energią aktywacji, natomiast wyraz przedwykładniczy (A) obejmuje prędkość absolutną Polanyi'a-Eyringa oraz szereg innych czynników takich jak: tunelowanie [16], efekt tarcia [17], współczynnik powrotnego przekraczania bariery i współczynnik fazowego odchylenia od zrównoważonej dystrybucji Boltzmana [7]. Jednak dla celów obliczeniowych, zwłaszcza w enzymologii, używane są jego bardziej rozbudowane wersje, jak np. ta prezentowana przez Warshela [18]:

$$k = \kappa \left(\frac{1}{2} \langle |x| \rangle_{TS} / \Delta x^* \right) \exp[-\Delta g^* / k_B T] \quad (\text{wzór 2}).$$

W powyższym wzorze mamy wyraźne rozdzielanie wyrażeń dotyczących efektów dynamicznych od probabilistycznych. Współczynnik transmisji (κ) obejmuje wszystkie elementy dynamiczne, podczas gdy symbol Δg^* – oznaczający energię swobodną aktywacji, zawiera wszystkie elementy probabilistyczne. Pozostałe symbole oznaczają odpowiednio: k – stałą prędkości reakcji, $\langle |x| \rangle_{TS}$ – średnią wielkość absolutnej prędkości wzdłuż współrzędnej reakcji w stanie przejściowym, k_B – stałą Boltzmana, T – temperaturę absolutną. Zastosowanie takiego wzoru pozwala uniknąć nieporozumień semantycznych w trwającej dyskusji nad zakresem stosowalności teorii stanu przejściowego Eyringa-Polanyi'a [11,18].

Profil energetyczny enzymatycznego cyklu katalitycznego wraz z niektórymi podstawowymi definicjami teorii ki-



Rycina 1. Schemat profilu energetycznego początkowych fragmentów prostego enzymatycznego cyklu katalitycznego. Symbole E, S, ES, ES[‡], EP oznaczają odpowiednio: wolny enzym, wolny substrat, kompleks enzymu z substratem w stanie podstawowym, kompleks enzymu z reagentem w stanie przejściowym, kompleks enzymu z produktem. Wyrażenia ΔG_b, Δg[‡], Δg[‡]_{kat} oznaczają odpowiednio: energię swobodną Gibbsa etapu wiązania substratu przez enzym ($\Delta G_b \approx RT \ln K_m$), energię swobodną aktywacji kompleksu ES, czyli etapu „przeciągnięcia” substratu przez stan przejściowy ($\Delta g_{kat}^\ddagger = -RT \ln k_{kat} / A$), energię swobodną netto aktywacji substratu w danej reakcji enzymatycznej ($\Delta g^\ddagger = \Delta g_{kat}^\ddagger + \Delta G_b = -RT \ln (k_{kat} / A K_m)$) gdzie A oznacza cały przedwykładniczy wyraz we wzorze Arrheniusa. Wzory definiujące poszczególne wielkości profilu podano za Warshelem [1].

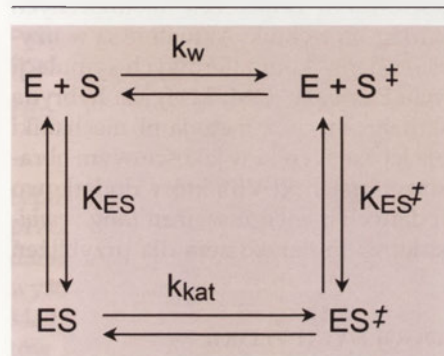
netyki enzymatycznej stały się przedmiotem ważnej dyskusji podczas analizy skutków mutacji centrum katalitycznego enzymów [19]. Niektóre wnioski i propozycje zmian wynikłe z tej dyskusji podano w rozdziale „Stanowiska poszczególnych grup badawczych”, szczególnie w podrozdziałach poświęconych publikacjom Herschlag i Northropa.

„WIELOWYMIAROWE” DIAGRAMY ENERGETYCZNE REAKCJI ENZYMATYCZNEJ

Reakcje biegnące z utworzeniem co najmniej dwóch wiązań kowalencyjnych mogą być przedstawiane przy użyciu dwóch alternatywnych profilów jednowymiarowych, stanowiących krawędzie dwuwymiarowej mapy powierzchni potencjału [20]. Modele tego typu pozwalają odpowiedzieć na pytanie czy poszczególne zdarzenia w przebiegu reakcji są synchroniczne (ang. *concerted*), czy następują etapami (ang. *stepwise*). Reakcja enzymatyczna biegnie jednak w środowisku o niezwyklej stopniu skomplikowania i duża ilość elementów strukturalnych olbrzymiej cząsteczki białka (lub RNA) ma swój udział w procesie katalitycznym. Zatem rzeczywista współrzędna reakcji enzymatycznych ma charakter wielowymiarowy i fakt ten powinien być w jakiś sposób brany pod uwagę podczas analizy ich mechanizmu. Liczba „pod-stanów” energetycznych w cząsteczce białka wynosi 3N, gdzie N oznacza liczbę atomów w danym białku. Z tego wynika, że wszelkie procesy zachodzące w takiej cząsteczce należy rozpatrywać w przestrzeni o 3N współrzędnych. Ten skomplikowany pejzaż energetyczny (ang. *energy landscape*) ma strukturę hierarchiczną, którą Frauenfelder [21] określa w skrócie jako: „studzienki w studniach, w studniach”. Graficzne schematy przedstawiania takich procesów są z konieczności jedynie rzutami jedno lub dwu wymiarowymi uśrednionych danych, dla jednej lub dwóch współrzędnych reakcji.

Inną próbą uwzględnienia wielowymiarowego charakteru reakcji enzymatycznych jest sposób rozważań zaprezentowany w artykule Cannona, Singletona i Benkovic [6]. W miejsce profilów potencjału termodynamicznego Gibbsa autorzy proponują stosowanie diagramów pracy (W) wymaganej dla przejścia od wolnego substratu do substratu w stanie wzbudzenia, w relacji do wartości uśrednionej siły (F) działającej wzdłuż drogi współrzędnej reakcji (r). Wyznacznikami tej współrzędnej są takie jej punkty, przy których $F(r) = 0$, czyli przy nieskończonej odległym substracie (E + S), po zamknięciu substratu z enzymem wewnątrz wspólnej osłonki solwacyjnej (E,S)^{cape}, po utworzeniu kompleksu w stanie podstawowym (ES), i po jego wzbudzeniu do stanu przejściowego (ES[‡]). Autorzy spodziewają się, że zmiany parametrów dających się zaobserwować przy użyciu analizy krystalograficznej, NMR, różnych technik spektroskopowych i symulacji komputerowych, mogą w sprzyjających okolicznościach mieć proste przełożenie na „ruch” kompleksów ES wzdłuż takiej współrzędnej. Użycie tego warsztatu teoretycznego w połączeniu z wymienionymi technikami stwarzałoby przede wszystkim szansę oszacowania ewentualnego udziału fluktuacji dynamicznych cząsteczki białka w enzymatycznym procesie katalitycznym.

Koncepcja „cyklu termodynamicznego” w analizie procesów katalitycznych została zainicjowana przez Kurza [22] a potem rozwinięta przez Lienharda [23] i Wolfendena [24]. Polega ona na zestawieniu alternatywnych dróg powstawania stanu przejściowego w układzie złożonym z roztworu reagentów i katalizatora (Ryc. 2). W reakcjach enzymatycznych jedną z dróg stanowią dwa początkowe etapy prostego enzymatycznego cyklu katalitycznego; natomiast drugi



Rycina 2. Schemat porównawczego cyklu termodynamicznego dla reakcji katalizowanych przez enzymy.

szlak polega na przekształceniu swobodnego substratu (S) do jego stanu przejściowego (S[‡]) bez udziału enzymu. Z ryciny 2 wynika, że produkt tego etapu może być następnie wychwytywany przez enzym i podobnie jak w pierwszym szlaku, powstaje kompleks zawierający substrat w stanie przejściowym (ES[‡]). Ta druga reakcja jest drogą raczej wirtualną niż rzeczywistą, bowiem w roztworze stężenie cząsteczek będących w stanie przejściowym jest tak małe, że kataliza polegająca na „wyławianiu” S[‡] z mieszaniny jest w praktyce niezauważalna. Jednak dzięki umieszczeniu tej drogi w schemacie, możemy konstruować hipotetyczny proces termodynamiczny o charakterze cyklicznym. To z kolei pozwala porównać proces tworzenia stanu przejściowego w roztworze z tym samym procesem w miejscu katalitycznym enzymu.

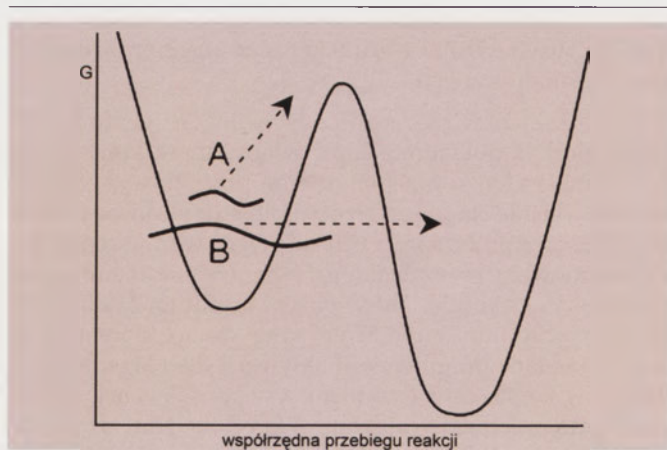
Enzymatyczna część tak skonstruowanego cyklu termodynamicznego polega zatem na wiązaniu przez enzym podstawowego stanu reagentu (S), a następnie przekształceniu go w stan przejściowy (S[‡]) w kompleksie (ES). Jeżeli założymy, że stan przejściowy substratu w stanie wolnym jest podobny do występującego w kompleksie z enzymem, to pojawienie się jakiegokolwiek efektu katalitycznego pod wpływem enzymu, oznacza istnienie nierówności $k_{kat} > k_w$ w schemacie cyklu przedstawionego na rycinie 2. W schemacie tym symbole k_{kat} i k_w oznaczają odpowiednio stałą szybkości reakcji zachodzącej w centrum aktywnym enzymu, oraz w roztworze wodnym; natomiast symbole K_{ES} i K_{ES^\ddagger} oznaczają wielkości stałych asocjacji enzymu z substratem w stanie podstawowym oraz z jego formą wzbudzoną. Ponieważ termodynamika przejścia od E + S do ES[‡] jest niezależna od wybranej drogi, wielkości $k_w K_{ES^\ddagger}$ oraz $k_{kat} K_{ES}$ są sobie równe. Zatem nierówność $k_{kat} > k_w$, reprezentująca istotę zjawiska katalizy, może mieć miejsce jedynie wtedy, gdy $K_{ES^\ddagger} > K_{ES}$. Z tego wynika, że większe powinowactwo enzymu do stanu przejściowego niż do stanu podstawowego substratu jest czynnikiem decydującym o większej szybkości tworzenia stanu przejściowego w kompleksie ES, niż w roztworze wodnym swobodnego substratu. Zatem specyficzność funkcjonalna enzymów – jedna z cech odróż-

niających katalizę enzymatyczną od innych mechanizmów katalitycznych – jest tu warunkiem sine qua non zaistnienia procesu katalitycznego.

Skoro enzym, wiążąc stan podstawowy reagentu jest do niego niezbyt dokładnie dopasowany, to w konsekwencji „wymusza” jego przejście w stan przejściowy, gdyż do takiego właśnie stanu jest strukturalnie dopasowany najlepiej. Pierwszą próbą sprecyzowania tego „wymuszenia” był zaproponowany przez Haldena, powszechnie znany model ręki i rękawiczki [25]. Nieco bliżej określił to Pauling [26] proponując termin „naprężenie” (ang: *strain*), które ma ułatwić pokonanie progę energii aktywacji dla reagentów będących w kontakcie z enzymem, a w konsekwencji doprowadzić do przemiany substratu w produkt. Nawiązując do zdolności czarodziejki z Odysei Homera, Jencks [27] określił to zjawisko jako „efekt Circe”, a jego istotą jest zdolność enzymu nie tylko do specyficznego wiązania substratu lecz również do jego destabilizacji. Aby cykl termodynamiczny spełniał warunek przystawalności (ang. *congruency*) [28], powinniśmy założyć taką samą wartość współczynnika transmisji (κ) dla obydwu dróg przebiegu reakcji. Problem zasadności takiego założenia był i jest nadal przedmiotem kontrowersji.

TEORIA DYNAMIKI WIELKICH CZĄSTECZEK

Fizycy zaangażowani w badania dynamiki cząsteczek biologicznych są przekonani że dla ich biologicznej funkcji istotna jest nie tylko struktura, lecz także ich dynamika [7,29-31]. Doświadczenia prowadzone przy użyciu takich metod fizycznych jak spektroskopia Mossbauera, rozpraszanie neutronów, echo fotonowe i inne, sugerują, że białka w roztworze nie są sztywnymi, izolowanymi systemami, lecz giętkimi strukturami, których ruchy dynamiczne są sprzężone z dynamiką swobodnego solwentu oraz z dynamiką jego cząsteczek związanych w osłonce solwatacyjnej. Większość podstawowego materiału doświadczalnego dotycząca tej tematyki pochodzi z badań nad mioglobina (Mb) która, ze względu na stosunkowo prostą strukturę, jest od dawna poligonem dla doświadczeń sprawdzających przydatność nowych fizycznych technik analitycznych w naukach biologicznych [29]. Struktura i funkcja tej cząsteczki jest bardziej złożona niż dotąd sądzono. Przede wszystkim oprócz znanych wcześniej zdolności wiązania i przechowywania dwuatomowych cząsteczek gazów (O₂, NO, CO), białko to okazało się enzymem katalizującym przemianę NO → NO₃⁻. Pomimo monomerycznej struktury, Mb jest białkiem allosterycznym, występującym w co najmniej trzech podstawowych postaciach pełniących odmienne funkcje. Przejścia pomiędzy tymi postaciami, ruchy relaksacyjne obserwowane po zastosowaniu podwyższonego ciśnienia, fluktuacje badane techniką spektralnego wypalania (ang: *hole burning*), oraz ucieczka cząsteczek CO z wnętrza Mb do solwentu, wykazują znaczne podobieństwo do ruchów „toczenia” cząsteczek wody w otaczającym solwencie. To podobieństwo skłoniło autorów do postulowania istnienia sprzężeń pomiędzy ruchami fluktuacyjnymi swobodnego solwentu a ruchami elementów strukturalnych wewnątrz cząsteczki białka enzymatycznego. Zatem wymienione wyżej ruchy można określić jako tzw. ruchy zniewolone [30]. Zniewolenie nieco innego typu dotyczy również ruchów



Rycina 3. Uproszczony schemat ideowy kwantowo-mechanicznego efektu tunelowania w reakcji chemicznej: Cząstka A, reprezentowana przez krótszą falę opuszcza studnię potencjału substratu jedynie po przekroczeniu bariery w sposób klasyczny – po uzyskaniu odpowiedniej energii, natomiast cząstka B, dzięki większej długości fali (λ), może „przeniknąć” bezpośrednio do sąsiedniej studni potencjału.

reszt aminokwasowych, zezwalających na transport liganu wewnątrz cząsteczki białka. Ruchy te wykazują analogię do drgań cząsteczek solwenty związanego w otocze solwatacyjnej. Natomiast szybkie fluktuacje obserwowane techniką echa wibracyjnego oraz inne tzw. ruchy szybkie, są niezależne od dynamiki cząsteczek solwenty.

KWANTOWO-MECHANICZNY EFEKT TUNELOWANIA

Efekt tunelowania w reakcjach chemicznych jest wynikiem dualizmu korpuskularno-falowego [32]. Zjawisko to jest znane niemal od narodzin mechaniki kwantowej i polega na paradoksalnej dla fizyki klasycznej, możliwości bezpośredniego „przenikania” cząstek przez barierę potencjału (Ryc. 3). Fizyka kwantowa dopuszcza taką możliwość na podstawie analizy funkcji falowej opisaną przez równanie Schrödingera. Możliwość wystąpienia tego efektu wynika również z zasady nieoznaczoności Heisenberga. W chemii zjawisko tunelowania jest znane w reakcjach przeniesienia bardzo małych cząstek, choć Zuew i inni [33] przedstawili dowody na gigantyczne przyspieszenie reakcji w której efekt tunelowy dotyczy atomu węgla. W reakcjach enzymatycznych obserwowano je głównie wtedy, gdy reakcja przebiegała z przeniesieniem elektronu, protonu, jonu wodorowego lub atomu wodoru [31,32]. Warunek niewielkich rozmiarów uczestnika efektu tunelowania wynika ze wzoru deBroglie’a, wskazującego zależność między długością fali a masą ($\lambda = h/\sqrt{2mE}$). Ze wzoru wynika, że im mniejsza masa cząstki (m) tym dłuższa fala (λ). Tymczasem podstawowym warunkiem zaistnienia efektu tunelowego jest właśnie długość fali przekraczająca szerokość bariery energii aktywacji. Zatem szerokość i kształt bariery energii aktywacji decydują o tym, czy dany element jest przenoszony ponad barierą, czy też możliwe jest jego bezpośrednie przeniknięcie do sąsiedniej studni potencjału (Ryc.3).

KOMPUTEROWE SYMULACJE STRUKTURY I FUNKCJI ENZYMÓW

Symulacje komputerowe reakcji chemicznych w zasadzie są już traktowane jako narzędzie raczej doświadczalne niż teoretyczne. Na razie nie można jednak powiedzieć tego o

reakcjach enzymatycznych; moc współczesnych komputerów jest jeszcze zbyt niska aby *ab initio* wyliczać wszystkie efekty energetyczne związane z funkcjonującą cząsteczką białka enzymatycznego [1]. Dlatego ten typ modelowania nadal narzuca dokonywanie szeregu założeń, które nie koniecznie i nie zawsze mogą okazać się słuszne. Żadna z wielu dotychczasowych technik symulacyjnych nie jest zdalna do objęcia wszystkich skali czasowych i przestrzennych, oraz wynikającej z nich różnorodności procesów zachodzących w dużej cząsteczce biologicznej [34]. Dlatego dla komputerowego modelowania cząsteczek biologicznych używa się kombinacji różnych technik. Aktualnie są w użyciu dwa najważniejsze systemy komputerowych symulacji reakcji enzymatycznych. Pierwszy (QM/MM) jest hybrydą metod kwantowo mechanicznych z metodami mechaniki molekularnej [35] i daje lepsze wyniki w jakościowym obrazowaniu; natomiast drugi system (EVB), który dodatkowo używa empirycznych danych o energii wiązań (ang.: *empirical valence bond*), jest lepszym narzędziem dla przybliżeń ilościowych [36,37].

NAJWAŻNIEJSZE Z OGÓLNYCH TEORII MECHANIZMU KATALIZY ENZYMATYCZNEJ

HIPOTEZA ELEKTROSTATYCZNEJ STABILIZACJI STANU WZBUDZONEGO

Została przedstawiona po rozpoznaniu mechanizmu hydrolizy wiązań glikozydowych przy udziale lizozymu oraz innych glikozydaz [38]. Pierwotnie była uznawana za jeden z kilku mechanizmów katalitycznych wspólnie odpowiedzialnych za wysoką sprawność katalityczną enzymów, w porównaniu do katalizatorów chemicznych. W miarę rozwoju metod biologii molekularnej i technik symulacji komputerowych hipoteza ta była wielokrotnie uzupełniana aż wreszcie została przez Warshela i jego grupę uznana za opis zasadniczego mechanizmu wysokiej sprawności katalitycznej większości enzymów [39]. W skrócie, mechanizm ten polega na istnieniu silnie naładowanych, odpowiednio rozmieszczonych i odpowiednio zorientowanych ugrupowań, stanowiących miejsce katalityczne enzymu. Grupy te biorą udział w tworzeniu i stabilizacji zdecydowanie polarnego stanu wzbudzonego substratów. Np w przypadku lizozymu [38], który katalizuje reakcję hydrolizy wiązania β 1-4 glikozydowego, głównymi grupami „katalitycznymi” są ugrupowania karboksylowe łańcuchów bocznych reszt Glu35 oraz Asp54, z których niezdysocjowany karboksyl Glu35 działa jako ogólny kwas, będący donorem protonu dla atomu tlenu łączącego jednostki cukrowe (N-acetylmuraminian z N-acetyloglukozaminą). Utworzony w ten sposób stan przejściowy, zawierający karbokation w pierwszej pozycji atomu węgla, jest elektrostatycznie stabilizowany przez drugą z grup katalitycznych – zdysocjowany karboksyl reszty Asp54. Podstawowy charakter elektrostatycznego mechanizmu katalizy enzymatycznej jest nadal potwierdzany w najnowszych publikacjach grupy Warshela [40].

WIĄZANIA WODOROWE O NISKIEJ BARIERZE

Ta teoria [2] w znacznym stopniu pokrywa się z hipotezą elektrostatycznej stabilizacji stanu przejściowego. Jej

autorzy, stwierdzając istnienie w miejscu katalitycznym grupy (lub grup) o ładunku ujemnym, będącej akceptorem protonów, zakładają odpowiednie rozmieszczenie (ang. *preorganization*) wszelkich reszt zdatnych do tworzenia wiązań wodorowych. Jednak dodatkowo autorzy ci zakładają możliwość tworzenia tam wiązań wodorowych o znacznie bardziej kowalencyjnym charakterze ($X^{\ominus} \cdots H \cdots Y^{\ominus}$) niż zwykłe wiązania wodorowe ($X-H-Y$) powstające w roztworze wodnym. Właśnie takie mocne wiązania wodorowe biorą udział w stabilizacji polarnego stanu wzbudzonego; natomiast przyczyną zwiększenia ich mocy oraz przyczyną nadania im charakteru kowalencyjnego jest niska polarność środowiska wnętrza centrum aktywnego enzymów.

HIPOTEZA DESOLWATACJI

Ten typ katalizy jest znany także z niektórych procesów typowo chemicznych [41]. W pewnym sensie ta teoria jest przeciwstawna dwóm poprzednio omówionym: Oparta o dane wskazujące na głównie hydrofobowy charakter reszt wyścielających kieszeń centrum aktywnego enzymów, zakłada cofanie polaryzacji reaktywnych elementów substratów podczas ich przejścia ze stanu podstawowego w stan przejściowy. Innymi słowy, destabilizacja stanu podstawowego jest spowodowana przeniesieniem substratów ze środowiska o wysokiej stałej dielektrycznej do środowiska przypominającego fazę gazową [42].

ENTROPOWE EFEKTY ZBLIŻENIA, ORIENTACJI I STEROWANIA ORBITALAMI

Znane od dawna zjawisko ułatwionej reakcji sąsiadujących grup stało się zaczątkiem najpopularniejszej hipotezy mechanizmu katalizy enzymatycznej [43]. Zmniejszenie dystansu między nukleofilem a elektrofilem przez ich wiązanie w jednej cząsteczce, znacznie przyspiesza reakcję. Zatem to samo może wystąpić wewnątrz centrum aktywnego enzymów. Bruice nazwał to zjawisko efektem zbliżenia (ang. *proximity*) lub bliskości (ang. *propinquity*). Bruice i Pandit [43,44] wyznaczyli sprawność nukleofilowej katalizy reakcji hydrolizy estrów przez wewnątrzcząsteczkowe grupy karboksylowe, dla których reakcją odniesienia była hydroliza 1M estru bromofenyloвого kwasu octowego przez wolny 1M kwas octowy. Związkiem pośrednim tych reakcji jest bezwodnik dikarboksylowy. Porównanie kinetyki syntezy szeregu monoestrowych połączeń różnych kwasów dikarboksylowych z kinetyką analogicznych reakcji międzycząsteczkowych, stało się podstawowym modelem do badań efektu zbliżenia oraz efektu orientacji w procesach katalitycznych. Podana przez Pandita i Bruice'a tabela efektywnych stężeń substratów tych reakcji [44] jest cytowana w wielu opracowaniach i podręcznikach w dyskusji nad efektami entropowymi w katalizie. Okazało się, że przyspieszenia reakcji w systemach wewnątrz-cząsteczkowych, szacowane jako różnice tzw. efektywnych stężeń substratów, osiągały aż osiem rzędów wielkości w porównaniu z odpowiednią reakcją międzycząsteczkową. Wspomniani autorzy doszli do wniosku, że olbrzymie przyspieszenia reakcji wewnątrz-cząsteczkowych, a więc i enzymatycznych, osiągane są dzięki następującym czynnikom: wiązaniu reagujących elementów w konformacji przypominającej stan przejściowy (ang. *near attack conformation*); utracie entropii ruchów translacyjnych wskutek zbliżenia reagujących ele-

mentów; utracie entropii ruchów rotacyjnych po wstępnym, właściwym zorientowaniu substratów, np. po utracie jednego ze swobodnie rotujących wiązań albo po usztywnieniu jednego z „rotamerów”. Jencks oraz Page [45,46], którzy użyli modeli chemicznych Bruice'a do obliczenia entropowych efektów energetycznych w centrum aktywnym enzymów, wręcz uznali sprawę olbrzymich enzymatycznych przyspieszeń katalitycznych za rozwiązana i zaapelowali o zaniechanie prac nad nowymi teoriami w tej dziedzinie. Odmianą entropowego efektu orientacji jest teoria dotycząca tzw. sterowania orbitalami [3]. Autorzy tej teorii zakładają ścisłą zależność poziomu energii stanu przejściowego od kąta zderzenia reagujących substratów.

KATALIZA PRZEZ WYKORZYSTANIE EFEKTÓW DYNAMICZNYCH

Jak wcześniej wspomniano, szereg danych doświadczalnych wykazuje, że pewna grupa ruchów dynamicznych wielkiej cząsteczki jest zdominowana przez fluktuacje momentu dipolowego solwentu. Zatem obdarzone ładunkiem grupy wewnątrz cząsteczki białka, oraz jej osłonka solwacyjna, są elementami sprzęgającymi dynamikę strukturalnych elementów wielkiej cząsteczki z otaczającym środowiskiem. W ten sposób dynamiczne ruchy solwentu mogą kontrolować szeroką gamę procesów w białku, począwszy od zmian konformacyjnych aż po przemieszczanie ligandu w procesie katalizy [29].

Już w latach siedemdziesiątych sugerowano [47,48] że enzymy mogą indukować pewne specyficzne typy fluktuacji, tak obniżające współczynnik transmisji (κ), że ma on inne wartości niż reakcje w roztworze. Tym samym zasugerowano niezgodność enzymatycznej katalizy z teorią prędkości absolutnej Eyringa-Polanyi'a. Aktualnie szereg pracowni publikuje dane potwierdzające taką możliwość [11]. Jeśli na podstawie tych danych można rzeczywiście sugerować występowanie istotnej różnicy wielkości współczynnika transmisji pomiędzy reakcją w roztworze a tą samą reakcją w centrum aktywnym enzymu, wtedy katalityczny cykl termodynamiczny – jedno z podstawowych narzędzi enzymologii – staje się nieprzystawalny i traci swój logiczny sens.

KATALIZA PRZEZ JĄDROWY EFEKT TUNELOWANIA

Pionierskie publikacje z pracowni Klinman [49] udokumentowały możliwość wykorzystania jądrowego, kwantowo-mechanicznego efektu tunelowania przez białka enzymatyczne. Efekt ten jest również związany z dynamiką reagujących cząsteczek, a w przypadku enzymów, z dynamiką ich elementów strukturalnych będących w kompleksie z reagentem. Sprężystość struktury enzymu zapewnia możliwość przeniesienia termalnych wibracji środowiskowych na grupy kontaktowe centrum aktywnego [31]. Wibracje takie mogą doprowadzić do zmian zarówno szerokości jak i wysokości bariery energetycznej katalizowanej reakcji. Mamy wtedy do czynienia z cyklicznym „bramkowaniem” możliwości pokonania bariery zarówno na drodze jej przekraczania jak i na drodze kwantowo-mechanicznego efektu tunelowego [50]. Sądzono do niedawna, że jedynie długodystansowe ruchy elementów strukturalnych cząsteczki

białka umożliwiają wspomaganie efektów katalitycznych; tymczasem w 2006 roku opublikowano dobrze udokumentowaną pracę [51] w której stwierdzono wpływ lokalnych oscylacji o krótkim zasięgu na proces tunelowania protonu.

STANOWISKA POSZCZEGÓLNYCH GRUP BADAWCZYCH

Duża liczba informacji uzyskiwanych w latach osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych dzięki użyciu kierowanej mutacji w centrach aktywnych enzymów, nie doprowadziła niestety do postępu w rozumieniu istoty mechanizmu enzymatycznej katalizy. Przeciwnie, doszło nawet do jeszcze większego zróżnicowania poglądów na ten problem, oraz do sporów dotyczących logicznej analizy profili energetycznych reakcji po zmianie struktury centrum aktywnego. Schowen [19] zaprezentował stanowisko, które sam prowokacyjnie określił jako „fundamentalistyczne”, całkowicie zaprzeczając jakimkolwiek udziałowi energii wiązania substratu będącego w stanie podstawowym (ΔG_b), w procesie obniżania jego energii aktywacji (ΔG^\ddagger). Wywołana tym wystąpieniem dyskusja z udziałem Mengera [52], a następnie Murphy'ego [53], obnażyła pewne słabe strony powszechnie używanych narzędzi teoretycznych, włącznie z niektórymi podstawowymi definicjami przyjętymi w enzymologii. To z kolei skłoniło Herschlag'a do wysunięcia tezy o „nieoznaczoności” szczegółowych danych dotyczących energetyki enzymatycznego procesu katalitycznego [54], a Northropa do wysunięcia propozycji zreformowania i dokładniejszej definicji podstawowych terminów kinetycznych używanych w enzymologii [55]. Pewne uporządkowanie poglądów i stanowisk poszczególnych grup badawczych przyniosły wspomniane wcześniej serie artykułów w *Journal of Biological Chemistry* [9], w *European Journal of Biochemistry* [10] oraz debata zorganizowana przez Królewskie Towarzystwo Naukowe [11]. Ta ostatnia debata została praktycznie zredukowana do konfrontacji dwóch różnych poglądów na ogólny problem stosowalności teorii stanu wzbudzonego w analizie mechanizmów katalizy enzymatycznej [56].

PROPOZYCJE NORTHROPA

Propozycje Northropa [55] polegają na wprowadzeniu fundamentalnej stałej kinetycznej która w braku jednolitego symbolu została przez niego określona jako V/K i zdefiniowana następująco: V/K jest stałą prędkości właściwej wychwytu substratu, z powstawaniem kompleksów enzymatycznych przeznaczonych do wytworzenia produktu w późniejszym czasie. Używając współczynników wprowadzonych przez Klinman i Matthews [57], Northrop rozwinął algebraiczny wzór na wartość stałej wychwytu (V/K), który po skróceniu funkcji seryjnych przybiera następującą postać:

$$V/K = k_{+1}(f) \quad (\text{wzór 3})$$

Wielkość f w tym wzorze jest wyrażeniem obejmującym wszystkie stałe prędkości ze standardowego równania kinetycznego reakcji enzymatycznej z wyjątkiem k_{+1} . Współczynnik f jest wielkością bezwymiarową i przybiera wartości od zera do jedności. Z przedstawionego wzoru wynika,

że wielkość V/K , tak jak definiuje ją Northrop, jest po prostu ułamkiem k_{+1} . Czyli jest ułamkiem wyrażenia dotyczącego raczej własności środowiska niż enzymu. Ułamek ten określa tę część zderzeń substratu z enzymem, które prowadzą do powstania kompleksów, dających (w późniejszym czasie) cząsteczki produktu.

Użycie pojęcia „wychwytu” ułatwia wyprowadzenie bardziej precyzyjnych definicji prędkości maksymalnej (V_{\max}) oraz stałej Michaelisa (K_m) [4]. Proponowane definicje upraszczają sens rzeczywistego znaczenia terminu powinowactwo enzymu do substratu, związanego z wielkością K_s a nie z K_m . Przy tradycyjnej definicji $\{K_m = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}\}$ stała Michaelisa może być używana jako miara powinowactwa jedynie dla tej grupy enzymów, które działają według mechanizmu szybkiej równowagi; a więc gdy $k_{-1} \gg k_{+2}$, a $K_m \approx k_{-1}/k_{+1} \approx K_s$, czyli gdy definicja K_m traci już swą ważność; co jest logicznie pokretnie i trudne dydaktycznie. Natomiast po zaakceptowaniu definicji Northropa $\{K_m = V_{\max}/(V/K) = k_{\text{release}}/k_{\text{capture}}\}$, stała Michaelisa (K_m) i stała substratowa (K_s) stają się osobnymi, myślowo łatwymi do uchwycenia terminami. Pojęcie „stałej wychwytu” ułatwia również definicję terminu „perfekcyjny enzym”, oraz ułatwia rozwikłanie niektórych problemów podniesionych podczas wcześniej wspomnianej dyskusji Schowen - Menger - Murphy [19,52,53]. Dotyczy to przynajmniej tych punktów spornych, które wynikły z różnego rozumienia niektórych terminów, czyli z braku precyzji w definiowaniu problemów kinetycznych i termodynamicznych. Propozycja Northrop'a ułatwia także zrozumienie nietypowych zjawisk kinetycznych w powtarzalnych reakcjach wydłużania lub skracania substratu polimerycznego po jego „zakotwiczeniu” (ang. *docking*) na enzymie lub na kompleksie wielo-enzymatycznym. Klasycznym przykładem wydłużania zakotwiczonego substratu, jest działanie kompleksu syntazy kwasów tłuszczowych [58] w której wielkość k_{+1} staje się mniej zależna od szybkości dyfuzji ligandów w środowisku, gdyż tutaj są one przekazywane pomiędzy centrami aktywnymi kompleksu. Natomiast zależności kinetyczne związane ze skracaniem zakotwiczonego substratu podczas enzymatycznej depolimeryzacji homopolimerów, dotyczą efektów tzw. ataku wielokrotnego. Tu można zauważyć prostą relację pomiędzy współczynnikiem (f) we wzorze Northropa [4] a współczynnikiem efektywności (y) wyprowadzonym dla mechanizmu ataku wielokrotnego [59].

TEZY HERSCHLAGA

Herschlag i współpracownicy [54] w swojej analizie wyników kierowanej mutagenyzy enzymów próbowali ilościowo opisać trojakiemu typu efekty energetyczne: udział danej reszty katalitycznej, udział danej strategii katalitycznej, oraz udział danej reszty wiążącej substrat w centrum aktywnym. Jednak żaden z tych sposobów analizy nie spełnił wymogu addytywności energii rozpisanej na poszczególne elementy procesu katalitycznego. Autorzy sądzą, że przyczyną tego faktu jest kooperatywny charakter funkcji białka lub RNA. Ta właśnie kooperatywność jest odpowiedzialna za „nieoznaczoność” energetycznego udziału danego elementu strukturalnego w obniżaniu energii aktywacji. Według tej koncepcji, kierowana mutagenyza daje więc jedynie możliwość potwierdzenia funkcji danej reszty aminokwasowej

w procesie katalitycznym, natomiast próby oszacowania jej procentowego udziału w tym procesie są skazane na niepowodzenie.

STANOWISKO KLINMAN, SCHWARTZA, SCRUTTONA I INNYCH

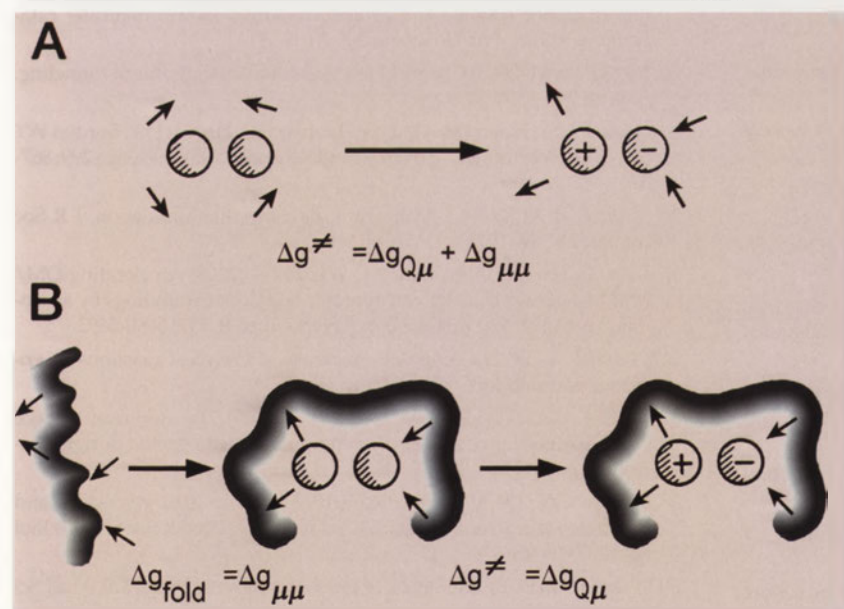
Rosnąca liczba publikacji kilku grup badawczych zajmujących się dynamiką białek i jej związkami z procesami katalitycznymi, doprowadziła do otwartego zakwestionowania przydatności teorii Eyringa-Polanyi'a w enzymologii [11,60,61]. Wyniki badań efektów izotopowych w katalizie enzymatycznej [49], szczegółowe obrazy struktur poszczególnych form kompleksu enzymu z ligandem uzyskiwane dzięki analizie krystalograficznej i NMR [62], oraz niektóre wyniki komputerowych symulacji funkcji enzymu [63] stanowią argument już nieodwracalnie dokumentujący udział zjawisk kwantowo-mechanicznych w reakcjach katalizowanych enzymatycznie. Wymienieni wcześniej autorzy są przekonani, że białka enzymatyczne mają także zdolność sterowania tymi mechanizmami w celu osiągnięcia efektu katalitycznego. Sterowanie takie odbywa się dzięki spontanicznym wibracjom odpowiednich elementów strukturalnych centrum aktywnego, kierujących współrzędną reakcji na inne tory niż wynikałoby to z obserwacji mapy wielowymiarowej powierzchni potencjału reakcji biegnącej w roztworze. Zatem problem współczesnej enzymologii polega nie na tym, czy wspomniane efekty kwantowo-mechaniczne mają miejsce w enzymatycznym procesie katalitycznym, lecz w jakim stopniu przyczyniają się one do przyspieszenia danej reakcji, oraz jak są rozpowszechnione wśród enzymów.

STANOWISKO WARSHELA

Odkrycia Warshela związane z hipotezą elektrostatycznego pochodzenia mocy katalitycznej enzymów dotyczą dwóch elementów, po pierwsze – stwierdził on wysoki stopień podobieństwa pomiędzy wnętrzem centrum aktywnego enzymów a środowiskiem wytworzonym przez otoczkę solwatacyjną substratów w roztworze wodnym [36,64]; po drugie – wyjaśnił paradoks wynikający z tego odkrycia, a polegający na tym, że z podobieństwa reakcji w tych dwóch środowiskach powinniśmy wnioskować raczej o braku katalizy a nie o jej zaistnieniu. Warshel wyjaśnia ten paradoks pracą wykonaną na enzymie podczas jego trzeciorzędowego fałdowania (1). Specyficzne fałdowanie doprowadza do takiego rozmieszczenia ładunków wewnątrz cząsteczki enzymu, że nowo powstający, spolaryzowany stan wzbudzony substratu nie musi już wykonywać koniecznej do jego stabilizacji repulsji dipoli wodnych w swoim najbliższym otoczeniu (Ryc. 4). Grupy niosące odpowiedni ładunek dla tej stabilizacji są w centrum aktywnym pre-organizowane czyli rozmieszczone w sposób optymalny dla ułatwienia reakcji. Zatem energia konieczna dla obniżenia bariery energetycznej katalizowanej reakcji została dostarczona enzymowi już na etapie specyficznego kształtowania jego wielkiej cząsteczki (64). Warshel nie zaprzecza istnieniu efektu tunelowania i innych efektów dynamicznych w reakcjach katalizowanych enzymatycznie. Podkreśla jedynie występowanie tych samych efektów w reakcjach odniesienia zachodzących w roztworze [65,66], co dowodzi, że nie mogą być one odpowiedzialne za katalizę. A jeśli nawet białko enzymatyczne ma pewną możliwość kształtowania studni potencjału swoich ligandów [50], to wpływ ten nie może być znaczący [18]. Również inne mechanizmy katalityczne, które tutaj w skrócie przedstawiono, mają według Warshel'a stosunkowo niewielki udział w procesie katalitycznym enzymów [66].

PODSUMOWANIE

W miarę wzrostu mocy komputerów, doświadczenia symulacyjne Warshela i jego grupy dostarczają coraz to nowych dowodów na słuszność pozornie trywialnej hipotezy o głównie elektrostatycznym charakterze oddziaływań stabilizujących stan przejściowy podczas katalizy enzymatycznej [64-67]. Co więcej, dane te generalnie sugerują zgodność mechanizmów katalizy enzymatycznej z teorią stanu przejściowego Eyringa [18]. Pogląd ten stoi więc w opozycji do bardzo atrakcyjnych i w związku z tym modnych hipotez o głównie dynamicznym podłożu katalizy enzymatycznej [60-63]. W lawinie nowych doniesień potwierdzających taki sposób funkcjonowania enzymów nie można jednak znaleźć dowodów zaprzeczających w racjonalny sposób tezę Warshela. W pracach tych albo brak wzmianki na ten temat, albo dyskusja z jego stanowiskiem ogranicza się do przywołania argumentu o „zdaniu większości badaczy”, co w nauce jest raczej nienajlepszym sposobem



Rycina 4. Graficzna prezentacja koncepcji Warshela (1) elektrostatycznego pochodzenia mocy katalitycznej enzymów: Zarówno reakcja biegnąca w roztworze (A) jak i reakcja w centrum katalitycznym enzymów (B) polega na specyficznej orientacji polarnych elementów zaangażowanych w aktywację substratu. W roztworze koszty procesu pokonywania bariery energetycznej (Δg^\ddagger) składają się z energii koniecznej do prawidłowego rozmieszczenia dipoli solwentu wobec wzbudzanego substratu ($\Delta g_{Q\mu}$) oraz energii koniecznej do wcześniejszej destrukcji warstwy solwatacyjnej w najbliższym otoczeniu substratu, czyli do pokonania oddziaływań pomiędzy dipolami wody w tej warstwie ($\Delta g_{\mu\mu}$). Natomiast w miejscu aktywnym enzymu dipole związane z grupami polarnymi, wewnętrzne cząsteczki wody, oraz zjonizowane reszty aminokwasowe, zostały częściowo zorientowane już podczas fałdowania cząsteczki enzymu. Zatem energia swobodna aktywacji w miejscu aktywnym enzymu jest niższa o wielkość $\Delta g_{\mu\mu}$. Rycinę opublikowano za zgodą autora.

polemizowania. Natomiast grupa Warshela konsekwentnie wykazuje, że wyniki doświadczeń dokumentujące istotny wkład dynamiki cząsteczek w proces enzymatycznej katalizy, lub negujące jego elektrostatyczny charakter, doświadczeń wykonanych nawet z użyciem najnowocześniejszych metod fizycznych, są często niezbyt dobrze zaprojektowane. W większości tych prac zabrakło bowiem porównania z prawidłowym układem odniesienia jakim jest reakcja chemiczna w osłonce solwatacyjnej [64,66] albo dokonano niewłaściwych założeń podczas interpretacji doświadczeń wykonywanych przy użyciu analogów stanu przejściowego [67].

Główne argumenty Warshela dotyczące podobieństwa środowisk reakcji w centrum aktywnym i w roztworze mogą być podważone jedynie przy zastosowaniu lepszych technik symulacji komputerowych niż jego metoda EVB, co na razie jest raczej mało prawdopodobne ze względu na olbrzymie doświadczenie grupy Warshela właśnie w tej dziedzinie. Wydaje się, że szansa na rozstrzygnięcie sporu o główne mechanizmy w enzymatycznej katalizie leży w radykalnym zwiększaniu mocy komputerów do takiego poziomu, aby możliwa stała się symulacja *ab initio* całej funkcjonującej cząsteczki białka. Próby takiej symulacji już są dokonywane [68]. Jednak jak dotąd, dzięki publikacjom grupy Warshela, slogan Knowlesa [69]: "Nie inna, lecz lepsza", dotyczący charakteru przewagi katalizy enzymatycznej nad chemiczną, jest wciąż aktualny.

PIŚMIENNICTWO

- Warshel A (1998) Electrostatic origin of the catalytic power of enzymes and the role of preorganized active sites. *J Biol Chem* 273: 27035-27038
- Cleland WW, Frey PA, Gerlt JA (1998) The low barrier hydrogen bond in enzymatic catalysis. *J Biol Chem* 273: 25529-25532
- Mesecar AD, Stoddard BL, Koshland DE (1997) Orbital steering in the catalytic power of enzymes: small structural changes with large catalytic consequences. *Science* 277: 202-206
- Northrop DB (1999) Rethinking fundamentals of enzyme action. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 73: 25-55
- Fenimore PW, Frauenfelder H, McMachon BH, Young RD (2005) Proteins are paradigms of stochastic complexity. *Physica A* 350: 1-13
- Cannon WR, Singleton SF, Benkovic SJ (1996) A perspective of biological catalysis. *Nat Struct Biol* 3: 821-833
- Garcia-Viloca M, Gao J, Karplus M, Truhlar DG (2004) How enzymes work: Analysis by modern rate theory and computer simulations. *Science* 303: 186-195
- Woycechowsky KJ, Hilvert D (2004) Deciphering enzymes Genetic selection as a probe of structure and mechanism. *Eur J Biochem* 271: 1630-1637
- Neet KE (1998) Enzyme catalytic power minireview series. *J Biol Chem* 273: 25527-25528
- Schowen RL (2002) Hydrogen tunneling. Good by to all that. *Eur J Biochem* 269: 3095
- Dutton PL, Munro AW, Scrutton NS, Sutcliffe MJ (2006) Introduction. Quantum catalysis in enzymes: beyond the transition state theory paradigm. *Phil Trans R Soc* 361: 1293-1294
- Polanyi M (1921) On adsorption catalysis. *Z Electrochem* 27: 143-152
- Eyring H (1935) The activated complex in chemical reactions. *J Chem Phys* 3: 107
- Hammond GS (1955) A correlation of reaction rates. *J Am Chem Soc* 77: 334-338
- Marcus RA (1956) On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer I. *J Chem Phys* 24: 966
- Warshel A (1984) Dynamics of enzymatic reactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 444-448
- Kraut J (1988) How do enzymes work. *Science* 242: 533-542
- Olsson MHM, Mavri J, Warshel A (2006) Transition state theory can be used in studies of enzyme catalysis: lessons from simulations of tunneling and dynamical effects in lipooxygenase and other systems. *Phil Trans R Soc* 361: 1417-143
- Schowen RL (1978) Chapter 2. W: Transition states of biological processes. Gandour RD, Showen RL (eds). Plenum Press New York, str. 77-114
- Bruice TC (1976) Some pertinent aspects of mechanism as determined with small molecules. *Ann Rev Biochem* 45: 331-373
- Frauenfelder H, Chen G, Berendzen J, Fenimore PW, Jansson H, MacMahon BH, Stroe IR, Swenson J, Young RD (2009) A unified model of protein dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 5129-5134
- Kurz JL (1963) Transition state characterization for catalyzed reactions. *J Am Chem Soc* 85: 987-991
- Lienhard GE (1973) Enzymatic catalysis and transition-state theory. *Science* 180: 149-154
- Wolfenden R (1974) Enzyme catalysis: conflicting requirements of substrate and transition state affinity. *Mol Cell Biochem* 3: 207-211
- Haldane JBS (1930) *Enzymes*. Green & Co. London
- Pauling L (1948) Nature of forces between large molecules of biological interest. *Nature* 161: 707-709
- Jencks WP (1975) Binding energy, specificity, and enzymatic catalysis: The Circe effect. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 43: 219-410
- Kosower EM (1962) *Molecular Biochemistry*. McGraw-Hill. New York
- Frauenfelder H, McMahon BH, Fenimore P (2003) Myoglobin: The hydrogen atom of biology and a paradigm of complexity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8615-8617
- Fenimore PW, Frauenfelder H, McMahon BH, Parak FG (2002) Slaving: Solvent fluctuations dominate protein dynamics and fluctuations. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16047-16051
- Antoniou D, Caratzoulas S, Kalyanaraman C, Mincer JS, Schwartz SD (2002) Barrier passage and protein dynamics in enzymatically catalyzed reactions. *Eur J Biochem* 269: 3103-3112
- McMahon RJ (2003) Chemical reactions involving quantum tunneling. *Science* 299: 833-834
- Zuew PS, Sheridan RS, Albu TV, Truhlar DG, Hrovat DA, Borden WT (2003) Carbon tunneling from a single quantum state. *Science* 299: 867-870
- Mulholland AJ (2008) Introduction, Biomolecular simulation. *J R Soc Interface* 5: 169-172
- Rosta E, Haranczyk M, Chu ZT, Warshel A (2008) Accelerating QM/MM free energy calculations: representing the surroundings by an updated mean charge distribution. *J Phys Chem B* 112: 5680-5692
- Warshel A (1991) *Computer modeling of chemical reactions in enzymes and solutions*. Wiley. New York
- Vardi-Kilshain A, Roca M, Warshel A (2009) The empirical valence bond as an effective strategy for computer-aided enzyme design. *Bio-technol J* 4: 495-500
- Vernon CA (1967) The mechanism of hydrolysis of glycosides and their relevance to enzyme-catalyzed reactions. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 120: 389-401
- Warshel A (1978) Energetics of enzyme catalysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 5250-5254
- Kilshain AV, Warshel A (2009) On the origin of the catalytic power of carboxypeptidase A and other metalloenzymes. *Proteins* 77: 536-550
- Lighston FC, Zheng YJ, Maulitz AH, Bruice TC (1997) Non-enzymatic and enzymatic hydrolysis of alkyl halides: A haloalkane dehalogenation enzyme evolved to stabilize the gas-phase transition state of an SN2 displacement reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8417-8420
- Dewar MJ, Storch DM (1985) Alternative view of enzyme reactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2225-2229

43. Bruice TC, Pandit UK (1960) Intramolecular models depicting the kinetic importance of "fit" in enzymatic catalysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 46: 402-404
44. Bruice TC, Pandit UK (1960) The effect of geminal substitution ring size and rotamer distribution on the intramolecular nucleophilic catalysis of the hydrolysis of monophenyl esters of dibasic acids and the solvolysis of the intermediate anhydrides. *J Am Chem Soc* 82: 5858-5865
45. Page ML, Jencks WP (1971) Entropic contributions to rate accelerations in enzymic and intramolecular reactions and the chelate effect. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 1678-1683
46. Jencks WP (1986) *Catalysis in chemistry and enzymology*. Dover, New York
47. Gavish B, Weber MM (1979) Viscosity-dependent structural fluctuations in enzyme catalysis. *Biochemistry* 18: 1269-1275
48. McCammon J, Wolynes PG, Karplus M (1979) Picosecond dynamics of tyrosine side chains in proteins. *Biochemistry* 18: 927-942
49. Bahnson BJ, Colby TD, Chin KJ, Goldstein BM, Klinman JP (1997) A link between protein structure and enzyme catalyzed hydrogen tunneling. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12797-12802
50. Basran J, Patel S, Sutcliffe MJ, Scrutton NS (2001) Importance of barrier shape in enzyme-catalyzed reactions. *J Biol Chem* 276: 6234-6242
51. Masgrau L, Roujeinikova A, Johanissen LO, Hothi P, Basran J, Raghavan KE, Mullholland AJ, Sutcliffe MJ, Scrutton NS, Leys D (2006) Atomic description of an enzyme reaction dominated by proton tunneling. *Science* 312: 237-241
52. Menger FM (1992) Analysis of ground-state and transition-state effects in enzyme catalysis. *Biochemistry* 31: 5368-5373
53. Murphy DJ (1995) Revisiting ground-state and transition-state effects, the split-site model, and the "fundamental position" of enzyme catalysis. *Biochemistry* 34: 4507-4510
54. Kraut DA, Carroll KS, Herschlag D (2003) Challenges in enzyme mechanism and energetics. *Ann Rev Biochem* 72: 517-571
55. Northrop DB (1998) On the meaning of K_m and V/K in enzyme kinetics. *J Chem Ed* 75: 1153-1157
56. Scrutton NS, Sutcliffe MJ, Dutton L (2006) Quantum catalysis in enzymes: beyond the transition state theory paradigm. *J R Soc Interface* 3: 465-469
57. Klinman JP, Matthews RG (1985) Calculation of substrate dissociation constants from steady-state isotope effects in enzyme catalyzed reactions. *J Am Chem Soc* 107: 1058-1060
58. Smith S (1994) The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J* 8:1248-1259
59. Hutny J (1981) Kinetics of hog pancreas α -amylase; Theoretical model of the dual-site enzyme. *Acta Biochim Pol* 48: 1085-1090
60. Knapp MJ, Klinman J (2002) Environmentally coupled hydrogen tunneling linking catalysis to dynamics. *Eur J Biochem* 269: 3113-3121
61. Pineda JRET, Schwartz SD (2006) Protein dynamics and catalysis: the problem of transition state theory and a subtlety of dynamic control. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 361: 1433-1438
62. Henzler-Wildman KA, Thai V, Lei M, Ott M, Wolf-Watz M, Fenn T, Pozharski E, Wilson MA, Petsko GA, Karplus M, Hubner CG, Kern D (2007) Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory. *Nature* 450: 838-843
63. Agarwal PK, Billeter SR, Rajagopalan PTR, Benkovic SJ, Hammes-Schiffer S (2002) Network of coupled promoting motions in enzyme catalysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2794-2799
64. Warshel A, Florian J (1998) Computer simulations of enzyme catalysis: Finding out what has been optimized by evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5950-5955
65. Olsson MH, Siegbahn PE, Warshel A (2004) Simulations of the large kinetic isotope effect and the temperature dependence of the hydrogen atom transfer in lipoxygenase. *J Am Chem Soc* 126: 2820-2828
66. Warshel A, Sharma PK, Kato M, Xiang Y, Liu H, Olsson MHM (2006) Electrostatic basis for enzyme catalysis. *Chem Rev* 106: 3210-3235
67. Warshel A, Sharma PK, Chu ZT, Aqvist J (2007) Electrostatic contribution to binding of transition state analogues can be very different from the corresponding contributions to catalysis: phenolates binding to the oxyanion hole of ketosteroid isomerase. *Biochemistry* 46: 1466-1476
68. Kamerlin SC, Haranczyk M, Warshel A (2009) Progress in *ab initio* QM/MM free-energy simulations of electrostatic energies in proteins: accelerated QM/MM studies of pKa, redox reactions and solvation free energies. *J Phys Chem B* 113: 1253-1272
69. Knowles JR (1991) Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* 350: 121-124

Dispute on the source of enzymes' catalytic power

Jan Hutny✉

Department of Biochemistry, Pharmacology and Toxicology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 31 C. Norwida St., 50-345 Wrocław, Poland

✉e-mail: jan.hutny@gmail.com

Key words: enzymatic catalysis, catalytic efficiency, transition state

ABSTRACT

The source of enzymes' unusual catalytic power is still a controversial problem. Experimental documentation of enzymatic ability to use their natural dynamic motions in catalytic processes did not end the dispute on the origin of the energy necessary for catalytic work. Thus, it seems that resolution of this problem will only follow given an increase in computer power, such that *ab initio* simulations of the entire, large protein or ribonucleic acid molecule, engaged in a catalytic process, will be possible.

Jacek Grębowski

Anita Krokosz

Zakład Radiobiologii, Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Zakład Radiobiologii, Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel.: (42) 635 44 80, e-mail: krokosz@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 22 lutego 2010 r.
Artykuł zaakceptowano 7 kwietnia 2010 r.

Słowa kluczowe: fulereny, przeciwutlenia-cze, promieniowanie jonizujące, właściwości radiochronne, radiocuczulacze, diagnostyka obrazowa

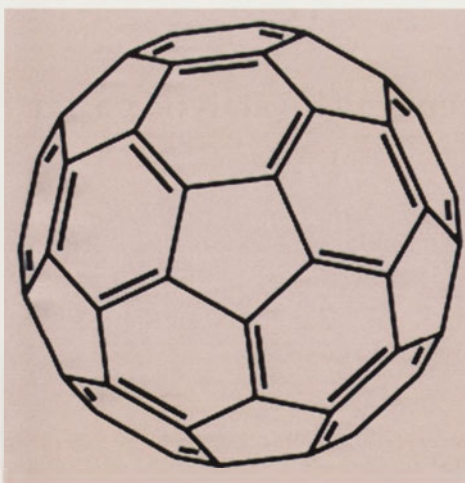
Wykaz skrótów: DF-1 – dendrofuleren; DPPH – rodnik 2,2-difenyl-1-pikrylohydrozylowy; FTIR – spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera; FulAq – uwodnione agregaty fulerenu C_{60} o średnicy 1,6-3,4 nm; GSH – glutation; nano- C_{60} – wodne roztwory agregatów fulerenu C_{60} o średnicach 50-200 nm; RFT – reaktywne formy tlenu; SOD – dysmutaza ponadtlenkowa; THF – tetrahydrofuran

STRESZCZENIE

Cząsteczka fulerenu, mająca kształt kuli lub elipsoidy, zbudowana jest z pierścieni, składających się z pięciu i sześciu atomów węgla, połączonych sprzężonymi wiązaniami π . Obecność zdelokalizowanych elektronów π w cząsteczce powoduje, że fulereny mogą łatwo przyłączać rodniki. Komórki ssaków są zbudowane głównie z cząsteczek wody, stanowiącej około 70% masy komórki. Uszkodzenia powstające pod wpływem działania promieniowania jonizującego są wynikiem reakcji przede wszystkim rodnikowych i nierodnikowych produktów radiolizy wody. W warunkach tlenowych rodnikami odpowiadającymi za uszkodzenia są: rodnik wodorotlenowy, anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru. Wolnorodnikowy mechanizm uszkodzeń radiacyjnych sugeruje, że fulereny mogą chronić strukturę komórkową przed uszkodzeniami wywoływanymi przez promieniowanie jonizujące. Jednak fulereny mogą być także donorem elektronów, które w reakcji z tlenem cząsteczkowym generują anionorodniki ponadtlenkowe. Kształt fulerenów pozwala na wykorzystanie ich także jako nośników atomów pierwiastków radioaktywnych stosowanych w terapii i diagnostyce medycznej. O właściwościach fulerenów i ich pochodnych decyduje kilka czynników, przede wszystkim, rodzaj przyłączonych grup funkcyjnych, struktura agregatów tworzonych przez niepodstawione fulereny w roztworach wodnych oraz właściwości układu doświadczalnego, w którym fulereny się znajdują.

WPROWADZENIE

Cząsteczka fulerenu zbudowana jest z pierścieni, składających się z pięciu i sześciu atomów węgla, połączonych sprzężonymi wiązaniami π . Najtrwalszy fuleren, zawierający 60 atomów węgla (C_{60}) ma kształt dwudziestościanu ściętego (20 pierścieni sześciocłonowych i 12 pierścieni pięciocłonowych), w którym wszystkie atomy węgla wykazują hybrydyzację sp^2 i są chemicznie równocenne. W fulerenie występują dwa typy wiązań: pojedyncze C_5-C_5 w pięciokątach oraz podwójne C_5-C_6 w sześciokątach (Ryc. 1). Cząsteczka C_{60} kształtem przypomina piłkę futbolową (Ryc. 2). Delokalizacja 30 wiązań podwójnych i uwspólnienie 60 elektronów π w całej cząsteczce, nadaje jej właściwości aromatyczne i zapewnia dużą stabilność [1]. Budowa cząsteczki fulerenu determinuje również jej właściwości chemiczne. Z jednej strony fulereny mogą być na tyle wydajnymi zmiataczami wolnych rodników, że nadano im nazwę „gąbki wolnorodnikowej”. Z drugiej strony mogą także wykazywać właściwości prooksydacyjne [1,2]. W wyniku pochłonięcia kwantu promieniowania przez fuleren, może nastąpić jego przejście w długotrwały, trypletowy stan wzbudzenia, co prowadzi do generowania wysoce reaktywnego tlenu singletowego (1O_2). Możliwy jest także inny mechanizm, w którym fuleren jest donorem elektronów i w reakcji z tlenem cząsteczkowym generuje anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$).



Rycina 1. Budowa przestrzenna fulerenu C_{60} .

Reaktywne formy tlenu (RFT) powstające w wyżej opisanych procesach przy udziale fulerenów, mogą powodować uszkodzenia struktur komórkowych, prowadząc w efekcie do przyspieszenia procesów starzenia się i do śmierci komórki [3-5]. Dualne właściwości fulerenów, możliwość zarówno zmiatania jak i generowania RFT, mogą pozwolić na zastosowanie ich jako czynników ochronnych lub cytotoksycznych dla komórek. O właściwościach fulerenów i ich pochodnych decyduje kilka czynników, przede wszystkim, rodzaj przyłączonych grup funkcyjnych, struktura agregatów tworzonych przez niepodstawione fulereny



Rycina 2. Schemat ilustrujący podobieństwo C_{60} do piłki futbolowej. Źródło: http://spin.fh-bielefeld.de/img/workunits/fullerene/fullerene_2.jpg (19.02.2010).

w roztworach wodnych oraz właściwości układu doświadczalnego, w którym fulereny się znajdują [6-8].

FUNKCJONALIZACJA FULERENÓW

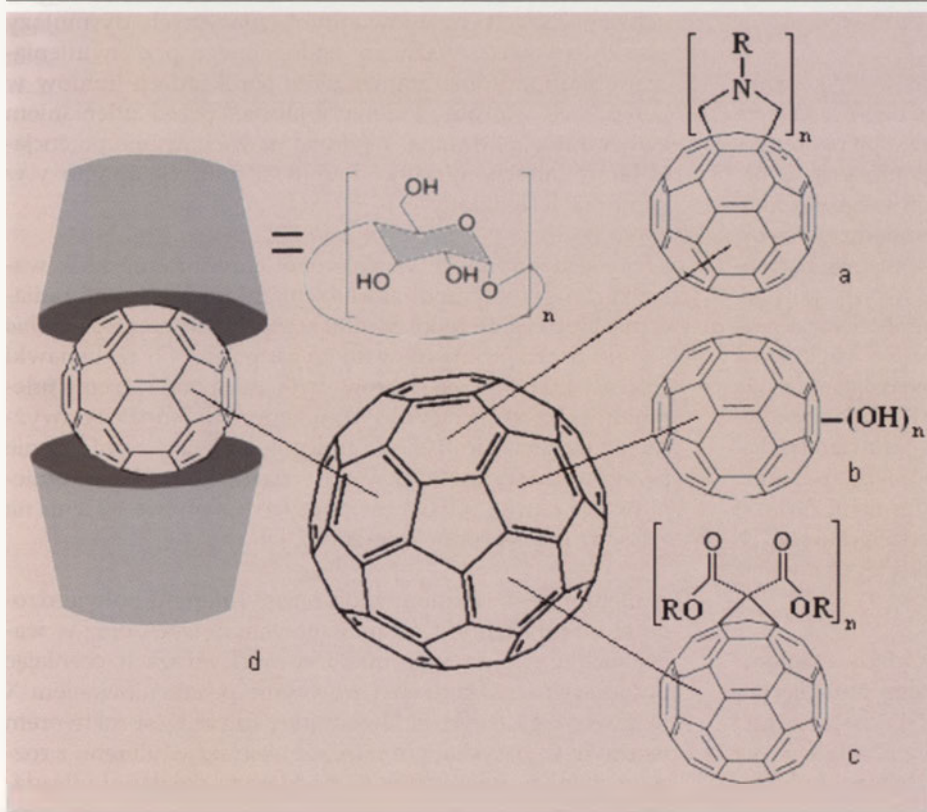
Fulereny rozpuszczają się w wielu rozpuszczalnikach niepolarnych, zarówno alifatycznych jak i aromatycznych [9]. Słaba rozpuszczalność fulerenów w cieczach polarnych jest poważnym mankamentem, gdy pod uwagę weźmie się biomedyczne zastosowanie „węglowych piłeczek”. Pomimo hydrofobowości fulerenów udało się otrzymać w wodzie stabilne roztwory C_{60} nazywane nano- C_{60} . Cząsteczki C_{60} w kontakcie z wodą, tworzą trwałe agregaty nanome-

trycznych wymiarów. Roztwory nano- C_{60} można uzyskać poprzez wymianę rozpuszczalników. Mieszając z wodą nasycony roztwór fulerenu C_{60} w toluenie i poddając go działaniu ultradźwięków do całkowitego odparowania toluenu, otrzymujemy koloidalny roztwór wodny agregatów C_{60} [10-12].

W zależności od sposobu przygotowania roztworów fulerenu w wodzie, uzyskujemy agregaty o różnych wielkościach, barwie i reaktywności. Liczne prace donoszą o toksyczności tak przygotowanych roztworów wobec struktur komórkowych poprzez oddziaływanie elektrostatyczne [13,14] oraz poprzez generowanie reaktywnych form tlenu [15,16]. Działanie roztworami nano- C_{60} w stężeniu powyżej 0,4 ppm na komórki bakterii *E. coli* DH5a i *B. subtilis* CB315 w hodowlach prowadzonych zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych, powodowało zahamowanie ich wzrostu. Niektórzy badacze uważają [17], że toksyczność roztworów nano- C_{60} wobec komórek wiąże się ze sposobem przygotowania tych roztworów i możliwością adsorpcji rozpuszczalników organicznych użytych do przygotowania roztworów na powierzchni nano- C_{60} .

Teorię tę potwierdzają wyniki badań [18], w których do przygotowania roztworów nano- C_{60} wykorzystano roztwory fulerenu C_{60} w tetrahydrofuranie (THF/ $n-C_{60}$). Roztwory te napromieniowano promieniowaniem gamma w dawce 34 kGy. Analiza spektroskopowa metodą FTIR potwierdziła radiacyjną degradację THF. Napromieniowanie roztworu THF/ $n-C_{60}$ przed ekstrakcją fulereny do wody, prowadziło do całkowitej utraty cytotoksyczności przez uzyskane w ten sposób wodne roztwory nano- C_{60} . Ponadto roztwory te zyskały zdolność do zmiatania RFT i ochrony komórek ssaków przed śmiercią wywołaną stresem oksydacyjnym. Przygotowanie wodnych roztworów nano- C_{60} przez ekstrakcję fulereny z roztworu w THF z pominięciem napromieniowania promieniowaniem gamma, powodowało znaczną toksyczność tak uzyskanych roztworów nano- C_{60} [19]. Nowsze prace również dowodzą toksyczności pozostałości THF, a nie cząstek nano- C_{60} w oddziaływaniu na komórki ssaków [20,21].

Wiele metod modyfikacji C_{60} do pochodnych rozpuszczalnych w wodzie, polega na przyłączeniu określonych grup funkcyjnych. W badaniach nad biologicznym działaniem fulerenów i ich właściwościami antyoksydacyjnymi wykorzystuje się głównie pochodne rozpuszczalne w wodzie takie jak: fulerenole (polihydroksyfulereny), PEG-fulereny (z przyłączonym glikolem polietylenowym) i PVP-fulereny (fulereny opłaszczane poliwinylpirolidonem) oraz kompleksy fulereny z cyklodekstrynami (Ryc. 3).

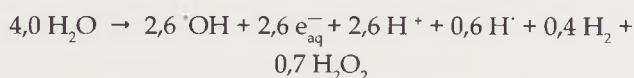


Rycina 3. Pochodne hydrofilowe fulereny C_{60} : a) PVP-fuleren, b) fulerenol, c) PEG-fuleren, d) kompleks fuleren-cyklodekstryna.

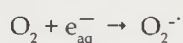
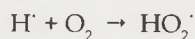
Wymienione powyżej przykłady hydrofilowych pochodnych C_{60} okazały się świetnymi zmiataczami wolnych rodników [22-24].

DZIAŁANIE PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO NA KOMÓRKĘ

Absorpcja promieniowania jonizującego o energiach rzędu kilku MeV przez materię jest niespecyficzna i prowadzi do jonizacji atomów i cząsteczek. Ponieważ komórki ssaków są zbudowane głównie z cząsteczek wody, stanowiącej około 70% masy komórki uszkodzenia powstające pod wpływem działania promieniowania jonizującego są wynikiem reakcji przede wszystkim produktów radiolizy wody. Pod nieobecność tlenu przebieg radiolizy wody można opisać równaniem:



Gdy w układzie jest obecny tlen, zachodzą wtórne reakcje, podczas których zanikają redukujące produkty radiolizy:



Rodnik $\text{O}_2^- \cdot$ jest mało reaktywny i ulega spontanicznej lub katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową reakcji dysmutacji.

Rodnik wodorotlenowy jest najbardziej reaktywną cząstką spośród wszystkich tzw. „reaktywnych form tlenu” z czasem życia rzędu kilku nanosekund. Powstaje *in vivo* po napromieniowaniu promieniowaniem wysokiej energii (np. promieniowanie X lub gamma) lub w wyniku katalizowanego rozpadu nadtlenu wodoru (reakcja Fentona). Ze względu na swoją wysoką reaktywność rodnik wodorotlenowy reaguje natychmiast z otaczającymi cząsteczkami w miejscu swojego powstania. Rodnik $\cdot\text{OH}$ ma bardzo wysoki potencjał utleniający, w środowisku obojętnym $E^0(\text{OH}/\text{OH}^-) = 1,8 \text{ V}$. Ze względu na swoje właściwości utleniające i niespecyficzne działanie może modyfikować praktycznie wszystkie składniki budujące komórki [25-27]. Wolnorodnikowy mechanizm uszkodzeń radiacyjnych sugeruje, że zmiatacze wolnych rodników powinny chronić struktury komórkowe przed uszkodzeniem. Związki elektronodonorowe poprzez naprawę uszkodzeń powstałych np. w wyniku redukcji utlenionych grup funkcyjnych również powinny wykazywać właściwości ochronne.

Pierwsze badania nad zastosowaniem środków chemicznych do ochrony przed promieniowaniem jonizującym przeprowadzono ponad 60 lat temu [28,29]. Zastosowano wówczas hormon estradiol, który wykazywał właściwości ochronne. Po odkryciu radioochronnego działania niektórych związków tiolowych, przede wszystkim cysteiny, rozpoczęto intensywne badania nad chemicznymi środkami radioochronnymi [29,30].

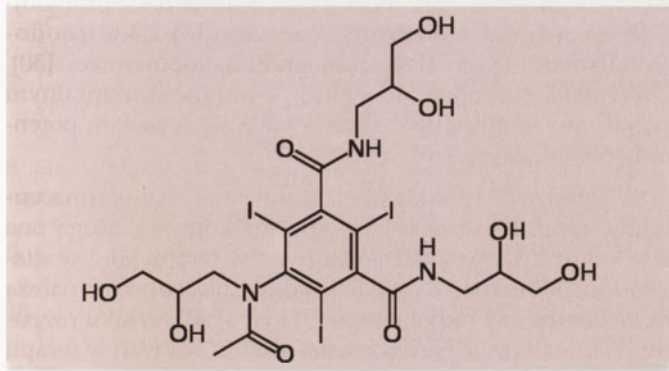
Pomysł wykorzystania fulerenów do ochrony komórek przed działaniem promieniowania jonizującego związany był z właściwościami chemicznymi i biologicznymi fulerenów i ich pochodnych. Fulereny cechują się wysokim powinowactwem elektronowym, wobec czego łatwo przyłączają rodniki oraz podstawniki nukleofilowe [31]. Ponadto wyniki badań wskazują, że niektóre z rozpuszczalnych w wodzie pochodnych fulerenu C_{60} i C_{82} nie wykazują cytotoksyczności w zakresie stężeń stosowanym do ochrony przed wolnymi rodnikami [32,33].

RADIOPROTEKCYJNE DZIAŁANIE FULERENÓW

Radioochronne działanie fulerenolu na napromieniowane tkanki zdrowych szczurów i myszy porównywane było z popularnym radioprotektorem amifostiną o komercyjnej nazwie Ethyol®. Oba związki wydłużały czas życia szczurów napromieniowanych dawką letalną 8 Gy powyżej 30 dni. Ponadto, fulerenol w dawce 100 mg/kg skuteczniej zapobiegał obniżaniu liczby granulocytów i limfocytów po napromieniowaniu szczurów dawką subletalną 7 Gy niż amifostina w stężeniu 300 mg/kg. Oba badane związki wykazywały właściwości ochronne wobec napromieniowanych tkanek, jednak fulerenol efektywniej chronił śledzionę, jelito cienkie i płuca natomiast amifostina była skuteczniejsza w ochronie serca, wątroby i nerek [34]. Podobne wyniki otrzymali inni badacze [35]. Podawali oni fulerenol $C_{60}(\text{OH})_{24}$ myszom w dawce 40 mg/kg przez 2 tygodnie. Następnie myszy napromieniowano dawką 8 Gy na całe ciało. Zaobserwowano zwiększoną o 73,7% przeżywalność myszy po 30 dniach od napromieniowania w stosunku do myszy, którym nie podawano wstępnie fulerenolu. Stwierdzono ochronę jednego z najważniejszych enzymów antyoksydacyjnych, dysmutazy ponadtlenkowej i ważnego, endogennego przeciwutleniacza, glutationu oraz zmniejszenie peroksydacji lipidów w komórkach wątroby. Fulerenol chronił przed utlenianiem białka mitochondrialne, wpływał na zachowanie potencjału błony mitochondrialnej, hamował indukcję apoptozy w komórkach śledziony.

Stwierdzono także, że fulerenol chroni komórki w warunkach *in vitro* przed uszkodzeniami inicjowanymi radiacyjnie [36,37]. Fulerenol chronił komórki szczepu *Stylynychia mytilus* przed promieniowaniem gamma z ^{60}Co aż do dawki 1500 Gy [37]. Stopień ochrony był zależny od stężenia fulerenolu w zakresie stężeń 0,06-0,1 mg/ml. Jednak podwyższenie stężenia do 0,25 mg/ml powodowało zmniejszenie przeżywalności komórek w stosunku do kontroli napromieniowanej dawką 500 Gy. Świadczy to o wpływie stężenia na właściwości ochronne fulerenolu.

Ochronne działanie uwodnionego fulerenu potwierdzono w warunkach *in vitro* na izolowanym DNA oraz w warunkach *in vivo* na napromieniowanych myszach, oceniając poradiacyjne uszkodzenia wywołane promieniowaniem X w dawce od 1 do 7 Gy. Uwodniony fuleren jest roztworem wodnym C_{60} uzyskanym poprzez ekstrakcję fulerenu z rozpuszczalnika organicznego i poddanym działaniu ultradźwięków. Powstają hydratowane agregaty o średnicach około 1,8 lub 3,4 nm [12]. Zaobserwowano, że stopień ochrony DNA przez FulAq był odwrotnie proporcjonalny do stęże-



Rycina 4. Wzór chemiczny cząsteczki joheksolu.

nia fulerenu [12]. Badacze efekt ten tłumaczą powstawaniem stref hydratacyjnych w obrębie cząsteczek i agregatów fulerenu. Powstaje stabilny kompleks donor-akceptor o budowie $C_{60}@(\text{H}_2\text{O})_n$. FulAq podany dootrzewnowo myszom w dawce 0,1 lub 1mg/kg masy ciała wydłużał życie myszy po napromieniowaniu dawką subletalną 7 Gy proporcjonalnie do zastosowanego stężenia, jeżeli podany był przed napromieniowaniem. Podanie FulAq po napromieniowaniu nie poprawiało przeżycia myszy.

Badania mające na celu określenie zdolności do ochrony przed promieniowaniem jonizującym przez fuleren C_{60} połączone z dendrymerem, prowadzono w warunkach *in vivo* na słodkowodnej rybie Danio pręgowanym (*Danio rerio*) z rodziny karpowatych. Zarodki Danio pręgowanego zostały poddane działaniu promieniowania jonizującego w dawkach od 20 do 80 Gy w obecności i pod nieobecność dendrofulerenu (DF-1). Ewentualna toksyczność oraz zdolności radioochronne DF-1 zostały ocenione na podstawie

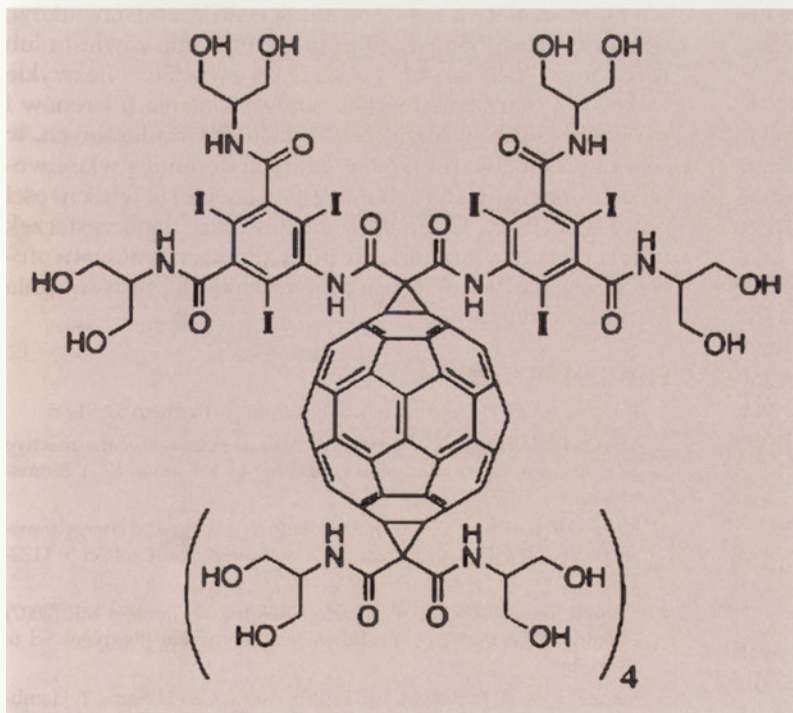
czasu przeżycia, morfologii jak i czynności narządów. DF-1 znacząco obniżył uszkodzenia wywołane promieniowaniem gamma z ^{137}Cs , jeśli podano go 3 godziny przed napromieniowaniem i 15 min po ekspozycji. DF-1 nie zapewniał żadnej ochrony, gdy został podany 30 min po napromieniowaniu. Toksyczności ze strony DF-1 nie stwierdzono [38]. Dendrofulereny cechują się dużymi stałymi szybkości z rodnikami tlenowymi, jednak ze względu na duże rozmiary, wydajność reakcji zależy będzie od możliwości kontaktu obszaru bogatego w elektrony π z rodnikami czyli od homogennego lub specyficznego miejscowo tworzenia rodników [39].

W historii radiobiologii dużą uwagę poświęcono możliwości wykorzystania białek antyoksydacyjnych w ochronie przed promieniowaniem jonizującym. Zastosowanie dysmutazy ponadtlenkowej w znaczący sposób zwiększało przeżywalność myszy poddanych działaniu radiacji [40,41]. Właściwości radioochronne fulerenów wynikają głównie z możliwości zmiatania rodników generowanych radiacyjnie w wyniku radiolizy wody. Jednak niektóre z pochodnych fulerenów wykazują działanie antyoksydacyjne poprzez naśladowanie działania niektórych enzymów antyoksydacyjnych [42,43]. Zaobserwowano, że fuleren C_{60} z przyłączonymi resztami kwasu malonowego (nazywany C_3) wykazuje działanie naśladujące działanie manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (Mn-SOD) w warunkach *in vitro* i *in vivo* [44]. Reakcja między maleinową pochodną C_{60} a $\text{O}_2^{\cdot-}$ nie zachodzi bezpośrednio [39], ale poprzez katalityczną dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego. Myszom z zablokowanym enzymem SOD2 podano pochodną C_3 , co spowodowało 3-krotne wydłużenie ich życia. Wyniki badań immunochemicznych udowodniły, że C_3 lokuje się w mitochondriach. W związku z powyższym zaproponowano [31] mechanizm działania karboksyfulerenu C_3 jako katalizatora

reakcji dysmutacji rodników ponadtlenkowych. Badacze uważają na podstawie obliczeń metodami modelowania molekularnego, że reakcja zachodzi poprzez przeniesienie niesparowanego elektronu z anionorodnika ponadtlenkowego na cząsteczkę C_3 , następnie anionorodnik $C_3^{\cdot-}$ reaguje z kolejnym anionorodnikiem ponadtlenkowym, w wyniku czego odtwarza się C_3 i powstaje H_2O_2 . Wyniki uzyskane w przedstawionych pracach dowodzą faktu, że fulereny lub niektóre ich pochodne mogą chronić komórki zarówno przez bezpośrednią reakcję z wolnymi rodnikami jak i przez naśladowanie działania enzymów antyoksydacyjnych.

FULERENY JAKO RADIOUCZULACZE

Zdolność do generowania zwiększonej ilości RFT nie zawsze jest niekorzystna z punktu widzenia medycznego. Możliwość zwiększenia generowania RFT w komórkach nowotworowych poddanych napromieniowaniu, może być przesłanką do zastosowania fulerenów w radioterapii. Istnieją doniesienia o radiouczulającym działaniu nano- C_{60} na komórki nowotworowe skóry i wątroby poddawane działaniu promieniowania γ z ^{60}Co [45]. Poddano napromieniowaniu dwie



Rycina 5. Wzór chemiczny pochodnej jodowej fulerenu o właściwościach kontrastujących w tomografii komputerowej.

linie komórkowe (B16 i SMMU-7721) o różnej promieniowrażliwości. Obydwie linie napromieniowane w obecności nano-C₆₀ wykazywały większą radiowrażliwość niż napromieniowane bez fulerenu. Wyniki tych badań wykazały radiosensybilizacyjne właściwości zawiesin nano-C₆₀ poprzez zwiększanie ilości wytwarzanych RFT i uszkodzanie błony komórkowej komórek nowotworowych.

Właściwości fulerenów można modyfikować zarówno poprzez podstawniki przyłączane do cząsteczki fulerenu lub poprzez tworzenie kompleksów typu gość-gospodarz oraz operując warunkami reakcji, w tym stężeniem fulerenu. Ochronny charakter fulerenolu, uchodzącego za obiecującą radioprotektor, zanika, gdy zwiększymy jego stężenie. Stosując stężenie 0,25 mg/ml fulerenolu C₆₀(OH)_n, n=18-22, badacze zaobserwowali radiouczulające działanie związku poprzez obniżanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy oraz zwiększanie poziomu peroksydacji lipidów w bakteriach *Stylomyces mytilius*. Fulerenol w stężeniach poniżej 0,1 mg/ml wykazywał działanie radioochronne [37].

DIAGNOSTYKA IZOTOPOWA Z UŻYCIEM FULERENÓW

Potencjalne wykorzystanie fulerenów w radiobiologii nie ogranicza się do zmniejszania skutków działania promieniowania na komórki prawidłowe. Ciekawe są perspektywy ich wykorzystania w diagnostyce medycznej do obrazowania z wykorzystaniem radioizotopów. Przenoszenie związków chemicznych wewnątrz makromolekuł zapewnia ich odizolowanie od środowiska zewnętrznego, a tym samym ochronę przed toksycznością związków stosowanych w diagnostyce. Ma to szczególne znaczenie w przypadku radiofarmaceutyków, gdyż pozwala ograniczyć ich znaczną toksyczność na prawidłowe komórki. Pochodne fulerenów, zawierające w swym wnętrzu atom(y) lub cząsteczki pierwiastków innych niż węgiel, to związki endohedralne. Przyjęto dla tej grupy oznaczenie M@C_n, gdzie M to rodzaj pierwiastka we wnętrzu fulerenu C_n, n to ilość atomów węgla tworzących fuleren. Pierwiastki, które najczęściej wykorzystuje się w diagnostyce, należą do grupy lantanowców. Dla tej grupy pierwiastków największą wydajność zamykania pierwiastka wewnątrz fulerenu uzyskano dla cząsteczki C₈₂, dającej cząsteczkę typu M@C₈₂. Wykazano, iż jon lantanowca M³⁺, który jest znacznie mniejszy niż wnętrze tego fulerenu, jest ulokowany centrycznie [46]. Najczęściej analizowanym związkiem typu M@C₈₂ jest Gd@C₈₂. Wybranie tego związku nie było przypadkowe, ponieważ gadolin jest stosowany jako czynnik kontrastujący w diagnostyce rezonansu magnetycznego (MRI). Aby zwiększyć rozpuszczalność Gd@C₈₂ w roztworach wodnych, poddano ten związek hydroksylacji [47,48]. Ponadto, porównanie zdolności do zmiatania RFT oraz redukcji stabilnego rodnika DPPH przez polihydroksyfuleren z włączonym gadolinem Gd@C₈₂(OH)₂₂ i fulerenol C₆₀(OH)₂₂ wykazało, że Gd@C₈₂(OH)₂₂ jest skuteczniejszym zmiataczem rodników [•]OH, DPPH oraz tlenu singletowego niż C₆₀(OH)₂₂ [49].

Szeroki zakres możliwości zastosowania pochodnych fulerenów w diagnostyce obrazowej stanowi wyzwanie dla naukowców, aby otrzymać pochodne o jeszcze lepszych właściwościach kontrastujących. Opracowano syntezę pochodnej jodowej fulerenu, która może być alternatywą dla

zastosowań jodeksolu, N,N'-bis-(2,3-dihydroksypropylo)-5-[N-(2,3-dihydroksypropylo)acetamido]-2,4,6-trijodoizoftalamidu (Ryc. 4) w tomografii komputerowej [50]. Otrzymana pochodna fulerenu C₆₀ o wzorze strukturalnym przedstawionym na Ryc. 5 cechowała się wysokim potencjałem kontrastującym.

W medycynie nuklearnej stosowanie radiofarmaceutyków może nieść ze sobą podwójne korzyści. Mogą one bowiem być wykorzystane zarówno w terapii jak i w diagnostyce klinicznej. Do takich radiofarmaceutyków należą m.in. kompleksy radioizotopu ¹⁶⁶Ho [51]. W wyniku rozpadu ¹⁶⁶Ho następuje emisja cząstek β⁻ stosowanych w terapii i emisja kwantów promieniowania γ wykorzystywanych w diagnostyce. Do zamknięcia izotopu holmu użyto polihydroksyfuleren C₈₂, podobnie jak do zamknięcia jonu gadolinu. Oddziaływanie ¹⁶⁶Ho_x@C₈₂(OH)_y na komórki myszy sprawdzono w warunkach *in vivo*. Wyniki badań wykazały, że ¹⁶⁶Ho_x@C₈₂(OH)_y jest trudno metabolizowany oraz wykazuje dużą stabilność kinetyczną. Głównym miejscem akumulacji ¹⁶⁶Ho_x@C₈₂(OH)_y były kości, wątroba i nerki [52]. Innym izotopem, używanym w diagnostyce SPECT czyli tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów (ang. *single photon emission computed tomography*) jest technet ^{99m}Tc. Utworzono egzohedralny związek kompleksowy pomiędzy polihydroksyfulerenem a ^{99m}Tc [53]. Badania na królikach wykazały, że głównym miejscem akumulacji kompleksu były wątroba, śledziona i kości. Akumulacja kompleksu fulerenolu i technetu w kluczowych organach, może zwiększać jego właściwości radioochronne dla całego organizmu zwierzęcego.

PODSUMOWANIE

Fulereny są obiecującą klasą związków mogących mieć zastosowanie w radiobiologii. Ich funkcja radioochronna lub radiouczulająca zależy od jakości i ilości podstawników, wielkości cząsteczki, sposobu przygotowania zawiesin lub roztworów, zastosowanego stężenia związku. Niezwykle ważne jest określenie mechanizmów działania fulerenów i ich pochodnych w różnych układach doświadczalnych, w celu określenia warunków, w których dominują właściwości ochronne, a w których mogą przejawiać się właściwości prooksydacyjne. Odmienne zachowanie nanocząsteczek fulerenowych w komórkach prawidłowych i nowotworowych jest bardzo obiecującą przesłanką do zastosowania ich w radioterapii.

PIŚMIENNICTWO

1. Krokosz A (2007) Fulereny w biologii. *Postepy Biochem* 53: 91-96
2. Markovic Z, Trajkovic V (2008) Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C₆₀). *Biomaterials* 29: 3561-3573
3. Koeppe R, Sariciftci NS (2006) Photoinduced charge and energy transfer involving fullerene derivatives. *Photochem Photobiol Sci* 5: 1122-1131
4. Mroz P, Tegos GP, Gali H, Wharton T, Sarna T, Hamblin MR (2007) Photodynamic therapy with fullerenes. *Photochem Photobiol Sci* 6: 1139-1149
5. Mroz P, Pawlak A, Satti M, Lee H, Wharton T, Gali H, Sarna T, Hamblin MR (2007) Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism. *Free Radic Biol Med* 43: 711-719

6. Satoh M, Takayanagi I (2006) Pharmacological studies on fullerene (C₆₀), a novel carbon allotrope, and its derivatives. *J Pharmacol Sci* 100: 513-518
7. Lee I, Mackeyev Y, Cho M, Li D, Kim JH, Wilson LJ, Alvarez PJ (2009) Photochemical and antimicrobial properties of novel C₆₀ derivatives in aqueous systems. *Environ Sci Technol* 43: 6604-6610
8. Shinohara N, Matsumoto K, Endoh S, Maru J, Nakanishi J (2009) *In vitro* and *in vivo* genotoxicity tests on fullerene C₆₀ nanoparticles. *Toxicol Lett* 191: 289-296
9. Cataldo F (2010) Interaction of C₆₀ fullerene with lipids. *Chem Phys Lipids* doi:10.1016/j.chemphyslip.2010.03.004
10. Scharff P, Risch K, Carta-Abelmann L, Dmytruk I.M, Bilyi MM, Golub OA, Khavryuchenko AV, Buzaneva EV, Aksenov VL, Avdeev MV, Prylutskyy Yul, Durov SS (2004) Structure of C60 fullerene in water: spectroscopic data. *Carbon* 42: 1203-1206
11. Sene JA, Pinheiro MVB, Krambrock K, Barbeira PJS (2009) Quantification of fullerene nanoparticles suspensions in water based on optical scattering. *Talanta* 78: 1503-1507
12. Andrievsky GV, Bruskov VI, Tykhomyrov AA, Gudkov SV (2009) Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C60 fullerene nanostructures *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 47: 786-793
13. Fortner JD, Lyon DY, Sayes CM, Boyd AM, Falkner JC, Hotze EM, Alemany LB, Tao YJ, Guo W, Ausman KD, Colvin VL, Hughes JB (2005) C₆₀ in water: nanocrystal formation and microbial response. *Environ Sci Technol* 39: 4307-4316
14. Lyon DY, Fortner JD, Sayes CM, Colvin VL, Hughe JB (2005) Bacterial cell association and antimicrobial activity of a C₆₀ water suspension. *Environ Toxicol Chem* 24: 2757-2762
15. Sayes CM, Fortner JD, Guo W, Lyon D, Boyd AM, Ausman KD, Tao YJ, Sitharaman B, Wilson LJ, Hughes JB, West JL, Colvin VL (2004) The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Lett* 4: 1881-1887
16. Sayes CM, Gobin AM, Ausman KD, Mendez J, West JL, Colvin VL (2005) Nano-C₆₀ cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials* 26: 7587-7595
17. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F (2005) [60]Fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett* 5: 2578-2585
18. Isakovic A, Markovic Z, Nikolic N, Todorovic-Markovic B, Vranjes-Djuric S, Harhaji L, Raicevic N, Romcevic N, Vasiljevic-Radovic D, Dramicanin M, Trajkovic V (2006) Inactivation of nanocrystalline C60 cytotoxicity by γ -irradiation. *Biomaterials* 27: 5049-5058
19. Isakovic A, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Nikolic N, Vranjes-Djuric S, Mirkovic M, Dramicanin M, Harhaji L, Raicevic N, Nikolic Z, Trajkovic V (2006) Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene. *Toxicol Sci* 91: 173-183
20. Kovochich M, Espinasse B, Auffan M, Hotze EM, Wessel L, Xia T, Nel AE, Wiesner MR (2009) Comparative toxicity of C60 aggregates toward mammalian cells: role of tetrahydrofuran (THF) decomposition. *Environ Sci Technol* 43: 6378-6384
21. Spohn P, Hirsch C, Hasler F, Bruinink A, Krug HF, Wick P (2009) C₆₀ fullerene: a powerful antioxidant or a damaging agent? The importance of an in-depth material characterization prior to toxicity assays. *Environ Pollut* 157: 1134-1139
22. Xiao L, Takada H, Gan XH, Miwa N (2006) The water-soluble fullerene derivative 'Radical Sponge®' exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 1590-1595
23. Kato S, Aoshima H, Saitoh Y, Miwa N (2009) Highly hydroxylated or gamma-cyclodextrin-bicapped water-soluble derivative of fullerene: the antioxidant ability assessed by electron spin resonance method and beta-carotene bleaching assay. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 5293-5296
24. Misirkic MS, Todorovic-Markovic BM, Vucicevic LM, Janjetovic KD, Jokanovic VR, Dramicanin MD, Markovic ZM, Trajkovic VS (2009) The protection of cells from nitric oxide-mediated apoptotic death by mechanochemically synthesized fullerene (C₆₀) nanoparticles. *Biomaterials* 30: 2319-2328
25. Krokosz A, Szweda-Lewandowska Z (2005) Changes in the activity of acetylcholinesterase and Na,K-ATPase in human erythrocytes irradiated with X-rays. *Cell Mol Biol Lett* 10: 471-478
26. Krokosz A, Koziczak R, Gonciarz M, Szweda-Lewandowska Z (2006) Study of the effect of dose-rate on radiation-induced damage to human erythrocytes. *Radiat Phys Chem* 75: 98-105
27. Komorowska M, Krokosz A, Szweda-Lewandowska Z (2007) Radiation damage to human erythrocytes: Influence of the composition of medium. *Radiat Phys Chem* 76: 1587-1593
28. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO (1954) Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119: 623-626
29. Chapman WA, Sipe CR, Eltzholtz DC, Cronkite EP, Chambers FW (1950) Sulfhydryl-containing agents and the effects of ionizing radiations. I. Beneficial effect of glutathione injection on x-ray induced mortality rate and weight loss in mice. *Radiology* 55: 865-873
30. Patt HM, Tyree EB, Straube RL, Smith DE (1949) Cysteine protection against X-irradiation. *Science* 110: 213-214
31. Osuna S, Swart M, Sola M (2010) On the mechanism of action of fullerene derivatives in superoxide dismutation. *Chem Eur J* 16: 3207-3214
32. Bakry R, Vallant RM, Najam-ul-Haq M, Rainer M, Szabo Z, Huck CW, Bonn GK (2007) Medicinal applications of fullerenes. *Int J Nanomedicine* 2: 639-649
33. Partha R, Conyers JL (2009) Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials. *Int J Nanomedicine* 4: 261-275
34. Trajković S, Dobrić S, Jačević V, Dragojević-Simić V, Milovanović Z, Dorđević A (2007) Tissue-protective effects of fullerol C₆₀(OH)₂₄ and amifostine in irradiated rats. *Colloids Surf B Biointerfaces* 58: 39-43
35. Cai X, Hao J, Zhang X, Yu B, Ren J, Luo C, Li Q, Huang Q, Shi X, Li W, Liu J (2009) The polyhydroxylated fullerene derivative C(60)(OH)₂₄ protects mice from ionizing-radiation-induced immune and mitochondrial dysfunction. *Toxicol Appl Pharmacol* 243: 27-34
36. Bogdanovic V, Stankov K, Icevic I, Zikic D, Nikolic A, Solajic S, Djordjevic A, Bogdanovic G (2008) Fullerol C₆₀(OH)₂₄ effects on antioxidant enzymes activity in irradiated human erythroleukemia cell line. *J Radiat Res (Tokyo)* 49: 321-327
37. Zhao O, Li Y, Xu J, Liu R, Li W (2005) Radioprotection by fullerol of *Stylyonychia mytilus* exposed to γ -rays. *Int J Radiat Biol* 81: 169-175
38. Daroczi B, Kari G, McAleer MF, Wolf JC, Rodeck U, Dicker AP (2006) *In vivo* radioprotection by the fullerene nanoparticle DF-1 as assessed in a zebrafish model. *Clin Cancer Res* 12: 7086-7091
39. Bensasson RV, Brettreich M, Frederiksen J, Göttinger H, Hirsch A, Land EJ, Leach S, McGarvey DJ, Schönberger H (2000) Reactions of e_{aq}⁻, CO₃⁻, HO[•], O₂⁻, and O₂^{•-}(Δ_{aq}) with a dendro[60]fullerene and C₆₀[C(CO-OH)₂]_n (n=2-6). *Free Radic Biol Med* 29: 26-33
40. Petkau A (1986) Scientific basis for the clinical use of superoxide dismutase. *Cancer Treatment Reviews* 13: 17-44
41. Abe M, Nishidai T, Yukawa Y, Takahashi M, Ono K, Hiraoka M, Ri N (1981) Studies on the radioprotective effects of superoxide dismutase in mice. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 7: 205-209
42. Ali SS, Hardt JJ, Dugan LL (2008) SOD activity of carboxyfullerenes predicts their neuroprotective efficacy: a structure-activity study. *Nanomed* 4: 283-294
43. Quick KL, Ali SS, Arch R, Xiong C, Wozniak D, Dugan LL (2008) A carboxyfullerene SOD mimetic improves cognition and extends the lifespan of mice. *Neurobiol Aging* 29: 117-128
44. Ali SS, Hardt JJ, Quick KL, Kim-Han JS, Erlanger BF, Huang T, Epstein CJ, Dugan LL (2004) A biologically effective fullerene (C₆₀) derivative with superoxide dismutase mimetic properties. *Free Rad Biol Med* 37: 1191-1202
45. Ni J, Wu Q, Li Y, Guo Z, Tang G, Sun D, Gao F, Cai J (2008) Cytotoxic and radiosensitizing effects of nano-C60 on tumor cells *in vitro*. *J Nanopart Res* 10: 643-651

46. Grushko YuS, Alekseev EG, Kozlov VS, Molkanov LI, Wortmann G, Giefers H, Rupprecht K, Khodorkovskii MA (2000) ^{161}Dy Mössbauer study of the endohedral metallofullerenes $\text{Dy}@C_n$ ($n = 80, 82, 84$). *Hyperfine Interactions* 126: 121-126
47. Mikawa M, Kato H, Okumura M, Narazaki M, Kanazawa Y, Miwa N, Shinohara H (2001) Paramagnetic water-soluble metallofullerenes having the highest relaxivity for MRI contrast agents. *Bioconjugate Chem* 12: 510-514
48. Laus S, Sitharaman B, Tóth É, Bolskar RD, Helm L, Asokan S, Wong MS, Wilson LJ, Merbach AE (2005) Destroying gadofullerene aggregates by salt addition in aqueous solution of $\text{Gd}@C_{60}(\text{OH})_x$ and $\text{Gd}@C_{60}[\text{C}(\text{COOH}_2)]_{10}$. *J Am Chem Soc* 127: 9368-9369
49. Yin JJ, Lao F, Fu PP, Wamer WG, Zhao Y, Wang PC, Qiu Y, Sun B, Xing G, Dong J, Liang XJ, Chen C (2009) The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials* 30: 611-621
50. Wharton T, Wilson LJ (2002) Highly-iodinated fullerene as a contrast agent for X-ray imaging. *Bioorg Med Chem* 10: 3545-3554
51. Hirsch AE, Rosenstein BS, Medich DC, Martel CB, Hirsch JA (2009) Polymethylmethacrylate and radioisotopes in vertebral augmentation: an explanation of underlying principles. *Pain Physician* 12: 887-891
52. Cagle DW, Kennel SJ, Mirzadeh S, Alford JM, Wilson LJ (1999) In vivo studies of fullerene-based materials using endohedral metallofullerene radiotracers. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5182-5187
53. Qingnuan L, yan X, Xiaodong Z, Ruili L, qieqie D, Xiaoguang S, Shaoliang C, Wenxin L (2002) Preparation of $(^{99m}\text{Tc}-\text{C}(60)(\text{OH})_x)$ and its biodistribution studies. *Nucl Med Biol* 29: 707-710

Fullerenes in radiobiology

Jacek Grębowski, Anita Krokosz

Division of Radiobiology, Department of Molecular Biophysics, University of Lodz, 12/16 Banacha Str., 90-237 Lodz, Poland

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

Key words: fullerenes, antioxidants, ionizing radiation, radioprotection, radiosensitizers, diagnostic imaging

ABSTRACT

Molecule of fullerene, having a spherical or ellipsoidal shape, is made of rings consisting of five or six carbon atoms, combined with conjugated π bonds. Delocalization of π electrons in the molecule of fullerene makes it easy to scavenge free radicals. But, despite being the effective antioxidants and radical scavengers fullerenes may be prooxidants by reactive oxygen species generation. Mammalian cells consist mainly of water (about 70%). Thus, the radical and non-radical products of water radiolysis are the basic sources of radiation damage to biomolecules. Reactive oxygen species, such as hydroxyl (HO^\cdot) and superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) radicals and hydrogen peroxide (H_2O_2), are responsible for radiation-induced damage in aerated systems. Free radical mechanism of radiation damage suggests that scavengers of free radicals should protect cellular structures against damage. Electron donor compounds should also exhibit protective properties towards oxidized functional groups by reducing them. However, the electron transfer from fullerene to oxygen may generate superoxide radical. The shape of fullerenes allows them to act as carriers of radioactive atoms of isotopes used in the therapy and medical diagnostics. Fullerenes and their derivatives due to its properties are new promising chemicals for application in radiobiology. Fullerenes may be radioprotectors, radiosensitizer or auxiliary compounds in diagnostic imaging. What they are depends on the experimental system used.

Wydajna ekstrakcja białek transbłonowych z zastosowaniem zestawu *ProteoExtract® Transmembrane Protein Extraction Kit*

STRESZCZENIE

Do solubilizacji białek błonowych, niezbędnej między innymi w procedurze ich oczyszczania, stosowane są najczęściej jonowe lub niejonowe detergenty. Zastosowanie detergentów może jednak niekorzystnie wpływać na strukturę białek, co uniemożliwia ich dalsze badania funkcjonalne. Ponadto, detergenty są często mało skuteczne, szczególnie do wydajnej solubilizacji białek zawierających powtarzające się domeny transbłonowe. Najnowszy zestaw *ProteoExtract® Transmembrane Protein Extraction Kit (TM-PEK)*, oferowany przez firmę Merck, zawiera w swoim składzie odczynniki pozbawione detergentów. Zapewnia to łagodną i wydajną ekstrakcję białek zawierających nawet siedem domen transbłonowych, takich jak receptory sprzężone z białkami G (GPCR), np. białka Frizzled-4 i CELSR-3 z linii komórek ssaków. Wyzolowane z zastosowaniem zestawu TM-PEK frakcje wzbogacone w białka transbłonowe, mogą być używane w testach enzymatycznych. Ich charakterystykę można prowadzić z zastosowaniem natywnej elektroforezy żelowej, 1- i 2-D elektroforezy w żelach poliakrylamidowych w obecności siarczanu dodecylu (SDS-PAGE), spektrometrii mas, metody Western blotting, immunoprecypitacji i ELISA. W porównaniu z innymi metodami, ekstrakcja białek z zastosowaniem zestawu TM-PEK nie wymaga sonikacji, długiego wytrząsania, ultrawierowania i inkubacji próbek w wyższych temperaturach.

WPROWADZENIE

W zależności od sposobu oddziaływania z błoną, białka błonowe dzieli się na białka integralne i powierzchniowe. Białka integralne, które przechodzą przez dwuwarstwę lipidową błony, należą do grupy białek transbłonowych [1]. Białka transbłonowe z kolei, można podzielić na białka jednokrotnie (białka monotopowe) lub wielokrotnie (białka politopowe) przechodzące przez błonę.

Białka błonowe odgrywają ogromną rolę w komórce. Są podstawowym elementem budulcowym większości receptorów znajdujących się na powierzchni komórek i biorą udział w patogenezie wielu chorób. Białka transbłonowe są potencjalnym celem poszukiwania nowych terapeutyków, dlatego też znajdują się w centrum zainteresowania wielu firm farmaceutycznych, zajmujących się projektowaniem leków. Corocznie na rynku farmaceutycznym pojawia się od kilkunastu do kilkudziesięciu nowych środków leczniczych. Szereg z nich „skierowanych” jest przeciwko białkom transbłonowym [2].

Analiza proteomiczna białek błonowych jest obiecującym narzędziem pozwalającym na identyfikację celów dla nowych leków, a także biomarkerów chorób. Niestety, pomimo ogromnego postępu technologicznego, istnieją duże problemy z ekstrakcją i rozpuszczalnością białek błonowych. Ograniczona dostępność skutecznych technik przygotowania próbek białek błonowych do dalszych aplikacji, opóźnia dodatkowo tempo badań proteomicznych.

Białka transbłonowe są zakotwiczone w błonie, głównie przez hydrofobowe reszty aminokwasowe białka zlokalizowane w hydrofobowym rejonie błony; białka te są nierozpuszczalne w wodzie. Nie można ich zatem łatwo wyizolować z błony, na przykład z wykorzystaniem roztworów soli. W celu solubilizacji tych białek należy stosować np. detergenty lub inne związki powierzchniowo czynne, które poprawiają rozpuszczalność białek [1]. Niestety zastosowanie detergentów może niekorzystnie wpływać na strukturę białek, co uniemożliwia ich dalsze badania funkcjonalne.

Do rozpuszczania białek błonowych stosowane są najczęściej detergenty jonowe (np. SDS) lub niejonowe (np. serii Triton®-X). W obecności SDS większość białek ulega denaturacji, co uniemożliwia zastosowanie tak przygotowanych próbek do dalszych analiz, np. do badań funkcjonalnych. Natomiast niejonowe detergenty są łagodniejsze, ale często mniej skuteczne. W związku z tym nie nadają się do wydajnej solubilizacji białek, szczególnie białek wielokrotnie przechodzących przez dwuwarstwę lipidową błony.

Karina Błachnio

Merck Sp. z o.o., Warszawa

[✉]Merck Sp. z o.o., Al. Jerozolimskie 178, 02-486 Warszawa; www.merck-chemicals.pl, tel.: (22) 535 97 00, e-mail: karina.blachnio@merck.pl

Słowa kluczowe: białka transbłonowe, ekstrakcja białek, proteomika, spektrometria mas, GPCR

Wykaz skrótów: 7-TM – siedem domen transbłonowych; GPCR – receptory sprzężone z białkami G; IEF – ogniskowanie izoelektryczne; SDS-PAGE – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS; TM-PEK – *ProteoExtract® Transmembrane Protein Extraction Kit*

W ofercie firmy Merck dostępny jest zestaw o nazwie ProteoExtract® Transmembrane Protein Extraction Kit (TM-PEK, nr katalogowy 71772-3), umożliwiający ekstrakcję białek błonowych z zachowaniem ich natywnej konformacji; zestaw ten zapewnia wysoką wydajność oraz czystość frakcji białkowych [3]. Jest on pozbawiony detergentów, co zapewnia łagodną ekstrakcję powierzchniowych i integralnych białek z komórek i tkanek ssaków [4]. Zestaw ten umożliwia izolację małych białek oraz dużych kompleksów białkowych, zbudowanych z białek zawierających od jednej do kilku domen transbłonowych np. białek GPCR (receptory sprzężone z białkami G), posiadających siedem domen transbłonowych.

Procedura ekstrakcji białek z wykorzystaniem zestawu TM-PEK jest dwuetapowa. Etap pierwszy obejmuje zawieszanie komórek lub homogenizowanych tkanek w buforze do ekstrakcji 1; po 10 min inkubacji próbki należy odwirować. Podczas wirowania oddzielana jest frakcja rozpuszczalna (cytoplazmatyczna) od nierozpuszczalnej, zawierającej białka błonowe. Etap drugi obejmuje ekstrakcję białek transbłonowych z dwuwarstwy lipidowej, poprzez zastosowanie jednego z dwóch dostępnych w zestawie buforów do ekstrakcji: 2A lub 2B. Bufory do ekstrakcji 2A i 2B są przygotowywane poprzez rozcieńczenie odczynników odpowiednio TM-PEK A lub TM-PEK B [4]. Charakterystyka poszukiwanego białka dyktuje wybór odpowiedniego buforu do ekstrakcji. Bufor optymalny dla poszukiwanego białka powinien zostać określony doświadczalnie. Bufor do ekstrakcji 2A pozwala w bardzo łagodnych warunkach odzyskać niestabilne kompleksy białek. Dla porównania, bufor do ekstrakcji 2B jest wydajnym odczynnikiem, który ułatwia odzysk trudnych do ekstrakcji białek, zawierających wielokrotne domeny transbłonowe. Do zestawu dołączana jest dodatkowo mieszanka inhibitorów proteaz, przeciwdziałająca degradacji oczyszczanych próbek. [4].

Odczynniki dostarczane w zestawie TM-PEK nadają się do większości metod analizy białek używanych rutynowo w laboratoriach np. 1-D i 2-D elektroforezie w warunkach natywnych lub w obecności SDS, w badaniach

aktywności enzymatycznych, w testach immunologicznych, ELISA, w technice Western blotting i immunoprecypitacji. Próbkę białek wyizolowane z jedno- i dwukierunkowych żeli poliakrylamidowych można analizować dalej, po wcześniejszym trawieniu otrzymanych białek z zastosowaniem trypsyny, z użyciem spektrometrii mas.

WYNIKI I ICH DYSKUSJA

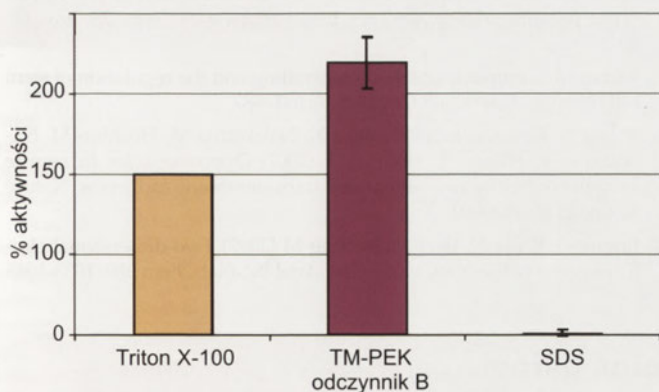
EKSTRAKCYJA BIAŁEK ZAWIERAJĄCYCH 7 DOMEN TRANSBŁONOWYCH

W celu zbadania skuteczności ekstrakcji białek błonowych z użyciem zestawu ProteoExtract® Transmembrane Protein Extraction Kit i metody Western blott wykonano analizę porównawczą ekstrakcji dwóch typów białek błonowych zawierających po 7 domen transbłonowych (7-TM), CELSR-3 (ang. *cadherin-EGF-lag seven-pass receptor-3*) i Frizzled-4. Wydajność ekstrakcji wymienionych białek porównywano z receptorem EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) zawierającym pojedynczą domenę transbłonową (1-TM) (Ryc. 1) [4]. Białka Frizzled-4 i CELSR-3 są kluczowymi elementami szlaku przekazywania sygnału WNT/PCP (ang. *planar cell polarity*). Białka z rodziny Frizzled pełnią rolę receptorów dla wydzielanych poza komórkę i oddziałujących z glikozaminoglikanami macierzy pozakomórkowej białek Wnt o strukturze zachowanej w ewolucji [5,6]. Białka Frizzled oddziałują z białkami Wnt dzięki obecności domeny zewnątrzkomórkowej, bogatej w reszty cysteiny [7,8]. Białko CELSR-3 bierze natomiast udział w regulacji wzrostu aksonów [9]. Niewielka liczba danych biochemicznych dotyczących CELSR-3 jest spowodowana dużymi trudnościami związanymi z uzyskaniem białka o pełnej długości.

Na rycinie 1 pokazano wydajność ekstrakcji białek Frizzled-4, CELSR-3 i EGFR z wykorzystaniem detergentu Triton X-100 i odczynnika TM-PEK A, w porównaniu do próbek wyizolowanych z wykorzystaniem SDS. Próbkę z SDS posłużyły jako kontrola składu lizatu komórkowego [4]. Doświadczenie to wykazało, że zarówno Triton X-100, jak i odczynnik TM-PEK A charakteryzują się porównywalną wydajnością ekstrakcji białka EGFR, za-



Rycina 1. Ekstrakcja białek transbłonowych z komórek raka piersi linii MDA-MB-468 [4]. Białka zawierające jedną (1-TM) lub siedem (7-TM) domen transbłonowych były ekstrahowane z linii MDA-MB 468 z zastosowaniem procedury do zestawu TM-PEK, opisanej w protokole o numerze TB477. Dwie identyczne próbki komórek 1×10^7 zostały zawieszony w buforze do ekstrakcji nr 1 (TM-PEK 1), dzięki czemu we wstępnym etapie otrzymano białka rozpuszczalne. Nierozpuszczalny materiał (frakcja błonowa) został następnie zawieszony w buforze nr 2A (TM-PEK 2A) lub w 0,5% detergentu Triton X-100. Próbkę z każdej frakcji rozdzielano w 10% żelu poliakrylamidowym w obecności SDS. Detekcja białek została wykonana z zastosowaniem metody Western blotting z użyciem I-rzędowych przeciwciał skierowanych przeciwko białkom EGFR (A), Frizzled-4 (B) i CELSR-3 (C) oraz przeciwciał II-rzędowych sprzężonych z HRP. Detekcję wykonano z zastosowaniem substratu chemiluminescencyjnego; 1 – kontrola pozytywna w 0,5% SDS (lizaty całych komórek); 2 – frakcja cytoplazmatyczna (TM-PEK 1); 3, 4 – frakcje błonowe otrzymane z użyciem detergentu Triton X-100 (3) i buforu TM-PEK 2A (4). Strzałki wskazują pozycję białek o pełnej długości.



Rycina 2. Pomiar aktywności enzymatycznej alkalicznej fosfatazy we frakcji błonowej otrzymanej z użyciem detergentu Triton X-100, odczynnika TM-PEK B lub SDS [7]. Aktywność enzymatyczną oznaczono w obecności *p*-nitrofenylofosforanu jako substratu. Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali 405 nm, w buforze o następującym składzie: 0,1 M glicyna, pH 10,4, 1 mM MgCl₂ i 1mM ZnCl₂. Pomary wykonano w czterech powtórzeniach (na wykresie przedstawiono odchylenie standardowe). Dane zostały ujednolicone wobec próbek zawierających detergent Triton X-100.

wierającego pojedynczą domenę transbłonową (Ryc. 1A). W przypadku ekstrakcji białka Frizzled-4, zawierającego 7-TM, Triton X-100 okazał się mało wydajny w porównaniu z odczynnikami TM-PEK A (Ryc. 1B). Wyniki otrzymane dla białka CELSR-3 (7-TM) wykazały, że wyraźny sygnał odpowiadający białku CELSR-3 o pełnej długości (358 kDa), obserwowany był jedynie w ścieżce numer 4. Ścieżka ta odpowiadała próbce ekstrahowanej z użyciem odczynnika TM-PEK A. Wyniki te świadczą o tym, że detergenty Triton X-100 i SDS pozwalają na ekstrakcję jedynie fragmentów białka CELSR-3 (Ryc. 1C) [7].

EKSTRAKCJA AKTYWNYCH BIAŁEK BŁONOWYCH

Aktywność enzymatyczną alkalicznej fosfatazy, zakotwiczonej w błonie komórkowej za pomocą kotwicy glikozylfosfatydyloinozytolowej (GPI, ang. *glycosylphosphatidylinositol-anchored*), badano z użyciem *p*-nitrofenylofosforanu jako substratu. Otrzymane wyniki pokazują, że próbki zawierające białka przygotowane z zastosowaniem odczynnika TM-PEK B, charakteryzują się o 70% wyższą aktywność niż te, przygotowane z zastosowaniem detergentu Triton X-100 (Ryc. 2) [7].

WYDAJNA EKSTRAKCJA FRAKCJI BIAŁEK BŁONOWYCH DO ZASTOSOWANIA W PROTEOMICIE

Ekstrakcja frakcji białek błonowych do zastosowania w proteomicie stanowi pierwszy krok na drodze ku identyfikacji nowych biomarkerów biorących udział w przekazywaniu sygnału w komórce. Przygotowanie próbek i rozdział białek błonowych stanowią obecnie duże wyzwanie dla naukowców. Najczęściej używaną metodą rozdziału białek, przed spektrometrią mas, jest dwukierunkowa elektroforeza w żelach poliakrylamidowych. Niestety tradycyjna elektroforeza 2-D PAGE, łącząca w sobie dwie techniki, ogniskowanie izoelektryczne i elektroforezę SDS-PAGE, obarczona jest błędem systematycznym w przypadku rozdziału białek błonowych. Białka transbłonowe posiadają hydrofobowe rejony, które są niezwykle skłonne do agregacji w trakcie ogniskowania izo-



Rycina 3. Porównanie ekstrakcji białek z komórek linii A431 z użyciem detergentu Triton X-100 (kolor purpurowy) i odczynnika TM-PEK B (kolor zielony) [7]. Użyto 200 µg białka całkowitego na próbkę. Kolor czarny wskazuje próbki pokrywające się. Warunki rozdzielania białek z użyciem elektroforezy dwukierunkowej: ogniskowanie izoelektryczne (pierwszy kierunek), pH 3-10 (od lewej do prawej); drugi kierunek 4-15% Tris-HCl SDS-PAGE.

elektrycznego (IEF) i podczas późniejszego rozdzielania na SDS-PAGE [10]. Jak pokazano na rycinie 3, próbki białek ekstrahowane z linii komórkowej A431 z użyciem zestawu TM-PEK, wykazują różny wzór rozdziału prążków w 2-D PAGE, w porównaniu z próbkami przygotowanych z zastosowaniem detergentu Triton X-100. Licniejsza reprezentacja podstawowych białek (prawa strona żelu) obserwowana była w próbkach przygotowanych z użyciem zestawu TM-PEK [7].

PODSUMOWANIE

Zestaw ProteoExtract® Transmembrane Protein Extraction Kit oferowany przez firmę Merck umożliwia wydajną ekstrakcję białek transbłonowych. Łagodna metoda ekstrakcji z użyciem odczynników pozbawionych detergentów umożliwia zastosowanie tego zestawu w badaniach proteomicznych. Procedura stosowana do oczyszczania z użyciem zestawu TM-PEK pozwala na wzbogacenie próbki w integralne i związane z błonami białka, zapewnia powtarzalność wyników doświadczeń, jak również lepsze dostosowanie otrzymanych próbek do dalszych badań. W porównaniu z innymi metodami, procedura z użyciem zestawu TM-PEK nie wymaga sonikacji, długiego wytrząsania, ultrawierowania i inkubacji próbek w wyższych temperaturach. Dlatego też minimalizuje ryzyko degradacji lub uszkodzenia białek w trakcie i po ekstrakcji z błony.

PIŚMIENNICTWO

1. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2009) Biochemia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.

- Landry Y, Gies JP (2008) Drugs and their molecular targets: An updated overview. *Fund Clin Pharmacol* 22:1-18
- Protein Sample Preparation Tools for Signal Transduction Research & Proteomics Brochure, Calbiochem® & Novagen® Merck
- www.merck-chemicals.com TB477, user protocol for product cat. No. 71772
- Huang HC, Klein PS (2004) The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol* 5: 234.1-234.7
- Planutis K, Planutiene M, Moyer MP, Nguyen AV, Pérez CA, Holcombe RF (2007) Regulation of norrin receptor Frizzled-4 by Wnt2 in colon-derived cells. *BMC Cell Biol* 8: 12
- Michelson U, von Hagen J (2008) Efficient extraction of transmembrane proteins. *Merck Novagen InNovations Newsletter* 28, July: 18-20
- Kleber M, Sommer L (2004) Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr Opin Cell Biol* 16: 681-687
- Shima Y, Kawaguchi SY, Kosaka K, Nakayama M, Hoshino M, Nabeshima Y, Hirano T, Uemura T (2007) Opposing roles in neurite growth control by two seven-pass transmembrane cadherins. *Nature Neurosci* 10: 963-969
- Braun RJ, Kinkl N, Beer M, Ueffing M (2007) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal Bioanal Chem* 389: 1033-1045

Efficient extraction of transmembrane proteins using ProteoExtract® Transmembrane Protein Extraction Kit

Karina Błachnio

Merck Sp. z o.o., Al. Jerozolimskie 178, 02-486 Warszawa, Poland; www.merck-chemicals.pl

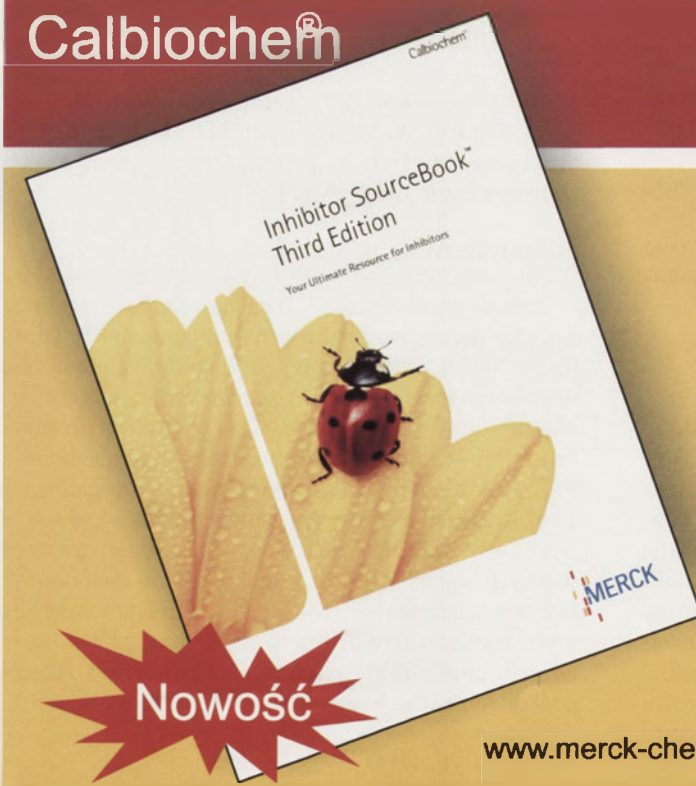
e-mail: karina.blachnio@merck.pl

Key words: transmembrane proteins, protein extraction, proteomic, mass spectrometry, GPCR

ABSTRACT

Detergents commonly used for solubilization of membrane proteins may be ionic or non-ionic. Exposing membrane proteins to detergents, however, can adversely affect their native structure, which can be a major hindrance for functional studies. This is especially true for proteins with multiple transmembrane domains. The ProteoExtract® Transmembrane Protein Extraction Kit (TM-PEK), offered by Merck, provides a detergent-free novel reagents to enable the mild and efficient extraction of proteins containing seven transmembrane domains, such as GPCRs (G-Protein Coupled Receptors) e.g.: Frizzled-4 and CELSR-3, from mammalian cells. The fraction enriched in transmembrane proteins using TM-PEK is directly compatible with enzyme assays, non-denaturing gel electrophoresis, 1- and 2-D SDS-PAGE, MS analysis, Western blotting, immunoprecipitation and ELISA. Unlike many alternatives, TM-PEK extraction procedure does not require sonication, extended rigorous vortexing, ultracentrifugation, or incubation of samples at elevated temperatures – thus minimizing the risk of post-extraction degradation or modifications.

Calbiochem®



Inhibitor SourceBook™
Third Edition

Your Ultimate Resource for Inhibitors

Protein
Phosphorylation/Dephosphorylation
Cell Cycle/Cell Division
DNA Damage/Repair
Lipid Signaling
Apoptosis/Necrosis
Neurobiology/Neurodegeneration
Nitric Oxide/Oxidative Stress
Proteases
ATPase/GTPase
NF-κB Activation
Stem Cell Biology
Angiogenesis
Other Inhibitors of Biological Interest

www.merck-chemicals.pl

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 wydrukowana 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 odautorskich, 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 „Postępow Biochemii”, w którym ukazał się jego artykuł.

WSKAZÓWKI SZCZEGÓŁOWE:

Przed przystąpieniem do napisania artykułu Autorzy są proszeni o zapoznanie się z najnowszym numerem „Postępow 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 składni 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 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:

1. Jiang QX, Wang ON, MacKinnon R (2004) Electron microscopic analysis of KvAP voltage-dependent K⁺ channels in an open conformation. *Nature* 430: 806-810
2. Toyoshima C, Inesi G (2004) Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73: 269-292
3. Dołowy K, Szewczyk A, Pikuła S (2003) *Blony biologiczne*, Wydawnictwo Naukowe Śląsk, Katowice, Warszawa
4. 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
5. 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).

PRZESYLANIE PRAC:

Prace w formie elektronicznej prosimy przysyłać na adres: postepy@nencki.gov.pl

W przypadkach uzasadnionych, np. brakiem odpowiedniego oprogramowania, prosimy o przysłanie pracy na dyskietce lub płycie CD; zabezpieczonej przed uszkodzeniem w czasie transportu, na adres:

Sławomir Pikuła, 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. Opłata za wydrukowanie jednej strony artykułu wynosi 150 zł. Szczegółowe informacje zamieściliśmy pod adresem:

www.postepybiochemii.pl/oplaty.htm

KOREKTA:

Powinna być wykonana na pliku pdf przesłanym przez redakcję, w formie komentarzy lub skreśleń, w programie Adobe Reader V. 8 lub nowsza (program bezpłatny, <http://get.adobe.com/reader/>).

Korekta obejmuje błędy: literówki, znaki interpunkcyjne oraz błędy zawinione przez redakcję, pozostałe zmiany są objęte dodatkem 10% do opłaty za druk.



52nd ICBL Expanding the Horizons of Lipidomics

30th August - 3rd September 2011
Warsaw, Poland



Oral sessions:

Lipids in molecular medicine
Lipids in regulation of gene expression
Lipids in signaling and intracellular trafficking
Membrane microdomains, lipid binding proteins and membrane repair
Lipid modifications of macromolecules
Isoprenoid lipids
Lipid - protein interactions

Invited speakers:

Peter J. Quinn, London
James Ntambi, Wisconsin-Madison
Jean E. Vance, Edmonton
Thomas W. Gettys, Baton Rouge
Christian Wolfrum, Zürich
Jan Kopecky, Prague
Frank J. Gonzalez FJ, Bethesda
Elina Ikonen, Helsinki
Shun-ichi Nakamura, Kobe
Laszlo Vigh, Szeged
Volker Gerke, Muenster

Annette Draeger, Bern
Li Peng, Beijing
Jun-ichi Inokuchi, Sendai
Kirill Alexandrov, Dortmund
Lawrence Marnett, Nashville
Michel Rohmer, Strasbourg
Po Huang Liang, Taipei
Gustav Dallner, Stockholm
Gerrit van Meer, Utrecht
Jennifer Lippincott-Schwartz, Bethesda

Registration

Early registration till April 30, 2011

Late registration from May 01, 2011

Abstracts:

Submission deadline May 01, 2011

<http://www.icbl-2011.org>
<http://rcin.org.pl>



INSTITUTE
OF BIOCHEMISTRY
AND BIOPHYSICS
POLISH ACADEMY
OF SCIENCES



nencki institute
of experimental biology

NEW

TurboFect™ siRNA Transfection Reagent

Highly efficient silencing at low siRNA concentrations



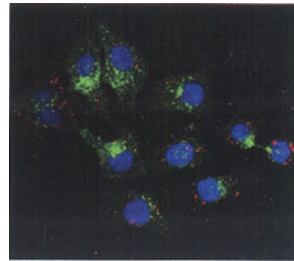
All the advantages at a glance

- **Highly efficient** siRNA transfection.
- **Low siRNA concentrations** for gene silencing.
- **Transfection of a wide variety of cell types.**
- **Compatible with serum and antibiotics.**

Applications

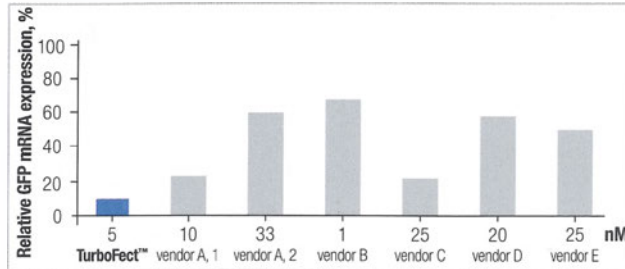
- siRNA transfection.
- siRNA-DNA co-transfection.

Efficient siRNA transfection



Red – Cy3-labeled siRNA
Blue – DAPI stained nuclei
Green – endosomes labeled with anti-Transferrin receptor antibodies

Efficient gene silencing using GFP specific siRNA



Inhibition of GFP expression in cells transfected with GFP-targeting siRNA. siRNA concentrations recommended by each manufacturer were used.

Product	Cat. #	Size
TurboFect™ siRNA Transfection Reagent	R1401	0.5 ml

NEW

TurboFect™ Protein Transfection Reagent

Highly efficient delivery of functionally active proteins



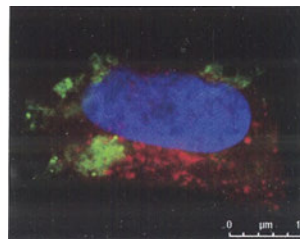
All the advantages at a glance

- **High transfection efficiency** of a wide variety of cell types.
- **Delivers functionally active proteins.**
- **Delivers more protein molecules per cell than other reagents.**

Application

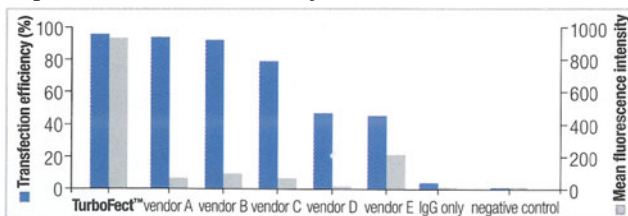
- Delivery of proteins, antibodies and peptides.

Transfected goat IgG is localized in HeLa cell



Green – Alexa Fluor 488-labeled goat IgG
Blue – DAPI stained nucleus
Red – endosomes labeled with PE conjugated mouse anti-Transferrin receptor antibodies

High transfection efficiency



Comparison of Fermentas reagent with transfection reagents from other vendors. HeLa cells were transfected with Alexa Fluor 488-labeled goat IgG.

Product	Cat. #	Size
TurboFect™ Protein Transfection Reagent (supplied with Enhancer Solution and control protein)	K1411	125 µl



abo Grażyna Tarnowska Boreysza
 ul. Podleśna 6a, 80-255 Gdańsk
 Biuro: ul. Wichrowe Wzgórze 123, 80-293 Gdańsk
 tel.: (58) 341 21 43; fax: (58) 520 33 80
 e-mail: abo@abo.com.pl; www.abo.com.pl



Fermentas
 Part of Thermo Fisher Scientific

RapidStep™ ECL Reagent

Gotowy do użycia substrat chemiluminescencyjny, przeznaczony do detekcji peroksydazy chrzanowej (HRP) z zastosowaniem metody immunoblottingu.

Cechy:

- **Wygoda:**
Dostarczany w butelce z dozownikiem w sprayu,
Wystarczy tylko rozpylić na membranę,
Nie wymaga mieszania ze sobą luminolu oraz roztworu wzmacniacza chemiluminescencji.
- **Wysoka czułość:**
Wykrywa nawet 20 pg białka.
- **Długotrwałość:**
Emisja światła wykrywana do 2 godzin po dodaniu substratu.
- **Uniwersalność:**
Używany z membranami nitrocelulozowymi lub PVDF.

www.merck4biosciences.com

